

Guilherme Benedini Damian

**"Caracterização molecular de pacientes com suspeita de
doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico
diferencial entre casos de hemofilia A"**

**Campinas
Unicamp
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Guilherme Benedini Damian

**"Caracterização molecular de pacientes com suspeita de
doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico
diferencial entre casos de hemofilia A"**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós Graduação em Clínica
Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica.

Orientadora: Dra. Margareth Castro Ozelo

Campinas

2010

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

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

D184c Damian, Guilherme Benedini
 “Caracterização molecular de pacientes com suspeita de doença de
 von Willebrand tipo 2N e diagnóstico diferencial entre casos de
 hemofilia A / Guilherme Benedini Damian. Campinas, SP : [s.n.],
 2010.

Orientador : Margareth Castro Ozelo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemifilia A. 2. Fator VIII. 3. Von Willebrand, fator de. I.
Ozelo, Margareth Castro. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Molecular assessment of suspect patients of type 2N Von Willebrand disease and differential diagnostic between hemophilia A cases

Keywords: • Hemophilia A
 • Factor VIII
 • Von Willebrand, factor

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Margareth Castro Ozelo
Profa. Dra. Andréa Aparecida Garcia
Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Data da defesa: 26-02-2010

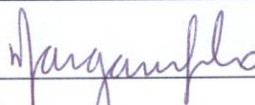
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Guilherme Benedini Damian

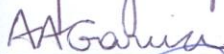
Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Castro Ozelo

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Margareth Castro Ozelo



2. Prof^a. Dr^a. Andréa Aparecida Garcia



3. Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula



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

Data: 26/02/2010

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu pai, Julio Cesar De Gasperi Damian, a minha mãe Esilia Benedini Damian, e aos meus irmãos, Valéria Benedini Damian e Eduardo Benedini Damian. Por todo o apoio a mim prestado durante todos esses anos em que estive comprometido com este projeto.

O reflexo de minha personalidade pessoal e profissional se deve aos grandes líderes que tive o privilégio de ser criado, sempre tendo em mente força, perseverança, objetivos, garra e determinação. Características fundamentais para desenvolver esse e os demais projetos da minha vida.

“Observa o teu culto a família e cumpre teus deveres para com teu pai, tua mãe, e todos teus parentes. Educa as crianças e não precisarás castigar os homens”

Pitágoras

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que nos inspira a sermos pessoas melhores, e quem nos oferece conforto nas horas mais agonizantes.

Também agradeço a todos meus queridos amigos, Enrico Iunes Centola, Alex Alves Ferreira, Felipe Lóis Afinni, André Nichan De Andrade Barganian, Milton Lobo Natali, Luciana Emer Borges, Marina Ivaldi, Bruna Olini, Graziela D`agosto, Isabela Basso, Paulo Mendes, Humberto Macedo Da Costa, José Luis Carballo, Bianca Ragazzi Sodré, Marina Lucas, Daniela Menezes, Luane Oliveira, Marcela dos Reis, Lívia Maringolo, Thais Galvani, Luana Dal Bo, Christina Crawford, Flavio Da Costa Lima Centola, Lais Cruz, Manoel Barros Cruz, André Ferrisi Engracia, Anderson Ferreira, Cintia Castilho, Letícia Yoshida, Mariana Stirlie, Kim Lewis, Diana Bonnemassou, Denise Lima, Tay e Helo Chiavenato pelo apoio incondicional. POIS SEM VOCES A VIDA NÃO TERIA GRACA !

Um agradecimento especial para o pessoal do laboratório de biologia molecular em hemostasia, Ucha, que sempre esteve presente para me ajudar, Vagner, Aline, Cristina, Deva, Barba, Mari, Josie, Carol, Carlinha, Silmara, que me ajudou em muito no desenvolvimento do teste de ligação, Tânia, Suzan, Ricardo e especialmente Andrey, pelo vínculo forte, rápido e duradouro, que muito me ajudou e com certeza continuara me ajudando. Agradeço a Denise e Dulcineia, pela ajuda prestada no uso do equipamento Mega Base.

Aos Doutores: Aranha, Joyce, Erich, e a Dra Margareth pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho que muito me agregou.

“A amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pesar o que pensa, nem medir o que se diz”

George Eliot

Lista de Abreviaturas

A (Ala)	Alanina
ADP	adenosina difosfato
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
DDAVP	desmopressina
DEPC	dietilpirocarbonato (para tratamento água livre de RNA)
DVW	doença de von Willebrand
E (Glu)	ácido glutâmico (Glu)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
F8	gene do FVIII
FVIII	fator VIII da coagulação
FVIII:C	atividade coagulante do fator VIII
FIX:C	atividade coagulante do fator IX
FVW	fator de von Willebrand
FVW:Ag	antígeno de von Willebrand
FVW:RCof	atividade cofatora da ristocetina
FVW:CBA	ligação do colágeno ao FVW
FVW:FVIII B	teste de ligação FVW ao FVIII
gDNA	ácido desoxirribonucleico genômico
GP	glicoproteína
GS	grupo sanguíneo
H (His)	histidina
K (Lys)	lisina
M (Met)	metionina
μL	microlitro
mM	milimolar
mg/mL	miligrama por mililitro
M	molar
N	normal (normalidade ou gramas de íon/litro de solução)
ND	não disponível
nm	nanômetro (unidade de comprimento de onda)

OPD	ortofenilenodiamina
P (Pro)	prolina
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
pré-pró-FVW	pré-pró-fator de von Willebrand
PRP	plasma rico em plaquetas
Q (Gln)	glutamina
R (Arg)	arginina
RIPA	agregação plaquetária induzida pela ristocetina (<i>ristocetin-induced platelet aggregation</i>)
rFVIII	concentrado de fator VIII recombinante
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativada
TS	tempo de sangramento
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
V (Val)	Valina
VR	valor de referência (normalidade)
W (Trp)	triptofano

Tabelas

Tabela 1. Classificação da DVW conforme Sadler (1994) e revisada em 2006.....	29
Tabela 2. Mutações identificadas relacionadas à DVW tipo 2N.....	32
Tabela 3. Descrição das quatro mutações do gene do FVW relacionadas à DVW tipo 2N mais freqüentes.....	47
Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise dos éxons 18 a 25 do gene do FVW.....	49
Tabela 5. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do cDNA da região correspondente aos éxons 16 a 28 do gene do FVW.....	52
Tabela 6. Relação de oligonucleotídeos para seqüenciamento do gene do fator VIII (<i>F8</i>).....	53
Tabela 7. Dados clínicos e laboratoriais dos casos com suspeita diagnóstica de DVW tipo 2N.....	58

Figuras

Figura 1. Representação do gene e estrutura do FVW humano.....	24
Figura 2. Estratégia para investigação molecular dos casos com suspeita clínica e laboratorial de DVW tipo 2N.....	45
Figura 3. Curva de calibração do teste de ligação FVW:FVIII B.....	56

Figura 4. Curva de calibração para quantificação do FVW:Ag.....	57
Figura 5. Curva controle do FVIII recombinante.....	57
Figura 6. Curva do teste de ligação FVW:FVIII B.....	57
Figura 7. Caso 1. Heredograma.....	60
Figura 8. Caso 1. Teste de ligação FVW:FVIII B.....	60
Figura 9. Caso 1. Avaliação molecular da paciente T.G.....	42
Figura 10. Caso 2. Heredograma.....	61
Figura 11. Caso 4. Heredograma.....	65
Figura 12. Caso 5. Heredograma.....	66
Figura 13. Caso 7. Heredograma.....	68
Figura 14. Caso 7. Avaliação molecular do gene do FVIII da paciente M.V.T....	69

Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
I. Introdução.....	20
1.1. Hemostasia.....	22
1.2. Fator de Von Willebrand.....	26
1.3. Doença de von Willebrand.....	26
1.3.1. Histórico sobre Doença de von Willebrand.....	26
1.3.2. Doença de von Willebrand: epidemiologia e quadro clínico.....	28
1.3.3. Doença de von Willebrand tipo 2N.....	31
1.3.3.1. Mutações relacionadas à DVW tipo 2N.....	33
1.3.3.2. Diagnóstico diferencial entre DVW tipo 2N e hemofilia A.....	33
II. Objetivo.....	34
III. Justificativa.....	36
IV. Casuística.....	38
V. Metodologia.....	41
5.1. Teste de ligação do FVW ao FVIII (FVW:FVIIIIB).....	42
5.1.1. Preparação da placa com anticorpo de captura (1º dia).....	42
5.1.2. Imobilização do FVW:Ag e do FVIII exógeno (2º dia).....	43

5.1.3. Remoção do FVIII endógeno e substituição pelo FVIII exógeno (3º dia).....	44
5.1.4. Detecção do FVW:Ag e FVIII (3º dia).....	44
5.2. Análise Molecular.....	45
5.2.1. Extração do DNA genômico.....	46
5.2.2. Avaliação das quatro mutações no gene do FVW mais freqüentes entre os casos de DVW tipo 2N.....	47
5.2.3. Avaliação das seqüências nucleotídeas dos éxons 18 a 27 do gene do FVW.....	48
5.2.4. Análise do DNA codificante (cDNA) da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.....	49
5.2.4.1. Extração do RNA mensageiro (RNAm) de plaquetas.....	51
5.2.4.2. Síntese do cDNA da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.....	52
5.2.4.3. Seqüenciamento do cDNA da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.....	52
5.2.5. Análise do molecular do gene do FVIII (<i>F8</i>) nos casos inconclusivos para mutação associada à DVW 2N.....	53
VI. Resultados.....	55
6.1. Análise dos resultados do teste de ligação FVW:FVIII B.....	56
6.2. Descrição dos casos clínicos.....	60

6.2.1. Casos 1: T.G.....	60
6.2.2. Casos 2: V.M.M.....	63
6.2.3. Casos 3: D.E.O.M.....	65
6.2.4. Casos 4: L.F.D.O.....	66
6.2.5. Casos 5: S.D.S.....	66
6.2.6. Casos 6: J.G.H.R.....	68
6.2.7. Casos 7: M.V.T.....	68
6.2.8. Casos 8: S.Z.M.....	70
6.3. Avaliação das quatro mutações relacionadas à DVW tipo 2N em casos previamente diagnosticados como hemofilia A moderada e leve.....	71
VII. Discussão.....	72
VIII. Conclusões.....	78
IX. Referências Bibliográficas.....	80
X. Anexos.....	84
Anexo 1.	
10.1.1. Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa.....	85
10.1.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
Anexo 2.	
10.2. Publicação.....	94
Anexo 3.	
10.3. Apresentações em congressos.....	95

Resumo



RESUMO

A doença de von Willebrand (DVW) é a doença hemorrágica hereditária mais freqüente. Dentre os subtipos relacionados à DVW, o tipo 2N apresenta exclusivamente diminuição da afinidade do fator de von Willebrand (FVW) ao fator VIII (FVIII). Como consequência esses pacientes apresentam redução do FVIII plasmático. Por essa razão, comumente esses casos são diagnosticados erroneamente como portadores de hemofilia A. Em um recente estudo brasileiro, foi observado que cerca de 10% dos casos de hemofílicos A leve sem antecedente familiar prévio para a doença, na verdade tratavam-se de DVW tipo 2N (SIMON & ROISENBERG, 2004). Para o diagnóstico de certeza da DVW tipo 2N, a avaliação molecular é o método mais utilizado, uma vez que os testes laboratoriais confirmatórios não apresentam boa reprodutividade.

Esse estudo tem como objetivos fazer a investigação molecular de casos previamente diagnosticados ou com suspeita de DVW tipo 2N baseados na história clínica, familiar e dados laboratoriais. Além disso, pacientes diagnosticados com hemofilia A moderada e leve, foram investigados para a presença das quatro mutações mais freqüentes relacionadas à DVW tipo 2N.

Esse estudo avaliou oito casos não relacionados de paciente com suspeita ou diagnóstico de DVW tipo 2N, acompanhados no Hemocentro da UNICAMP (Campinas, SP) e no Hemocentro do Espírito Santo (Vitória, ES). Os oito casos foram investigados para mutações presentes na região que corresponde ao local do sítio de ligação do FVIII ao FVW, localizada entre os éxons 18 a 27 do gene do FVW. Apenas um caso foi conclusivo, com a presença da mutação em

homozigose R816W no gene do FVW Essa mutação corresponde à 11% dos casos de DVW tipo 2N. Os outros sete casos foram exaustivamente investigados para mutações nessa região, incluindo o seqüenciamento do DNA genômico e codificante da região entre éxon 18 a 27 do gene do FVW e não foram conclusivos. Esses mesmos casos foram investigados através do seqüenciamento do gene do FVIII, para avaliar a presença de mutação associada à hemofilia A. Em um dos casos do sexo feminino, foi possível a identificação de uma mutação em homozigose G265 +1 G>T no íntron 3 do gene do FVIII. Trata-se de uma mutação não descrita no local de um sítio doador de *splice*.

Foram avaliados ainda 67 pacientes não relacionados com diagnóstico de hemofilia A leve ou moderada para as quatro mutações mais freqüentes relacionadas à DVW tipo 2N. Em nenhum desses casos essas mutações estavam presente, nem mesmo em heterozigose.

Em conclusão, na avaliação de oito casos não relacionados com suspeita de DVW tipo 2N, em apenas um caso esse diagnóstico foi confirmado. Em outro caso do sexo feminino foi confirmado o diagnóstico de hemofilia A grave/moderada. Ao contrário do que foi observado em outra população brasileira estuda, entre os pacientes diagnosticados com hemofilia A leve e moderada aqui estudos, as quatro mutações mais freqüentes na região do sítio de ligação do FVIII ao FVW estavam ausentes em todos os casos. O diagnóstico de certeza entre a DVW tipo 2N e hemofilia A é de extrema importância para o tratamento correto desses casos e para o aconselhamento genético. A investigação molecular continua sendo a melhor maneira para a diferenciação desses casos.

Abstract



ABSTRACT

The von Willebrand disease (VWD) is the most frequently hemorrhagic disease. Among the different types of VWD, the type 2N VWD is characterized by a markedly decreased affinity of von Willebrand factor (VWF) to factor VIII (FVIII). As consequence, the clearance of FVIII is accelerated and these patients while maintaining the concentration of VWF and its ability to normal platelet aggregation have reduced plasma FVIII. Frequently these cases are misdiagnosed as carriers of hemophilia A (HA). In a recent Brazilian study, it was observed that about 10% of cases of mild hemophilia A with no family history, it was actually type 2N VWD (SIMON & ROISENBERG, 2004).

The molecular investigation is the best method to confirm the diagnosis of type 2N VWD once the confirmatory test, VWF:FVIII binding assay (VWF:FVIII B) it is not reproducible.

This study aims investigate the molecular diagnosis of cases previously diagnosed or with suspect of type 2N VWD, based on clinical and family history, and laboratorial data. Furthermore, patients diagnosed with mild or moderate hemophilia A, were investigated for the presence of the four most frequent mutations related to type 2N VWD.

The study evaluated eight unrelated cases with suspect or diagnosis of type 2N VWD followed at Hemocentro UNICAMP (Campinas, SP) and Hemocentro do Espírito Santo (Vitória, ES). The eight cases were investigated for mutations in the region that corresponds to the location of the binding site of FVIII to VWF, located between exons 18 to 27 of the VWF gene. Only one case was conclusive, with the

presence of the R816W mutation in the VWF gene. This mutation corresponds to 11% of type 2N VWD. The other seven cases were repeatedly investigated for mutations in this region, including the sequencing of genomic DNA and the coding region of exon 18 to 27 of the VWF gene and were not conclusive. These same cases were investigated by sequencing of the FVIII gene to assess the presence of mutations associated with hemophilia A. In one female case, it was possible to determine the presence in homozygosity of a mutation G265 +1 G>T, a donor splicing region in the intron 3 of the FVIII gene. This mutation was not previously described.

In addition, we evaluated 67 unrelated patients with diagnosis of mild or moderate hemophilia A for the four most frequent mutations related to type 2N VWD. None of these cases showed the presence of these mutations, even in heterozygosity.

In conclusion, the evaluation of eight unrelated cases for type 2N VWD showed that just one case this diagnosis was confirmed. Different to what was observed in another Brazilian population studied, among mild and moderate hemophilia A followed at the Hemocentro UNICAMP, the four mutations in the binding site of FVIII to VWF were absent in all the cases. The confirmatory diagnosis between type 2N VWD and hemophilia A is extremely important for the correct treatment and the appropriate genetic counselling. The molecular investigation remains the best way to differentiate these cases.

I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

1.1. Hemostasia

A hemostasia é responsável em manter o sangue fluído sob condições fisiológicas, para responder rapidamente a lesões nos vasos sangüíneos, formando um coágulo que impede a perda de sangue até que o tecido vascular se regenere. Fazem parte desse processo: o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores de coagulação plasmáticos e diversas estruturas vasculares subendoteliais como colágeno, fibronectina, laminina, cininogênio de alto peso molecular, fator de von Willebrand e fator tecidual (BUTENAS & MANN, 2002).

A resposta do sistema hemostático a lesões vasculares inicia-se com a formação do trombo hemostático, evento que envolve componentes do endotélio vascular e plaquetas. Quando um vaso é lesado o endotélio libera o fator de von Willebrand (FVW), que interage tanto com o colágeno da parede vascular quanto com a glicoproteína (GP) Ib-IX-V da membrana plaquetária, fazendo uma ponte que ancora as plaquetas no local da lesão. Esse processo é denominado adesão plaquetária. Como a interação GP Ib-IX-V apresenta alta taxa de dissociação a camada inicial do trombo formada com a adesão é instável (RUGGERI, 2003).

A adesão desencadeia a ativação plaquetária, que é modulada por agonistas e promove uma série de eventos citoplasmáticos. Um dos efeitos desses eventos é a mudança conformacional da GP IIb-IIIa, que passa a ter afinidade ao FVW. Isso fortalece a ligação entre as plaquetas e parede vascular, estabilizando o trombo em formação. A agregação plaquetária ocorre pela interação da GP IIb-IIIa ao FVW e principalmente ao fibrinogênio. Essas moléculas

ligam-se aos complexos GP IIb-IIIa de duas plaquetas, promovendo a formação de uma rede plaquetária coesa (RUGGERI, 2003).

A hemostasia primária compreende o conjunto destes dois mecanismos: adesão e agregação plaquetária. Assim os principais elementos desta fase da hemostasia são as plaquetas, os vasos e o FVW. Embora o fibrinogênio faça parte da hemostasia primária, é também uma das proteínas essenciais do sistema de coagulação, sendo considerado um elemento, sobretudo, da hemostasia secundária ou cascata da coagulação.

Simultaneamente aos processos presentes na hemostasia primária, a lesão vascular ativa o sistema de coagulação, que através de reações em cadeia envolvendo diversas proteases do plasma (fatores de coagulação) forma uma rede de fibrina. Essa rede fortalece o trombo plaquetário para que ele resista até a regeneração do tecido lesado estar completa.

Para que a formação de fibrina não seja exacerbada, o que poderia ocasionar problemas trombóticos, há dois sistemas auxiliares, a anticoagulação natural e a fibrinólise. Esses sistemas também ocorrem através da atividade de uma série de proteínas plasmáticas levando a inibição direta de fatores pró-coagulantes (anticoagulação) ou através da degradação direta da fibrina formada (fibrinólise).

1.2. Fator de Von Willebrand

O FVW é uma glicoproteína plasmática composta por diversos multímeros de pesos moleculares distintos. Após sua síntese, o FVW fica armazenado nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais, sendo liberado após a

ativação plaquetária. As funções do FVW são basicamente: a) promover a adesão plaquetária à matriz subendotelial exposta após lesões endoteliais e b) formar um complexo ao fator VIII (FVIII) da coagulação na circulação sangüínea, evitando a proteólise do FVIII circulante.

O gene do FVW está localizado no braço curto do cromossomo 12, corresponde a 178 kb do DNA genômico e é constituído por 52 éxons, sendo o éxon 28 o maior deles (com 1,4 kb) (GINSBURG et al., 1985, VERWEIJ et al., 1985). Ele é transcrito em um RNA mensageiro (RNAm) de 8,7 kb, que resulta, após a tradução, em uma proteína com 2813 aminoácidos, designada pré-pró-fator de von Willebrand (pré-pró-FVW). Essa proteína monomérica é composta por um peptídeo sinal de 22 aminoácidos, um propolipeptídeo de 741 aminoácidos e uma subunidade madura de 2050 aminoácidos, a qual contém uma seqüência de domínios repetidos. Nesses domínios estão localizadas as áreas funcionais, conforme ilustrado na figura 1 (KEENEY & CUMMING, 2001).

A dimerização ocorre no retículo endoplasmático e consiste na formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína da extremidade carbóxi-terminal dos propolipeptídeos. Ela só é possível após a clivagem do peptídeo sinal dos monômeros (pré-pró-fator de von Willebrand) e a glicosilação inicial dos propolipeptídeos (KEENEY & CUMMING, 2001).

A multimerização ocorre através da formação de ligações não-covalentes entre os dímeros e posterior estabelecimento de pontes dissulfeto entre as extremidades amino-terminal das subunidades maduras. Durante esse processo os propolipeptídeos são clivados (KEENEY & CUMMING, 2001).

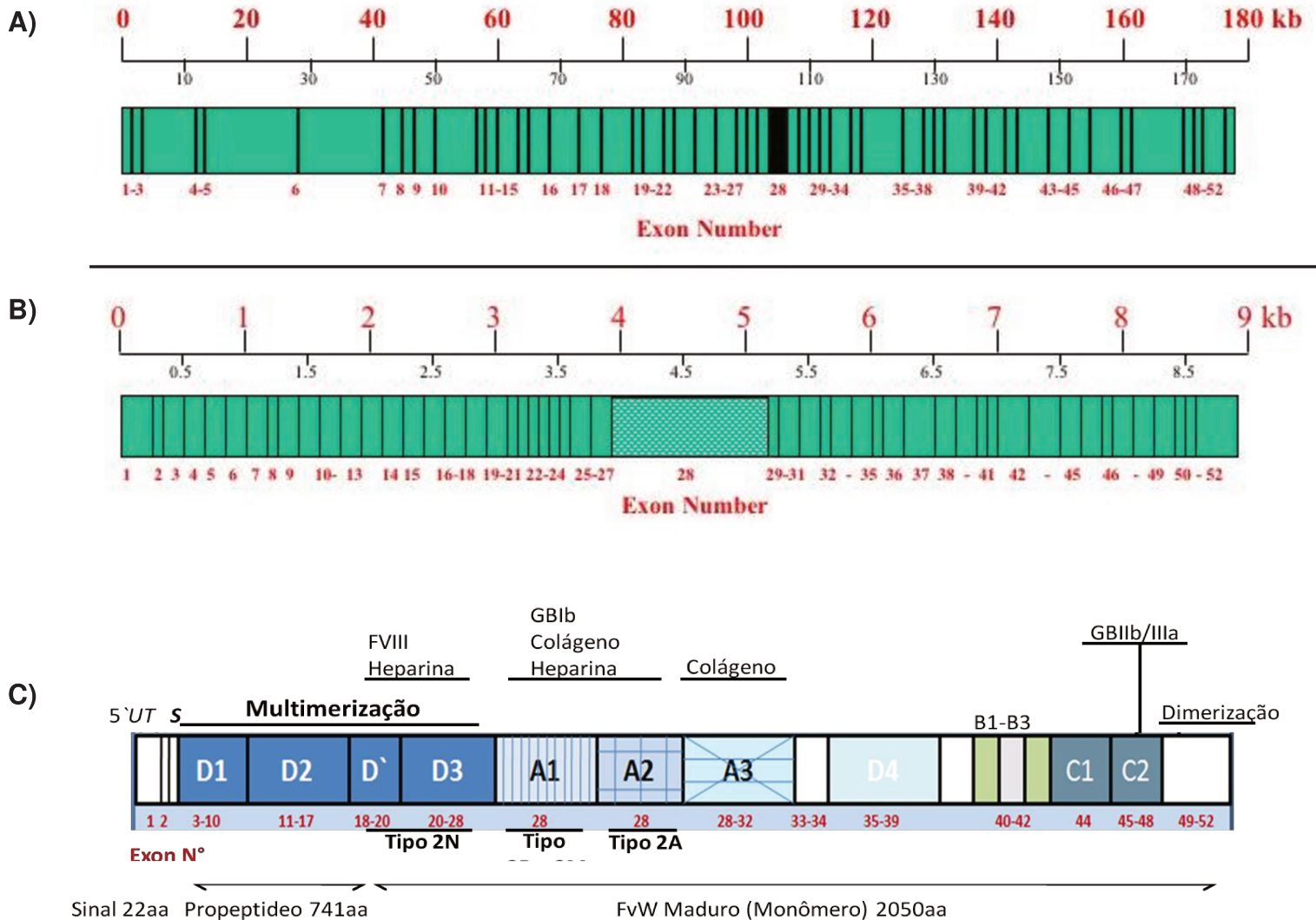


Figura 1. Representação do gene e estrutura do FVW humano. A) Gene do FVW. Gene com 52 éxons está localizado no cromossomo 12 (p13.3). B) Representação do RNAm do FVW (8,7 Kb). C) Proteína FVW. As caixas marcadas com letras (D1 a C2) representam os segmentos homólogos repetidos e o domínio B pode ser subdividido em regiões B1, B2 e B3. A estrutura do pré-pró-FVW completa com seus 2813 aminoácidos (aa), onde as setas representam os sítios de clivagem do peptídeo sinal e do pró-polipeptídeo. Na subunidade madura do FVW (com 2050aa), estão representadas as localizações dos domínios funcionais, com referência às moléculas ligantes de cada domínio e ao intervalo de aminoácidos correspondente a cada um deles (adaptado de KEENEY & CUMMING, 2001).

1.3. Doença de von Willebrand

1.3.1. Histórico sobre Doença de von Willebrand

Em 1926, em Helsinski, Finlândia, Eric Adolf von Willebrand publicou pela primeira vez sobre a doença hemorrágica que havia observado em vários membros de uma única família de Floglo, no arquipélago das Ilhas Aland, localizado no Golfo da Botnia, entre a Finlândia e a Suécia.(SHULMAN *et al.*, 1999). Nessa publicação, VON WILLEBRAND *apud* (SCHULMAN *et al.*, 1999) descreveu detalhes dos sintomas predominantes da doença, que consistiam em: epistaxe, sangramento gengival importante após extração dentária, sangramento no trato genital feminino e em ferimentos que apareciam ainda na infância (VON WILLEBRAND, 1931) e (NILSON *et al.*, 1957). Hemartroses comuns à hemofilia eram relativamente raros, o tempo de sangramentos era prolongado, a contagem das plaquetas e sua morfologia eram normais. Para controle de perda sanguínea e hemorragias, era empregado o uso de transfusão sanguínea.

Foi considerada então uma doença hereditária autossômica, com penetrância variável, ou recessiva, que afeta ambos os sexos, distinta da hemofilia e dominada: Pseudo – Hemofilia Hereditária (JURGERS, R. & FORSUIS, H. 1951) *apud* (ZIMMERMAM, T. S. & RUGGERI, Z. M. 1987). O tempo de sangramento prolongado foi considerado o sinal mais importante, acreditando-se que em deficiência funcional de plaquetas, combinada com lesões sistêmicas nas paredes dos vasos sanguíneos. Em 1950, através das novas metodologias para avaliar a atividade do FVIII, foi observado que a anormalidade hemostática estava

relacionada ao tempo de sangramento prolongado e diminuição da atividade coagulante do FVIII (ALEXANDER, B. & GOLDSTEIN, R. 1953).

Em 1960, ficou estabelecido que a doença de von Willebrand apresentava as seguintes características: (a) herança genética autossômica dominante; (b) sangramentos de mucosas; (c) tempo de sangramento prolongado; (d) atividade do FVIII diminuída, com aumento secundário do FVIII após infusão de plasma fresco congelado.

Iniciaram-se em 1970, estudos para isolar o FVW através da purificação do FVIII por cromatografia, sendo identificada uma grande macroglobulina (VAN MOURIK, J. A. & MOCHTAR, I. A. 1970), contra qual pesquisadores desenvolveram anticorpos específicos (ZIMMERMAN *et al.*, 1971). Estudos imunológicos com a proteína do FVW verificaram pacientes com níveis normais do antígeno, que a proteína possuía mobilidade eletroforética acentuada e migrava mais rapidamente em relação às proteínas (FVW) de indivíduos normais (HOLMBERG, L. & NILSSON, I. M. 1992) (FURLAN *et al.*, 1996). Através dessas observações, verificavam-se anormalidades na estrutura do FVW, distinguindo alterações qualitativas e quantitativas.

Em 1989, toda estrutura do gene do FVW foi descrita (MANCUSO, *et al.*, 1991).

Em 1994, foi definida a classificação da DVW atualmente utilizada. Criada com a intenção de refletir as diferenças nos mecanismos fisiopatológicos que levam aos vários fenótipos da DVW, essa classificação foi aceita pelo Subcomitê da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (SADLER, 1994).

1.3.2. Doença de von Willebrand: epidemiologia e quadro clínico

A doença de von Willebrand (DVW) é a mais comum dentre todas as desordens hemorrágicas hereditárias e ocorre em até 1 a cada 800 a 1.000 indivíduos, com uma prevalência estimada entre 1% e 3% (RODEGHIRO et al., 1987; WERNER et al., 1993). Mas somente 10% desses indivíduos apresentam doença sintomática.

A DVW é um distúrbio hereditário causado pela alteração na concentração, estrutura ou função do FVW. Entre os sintomas estão manifestações hemorrágicas cutâneo-mucosas como: epistaxe, gengivorragia, equimoses, sangramentos após exodontias, menometrorragias e sangramentos associados a procedimentos ou traumas. O quadro clínico associado à DVW é bastante variável e depende das características fenotípicas decorrentes da grande variabilidade genética que envolve a doença. Atualmente são descritas mais de 300 mutações diferentes no gene do FVW e estão reunidas em um banco de dados (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>).

Os pacientes com DVW apresentam um quadro clínico variável em intensidade e manifestação dos sintomas. Anteriormente foram descritos mais de vinte subtipos de DVW. No entanto, Sadler em 1994, descreveu uma classificação com seis subtipos (SADLER, 1994), recentemente revisada (SADLER et al., 2006).

Segundo a classificação atualmente considerada (tabela 1), os tipos 1 e 3 caracterizam-se por redução da quantidade de fator de von Willebrand, sendo o tipo 1 deficiência parcial, e o tipo 3 deficiência virtualmente completa do FVW. O

tipo 2 consiste em defeitos funcionais da proteína, sendo subdividido em 2A, 2B, 2M e 2N.

Entre os casos de DVW com defeito qualitativo, ou seja, tipo 2, o subtipo 2A, com incidência de 10 a 15%, tem padrão de transmissão autossômico dominante como regra e apresenta redução dos multímeros de alto peso molecular. Os sintomas são tendência hemorrágica leve a moderada, causada por deficiência na ligação do FVW ao complexo plaquetário GP Ib-IX-V.

O subtipo 2B é pouco comum (menos de 5% dos casos de DVW) e tem padrão de herança autossômico dominante na maioria dos casos. Caracteriza-se pela maior afinidade do FVW a GP Ib-IX-V. Como consequência há a formação espontânea de complexos entre plaquetas e FVW. Esses complexos são rapidamente depurados, o que causa plaquetopenia e redução acentuada dos multímeros de alto peso molecular.

O subtipo 2M tem padrão de herança autossômico dominante. Apresenta tendência hemorrágica de intensidade variável ocasionada pela ligação deficiente entre FVW e a GP Ib-IX-V, como no subtipo 2A, porém sem perda de multímeros.

O subtipo 2N é pouco comum e se assemelha à hemofilia A, por apresentar redução na quantidade de fator VIII coagulante. Porém, seu padrão de herança é autossômico recessivo, diferente do padrão da hemofilia, que é ligado ao sexo. A tendência hemorrágica apresenta intensidade variável e não há perda de multímeros nem de afinidade entre o FVW e a GP Ib-IX-V, portanto a adesão plaquetária é preservada. As mutações causadoras desse subtipo estão localizadas entre os éxons 18 a 27 do gene do FVW, o que corresponde ao domínio D' e parte do domínio D3 na proteína. Essa região corresponde ao sítio

de ligação do FVIII no FVW (figura 1). Como essa interação está comprometida, o FVIII fica vulnerável a proteólise, acelerando assim seu clearance.

Tabela 1. Classificação da DVW conforme Sadler (1994) e revisada em 2006.

Classificação da DVW	Descrição
Tipo 1	Deficiência quantitativa parcial do FVW. Tipicamente herança autossômica dominante, embora o diagnóstico seja complicado pela penetrância reduzida e pela expressividade variável. Caracteriza-se por redução tanto na quantidade do FVW:Ag quanto do FVIII. A distribuição de multímeros é normal.
Tipo 2 ^a	Deficiência qualitativa do FVW associada à ausência dos multímeros de alto peso molecular e baixos níveis do FVW:Rcof quando comparados com os níveis do FVW:Ag. Geralmente autossômico dominante causado por mutações missense no domínio A2 do FVW. O grupo 1 apresenta defeito no transporte intracelular do FVW e o grupo 2 aumento na proteólise do FVW plasmático.
Tipo 2B	Defeito qualitativo do FVW geralmente associado à redução do número de multímeros de alto peso molecular. Apresenta aglutinação plaquetária induzida por Ristocetina (RIPA) aumentada, embora os níveis do FVW:Rcof possam ser normais. Muitas vezes cursa com plaquetopenia. A herança é autossômica dominante.
Tipo 2M	Defeito qualitativo do FVW associado com defeitos específicos na interação plaquetas/FVW. Padrão normal de multímeros. A herança é autossômica dominante.
Tipo 2N	Defeito qualitativo do FVW que reduz sua afinidade de ligação ao FVIII, causando redução do mesmo na circulação. A herança é autossômica recessiva.
Tipo 3	Desordem quantitativa clinicamente severa caracterizada por redução marcante do FVW plaquetário e plasmático (menos de 5U/dL). Atividade do FVIII reduzida. A herança geralmente é autossômica recessiva, mas também pode ser uma manifestação de herança homozigota ou heterozigota composta do tipo 1 da DVW.

FVW:Ag: antígeno do fator de von Willebrand; FVW:Rcof: atividade cofatora da ristocetina; RIPA: aglutinação plaquetária induzida por ristocetina.

1.3.3. Doença de von Willebrand tipo 2N

A DVW tipo 2N era anteriormente reconhecida como “mutantes no sítio de ligação ao FVIII” ou DVW Normandy (motivo pelo qual recebeu a designação de 2N).

Laboratorialmente é caracterizada por apresentar níveis normais do antígeno de von Willebrand (FVW:Ag) e da atividade cofatora da ristocetina (FVW:RCof), além de apresentar estrutura multimérica normal do FVW, mas apenas com níveis reduzidos do FVIII, observado pela diminuição da atividade coagulante do fator VIII (FVIII:C) (FEDERICI, 2006). Embora alguns casos apresentem níveis bastante reduzidos do FVIII (FVIII:C 1-2%), não se observam níveis inferiores a 1% e de fato a maioria dos pacientes mantém níveis de FVIII:C entre 5-40% (MAZURIER et al., 2001). Por este motivo, comumente esses pacientes são erroneamente classificados como portadores de hemofilia A moderada ou leve, sendo a distinção maior entre ambas as doenças seu tipo de transmissão genética, como anteriormente mencionado. Em casos onde a diferença de transmissão genética não esta evidente, muitas vezes o diagnóstico laboratorial de certeza disponível será o teste *in vitro* para avaliar a capacidade de ligação entre o FVW plasmático e o FVIII exógeno, ou ensaio de ligação ao FVIII (NISHINO et al., 1989). No entanto, esse teste apresenta algumas limitações na sua reprodutividade e de fato, o diagnóstico confirmatório é obtido apenas após a determinação molecular das mutações envolvidas.

O quadro clínico está relacionado a hemorragias decorrentes de traumas e procedimentos, sendo relatado com certa frequência hemorragia pós-parto (o que não é comumente visto em todos os subtipos de DVW) (MAZURIER et al., 2001).

O tratamento principal se baseia na reposição do FVIII com concentrados que contenham FVW. Outras opções terapêuticas apresentam boa resposta como a desmopressina (DDAVP), também utilizados em outros subtipos de DVW, além de medidas paliativas como o uso de antifibrinolíticos.

1.3.3.1. Mutações relacionadas à DVW tipo 2N

A primeira mutação relacionada a DVW 2N identificada foi uma mutação *missense* com a troca de uma treonina na posição 791 do pré-pró-FVW por uma metionina (T791M) em 1991, em um paciente com antecedente de consanguinidade, originário da Normandia (GAUCHER et al, 1991). O relato dessa mutação foi extremamente importante para a determinação do local de ligação do FVIII ao FVW, assim como para os estudos de função da proteína.

Desde então, várias mutações foram descritas e a maioria delas são do tipo *missense* localizadas entre os éxons 18 e 20 do gene do FVW, o que corresponde ao domínio D' (aminoácidos 769-865) do FVW (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>). De fato, três mutações nessa região: T791M; R816W e R854Q correspondem a mais de 50% dos casos identificados (tabela 2). No entanto, recentemente foi identificada uma mutação no éxon 25 do gene do FVW, resultante da troca de uma lisina por um ácido glutâmico na posição 1078 (E1078K), em heterozigose com a mutação já descrita R854Q (HILBERT et al., 2004).

Tabela 2. Mutações identificadas relacionadas à DVW tipo 2N

DVW tipo 2N		
Total		54 mutações
Dados gerais: •éxon: 18-25 do gene FVW (códon: 782-1078) •domínios: D' e D3		
Mutações mais comuns:		
Toca de aminoácido	Número de referências	% do total de mutações
T791M	5	9.2
R816W	6	11.1
R854Q	12	22.2
Total		42.5

1.3.3.2. Diagnóstico diferencial entre DVW tipo 2N e hemofilia A

Entre os casos definidos como portadores de DVW tipo 2N é comum observar história de diagnóstico prévio de hemofilia A. De fato, como consequência muitos desses casos apresentam complicações relacionadas ao tratamento inadequado, além de grave equívoco para o aconselhamento genético dessas famílias.

Recentemente, foi relatado por Simon e Roisenberg (SIMON & ROISENBERG, 2004) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, quatro novos casos de DVW 2N entre 42 hemofílicos leves sem antecedente familiar para hemofilia e dois casos novos entre seis mulheres em investigação de história hemorrágica. Nesse estudo foram investigadas exclusivamente as quatro mutações mais freqüentes relacionadas com DVW 2N (E787K, R816W, R854Q e H817Q). Apenas nos casos que apresentaram essas mutações em heterozigose foi realizado o seqüenciamento dos éxons 18, 19 e 20 do gene FVW, sendo a avaliação conclusiva em apenas um dos casos. É possível que outras mutações não avaliadas possam estar envolvidas.

II. Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente estudo apresenta como objetivos:

1. Caracterizar a mutação presente entre os casos acompanhados no Hemocentro da UNICAMP e no Hemocentro do Espírito Santo (HEMOES) com diagnóstico ou suspeita de DVW tipo 2N.
2. Avaliar o diagnóstico diferencial de DVW tipo 2N entre os pacientes previamente diagnosticados como hemofílicos A moderados (FVIII:C 1 a 5 UI/dL) ou leves (FVIII:C 6 a 40 UI/dL) acompanhados no Hemocentro da UNICAMP.
3. Implementar o teste de ligação do FVIII ao FVW (FVW:FVIII B) no laboratório de pesquisa molecular em hemostasia.

III. Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

A DVW é a doença hemorrágica hereditária mais comum. Dentre os subtipos relacionados à DVW, o tipo 2N apresenta exclusivamente diminuição da afinidade do FVW ao FVIII. Comumente esses casos são diagnosticados erroneamente como portadores de hemofilia A. Além da avaliação molecular desses casos, não há nenhum outro teste laboratorial de fácil reprodutividade que confirme esse diagnóstico. O diagnóstico de certeza entre a DVW tipo 2N e hemofilia A é de extrema importância para o tratamento correto desses casos e para o aconselhamento genético.

Esse estudo tem como objetivos implantar as técnicas para que possibilitem fazer a pesquisa molecular dos casos diagnosticados previamente como portadores de DVW baseados na história clínica, familiar e dados laboratoriais. Isso possibilitará que essa pesquisa seja realizada rotineiramente para os demais casos que no futuro apresentem implicações desse diagnóstico.

A pesquisa das mutações associadas a DVW entre casos de hemofilia A moderada e leve contribuirá para avaliar possíveis casos erroneamente diagnosticados, como anteriormente observado no estudo brasileiro de Simon e Roisenberg (SIMON & ROISENBERG, 2004).

IV. Casuística

4. CASUÍSTICA

Foram convidados a participar deste estudo, pacientes acompanhados no ambulatório de Hemostasia da UNICAMP (Campinas, SP) e no Hemocentro do Espírito Santo, HEMOES (Vitória, ES), com diagnóstico de DVW tipo 2N (objetivo 1) ou hemofilia A moderada ou leve (objetivo 2).

Foi realizado um levantamento do histórico clínico e laboratorial de todos os casos incluídos nesse estudo.

Para o diagnóstico de DVW 2N espera-se encontrar os seguintes parâmetros:

- a) História hemorrágica crônica, sobretudo associada a traumas ou procedimentos;
- b) Presença ou não de antecedente familiar para história hemorrágica, podendo incluir homens e mulheres. Possibilidade da presença de antecedente de consangüinidade (herança autossômica recessiva);
- c) Laboratorialmente:
 - Redução da FVIII:C (atividade coagulante do FVIII), levando na maioria das vezes a aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), embora em alguns casos quando a redução do FVIII:C não for significativa, o TTPa pode estar normal;
 - Testes quantitativos e funcionais relacionados ao FVW normais: antígeno do FVW (FVW:Ag); atividade cofatora da ristocetina (FVW:Rcof); agregação plaquetária induzida pela ristocetina (*ristocetin-induced platelet aggregation*)

-*RIPA*); ligação do colágeno ao FVW (FVW:CBA); Ivy teste (tempo de sangramento pelo método de Ivy).

- d) Ausência de outras alterações entre os testes relacionados para investigação hemorrágica sem outra causa relacionada: quantificação de plaquetas; agregação plaquetária; dosagem demais testes da coagulação.

Na segunda fase desse estudo, foram convidados a participar os casos de hemofilia A moderada (FVIII:C 1 a 5 UI/dL) ou leve (FVIII:C 6 a 40 UI/dL). Esses casos foram avaliados segundo critérios clínicos, incluindo antecedentes familiares, para avaliar a presença de critérios maiores que justifiquem a possibilidade do diagnóstico de DVW 2N. Foram considerados critérios maiores, a presença de qualquer uma das seguintes alternativas:

- a) antecedente familiar hemorrágico não compatível com herança ligada ao cromossomo X: história hemorrágica entre mulheres aparentadas; antecedente hemorrágico entre parentes de origem paterna;
- b) antecedente de consangüinidade;
- c) qualquer outro dado clínico ou laboratorial não compatível com o diagnóstico de hemofilia que possa ser associado a DVW 2N.

V. Metodologia

5. METODOLOGIA

5.1. Teste de ligação do FVW ao FVIII (FVW:FVIII:B)

O diagnóstico laboratorial para confirmação da DVW 2N é feito através do teste de ligação do FVW ao FVIII. Este teste é realizado através do método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), descrito em 1998 por Casonato (CASONATO *et al.*, 1998) e modificado por Taylor em 2002 (TAYLOR *et al.*, 2002). Este teste de ELISA foi desenhado para mensurar a atividade de ligação do FVW ao FVIII (FVW:FVIII:B), considerando-se a concentração de FVW:Ag, avaliada em paralelo. O método foi desenvolvido *in house* sendo um procedimento realizado no período de três dias.

5.1.1. Preparação da placa com anticorpo de captura (1º dia).

Duas microplacas foram inicialmente preparadas, a **placa A** para avaliação FVW:FVIII:B e a **placa B** para a quantificação do FVW:Ag. A parede das duas microplacas foram revestidas com um anticorpo de coelho anti-FVW humano (Dako®, Copenhagen, Dinamarca), (100 µL por poço de 5µg/mL em 0,05 M de tampão carbonato de sódio, pH 9,6). As placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

Como controle para avaliar a atividade do FVIII exógeno, foi prepara uma terceira placa, **placa C**. A mesma foi revestida com 2ug/mL de anticorpo de coelho anti-FVIII humano (Kordia®, Leiden, Holanda) diluído em 0,05 M de tampão carbonato de sódio, pH 9,6, em volume final de 100 µL. Essa terceira placa foi incubada *overnight* a 4°C.

5.1.2. Imobilização do FVW:Ag e do FVIII exógeno (2º dia).

As três placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem contendo uma solução de 3% de albumina bovina em 0,01 M de tampão fosfato-salina (PBS: 0,137 M de NaCl, 2,68 mM de KCl, 6,8 mM de Na₂HPO₄ 70,74 mM de KH₂PO₄) pH 8,0 e 0,5% de Tween 20 (Sigma-USA).

5.1.2.1. Imobilização do FVW:Ag

Um calibrador comercial, *Standard Human Plasma*® (Siemens, Marburg, Alemanha) de concentração conhecida foi utilizado para a construção da curva de calibração da placa A, para a ligação FVW:FVIII B e da placa B, para concentração do FVW: Ag. Foram realizadas diluições seriadas do calibrador, sendo a diluição inicial de 5,0 UI/dL até a diluição final de 0,016 UI/dL (1/20 a 1/640). Para a avaliação dos pacientes e controles foram utilizadas três diluições diferentes do FVW:Ag da amostra previamente testada em um teste de ELISA independente. As concentrações do FVW:Ag utilizadas para cada amostras foram de 5,0 UI/dL; 2,5 UI/dL e 1,25 UI/dL. As amostras foram preparadas para utilização de 100 µL por poço.

5.1.2.2. Imobilização do FVIII exógeno

Para controle de FVIII exógeno recombinante foi preparada a placa C, previamente revestida com anticorpo anti-FVIII. Foram realizadas seis diluições seriadas do concentrado de FVIII recombinante (rFVIII), ReFacto® (Wyeth,

Filadélfia, PA, EUA).(3,125 UI/mL a 0, 098 UI/mL) em tampão diluente (3% de albumina bovina em PBS pH 8,0; 0,5% de Tween 20 e 10 mM CaCl₂, pH 8,0), sendo adicionado 100 µL por poço referente a cada diluição.

5.1.3. Remoção do FVIII endógeno e substituição pelo FVIII exógeno (3º dia).

5.1.3.1. Remoção do FVIII endógeno

As três placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. As placas A e B foram incubadas por uma hora com um tampão de remoção do FVIII endógeno (3% de albumina bovina em 0,01 M de tampão fosfato-salina, pH 8,0; 0,5 % de Tween 20 e 350 mM de CaCl₂), este processo foi repetido após uma hora. A placa C permanece apenas com o tampão de lavagem.

5.1.3.2. Substituição pelo FVIII exógeno

As três placas foram lavadas com tampão de lavagem por três vezes. Foi adicionada a placa A 100uL por poço de 1,25 UI/mL do rFVIII ReFacto®, diluído em tampão de diluição do FVIII (3% de albumina bovina em 0,01 M de tampão fosfato-salina, pH 8,0; 0,5 % de Tween 20 e 10 mM de CaCl₂). Nas placas B e C foram adicionados 100 µL por poço de tampão de lavagem. Todas as placas foram incubadas a 37°C por duas horas.

5.1.4. Detecção do FVW:Ag e FVIII (3º dia).

As três placas foram lavadas três vezes. Foram adicionados à placa A (FVW:FVIII B) e à placa C (controle rFVIII) 100 µL por poço de 1,66 µg/mL do

anticorpo de coelho anti-FVIII humano conjugado com peroxidase (Kordia®, Leiden, Holanda).

Foi adicionado à placa B (FVW:Ag) 100 µL por poço de 10 µg/mL de anticorpo de coelho anti-FVW humano conjugado com peroxidase (Dako®, Copenhagen, Dinamarca), diluído em tampão diluente Tris salino.

As três placas foram incubadas por uma hora a 25°C. Após as placas foram lavadas por três vezes.

Em seguida foi realizado o processo de revelação das três placas com a adição de 100 µL por poço de substrato cromogênico OPD (ortofenilenodiamina, Sigma, USA). A coloração foi desenvolvida em cinco minutos para as placas A e C e 15 minutos para a placa B. A reação foi neutralizada com 50 µL de 3 M de H₂SO₄. A absorbância foi mensurada em 450 nm, utilizando-se um leitor de ELISA.

5.2. Análise Molecular

Para avaliação do diagnóstico molecular dos casos com suspeita clínica e laboratorial de DVW 2N foi adotada a estratégia descrita na figura 2.

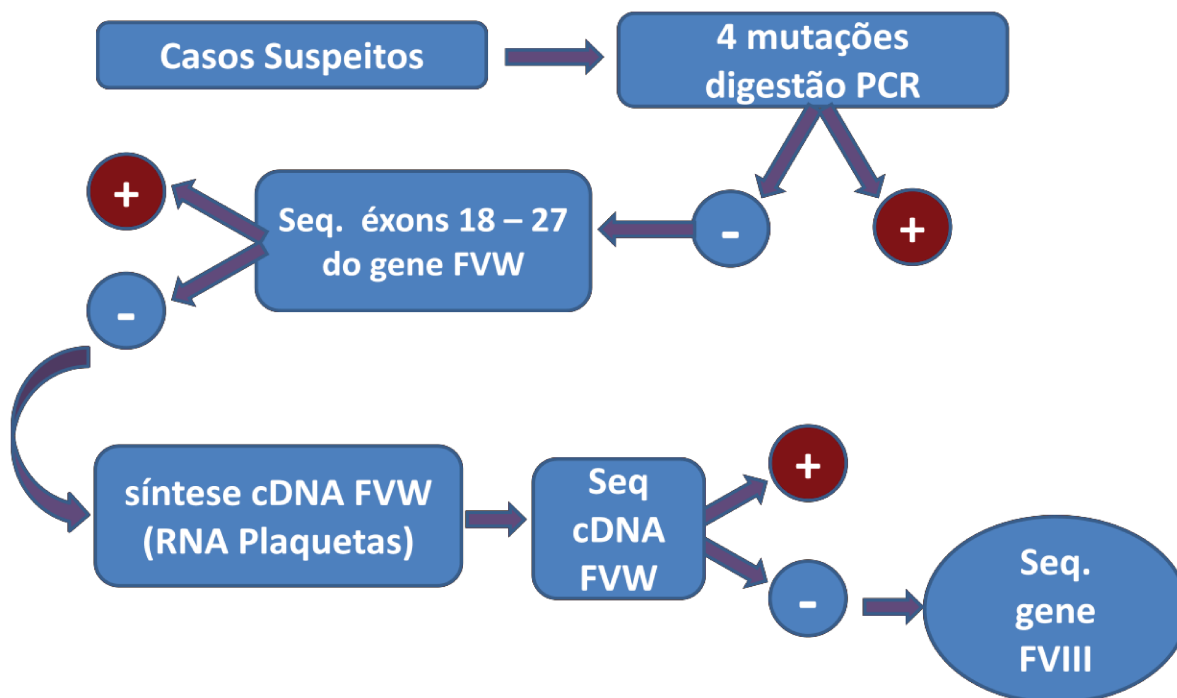


Figura 2. Estratégia para investigação molecular dos casos com suspeita clínica e laboratorial de DVW tipo 2N. Os casos suspeitos foram inicialmente investigados para as quatro mutações mais freqüentes associadas à DVW tipo 2N. Os casos que apresentaram alterações foram concluídos (+) e a mutação foi confirmada pelo seqüenciamento da região. Para os casos negativos para essas mutações, amostras de DNA genômico (gDNA) foram utilizadas para o seqüenciamento da região entre os éxons 18-27 (domínios D' e D3 da proteína do FVW, sítio de ligação do FVIII ao FVW) do gene do FVW. Os casos onde foi encontrada mutação nessa região foram concluídos (+). Os casos negativos foram analisados através do seqüenciamento dos éxons 16-28 do gene do FVW utilizando o DNA codificante (cDNA), sintetizados a partir do RNA mensageiro (RNAm) extraído das plaquetas. Os casos que permaneceram sem conclusão foram investigados através do seqüenciamento do gDNA do gene do FVIII, a fim de avaliar a presença de mutação associada à hemofilia A.

5.2.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir do pool leucocitário, pelo método rotineiramente utilizado em nosso laboratório fenol/clorofórmio (DAVIS et al., 1986).

Após a assinatura do termo de consentimento pelo paciente ou responsável, foi solicitada a coleta de amostras de 9 mL de sangue periférico contendo solução de 10% de EDTA (sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético) para a extração do DNA.

5.2.2. Avaliação das quatro mutações no gene do FVW mais freqüentes entre os casos de DVW tipo 2N

Todos os casos incluídos nesse estudo foram analisados inicialmente para a presença das quatro mutações do gene do FVW relacionadas ao diagnóstico de DVW 2N mais freqüentes: E787K, R816W, R854Q e H817Q. Essas quatro mutações são do tipo *missense*. A troca dos aminoácidos envolvidos nas quatro alterações pode ser reconhecida por enzimas de restrição, conforme descrito na tabela 3.

A mutação E787K no éxon 18 do gene do FVW é detectada pela enzima de restrição TaqI. As mutações no éxon 19 do gene do FVW, R816W e H817Q, são detectadas através das enzimas de restrição MspI e NlaIII, respectivamente. A mutação R854Q, no éxon 20 do gene do FVW é reconhecida através da digestão com a enzima MspI.

As regiões gênicas dos éxons correspondentes a cada mutação foram amplificadas a partir de amostras do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1988), utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos descritos na tabela 4.

Tabela 3. Descrição das quatro mutações do gene do FVW relacionadas à DVW 2N mais freqüentes.

Mutação*	Posição e troca	Posição no FVW forma madura	Enzima de restrição
E787K	2359 G → A éxon 18	Glu 24 Lys	TaqI
R816W	2446 C → T éxon 19	Arg 53 Trp	MspI
H817Q	2451 T → A éxon 19	His 54 Gln	NlaIII
R854Q	2561 G → A éxon 20	Arg 91 Gln	MspI

E – ácido glutâmico (Glu); K - lisina (Lys); R - arginina (Arg); W - triptofano (Trp); H - histidina (His); Q - glutamina (Gln).

* A descrição das mutações utilizada refere-se a nova nomenclatura atualmente recomendada, utilizando código de letras para os amino ácidos e posição no pré-pró-FVW.

5.2.3. Avaliação das seqüências nucleotídeas dos éxons 18 a 27 do gene do FVW.

Após a avaliação da presença das quatro mutações mais freqüentes relacionadas à DVW 2N, os casos que não foram conclusivos (negativos para as mutações investigadas, ou presença em heterozigose para apenas uma delas), foram submetidos a uma ampla investigação de outras possíveis mutações. Embora o sítio de ligação do FVIII esteja localizado entre os éxons 18 a 25 do gene do FVW, nossa investigação incluiu o seqüenciamento dos éxons 18 a 27.

A avaliação dos éxons 18 a 27 do gene do FVW foi realizada através do método de seqüenciamento automático direto das regiões amplificadas do DNA genômico, utilizando os oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) descritos na tabela 4 (KAKELA et al., 2005).

O método utilizado para a realização do seqüenciamento é o mesmo já utilizado em nosso laboratório. Após a amplificação das regiões específicas do

DNA pela técnica de PCR, o produto final foi purificado, utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Inglaterra). O produto purificado foi quantificado em gel de agarose com marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*; Invitrogen, EUA). Em seguida foi realizada a reação de seqüenciamento, utilizando o *Dynamic ET Dye Terminator Kit* (Amersham Biosciences, Inglaterra), de acordo com instruções do fabricante, para posterior eletroforese em seqüenciador automático (MegaBACE DNA Analysis System®, Amersham Biosciences) e análise das seqüências.

5.2.4. Análise do DNA codificante (cDNA) da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.

A avaliação molecular dos casos suspeitos de DVW 2N, consistiu também do seqüenciamento do DNA codificante (cDNA) da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3. Essa análise foi incluída para avaliar presença de possíveis região de *splice* que pudessem estar relacionados à DVW 2N. Para essa avaliação o cDNA foi sintetizado a partir do RNA mensageiro (RNAm) extraído das plaquetas dos casos em investigação.

Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise dos éxons 18 a 27 do gene do FVW.

	Oligonucleotídeos	Produto
VW18F	5'- gcggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtggaacaaaggacagtgtggaagg -3'	378 pb
VW18R	5'- gcccgccccgccgcccggccaggaaacagctatgaccacagccccctcactcatccc -3'	
VW19F	5'- ggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtgaggagggttagatcagtcactg -3'	292 pb
VW19R	5'- gcccgccccgccgcccaggaaacagctatgaccgcaccctcactccacccgcag -3'	
VW20F	5'- gcggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtcctcaaaccaagggtgccaac -3'	314 pb
VW20R	5'- gcccgccccgccgcccggccaggaaacagctatgaccaccctcctagaagaagaacagc -3'	
VW21F	5'- gcccccgccggtaaaacgacggccagtgagccagtggggataatggt -3'	287 pb
VW21R	5'- gcccgccccccaggaaacagctatgacctggcagaagcacaagcg -3'	
VW22F	5'- gcccccgccggtaaaacgacggccagtgagacagatgggcaggtgt -3'	350 pb
VW22R	5'- gcccgccccgccgcccaggaaacagctatgaccacactccaaaggccaagtcc -3'	
VW23F	5'- gcgtcccggtaaaacgacggccagtcctgagccggagagcatgct -3'	310 pb
VW23R	5'- gcccgccccgccgcaggaaacagctatgaccattccaggaagcaagctcta -3'	
VW24F	5'- gcccccgccggtaaaacgacggccagtgctcctctgtccccattgtc -3'	445 pb
VW24R	5'- gcccgccccccaggaaacagctatgaccgcagatcatgtcaagacacg -3'	
VW25F	5'- gcggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtcagactaagagccagagttc -3'	330 pb
VW25R	5'- gcccgccccgccgcccggccaggaaacagctatgaccgcatctgagaacatgagggc -3'	
VW26F	5'- gcggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtcacattatctccagatggc -3'	374 pb
VW26R	5'- gcccgccccgccgcccgcaggaaacagctatgaccctatccatcccaccagcct -3'	
VW27F	5'- ggcccgccgccccgccggtaaaacgacggccagtgtaaaaaatgaggcttcctc -3'	312 pb
VW27R	5' gcccgccccgccgcccgcaggaaacagctatgaccgattcatcacttcaaacaac --3'	

pb: pares de base.

5.2.4.1. *Extração de RNA mensageiro (RNAm) de plaquetas.*

Para a obtenção do RNAm foram coletas amostras de 20 mL de sangue total periférico, em citrato de sódio 3,2%, na diluição 1:10. Essas amostras foram inicialmente centrifugadas a 150 x g por 20 minutos e coletou-se o sobrenadante ou plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi centrifugado a 2000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado ao pellet obtido 750µL de TRizol® *Reagent* (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). A solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e foi adicionado 200µL de clorofórmio e posterior agitação vigorosa por 15 segundos utilizando-se um vórtex. O material foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL, e centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubado durante a noite a -80°C para precipitação do RNA.

Na etapa seguinte, a solução foi centrifugada a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 500 µL de etanol 75%, seguido de homogeneinização (vortex) por 15 minutos. Após a amostra foi centrifugada a 15.000 x g por 15 minutos. O etanol foi removido por evaporação, sendo o pellet colocado em um banho seco a temperatura de 65° C. Em seguida o pellet foi ressuspenso em 20µL de água tratada com RNase Free. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se o aparelho NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

5.2.4.2. Síntese do cDNA da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript® III *First Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, San Diego, Estados Unidos). Foram seguidas as recomendações de acordo com o fabricante. Resumidamente, foram transferidas 5 µg do RNAm total em um tubo de polipropileno de 0,2 mL. Adicionou-se 2 µL de 50 µM do Oligo(dT)₂₀, 1 µL de tampão de anelamento, e o volume final foi completado com água Mili-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) RNase free para 8 µL. A amostra foi incubada em um termociclador a 65° por 5 minutos, imediatamente após o tubo contendo a solução foi colocada em gelo por 1 minuto. Adicionou-se 10 µL do reagente *2x First Strand Reaction*, além de 2 µL da enzima *Super Script III®* e 2 µL *RNaseOUT*. Adicionou-se o oligonucleotídeo específico (tabela 5) e iniciada a reação em termociclador, sendo um ciclo de 50 minutos a 50°C, seguido de um ciclo de 5 minutos a 25°C e após 50 minutos a 50 °C. Após a síntese do cDNA, a enzima *Super Script III®* foi denaturada a 85°C por 5 minutos e a amostra foi estocada a -20 °C, até ser realizada a reação de seqüenciamento.

5.2.4.3. Seqüenciamento do cDNA da região do gene do FVW correspondente aos domínios D' e D3.

Para o seqüenciamento do cDNA da região correspondente ao sitio de ligação do FVIII ao FVW, foram utilizados oligonucleotídeos que reconhecem regiões entre os éxons 16 a 28 do gene do FVW (tabela 5). A técnica utilizada

para o seqüenciamento automático dessa região foi a mesma que anteriormente descrita.

Tabela 5. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na análise do cDNA da região correspondente aos éxons 16 a 28 do gene do FVW.

Éxon	Oligonucleotídeos	Produto
16 a 21	CAGTGCCCCTGTTACTATG 5' CTCCCGTCAAACAGCTCAAT 3'	704 pb
20 a 28	CCTTCGACGGGCTCAAATAC 5' TCCGATCCTAGGACGAA 3'	1903 pb

5.2.5. Análise do molecular do gene do FVIII (*F8*) nos casos inconclusivos para mutação associada à DVW tipo 2N.

Os casos suspeitos para DVW tipo 2N, nos quais não foram encontradas mutações na região correspondente aos domínios D' e D3 do gene do FVW, foi realizada a avaliação molecular do gene do FVIII (*F8*) através do seqüenciamento do DNA genômico dos casos.

Para isso utilizamos os oligonucleotídeos anteriormente descritos (ARRUDA, et al., 1995) e relacionados na tabela 6.

Tabela 6. Relação de oligonucleotídeos para seqüenciamento do gene do fator VIII (*F8*).

Exon	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	Exon	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)
1	GCTCCTGTTCACCTTTGACTT AGCATCCACAACCATCCTAAC	608	14A	GAGAACCTCTAACAGAACGT CTGTTGGACCATTTCATGT	1252
2	TGAAGTGTCCACCAAAATGA TACCCAATTTCATAAATAGC	207	14B	ATGCTACAGCTTTGAGGCTA AGATGAGAAGAGTTGTCTTG	1085
3	GTACTATCCCCAAGTAACCT TATTCATAGAATGACAGGAC	208	14C	ATTGCAAAGGTATCATCATT AGCAGAGCAAAGGAATAACC	1029
4	ACAGTGGATATAGAAAGGAC TGCTTATTTTCATCTCAATCC	295	15	CACCTAGGAAAAATGAGGATG AGTGGGAATACATTATAGTC	314
5	CTCCTAGTGACAATTTCTTA AGCAGAGGATTTCTTTCAGG	187	16	AGCATCCATCTTCTGTACCA TTGCACGTAGGATAAATATC	456
6	CATGAGACACCATGCTTAGC CTGGTGCTGAATTTGGAAGA	220	17-	AATCCACTCTGGTTCATAGG	778
7	TCAGATTCTCTACTTCATAG GAAACTGTGCAAGGTCCATC	225	18	ACTGATTGTGTTCCCAGTGC	
8	CTCTGGTATAGGACAGCCTA AGAGAGGTACAATAGTCAAA	356	19	GCAAGCACTTTGCATTTGAG GCTGAGTAGGTAGGGAACCT	197
9	AGAGTTGGATTTGAGCCTAC CAGACTTTTTCTTCTTACCT	284	20	TTGTGCACTCTAGTTACTGT ATAATCAGCCCAGGTTCTTG	155
10	AGCCTCAAATTACTATAATG ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	347	21	GACTAACCCAGCTGAATTTA GAGTGAATGTGATACATTTT	181
11	CATGATTATCAATATGTGGC GGATCCGACATACACTGAGA	334	22	TCAGGAGGTAGCACATACAT GTCCAATATCTGAAATCTGC	288
12	CTAGCTCCTACCTGACAACA GACATCACTTTGATTACATC	283	23	CTCTGTATTCACTTTCCATG GATATTGGATGACTTGGCAC	214
13	CATATAATAATTCCTAATTG AGAGCATACGAATGGCTAGT	368	24	GCTCAGTATAACTGAGGCTG CTCTGAGTCAGTTAAACAGT	249
			25	GAATTTCTGGGAGTAAATGG GCTTACCTTTACTTTGCCAT	322
			26	ACTGGAAACAACCTAGAAGTG TTAGCACAAAGGTAGAAGGC	317

VI. Resultados

6. RESULTADOS

Foram incluídos nesse estudo oito pacientes não relacionados com diagnóstico ou suspeita de DVW 2N. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes estão resumidos na tabela 7.

Todos esses casos foram investigados para avaliação molecular da região correspondente ao sitio de ligação do FVIII ao FVW. Essa região está localizada nos domínios D' e D3 do FVW e é codificada pelos éxons 17 a 25 do gene do FVW.

6.1. Análise dos resultados do teste de ligação FVW:FVIII B

Para a padronização do teste de ligação do FVIII ao FVW foram realizadas três placas de ELISA onde a placa A corresponde ao teste de ligação FVW:FVIII B (figura 3). Simultaneamente foi realizado o teste para confirmação da concentração do FVW:Ag em cada amostra, utilizando-se as mesmas diluições, placa B (figura 4). A placa C refere-se ao controle das diferentes diluições utilizadas na preparação do rFVIII. (figura 5).

Os resultados do teste de ligação FVW:FVIII B foram avaliados considerando a relação entre a porcentagem de ligação obtida na placa A (FVW:FVIII B) e a concentração do FVW:Ag (placa B) para cada diluição das amostras (figura 6). O valor de referência dessa relação é considerada normal

quando superior a 0,7. Valores entre 0,5 e 0,7 são considerados intermediários e devem ser avaliados considerando os demais dados clínicos e laboratoriais. Quando a relação é inferior a 0,5 considera-se que a ligação foi inadequada, podendo-se tratar de um caso de DVW 2N.

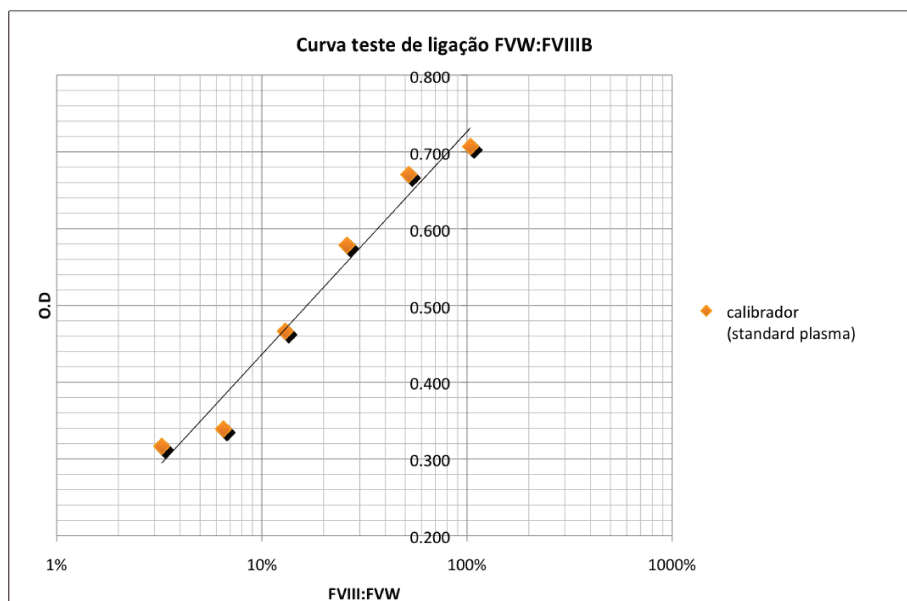


Figura 3. Curva de calibração do teste de ligação FVW:FVIII B. O gráfico mostra a curva de calibração realizada utilizando-se o calibrador comercial em diluições seriadas.

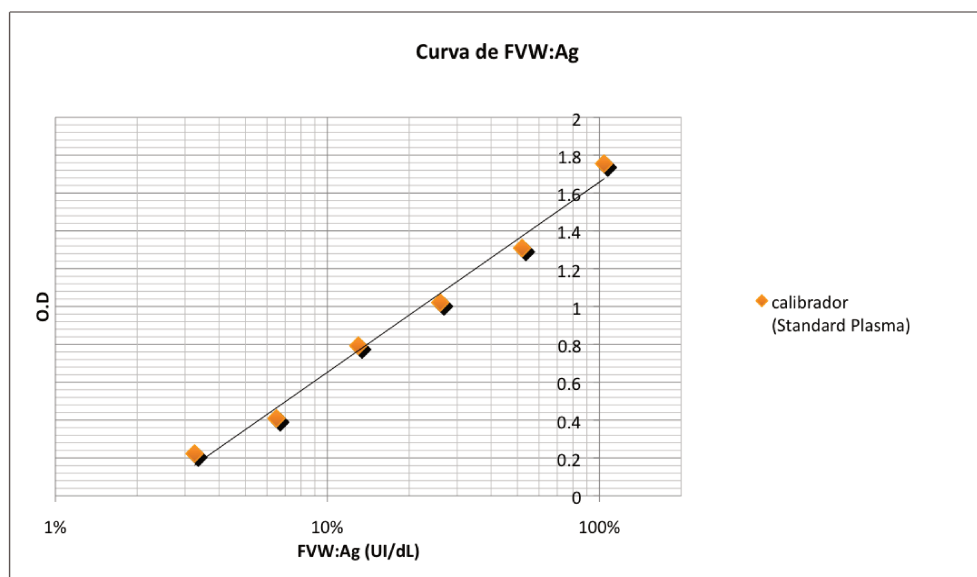


Figura 4. Curva de calibração para quantificação do FVW:Ag. O gráfico mostra a curva de calibração realizada utilizando-se o calibrador comercial em diluições seriadas.

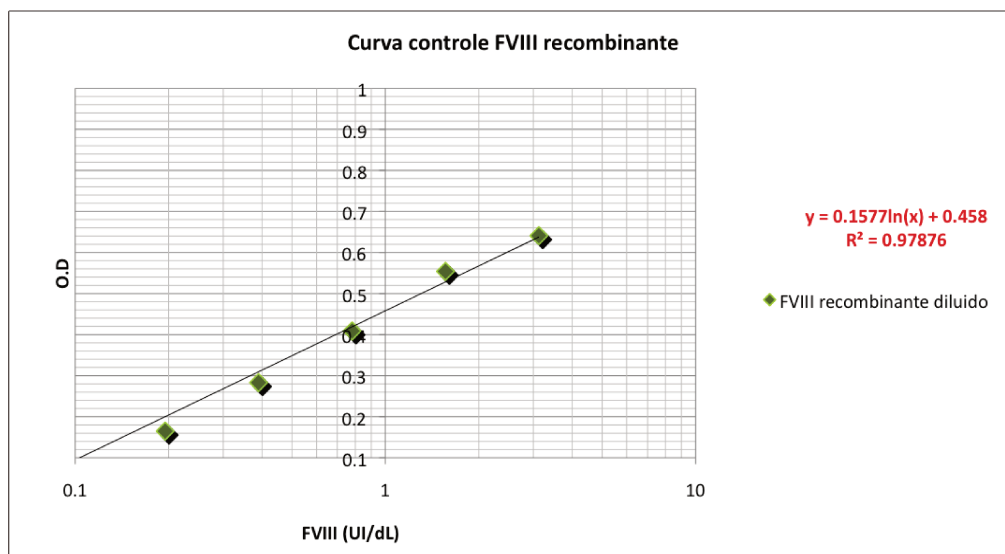


Figura 5. Curva controle do FVIII recombinante. O gráfico mostra a curva de controle das diferentes diluições utilizadas na preparação do rFVIII.

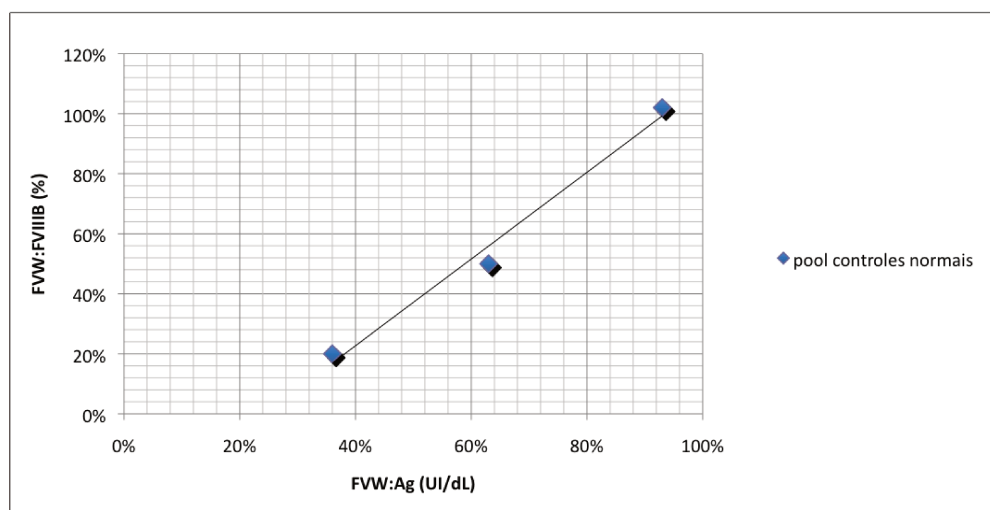


Figura 6. Curva do teste de ligação FVW:FVIIIIB. O gráfico mostra o resultado do teste de ligação do FVW ao FVIII realizada a partir de diluições de amostras de pool de plasma de 25 doadores normais.

Tabela 7. Dados clínicos e laboratoriais dos casos com suspeita diagnóstica de DVW tipo 2N.

Identificação (Iniciais)	Idade (anos)	Sexo	Histórico de sangramento	Parentesco	Dados Familiares	FVIII:C IU/dL (VR 60-150)	FVW:Ag IU/dL (VR 50-150)	FVW:RicoF IU/dL (VR 50-150)	FVW:FVIII B (VR > 0,7)	GS
TG	79	F	hemartrose e hematomas	paciente	irmão com hemartrose	4,2	200	146	0,02	
VMM	23	F	pós extração dentária	paciente	pai e tio: paterno hemofilia B moderada	13 a 44	137	89	0,47	
OM	50	M	hemartrose	pai		184	194	128	0,66	
TRMM	42	F	ausente	mãe		135	120	122	0,74	
DEOM	28	F	hematomas e equimoses	paciente	sem histórico de sangramento	4,3	80	97	0,66	
AM	62	M	ausente	pai		115	113	69	0,89	
MJOM	57	F	ausente	mãe		45	187	148	ND	
LFDO	17	M	equimoses e epistaxe	paciente	sem histórico de sangramento	2,2	83	62	ND	O +
TFCO		F	ausente	mãe		32,6	153	68	ND	
SDS	42	M	sangramento oral	paciente	sobrinhos hematomas, pais consangüíneos	7,9	118	107	0,47	A +
JGHR	7	M	hemartrose e gengivorragia	paciente	sem histórico de sangramento	1,6	90,5	50	ND	O +
MVT	27	F	epistaxe	paciente	pai e tio histórico de epistaxe	1,3	ND	ND	ND	O +
SZM	24	F	hemartrose	paciente	filho com histórico de hematomas	4,5	114	488	ND	A +
FM		M	hematoma	filho		1,6	93,4	ND	ND	

ND: não disponível; VR: valor de referência; GS: grupo sanguíneo.

6.2. Descrição dos casos clínicos

6.2.1. Casos 1: T.G.

Paciente T.G., sexo feminino. Iniciou acompanhamento no Hemocentro da UNICAMP em 2004, aos 72 anos de idade. Apresentava histórico hemorrágico desde a infância, com episódios de hemartrose associados a traumas e hematomas. Aos 37 anos foi diagnosticada com hemofilia A, quando passou a receber transfusões de crioprecipitado durante os episódios hemorrágicos. Nos últimos dez anos fez uso de concentrados de FVIII, no entanto a paciente relata que a resposta para controle dos episódios hemorrágicos era inferior quando comparado à reposição de crioprecipitado. Como complicações apresenta seqüelas articulares em joelhos e hepatopatia crônica secundária ao vírus da hepatite C (HCV), cuja contaminação ocorrida provavelmente associada à transfusão de hemocomponentes.

Paciente nega história de consanguinidade na família. Relata história familiar hemorrágica, sendo que um irmão faleceu por complicações hemorrágicas e apresentava episódios semelhantes de sangramento, sobretudo hemartroses. O mesmo também foi diagnosticado com hemofilia A e recebia transfusões de crioprecipitado (figura 7).

Os exames laboratoriais evidenciaram FVIII:C de 4,3 UI/dL. Os demais exames, incluindo investigação para alteração quantitativa e funcional do FVW foram todos normais, com FVW:Ag de 200 UI/dL, FVW:RicoF de 146 UI/dL e FVW:CBA de 220% (VR: 40 a 232%). Demais exames para avaliação da hemostasia foram normais, incluindo tempo de sangramento (TS) de 6'29" (VR:

2'15" a 9'30 ") e teste de agregação plaquetária. O teste de ligação FVW:FVIII B mostrou uma relação inferior a 0,02 (valor de referência >0,7) (figura 8), sendo interpretado como ausência da ligação do FVIII ao FVW.

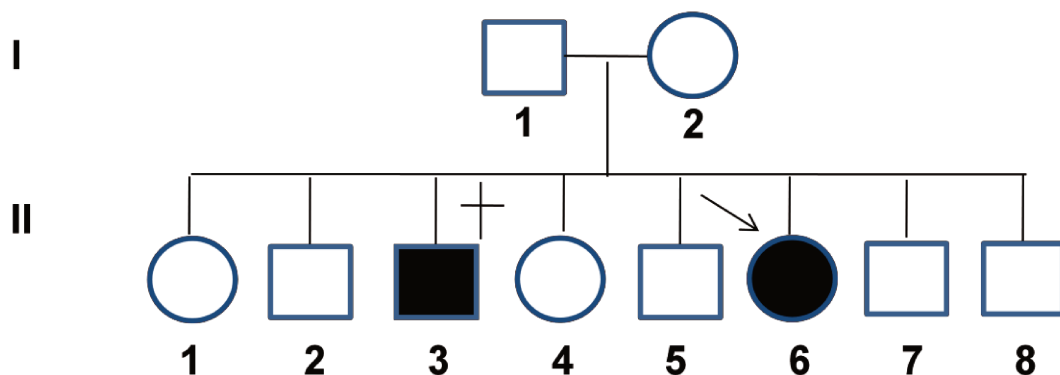


Figura 7. Caso 1. Heredograma. Paciente T.G. (II-6) e seu irmão (II-3), ambos com história de hemorragias recorrentes. Ausência de consanguinidade na família.

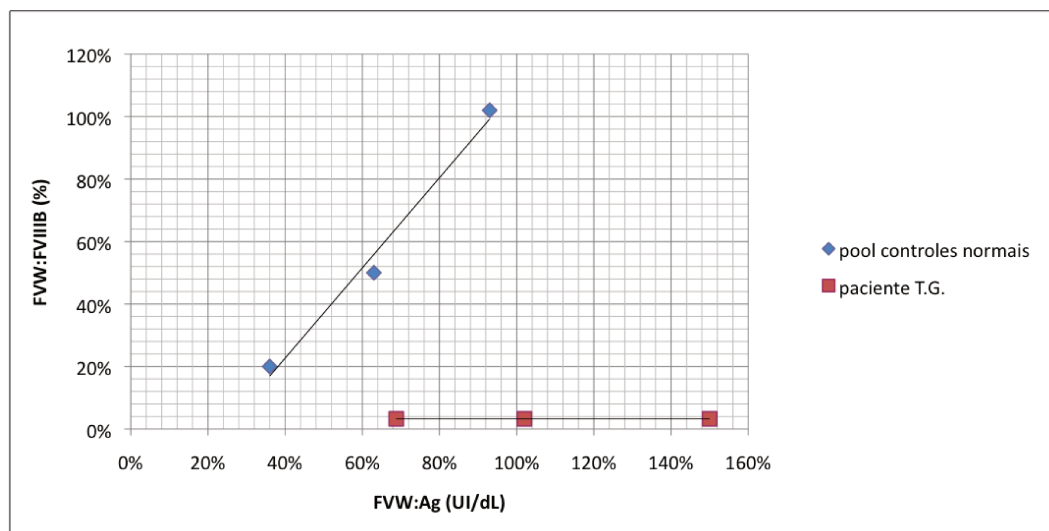


Figura 8. Caso 1. Teste de ligação FVW:FVIII B. O gráfico mostra o resultado do teste de ligação do FVW ao FVIII da paciente (em vermelho) em relação ao resultado obtido na amostra de controle normal, realizada com pool de plasma de 25 doadores normais (azul).

A investigação molecular evidenciou a presença da mutação *missense* em homozigose, com a troca da base 2446 C>T, resultando na troca do aminoácido arginina 816 por um triptofano, R816W. Trata-se de uma das quatro mutações mais freqüentes entre os casos de DVW 2N. A presença da mutação foi confirmada através do seqüenciamento do gDNA e do cDNA do éxon 19 (figura 9).

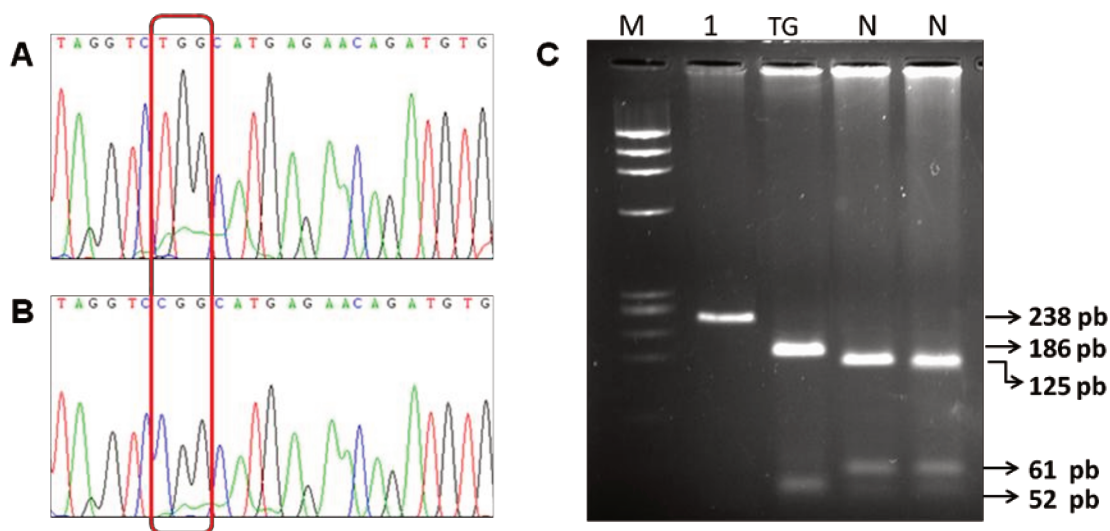


Figura 9. Caso 1. Avaliação molecular da paciente T.G. Foi identificado a presença em homozigose da mutação *missense* 2446 C>T R816W, conforme observado no seqüenciamento do gDNA do fragmento correspondente ao éxon 19 do gene do FVW da paciente (A), comparado com a seqüência da amostra de controle normal (B). A presença da mutação R816W leva à perda de um sítio de restrição pela enzima MSP I, conforme observado no gel de agarose submetido a eletroforese (C). Na coluna 1, presença do fragmento de PCR correspondente ao éxon 19 não digerido, com um fragmento único de 238 pb. TG corresponde a amostra da paciente após a digestão com MSP I, apresentando duas bandas, de 186 pb e 52 pb. N corresponde aos controles normais (três bandas, 125 pb, 61pb e 52 pb). M, marcador de peso molecular (Ø X174 DNA-Hae).

6.2.2. Casos 2: V.M.M.

A paciente V.M.M., do sexo feminino, apresenta história de sangramento apenas relacionada à realização de procedimentos, como extração dentária. No momento a mesma está com 23 anos de idade e nega outros episódios de sangramentos. Os exames laboratoriais mostraram FVIII:C de 13 a 44 UI/dL, FVW:Ag de 137 UI/dL e FVW:RicoF de 89 UI/dL, RIPA 90% . O teste FVW:FVIII:B apresentou uma relação de 0,47, evidenciando uma redução da ligação do FVIII ao FVW.

O pai da paciente, identificado como O.M., é também acompanhado no ambulatório do Hemocentro da UNICAMP com diagnóstico de hemofilia B moderada, apresentando atividade coagulante do fator IX (FIX:C) de 2,3 UI/dL. A paciente possui ainda um tio paterno com o mesmo diagnóstico. Os exames da paciente V.M.M. revelaram FIX:C de 41,3 UI/dL. O diagnóstico de hemofilia B moderada nessa família deve-se a presença da uma mutação *missense* com a troca de base 31163 A>G, levando a troca do aminoácido pM348V, no éxon 8 do gene do fator IX. A mesma mutação foi confirmada em heterozigose na paciente, que de acordo com seu pedigree é portadora obrigatória para essa mutação (figura 10).

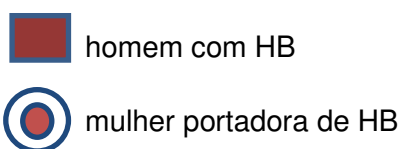
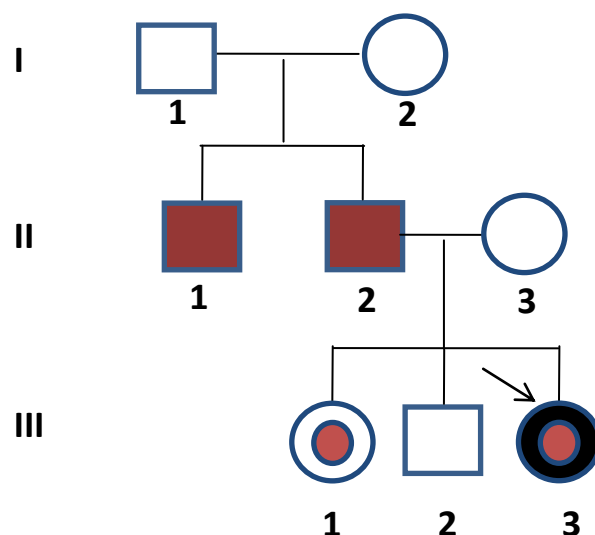


Figura 10. Caso 2. Heredograma. Paciente V.M.M. (III-3), pai (II-1) e tio (II-2), ambos com hemofilia B (HB). Ausência de consanguinidade na família.

A investigação molecular da região correspondente aos éxons 18 a 27 do gene do FVW, evidenciou apenas uma alteração em heterozigose com troca da base 2271 G>A, que leva à troca do aminoácido arginina 924 por uma glutamina, R924Q. Essa alteração R924Q já foi relacionada à DVW Tipo 1 (JAMES, *et al.*, 2007). No entanto, é considerada hoje que se trata de um provável polimorfismo (LESTER, *et al.*, 2008; BERBER, *et al.*, 2009).

Amostras do cDNA sintetizadas a partir do RNA isolado das plaquetas da paciente V.M.M. também foram submetidas ao sequenciamento da região compreendida entre os éxons 16 a 28 do gene do FVW. Novamente apenas a alteração R924Q foi encontrada.

Assim foi realizada a investigação para presença de mutação relacionada à hemofilia A no *F8*. Inicialmente foram descartadas a ocorrência da inversão do intron 1 e do intron 22 do gene do FVIII, mutações comumente encontradas entre casos de hemofilia A grave.

6.2.3. Casos 3: D.E.O.M.

A paciente D.E.O.M., do sexo feminino, é acompanhada no ambulatório do Hemocentro da UNICAMP desde os 28 anos com história de hematomas e equimoses associado a traumas. Os exames laboratoriais mostraram FVIII:C de 4,3 UI/dL, FVW:Ag de 80 UI/dL e FVW:RicoF de 97 UI/dL. O teste FVW:FVIII:B apresentou relação de 0,66, sendo considerado próximo da normalidade.

A paciente não apresenta história familiar hemorrágica nem antecedente de consanguinidade na família. Na investigação laboratorial apenas a mãe apresentou FVIII:C de 45 UI/dL, demais exames para DVW normais (tabela 7). O teste FVW:FVIII:B da amostra da mãe foi prejudicado devido a qualidade da amostra e deverá ser repetido.

A investigação molecular da região correspondente aos éxons 18 a 27 do gene do FVW, assim como o cDNA correspondente aos éxons 16 a 28 do gene do FVW não evidenciou nenhuma alteração que pudesse justificar o quadro.

Foi então realizada a investigação do gene do FVIII. As inversões do íntron 1 e 22 do *F8* foram descartadas. O sequenciamento parcial do gDNA da região correspondente ao gene do FVIII, não evidenciou alteração até o momento e deverá ser concluído.

6.2.4. Casos 4: L.F.D.O.

O paciente L.F.D.O. do sexo masculino, 17 anos, é acompanhado no serviço de hematologia da UNICAMP desde os 12 anos de idade. Apresenta histórico hemorrágico de equimoses desde os 2 anos de idade e desde os 6 anos quadros de epistaxe de repetição. Os dados laboratoriais evidenciaram FVIII:C 3,67 UI/dL, FVW:Ag 83,46 UI/dL e FVW:RicoF 71,2 UI/dL.

Não apresenta história de consanguinidade na família (figura 11). Na investigação familiar apenas a mãe refere episódios de menorragias e na investigação laboratorial apresentou FVIII:C 32,6 UI/dL.

A investigação molecular da região correspondente ao sítio de ligação do FVW ao FVIII (éxons 18 a 27 do gene do FVW) foi realizada utilizando amostras de gDNA e do cDNA e não foram encontradas alterações associadas à DVW 2N.

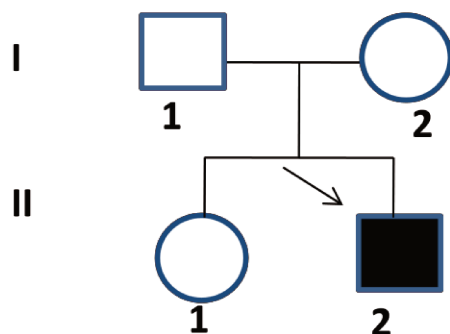


Figura 11. Caso 4. Heredograma. Paciente L.F.D.O (II-2) e sua mãe (I-2) apresentam história de sangramentos cutâneo-mucosos. Sem histórico de consanguinidade.

6.2.5. Casos 5: S.D.S.

O paciente S.D.S. do sexo masculino, 43 anos, é acompanhado no serviço de hematologia da UNICAMP desde os 37 anos de idade. Apresenta histórico hemorrágico desde infância associado a traumas. Os dados laboratoriais

evidenciaram FVIII:C 7,9 UI/dL, FVW:Ag 118 UI/dL e FVW:RicoF 107 UI/dL. Teste de agregação plaquetária normal com ristocetina, adenosina difosfato (ADP), adrenalina, colágeno, ácido aracdônico. O teste FVW:FVIII:B apresentou relação de 0,47, sendo considerado alterado.

Refere que pais são primos em segundo grau. Refere que mãe apresentava história de sangramento associado a procedimentos dentários e dois sobrinhos, filhos de duas irmãs apresentam história de hemorragias associada a traumas. A dosagem do FVIII:C dos sobrinhos foi de 5,76 UI/dL e 6,5 UI/dL (figura 12).

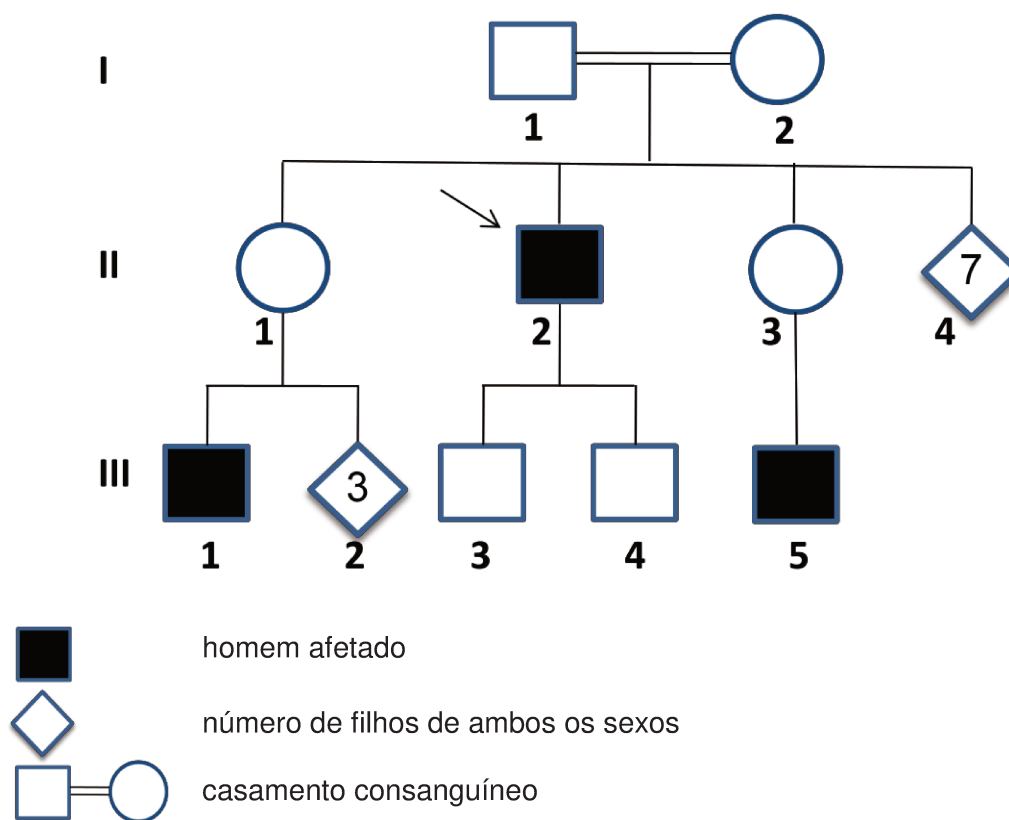


Figura 12. Caso 5. Heredograma. Paciente S.D.S. (II-2) e os sobrinhos (III-1 e III-5) apresentam história hemorrágica e deficiência de FVIII. Pais primos em segundo grau, sendo a mãe (I-2) história de hemorragias.

A investigação molecular da região correspondente aos éxons 18 a 27 do gene do FVW, assim como o cDNA correspondente aos éxons 16 a 28 do gene do

FVW não evidenciou nenhuma alteração que pudesse justificar o quadro. O sequenciamento parcial do gDNA da região correspondente ao gene do FVIII, não evidenciou alteração até o momento e deverá ser concluído.

6.2.6. Casos 6: J.G.H.R.

Paciente J.G.H.R. é acompanhado no HEMOES, em Vitória, ES. Atualmente com 7 anos de idade e história de gengivorragia e esporadicamente hemartrose. Não possui história familiar para sangramento. Na investigação observado FVIII:C 1,6 UI/dL, FVW:Ag de 90,5 UI/dL e FVW:RicoF de 50 UI/dL.

Esse caso foi encaminhado com suspeita clínica de DVW 2N, sobretudo pela história hemorrágica predominante de sangramento cutâneo-mucoso e reposta ao tratamento de reposição com concentrado de FVIII pouco satisfatório. Foi realizada a investigação molecular da região correspondente aos éxons 18 a 27 do gene do FVW que não evidenciou nenhuma alteração que pudesse justificar o quadro. O sequenciamento parcial do gDNA da região correspondente ao gene do FVIII, não evidenciou alteração até o momento e deverá ser concluído.

6.2.7. Casos 7: M.V.T.

A paciente M.V.T. do sexo feminino, atualmente com 28 anos de idade, é acompanhado no HEMOES, em Vitória, ES. História hemorrágica de epistaxe assim como seu pai e tio paterno (figura 13). Não há relato de consangüinidade, ou história hemorrágica do lado materno. Os exames laboratoriais mostraram

FVIII:C de 1,3 UI/dL. Os demais exames não puderam ser realizados por falta de amostra adequada.

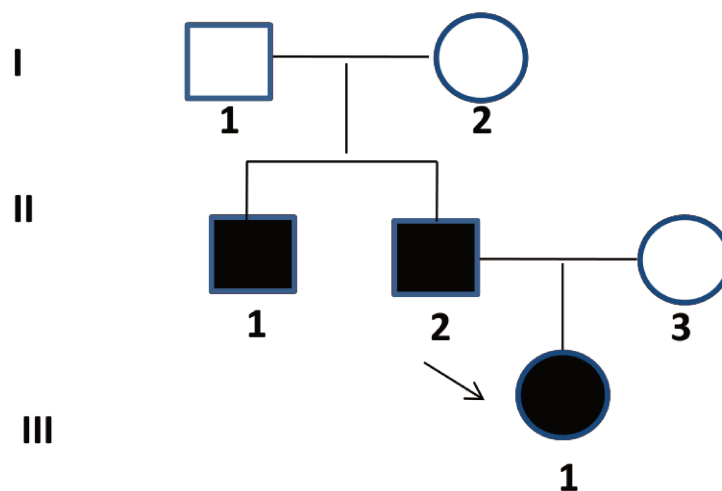


Figura 13. Caso 7. Heredograma. Paciente M.V.T. (III-1), seu pai (II-2) e o tio paterno (II-1) apresentam história hemorrágica e deficiência de FVIII.

A investigação molecular da região correspondente ao sítio de ligação do FVW ao FVIII (éxons 18 a 27 do gene do FVW) foi realizada utilizando amostras de gDNA e não foram encontradas alterações associadas à DVW 2N. O seguimento da investigação molecular consistiu do seqüenciamento do gene do FVIII, tendo sido encontrada a presença em homozigose de uma troca na posição G265 +1 G>T no íntron 3 do gene do FVIII (figura 14). Essa mutação não foi descrita anteriormente na literatura e corresponde a uma região de um sítio doador de *splice*.

Diante das alterações laboratoriais o diagnóstico de hemofilia A grave/moderada está confirmado nessa paciente do sexo feminino.

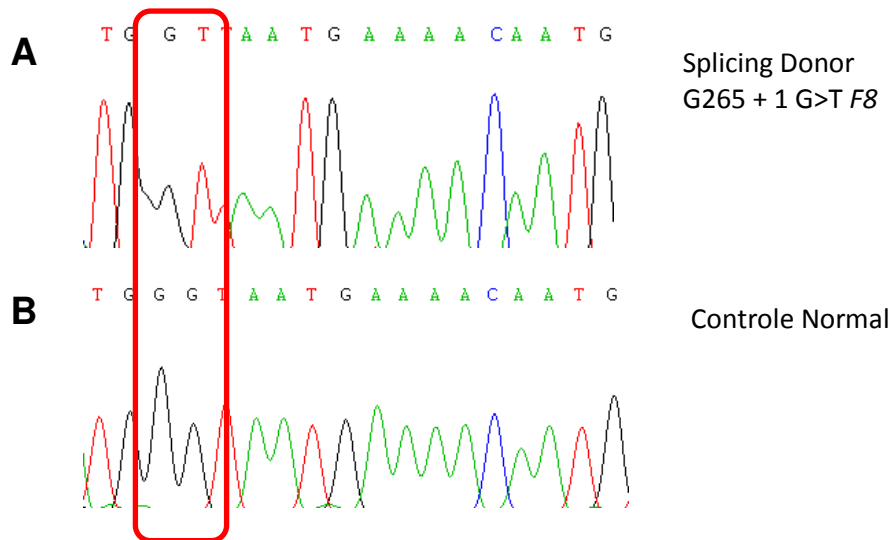


Figura 14. Caso 7. Avaliação molecular do gene do FVIII da paciente M.V.T.. Foi identificado a presença em homozigose da mutação *missense* G265+1 G>T no íntron 3 do gene do FVIII. O genótipo confirma o diagnóstico de hemofilia A grave/moderada para a paciente.

6.2.8. Casos 8: S.Z.M.

Paciente S.Z.M., sexo feminino, 24 anos, é acompanhada em Cuiabá, MT. História de sangramento desde infância com episódios freqüentes de hemartrose, evoluindo com artropatia hemofílica em joelho esquerdo e cotovelo direito. No histórico familiar, filho apresenta hematomas associados a traumas. Na avaliação laboratorial observado FVIII:C 4,5 UI/dL, FVW:Ag de 114 UI/dL e FVW:Ricof de 488 UI/dL (exames realizados no serviço de origem). O filho F.M. realizou investigação laboratorial, sendo constatado FVIII:C 1,6 UI/dL, FVW:Ag de 93,4 UI/dL e FVW:CBA de 102,6 % (VR: 50 a 150 %).

A investigação molecular da região correspondente aos éxons 18 a 27 do gene do FVW não evidenciou nenhuma alteração que pudesse justificar o quadro.

O seqüenciamento parcial do gDNA da região correspondente ao gene do FVIII, não evidenciou alteração até o momento e deverá ser concluído.

6.3. Avaliação das quatro mutações relacionadas à DVW tipo 2N em casos previamente diagnosticados como hemofilia A moderada e leve.

Nesse estudo foram realizadas a investigação das quatro mutações mais comuns associadas à DVW tipo 2N, incluindo, E787K, R816W, H817Q, e R854Q. Foram avaliados total de 67 casos não relacionados, incluindo 31 pacientes com diagnóstico de hemofilia A moderada (FVIII:C 1 a 5 UI/dL) e 36 pacientes com hemofilia A leve (FVIII:C 6 a 40 UI/dL). Esses casos são acompanhados no Hemocentro da UNICAMP.

As quatro mutações da região do gene do FVW correspondente ao sítio de ligação do FVIII ao FVW e que estão relacionadas à DVW tipo 2N foram excluídas em todos os casos de hemofilia A moderada e leve avaliados. Essas mutações não estavam presentes nem em heterozigose.

VII. Discussão

7. DISCUSSÃO

A DVW tipo 2N é pouco comum e freqüentemente pode ser diagnosticada erroneamente como hemofilia A, uma vez que apresenta predominantemente redução na quantidade de fator VIII coagulante (SADLER, 1994). Uma das principais diferenças entre as duas patologias é o padrão de hereditariedade, onde a DVW tipo 2N possui herança autossômica recessiva e a hemofilia é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X. O quadro clínico entre as duas patologias é semelhante, no entanto, a DVW tipo 2N apresenta uma resposta terapêutica inferior ou inadequada ao tratamento de reposição realizado com concentrado de FVIII, sendo indicado a reposição simultaneamente do FVIII e FVW. Portanto, o diagnóstico diferencial entre as duas patologias é crítico para o aconselhamento genético apropriado e o tratamento adequado.

As mutações relacionadas à DVW tipo 2N estão localizadas entre os éxons 18 a 25 do gene do FVW, o que corresponde ao domínio D' e parte do domínio D3 na proteína, região onde está localizado o sítio de ligação do FVIII no FVW, localizado entre os aminoácidos 764 a 1035 da proteína pré-pró-FVW (FOSTER *et al.*, 1987). Devido a falta da ligação do FVIII ao FVW, o FVIII fica vulnerável à proteólise, acelerando assim seu clearance.

O diagnóstico laboratorial da DVW tipo 2N é baseado na ocorrência de diminuição do FVIII:C e níveis normais de FVW:Ag, assim como os testes funcionais do FVW também não apresentam alteração (FEDERICI, 2006). O diagnóstico laboratorial confirmatório é feito através do teste de ligação do FVIII ao gene do FVW ou VWF:FVIII:B. No entanto, esse teste é complexo em sua

execução e reprodutividade, não sendo facilmente disponível em todos os serviços. Uma das dificuldades encontradas em nosso meio é o acesso ao concentrado de fator VIII recombinante. Esse é o produto recomendado para realização desse teste, pois não há o risco de interferência com a presença de FVW como há em outros produtos, como o pdFVIII. Embora o rFVIII seja atualmente um produto disponível para o tratamento de pacientes hemofílicos no Brasil, sua compra em nosso país está normalmente vinculada apenas à grandes aquisições e não ao mercado interno para uso laboratorial.

O diagnóstico confirmatório dos casos suspeitos de DVW tipo 2N é muitas vezes baseado na investigação molecular da região correspondente ao sítio de ligação do FVIII ao FVW no gene do FVW. Essa é uma das alternativas mais utilizadas em vários centros onde há laboratórios de biologia molecular.

Nesse estudo foram incluídos oito casos não relacionados, acompanhados no Hemocentro da Unicamp e no Hemocentro do Espírito Santo, onde a suspeita diagnóstica era de DVW tipo 2N. Essa hipótese diagnóstica na maioria das vezes era baseada na história clínica e familiar, sobretudo no padrão de hereditariedade. Na investigação desses indivíduos, a realização do teste FVW:FVIII:B não foi conclusiva para todos os casos. Apenas um caso tem confirmado o diagnóstico de DVW tipo 2N, o caso 1 (paciente T.G.), que posteriormente teve a comprovação diagnóstica baseada no resultado molecular. Entre os outros casos em que o teste foi possível de ser realizado 3 apresentaram resultado da relação FV:FVIII:B e FVW:Ag inferior que a normalidade ($< 0,7$). De fato, em dois casos esse resultado foi $< 0,5$, considerado como provável diagnóstico de DVW tipo 2N. Nem todos os casos foram testados por falta de amostra, ou o resultado não foi reproduzível.

Dessa maneira todos os oito casos incluídos foram avaliados através do seqüenciamento da região compreendida entre os éxons 18 a 27 do gene do FVW. Essa avaliação foi realizada através do seqüenciamento em duplicada de cada fragmento, repetido em dois laboratórios distintos. Além disso, quatro casos, onde foi possível a obtenção do cDNA dessa região a partir de amostras de RNAm extraídas de plaquetas, o seqüenciamento dos éxons 16 a 28 foi repetida.

Apenas um paciente, entre os oito casos não relacionados incluídos, teve a confirmação do diagnóstico de DVW tipo 2N através da identificação da mutação relacionada. A paciente T.G., cujo resultado do teste da ligação FVW:FVIIIIB já comprovava o diagnóstico de DVW tipo 2N apresenta a mutação *missense* R816W em homozigose. Essa mutação já foi descrita anteriormente (GAUCHER *et al.*, 1991) e de fato, corresponde a 11% das mutações entre os casos com DVW tipo 2N (GOODEVE, 2005). A mutação R816W no FVW está geralmente associada a níveis de FVIII:C inferiores a 10 UI/dL (LILLICRAP, 2009), como observado no caso aqui descrito onde a paciente possui FVIII:C 4 UI/dL. Além disso, embora nos casos onde o nível de FVIII é muito baixo, não se observa resposta adequada ao DDAVP, foi recentemente descrito que pacientes portadores da mutação R816W obtiveram correção completa dos níveis de FVIII após administração de DDAVP (CASTAMAN, et al., 2009). A paciente T.G. não foi testada para o uso de DDAVP devido sua idade e demais complicações que apresenta no momento.

Um dos casos, a paciente V.M.M., também apresentou alteração na região do sítio de ligação do FVIII no gene do FVW. Foi observado que a paciente apresenta a alteração em heterozigose R924Q. Apesar da alteração R924Q, ter

sido anteriormente publicada como relacionada à DVW Tipo 1 (JAMES, *et al.*, 2007), sabe-se hoje que trata-se de um provável polimorfismo e não está associada com deficiência da ligação do FVIII (LESTER, *et al.*, 2008; BERBER, *et al.*, 2009). Interessante notar que essa mesma paciente possui história familiar para hemofilia B moderada, sendo portadora obrigatória, uma vez que seu pai tem o diagnóstico de hemofilia B. Isso foi comprovado através da determinação da mutação pM348V, no éxon 8 do gene do fator IX, na amostra de DNA da paciente e de seu pai e tio paterno.

Os casos onde foi descartado a presença de mutação na região analisada do gene do FVW, foram então submetidos a investigação molecular do gene do FVIII, considerando que o fenótipo predominantes desses casos é a presença de diminuição do FVIII:C isoladamente. Embora não tenha sido possível até o momento a conclusão de todos os casos, foi encontrado em um dos casos, a paciente M.V.F., do sexo feminino, a presença em homozigose de uma troca na posição G265 +1 G>T no íntron 3 do gene do FVIII, que corresponde a uma região de um sítio doador de *splice*. Essa mutação não foi descrita anteriormente na literatura. É importante observar que a paciente não possui antecedente do lado materno para hemorragias, nem história de consangüinidade dos pais. Como não tivemos acesso a amostras de DNA do pai ou da mãe. O fragmento analisado não apresentava polimorfismos em heterozigose que pudessem comprovar a presença de dois alelos. Portanto não está descartado que a mutação encontrada esteja em hemizogose e que tenha ocorrido perda do outro alelo.

Ainda como parte desse estudo foram analisadas as quatro mutações mais freqüentes relacionadas à DVW tipo 2N, sendo E787K, R816W, R854Q e H817Q.

Essas mutações respondem juntas por mais de 50% das mutações encontradas em casos descritos de DVW tipo 2N (GOODEVE, 2005). Em um recente estudo realizado em Porto Alegre, RS (SIMON & ROISENBERG, 2004) foi observado que entre 42 hemofílicos leve, sem antecedente familiar para hemofilia, quatro pacientes (9,5%) e dois casos novos entre seis mulheres em investigação de história hemorrágica, apresentavam uma dessas quatro mutações. Entre esses casos, 3 casos foram heterozigotos para pelo menos uma mutação, não tendo sido evidenciada a outra alteração. Dois outros casos foram homozigotos para a mutação R816W e um caso foi heterozigoto para R854Q associado à perda do outro alelo.

Para avaliarmos a influência dessas quatro mutações entre os pacientes acompanhados no Hemocentro da UNICAMP com o diagnóstico de hemofilia A, as mutações do gene do FVW, E787K, R816W, R854Q e H817Q, foram avaliadas em 67 pacientes não relacionados com diagnóstico de hemofilia A, sendo 31 com hemofilia A moderada e 36 com hemofilia A leve. Em nenhum desses casos foi encontrado a presença dessas mutações. Portanto, embora a DVW tipo 2N tenha sido encontrada entre pacientes hemofílicos em outro centro no Brasil, entre nossos pacientes não constatamos a mesma ocorrência.

VIII. Conclusões

8. CONCLUSÕES

Esse estudo tem como conclusões:

1. Apenas um dos oito casos não relacionados com diagnóstico ou suspeita de DVW tipo 2N teve esse diagnóstico confirmado após a investigação molecular da região no gene do FVW relacionada a essa alteração.
2. Foi confirmada a presença da mutação R816W em homozigose, que também está envolvida no diagnóstico de 11% dos casos descritos na literatura onde a mutação relacionada à DVW tipo 2N foi identificada.
3. O teste de ligação FVW:FVIIIIB embora tenha sido sensível para a detecção do único caso confirmado de DVW tipo 2N, foi inconclusivo para os demais casos onde a mutação foi descartada. Isso prova a difícil reprodutividade desse teste.
4. A investigação da presença das quatro mutações relacionadas à DVW tipo 2N foi descartada entre 67 pacientes não relacionados com diagnóstico de hemofilia A moderada ou leve acompanhados no Hemocentro da UNICAMP.

IX. Referências Bibliográficas

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARRUDA VR, PIENEMAN WC, REITSMA PH, DEUTZ-TERLOUW PP, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, BRIËT E, COSTA FF. Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. **Blood**. Oct 15;86(8):3015-20, 1995.
- BERBER E, JAMES PD, HOUGH C, LILLICRAP D. An assessment of the pathogenic significance of the R924Q von Willebrand factor substitution. **J Thromb Haemost**. Oct;7(10):1672-9, 2009.
- BUTENAS S, MANN KG. Blood coagulation. **Biochemistry (Mosc)**. Jan;67(1):3-12, 2002.
- CASONATO A, PONTARA E, ZERBINATI P, ZUCCHETTO A, GIROLAMI A. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: significance and practical implications. **Am J Clin Pathol**., Mar;109(3):347-52, 1998.
- CASTAMAN G, LETHAGEN S, FEDERICI AB, TOSETTO A, GOODEVE A, BUDDE U, BATLLE J, MEYER D, MAZURIER C, FRESSINAUD E, GOUDEMAND J, EIKENBOOM J, SCHNEPPENHEIM R, INGERSLEV J, VORLOVA Z, HABART D, HOLMBERG L, PASI J, HILL F, PEAKE I, RODEGHIERO F. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. **Blood**. Apr 1;111(7):3531-9, 2008.
- DAVIS LG, DILNER MD, BATTEY JF. **Basic methods in molecular biology**. Nova York, Elsevier Science, 1986.
- GAUCHER C, JORIEUX S, MERCIER B, OUFKIR D, MAZURIER C. The "Normandy" variant of von Willebrand disease: characterization of a point mutation in the von Willebrand factor gene. **Blood**, May 1;77(9):1937-41, 1991.
- GAUCHER C, MERCIER B, JORIEUX S, OUFKIR D, MAZURIER C. Identification of two point mutations in the von Willebrand factor gene of three families with the "Normandy" variant of von Willebrand disease. **Br J Haematol**, Aug 78 (4):506-14, 1991.
- GISNBURG D, HANDIN RI, BONTHRON DT, DONLON TA, BRUNS GA, LATT SA, ORKIN SH. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. **Science**, Jun 21;228(4706):1401-6, 1985.
- GOODEVE A. Genotypic classification of von Willebrand disease. **Haematologica**, 1(4):16-9, 2005.
- HILBERT L, D'OIRON R, FRESSINAUD E, MEYER D, MAZURIER C. First identification and expression of a type 2N von Willebrand disease mutation (E1078K) located in exon 25 of von Willebrand factor gene. **J Thromb Haemost**., Dec;2(12):2271-3, 2004.

FEDERICI AB. Diagnosis of inherited von Willebrand disease: a clinical perspective. **Semin Thromb Hemost.**, Sep;32(6):555-65, 2006.

FOSTER PA, FULCHER CA, MARTI T, TITANI K, ZIMMERMAN TS. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biological Chemistry*, 262: 8443-6, 1987.

JAMES PD, NOTLEY C, HEGADORN C, LEGGO J, TUTTLE A, TINLIN S, BROWN C, ANDREWS C, LABELLE A, CHIRINIAN Y, O'BRIEN L, OTHMAN M, RIVARD G, RAPSON D, HOUGH C, LILICRAP D. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. **Blood**. Jan 1;109(1):145-54.et al., 2007.

KAKELA JK, FRIEDMAN KD, HABERLICHTER SL, BUCHHOLZ NP, CHRISTOPHERSON PA, KRONER PA, GILL JC, MONTGOMERY RR, BELLISSIMO DB. Genetic mutations in von Willebrand disease identified by DHPLC and DNA sequence analysis. **Mol Genet Metab.**, Mar;87(3):262-71, 2005.

KEENEY S, CUMMING AM. The molecular biology of von Willebrand disease. **Clin Lab Haematol.**, Aug;23(4):209-30, 2001.

LESTER W, GUILLIATT A, GRUNDY P, ENAYAT S, MILLAR C, HILL F, CUMMING T, COLLINS P. Is VWF R924Q a benign polymorphism, a marker of a null allele or a factor VIII-binding defect? The debate continues with results from the UKHCDO VWD study. **Thromb Haemost.** Oct;100(4):716-8, 2008.

LILICRAP D. Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty? **J Thromb Haemost**, 7 (Suppl. 1): 65–70, 2009.

MAZURIER C, GOUDEMAND J, HILBERT L, CARON C, FRESSINAUD E, MEYER D. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. **Best Pract Res Clin Haematol.**, Jun;14(2):337-47, 2001.

NISHINO M, GIRMA JP, ROTHSCHILD C, FRESSINAUD E, MEYER D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. **Blood**, Oct;74(5):1591-9, 1989.

O'BRIEN LA, JAMES PD, OTHMAN M, BERBER E, CAMERON C, NOTLEY C, HEGADORN C, et al. Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. **Blood** 2003; **102**:549-557.

RODEGHIERO F, CASTAMAN G, DINI E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand disease. **Blood**, 69: 454-9, 1987.

RUGGERI ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **J Thromb Haemost.**, Jul;1(7):1335-42, 2003.

SADLER, J.E. A revised classification of von Willebrand disease. **Thrombosis and Haemostasis**, 71:520-525, 1994.

SADLER JE, BUDDE U, EIKENBOOM JC, FAVALORO EJ, HILL FG, HOLMBERG L, INGERSLEV J, LEE CA, LILICRAP D, MANNUCCI PM, MAZURIER C, MEYER D, NICHOLS WL, NISHINO M, PEAKE IR, RODEGHIERO F, SCHNEPPENHEIM R,

RUGGERI ZM, SRIVASTAVA A, MONTGOMERY RR, FEDERICI AB; THE WORKING PARTY ON VON WILLEBRAND DISEASE CLASSIFICATION. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. **J Thromb Haemost.**, 4(10):2103-14, 2006.

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-91, 1988.

SIMON D, ROISENBERG I. Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. **Haemophilia.**, Sep;10(5):473-6, 2004.

TAYLOR, S.L. BROMIDGE, E. SAVIDGE, G.F. ALHAQ, A. Evaluation of an automatic screening assay for von Willebrand disease type 2N. **Clin. Lab. Haem.** 24: 369-75, 2002.

VERWEIJ CL, DE VRIES CJ, DISTEL B, VAN ZONNEVELD AJ, VAN KESSEL AG, VAN MOURIK JA, PANNEKOEK H. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. **Nucleic Acids Res.**, Jul 11;13(13):4699-717, 1985.

WERNER EJ, BROXSON EH, TUCKER EL, GIROUX DS, SHULTS J, ABSHIRE TC. Prevalence of VWD in children: a multiethnic study. **J Pediatr**, 123: 893-8, 1993.

X. Anexos

ANEXO 1

10.1.1 Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 31/01/07.
(Grupo II)

PARECER PROJETO: N° 666/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0536.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PORTADORES DE DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 2N E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CASOS DE HEMOFILIA A"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Benedini Damiano
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/11/06
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/11/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Caracterizar a mutação presente entre os casos atualmente acompanhados no Hemocentro da Unicamp com diagnóstico de doença de von Willebrand (DVW) tipo 2N; Avaliar o diagnóstico diferencial de DVW tipo 2N entre os pacientes previamente diagnosticados como hemofílicos A moderados (FVIII: C 1 a 5%) ou leves (FVIII: C 6 a 40%) acompanhados no Hemocentro da Unicamp.

III - SUMÁRIO

A presente pesquisa trata-se de um estudo do tipo exploratório/descritivo, onde os sujeitos serão 200 pacientes acompanhados no Ambulatório de Hemostasia da Unicamp com diagnóstico de DVW tipo 2N ou hemofilia A moderada ou leve. Será realizado um levantamento do histórico clínico e laboratorial de todos os casos incluídos nesse estudo. Também será realizado: a extração do DNA genômico; avaliação das quatro mutações no gene do FVW mais frequentes entre os casos de DVW 2N e avaliação das sequências nucleotídicas dos éxons 18 a 27 do gene do FVW.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O presente estudo descreve riscos mínimos, pois será coletada amostra sanguínea e aplicado um questionário para levantamento de dados pessoais. Porém o mesmo será suspenso se algum risco ou dano à saúde do indivíduo for percebido ou, se o mesmo, sujeito da pesquisa, assim o desejar. Os sujeitos da pesquisa poderão obter benefícios imediatos, visto que poderão ocorrer intervenções na conduta médica após a obtenção dos dados de correlação clínico-laboratoriais obtidos. Os resultados dos exames serão repassados ao sujeito da pesquisa e aos

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



seus familiares por um médico, ou profissional habilitado. Ele dará todas as explicações sobre a alteração genética e ainda vai orientá-lo quanto às possibilidades de outras pessoas de sua família apresentar o mesmo problema. O armazenamento de material biológico será feito no Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia do Hemocentro da Unicamp após consentimento do paciente. O orçamento será concedido pelo programa de Hemofilia da Bayer (Bayer Hemophilia Awards Program Grants). O TCLE está bem redigido, contemplando as normas da resolução 196/96 e complementares.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de novembro de 2006.


Prof. Dr. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 61311
13084-971 Campinas - SP

fone (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br

10.1.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Centro de Hematologia e Hemoterapia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE: _____
REGISTRO HOSPITALAR-HC: _____
DATA NASCIMENTO: ____/____/____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M Ž F Ž
DATA NASCIMENTO: ____/____/____
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO. _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____
TELEFONE: DDD (____) _____
2. RESPONSÁVEL LEGAL _____
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : _____ SEXO: M Ž F Ž
DATA NASCIMENTO: ____/____/____
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "**Caracterização molecular de portadores de doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico diferencial entre casos de hemofilia A**".

PESQUISADORES:

Guilherme Benedini Damião: Aluno de Mestrado - Departamento Clínica Médica

Margareth Castro Ozelo, CRM: 77434 CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente, Orientadora

UNIDADE DA FCM - UNICAMP: Serviço de Hematologia e Hemoterapia – HEMOCENTRO UNICAMP

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. justificativa e os objetivos da pesquisa:** os médicos do Hemocentro da UNICAMP que acompanham pacientes portadores de doenças associadas a sangramentos, tais como hemofilia e doença de von Willebrand, estão fazendo uma pesquisa chamada: "**Caracterização molecular de portadores de doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico diferencial entre casos de hemofilia A**". O objetivo deste estudo é avaliar entre os pacientes com diagnóstico de doença de von Willebrand tipo 2N, quando ocorre a diminuição do fator VIII no sangue, a causa molecular que resultou na ocorrência da doença, ou seja, determinar qual foi o defeito no DNA daquele paciente que causou a doença. A determinação desta alteração no DNA (mutação) é importante para confirmar o diagnóstico e possibilitará orientar os familiares sobre os riscos de outras pessoas na família apresentarem o mesmo problema, ou terem filhos com essa doença. Além disso, como a doença de von Willebrand tipo 2N é muito parecida com alguns casos de hemofilia A, estaremos convidando os pacientes com hemofilia A moderada (quando o fator VIII no sangue está entre 1 a 5%) ou hemofilia A leve (fator VIII no sangue entre 6 a 40%) a serem investigados sobre esses mesmos defeitos da doença de von Willebrand tipo 2N, pois é comum que tenham

recebido um diagnóstico errado de hemofilia. Não existem outros exames disponíveis que facilitam a confirmação dos diagnósticos entre hemofilia A e doença de von Willebrand 2N. A certeza do diagnóstico correto é muito importante, pois existem diferenças no tratamento, na orientação dos familiares e na chance de terem filhos com uma das duas doenças.

- 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** se você/seu filho (a) concordar em participar deste estudo, após a assinatura deste documento, o Termo de Consentimento, serão coletas amostras de sangue (em torno de 10 ml de sangue no total) que serão utilizadas para: obter o DNA que será utilizado para pesquisar a presença ou não da mutação (alteração) relacionada a doença de von Willebrand 2N. Esta mesma alteração poderá ser pesquisada em outros membros da sua família, desde que seja do desejo destas pessoas saber se também apresentam risco de ter a doença ou de terem filhos que possam apresentar a doença. Neste caso, será solicitada amostra de sangue (em torno de 10 ml de sangue no total) também para os outros membros da família. Nenhuma alteração ou interferência em seu tratamento será feita em decorrência de sua participação nesse estudo. Um questionário, com perguntas sobre você, o diagnóstico e evolução da sua doença, assim como, alguns dados de sua família, será feito por seu médico, para que se possa entender melhor os resultados que esperamos encontrar. Você terá assegurado o direito de livre acesso aos resultados dos exames realizados nesse estudo. Gostaríamos de solicitar ainda sua autorização para mantermos armazenado o seu material genético (DNA) em nosso laboratório. Caso haja a possibilidade de utilizarmos esta amostra em projetos de pesquisa futuros, mediante aprovação dos comitês de ética, você será anteriormente informado e novamente solicitaremos sua autorização para que a pesquisa possa ser realizada.
- 3. desconfortos e riscos esperados:** durante a coleta de sangue você pode sentir dor. Pode ficar uma mancha roxa no local da coleta.
- 4. acesso aos resultados:** os resultados de seus exames e dos exames de seus familiares, realizados durante esta pesquisa serão repassados a você e a seus

familiares por um médico, ou profissional habilitado. Ele dará todas as explicações sobre sua alteração genética e ainda vai orientá-lo(a) quanto as possibilidades de outras pessoas de sua família apresentarem o mesmo problema. Você e/ou seus familiares também têm o direito de não ser informado do resultado, caso seja essa a escolha.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.** Se você tiver qualquer dúvida ou pergunta sobre este estudo, você pode entrar em contato com o Hemocentro para esclarecimento.
 - 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.** Se você concordar em participar no estudo "**Caracterização molecular de portadores de doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico diferencial entre casos de hemofilia A**", você poderá mudar de idéia e se retirar do estudo a qualquer momento. Se você não quiser participar, você continuará a ser tratado normalmente aqui no Hemocentro da UNICAMP.
 - 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** Será mantido sigilo dentro dos limites da lei. Os arquivos de pesquisa do estudo serão identificados por um código numérico e este código vai ficar em lugar seguro, com acesso restrito aos médicos do Hemocentro da UNICAMP.
 - 4. disponibilidade de assistência no Hemocentro da UNICAMP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.** Caso aconteça algum problema durante a coleta, você terá atendimento gratuito da equipe do Hemocentro da UNICAMP.
-

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA
CONTATO.**

Em caso de qualquer intercorrência, entrar em contato com o Hemocentro da UNICAMP (Dra Margareth Castro Ozelo; Dr Erich Vinícius de Paula; ou com o biólogo Guilherme Benedini Damião) pelos telefones (19) 3521-8715; (19) 3521-8755. Nos finais de semana, feriados e no período das 19h às 8h, ligar para (19) 3521-7246 no serviço de Transfusão do HC-UNICAMP.

Comitê de Ética em Pesquisa – FCM Tel.: (19) 3521-8936

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, intitulado: **"Caracterização molecular de portadores de doença de von Willebrand tipo 2N e diagnóstico diferencial entre casos de hemofilia A"**.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

Assinatura de uma testemunha

Data

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Data

VII - CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DE DNA / RNA

Obs: Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter seu DNA (de seu filho (a)) armazenado em nosso Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que meu DNA seja armazenado”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Além disso, você poderá retirar o seu material biológico a qualquer momento da pesquisa. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que meu DNA seja armazenado”.

[] SIM, eu aceito que meu DNA / RNA seja armazenado _____

[] NÃO, não aceito que meu DNA / RNA seja armazenado _____

_____, ____ de ____ de ____.
local dia mês ano

ANEXO 2

10.2. Publicação:

“Molecular Evaluation of Factor VIII Binding Site in von Willebrand Factor Gene in Suspected Cases of Type 2N von Willebrand Disease.”

Guilherme B. Damian, Andrey dos Santos, Lúcia H. Siqueira, Alessandra Prezoti, Joyce M. Annichino-Bizzacchi, Erich V. De Paula, Margareth C. Ozelo.

Submetido para publicação no periódico: *Blood Coagulation & Fibrinolysis*

ANEXO 3

10.3. Apresentação em congressos:

10.3.1. “Avaliação molecular do sítio de ligação do fator VIII no gene do fator de von Willebrand em indivíduos com suspeita de doença de von Willebrand tipo 2N”. Damião GB, Dos Santos A, Migueli CO, Prezoti AN, Siqueira LH, De Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC. Apresentado em forma de pôster no: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia (HEMO2007), São Paulo, SP, 07-10/11/2007.

10.3.2. “Molecular assessment of FVIII binding site in von Willebrand factor gene in suspected patients of type 2N von Willebrand disease”. Damian GB, Santos A, Oliveira Di Migueli C, Siqueira L, Prezoti A, De Paula E, Bizzacchi J, Ozelo M., Apresentado em forma de pôster no: XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) – Boston, MA, EUA, 11-16/6/2009.