

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Daniela Flosi Valadares

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA ABO SOBRE O FATOR DE VON
WILLEBRAND E O SEU PRÓ-PEPTÍDEO FVW:AGII**

SÃO PAULO
2016

Daniela Flosi Valadares

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA ABO SOBRE O FATOR DE VON
WILLEBRAND E O SEU PRÓ-PEPTÍDEO FVW:AGII**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof^a. Dr^a. Juliana Vieira dos Santos Bianchi e Co-orientado pela Prof^a. Dr^a. Rosangela de Paula Silva Soares, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**SÃO PAULO
2016**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Valadares, Daniela Flosi

A influência do sistema ABO sobre o Fator de von Willebrand e o seu pró-peptídeo FVW:AgII / Daniela Flosi Valadares. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2016.
58 p.

Orientação de Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2016.

1. Fator de von Willebrand 2. Hemostasia 3. Lesões do sistema vascular 4. Proteínas sanguíneas 5. Sistema do grupo sanguíneo ABO 6. Pró-peptídeo FVW:AgII I. Bianchi, Juliana Vieira dos Santos II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.15

Daniela Flosi Valadares

**A INFLUÊNCIA DO SISTEMA ABO SOBRE O FATOR DE VON
WILLEBRAND E O SEU PRÓ-PEPTÍDEO FVW:AGII**

São Paulo, 09 de Junho de 2016

Prof^a Dr^a Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Prof. Dr. Michelangelo Juvenale

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por seu amor incondicional. Para vocês que sempre me incentivam e apoiam não basta um obrigada. Espero ser merecedora do esforço a mim dedicado em todos os aspectos, mas sobretudo em relação a minha formação. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora de Iniciação Científica Ro, pelas lições de biologia e de vida. Você me conhece bem.

Gigi, sem sua indicação, nada disso teria acontecido.

Obrigada!

VALADARES, Daniela Flosi. A influência do sistema ABO sobre o Fator de von Willebrand e o seu pró-peptídeo FVW:AgII. 2016. 58f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

O Fator de von Willebrand (FVW) é uma proteína envolvida na hemostasia, responsável por mediar a adesão e agregação plaquetária em eventos de lesão vascular. Essa proteína é sintetizada na forma de pré-pró-FVW e contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo conhecido como FVW:AgII e uma subunidade madura. A subunidade madura e o pró-peptídeo são secretados na corrente sanguínea em quantidades equimolares, porém, apresentam meia-vida diferentes. O FVW é considerado um marcador clássico de lesão endotelial, embora se saiba que seus níveis podem ser influenciados por algumas condições, como idade, hormônios e o grupo sanguíneo ABO. Já o seu pró-peptídeo (FVW:AgII) parece não sofrer influência desse grupo sanguíneo. Nesse trabalho investigamos a influência do sistema ABO sobre as variáveis FVW:Ag e FVW:AgII em uma população de 117 indivíduos saudáveis, doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: “O” e “Não O”. As concentrações antigênicas do FVW:Ag e FVW:AgII foram determinadas por ELISA e a razão entre as proteínas FVW:AgII/FVW:Ag, nos indivíduos “O” e “Não O” foi determinada por cálculos matemáticos. Foi observada uma diminuição significativa na concentração de FVW:Ag nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($98,64 \pm 2,95$ vs $99,66 \pm 1,84$ UI.dL⁻¹; $p=0,0423$). Já o FVW:AgII não variou de maneira significativa entre os grupos. A razão entre as proteínas FVW:AgII/FVW:Ag também não variou de maneira significativa entre os grupos. Esses resultados nos mostram que o sistema ABO influencia a concentração plasmática do FVW maduro e não a concentração do pró-peptídeo FVW:AgII. Isso faria do FVW:AgII um melhor marcador de lesão endotelial, uma vez que além de não ser consumido pela agregação plaquetária, não sofre influência do grupo sanguíneo ABO.

Palavras chaves: Fator de von Willebrand; Hemostasia; Lesões do sistema vascular; Proteínas sanguíneas; Sistema do grupo sanguíneo ABO; Pró-peptídeo FVW:AgII.

VALADARES, Daniela Flosi. ABO blood group influence on von Willebrand Factor and its propeptide VWF:AgII. 2016. 58p. Dissertation (Bachelor of Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016

Von Willebrand Factor (VWF) is a protein involved in homeostasis that mediates platelet adhesion and aggregation in events of vascular injury. This protein is synthesized as pre-pro-VWF and contains a signal peptide, a propeptide known as pro-VWF or VWF:AgII and a mature subunit. These two last molecules are secreted into the bloodstream in equimolar amounts but have different half-lives. VWF is considered a classic marker of endothelial injury, even though it's levels can be influenced by certain conditions, such as age, hormones and blood group. On the other hand, it's propeptide (VWF:AgII) does not seem to be influenced by blood group. In this study we investigated the influence of ABO blood system on VWF variables: VWF:Ag and VWF:AgII in a healthy population of 117 individuals, blood donors at Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo. The subjects were divided into two groups: "O" and "Non O". Antigenic concentrations of VWF:Ag and VWF:AgII were determined by ELISA and based on these results we determine the ratio between FVW:AgII / VWF:Ag in individuals "O" and "Non O". We observed a significant decrease in VWF:Ag concentration in group "O" as opposed to "Non O" (98.64 ± 2.95 vs 99.66 ± 1.84 IU / dL; $p = 0,0423$). VWF:AgII did not vary significantly between groups. The ratio of FVW:AgII/VWF:Ag did not vary significantly between groups either. These results show that ABO blood system influences plasma concentration of mature VWF but not its propeptide, making VWF:AgII a better marker of endothelial injury.

Keywords: von Willebrand Factor; Homeostasis; Vascular injury; Blood proteins; ABO blood group system; Propeptide VWF:AgII.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Sistema sanguíneo ABO.....	10
1.2 Endotélio vascular.....	13
1.3 Coagulação.....	15
1.3.1 Modelo clássico.....	16
1.3.2 Conceito atual de coagulação.....	17
1.3.3 Fibrinólise.....	19
1.4 Fator de von Willebrand.....	20
1.4.1 Pró- peptídeo do Fator de von Willebrand.....	25
1.4.2 Relação entre o sistema ABO e as proteínas FVW, FVW:AgII e FVIII.....	25
2 OBJETIVOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Casuística.....	29
3.1.1 Aspectos éticos.....	29
3.2 Procedimentos laboratoriais.....	29
3.2.1 Reagentes.....	29
3.2.2 Coleta com anticoagulante.....	30
3.2.3 Determinação dos antígenos FVW:Ag e FVW:AgII.....	30
3.2.4 Cálculo da razão entre FVW:AgII/FVW:Ag.....	33
3.3 Análise dos resultados.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Características gerais da amostra.....	34
4.2 Proteína do Fator de von Willebrand (FVW:Ag).....	34
4.3 Pró-peptídeo do Fator de von Willebrand (FVW:AgII).....	35
4.4 Razão e correlação entre FVW:AgII e FVW:Ag.....	36
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE.....	50
ANEXO.....	58

1 INTRODUÇÃO

O Fator de von Willebrand (FVW) é uma proteína fundamental no processo de coagulação e, portanto, na hemostasia. Essa proteína é produzida por células endoteliais e megacariócitos, e por isso é utilizada como marcador de disfunção endotelial, apresentando significância clínica no diagnóstico e acompanhamento de doenças vasculares (GIRIBELA et al., 2011). Seus níveis plasmáticos podem, no entanto, sofrer influência de algumas variáveis, como o grupo sanguíneo ABO, gênero e idade (LIP, 1997). Assim, recentemente, estudos têm surgido propondo outros marcadores menos influenciáveis para a avaliação de doenças vasculares (MAHAT; A ZAIDAH; MARAINA, 2015).

O FVW é sintetizado na forma de pré-pró-FVW, uma proteína precursora do FVW que contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo e uma subunidade madura (Figura 6). Durante o processo de síntese, ocorre a clivagem do pró-peptídeo e são liberadas duas moléculas, o pró-peptídeo e o FVW maduro (WIT; VAN MOURIK, 2001).

O FVW é considerado um marcador clássico de lesão endotelial, embora se saiba que seus níveis podem ser influenciados por algumas condições, como idade, hormônios e o grupo sanguíneo ABO. Sua associação com o processo de formação de trombos sugere que altas concentrações de FVW podem ser um indicador de aterosclerose ou trombose (LIP, 1997).

Estudos anteriores demonstraram que, não só o FVW:Ag, mas também o seu pró-peptídeo encontram-se elevados em doenças vasculares associadas à disfunção endotelial. Sendo assim, recentemente o seu pró-peptídeo (ou FVW:AgII) tem sido proposto como um possível marcador de lesão endotelial, uma vez que parece não sofrer influência do sistema ABO (MAHAT; A ZAIDAH; MARAINA, 2015).

No Brasil, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos (GUIMARÃES et al, 2015). Sendo assim, a análise do pró-peptídeo do FVW como um possível biomarcador de lesão endotelial torna-se uma alternativa para o

diagnóstico ou como um indicador de progressão dessas doenças (MAHAT; A ZAIDAH; MARAINA, 2015).

1.1 Sistema sanguíneo ABO

O sistema ABO é considerado o mais importante sistema de grupos sanguíneos na medicina clínica transfusional (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). Esses antígenos (A, B e H) são moléculas de carboidratos complexas, presentes em hemácias, plaquetas e diversas proteínas circulantes no sangue, além do endotélio, rins, coração, intestinos, pâncreas e pulmões (FUNG et al., 2014).

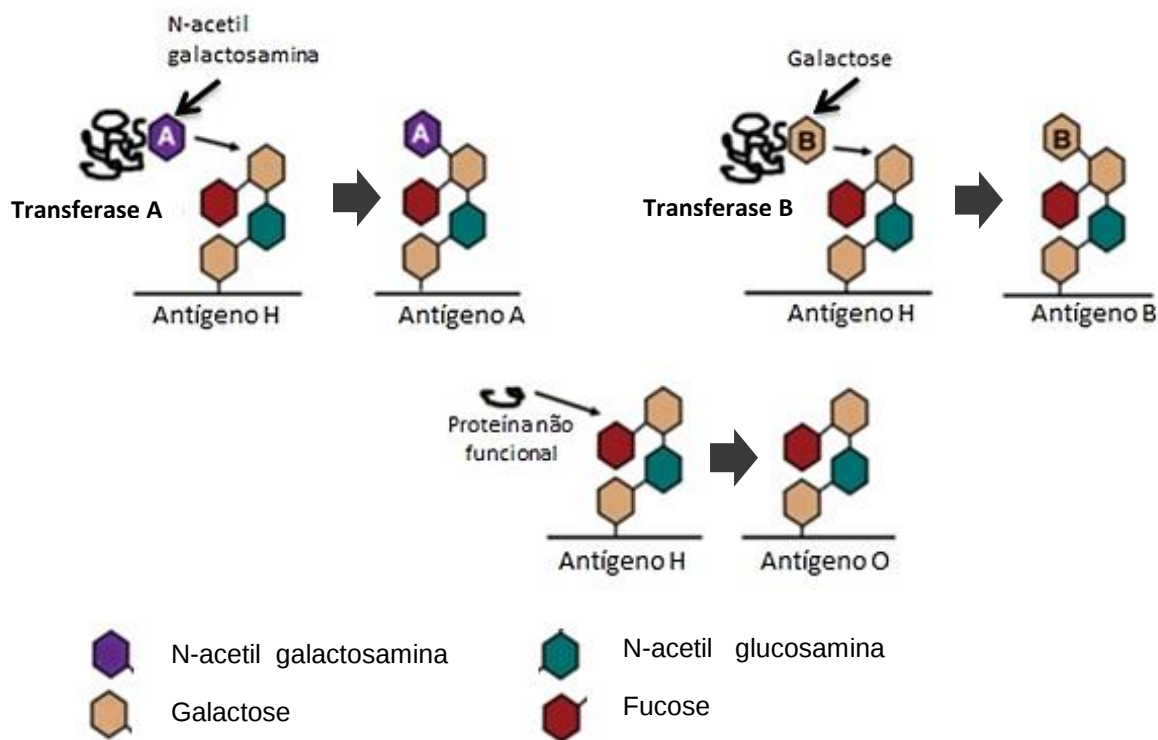
O sistema ABO apresenta 4 fenótipos principais: A, B, O e AB, que são determinados pela presença ou ausência de dois antígenos (A e B) na membrana eritrocitária. Esses antígenos são determinados por açúcares que são adicionados sobre um precursor, o antígeno H, por enzimas específicas, conforme demonstrado na figura 1 (FUNG et al., 2014).

O gene do ABO está localizado no braço longo do cromossomo 9 e apresenta sete éxons. Foram definidos 4 genes: A1, A2, B e O, que codificam duas enzimas glicosiltransferases A e B. Cada uma dessas enzimas adiciona um açúcar ao antígeno H, que é um carboidrato produzido por uma enzima α -2-fucosiltransferase, codificada no locus FUT1 do cromossomo 19, sendo independente do locus ABO (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003).

A transferase A (1,3 N acetilgalactosaminil transferase) adiciona um açúcar N-acetil galactosamina a galactose subterminal do antígeno H, produzindo o antígeno A, enquanto a transferase B (α -1,3 galactosil transferase) adiciona um açúcar galactose, a mesma galactose subterminal do antígeno H, produzindo o antígeno B. Indivíduos do grupo AB apresentam ambas estruturas. O genótipo O não produz uma transferase ativa, pois apresenta uma sequência de DNA idêntica a do gene A, exceto pela deleção de uma base nitrogenada guanina na posição 261 do éxon 6, o que resulta em uma

proteína truncada. Como consequência, indivíduos O expressam apenas o antígeno H da estrutura precursora (FUNG et al., 2014).

Figura 1: Estrutura dos carboidratos do sistema sanguíneo ABO.



Fonte: Modificada de (BÖHMIG et al, 2015)

A frequência dos antígenos ABO varia em diferentes populações, conforme demonstrado nos quadros 1 e 2. Segundo Batissoco e Novaretti (2003), a frequência dos antígenos ABO nos doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo varia de acordo com o quadro abaixo:

Quadro 1: Frequência fenotípica do Sistema de Grupo ABO (percentual) em 2.462 doadores de sangue na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo.

Fenótipo	Caucasianos	Mulatos	Negros	Total
O	46,52	53,20	47,94	49,23
A	39,45	29,63	31,96	33,71
B	11,51	13,78	16,60	13,39
AB	2,52	3,39	3,50	3,13

Fonte: (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003)

A análise de outras populações mostrou que o fenótipo O apresenta-se como o mais constante e AB o fenótipo mais raro, com alguma variação na frequência de indivíduos dos tipos A e B, conforme quadro abaixo que apresenta dados de estudos conduzidos na população Indiana por Agrawal et al. (2014), na população da Etiópia por Atire (2015) e na população Italiana por Carpeggiani et al. (2010).

Quadro 2: Frequência fenotípica do Sistema de Grupo ABO (percentual) nas populações indiana, etíope e italiana

Fenótipo	Indianos	Etíopes	Italianos
O	37,12	44,49	43,3
A	22,88	26,32	41,4
B	32,26	26,32	44,2
AB	7,74	2,87	4,1

Fonte: (AGRAWAL et al., 2014), (ATIRE, 2015) e (CARPEGGIANI et al., 2010).

Embora sejam conhecidos como antígenos da membrana eritrocitária, os carboidratos A e B são expressos em uma variedade de tecidos. Além disso, o sistema sanguíneo ABO influencia de maneira significativa o processo de hemostasia, conforme descrito por Preston e Barr em 1964 e confirmado por estudos subsequentes (FRANCHINI et al., 2012).

A influência do sistema sanguíneo ABO sobre a hemostasia é refletida nos níveis plasmáticos de duas glicoproteínas da coagulação, o FVW e o fator VIII da coagulação (FRANCHINI et al., 2012). Embora esse mecanismo não esteja bem estabelecido, estudos sugerem que modificações na estrutura do FVW podem influenciar na sua proteólise. Dessa maneira, a adição de carboidratos do sistema sanguíneo ABO ao FVW poderia influenciar sua meia-vida, afetando seu catabolismo (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

A habilidade de sintetizar e adicionar carboidratos sobre os diferentes tecidos é determinada geneticamente e varia entre indivíduos. Essa variação é refletida no número de cópias de antígenos ABH que varia entre os indivíduos dos tipos A, B, AB e O (FUNG et al., 2014). O'Donnell (2002) demonstrou que existe uma relação entre o

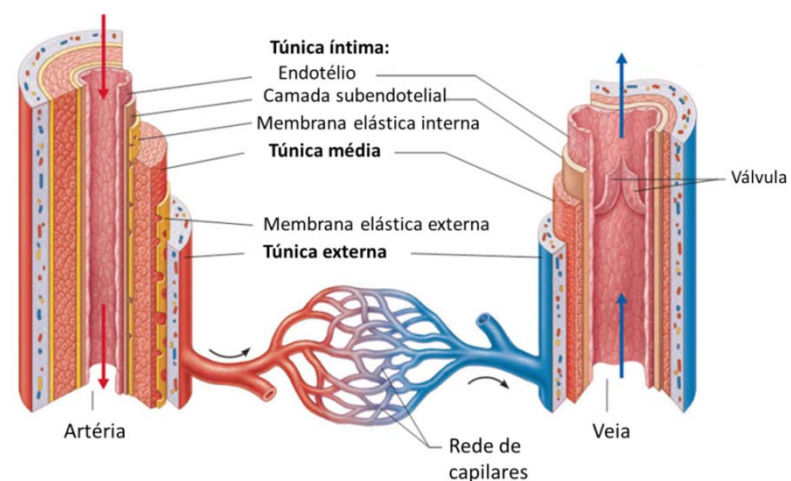
genótipo ABO, a expressão das transferases e o número de cópias dos antígenos ABH expressos no FVW circulante.

Segundo O'Donnell (2002), os antígenos ABH são encontrados nas cadeias de oligossacarídeos N-ligadas do FVW, de acordo com o tipo sanguíneo do indivíduo. Um de seus estudos comparou o número de cópias do antígeno H presente no FVW de indivíduos O e A com o nível plasmático de FVW desses indivíduos. Os autores observaram que a quantidade de antígenos H expressos no FVW é inversamente proporcional ao nível plasmático dessa proteína em indivíduos do grupo O, os quais expressam apenas o antígeno H da estrutura precursora. Assim, foi proposto que a presença do antígeno H aumentaria a depuração do FVW, sendo esse um possível mecanismo de influência do ABO sobre o FVW.

1.2 Endotélio vascular

Os vasos sanguíneos são formados por camadas denominadas túnicas (Figura 2). Existem três túnicas: a mais interna, chamada túnica íntima, uma intermediária chamada túnica média e uma mais externa, chamada túnica adventícia (BAHIA et al., 2006).

Figura 2: Endotélio Vascular



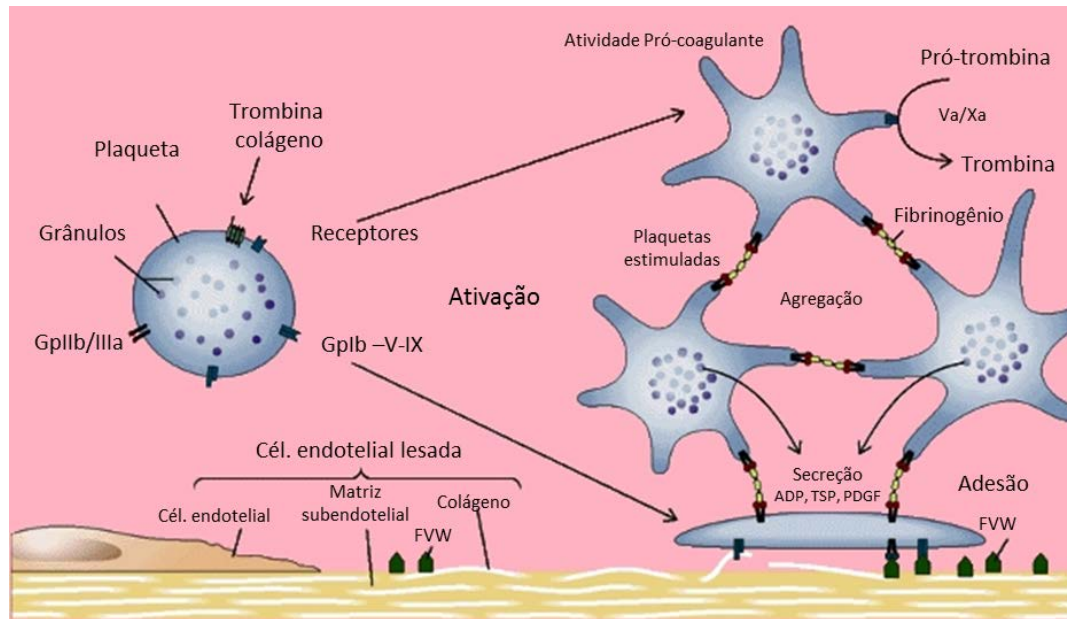
Fonte: (CAI; HARRISON, 2000).

O endotélio vascular, que forma a túnica íntima, é um tecido localizado entre o lúmen vascular e a parede do vaso. Esse tecido participa do controle do tônus vascular, da coagulação e fibrinólise local, além de interagir com leucócitos e plaquetas. O endotélio é composto por uma única camada de células epiteliais pavimentosas que repousam sobre uma lâmina basal. Essa camada de células cobre toda a superfície interna dos vasos sanguíneos, separando o sangue circulante dos tecidos (BAHIA et al., 2006).

O endotélio é um órgão ativo que responde a cada estímulo físico ou químico liberando substâncias com o objetivo de manter o equilíbrio vasomotor e hemostático do tecido vascular. Em resposta a esses estímulos, o endotélio saudável produz uma série de fatores que regulam o tônus vascular, adesão celular, proliferação celular e inflamação. Além disso, o endotélio regula a hemostasia, uma vez que produz componentes pró e antitrombóticos. A manutenção da hemostasia por meio desses componentes é essencial para garantir o fluxo sanguíneo dentro dos vasos e impedir a formação de trombos (ESPER et al., 2006).

As células endoteliais são reguladoras da hemostasia sendo que o equilíbrio entre suas atividades anti e pró-trombóticas determina se ocorre formação, propagação ou dissolução do trombo. Em seu estado normal, o endotélio exerce uma função anticoagulante que contribui para a fluidez do sangue, expressando fatores que inibem a agregação plaquetária, a coagulação e promovem fibrinólise, como a trombomodulina e o inibidor da via do fator tecidual. Mediante lesão vascular, esse equilíbrio se altera e o endotélio assume um estado pró coagulante, no qual, frente à lesão endotelial, as plaquetas entram em contato com a matriz extracelular subendotelial e a ela se mantêm aderidas mediante ação do FVW que interage tanto com o colágeno exposto no endotélio lesado, quanto com as plaquetas, por meio da ligação ao receptor de glicoproteína GPIIb permitindo sua adesão ao vaso lesado. A adesão é seguida da agregação plaquetária, que ocorre por intermédio do FVW, que atua como ponte entre plaquetas por meio da ligação ao receptor de glicoproteína GPIIb/IIIa, conforme esquema a seguir (ROSENBERG, 2002).

Figura 3: Esquema didático da adesão e agregação plaquetária.



Legenda: ADP: adenosina difosfato; TSP: trombospondina; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas. Fonte: (LEUNG, 2007)

Existem diversos testes clínicos que avaliam inúmeros aspectos do endotélio normal e ativado. Esses testes avaliam moléculas endoteliais na circulação periférica, incluindo citocinas inflamatórias, óxido nítrico, moléculas de adesão, reguladores de trombose e marcadores de dano ou reparo endotelial. Uma dessas moléculas é o FVW, que é liberado na circulação pelas células endoteliais em evento de lesão vascular e participa da ativação plaquetária e do processo de coagulação (GIRIBELA et al., 2011).

1.3 Coagulação

A coagulação é uma série de reações químicas que convertem pró-enzimas em enzimas denominadas fatores da coagulação, que são numerados de I a XIII. A ativação desses fatores é iniciada pelo endotélio ativado e culmina na formação do agregado estável de plaquetas (SMITH, 2009).

Mediante a injúria do endotélio (células endoteliais estimuladas ou danificadas), a coagulação ativada pode ser drasticamente amplificada e o equilíbrio entre os sistemas de coagulação e fibrinólise é perdido. Nesse cenário a atividade coagulante excede a atividade anticoagulante e a resposta fibrinolítica (EPSTEIN et al., 1992).

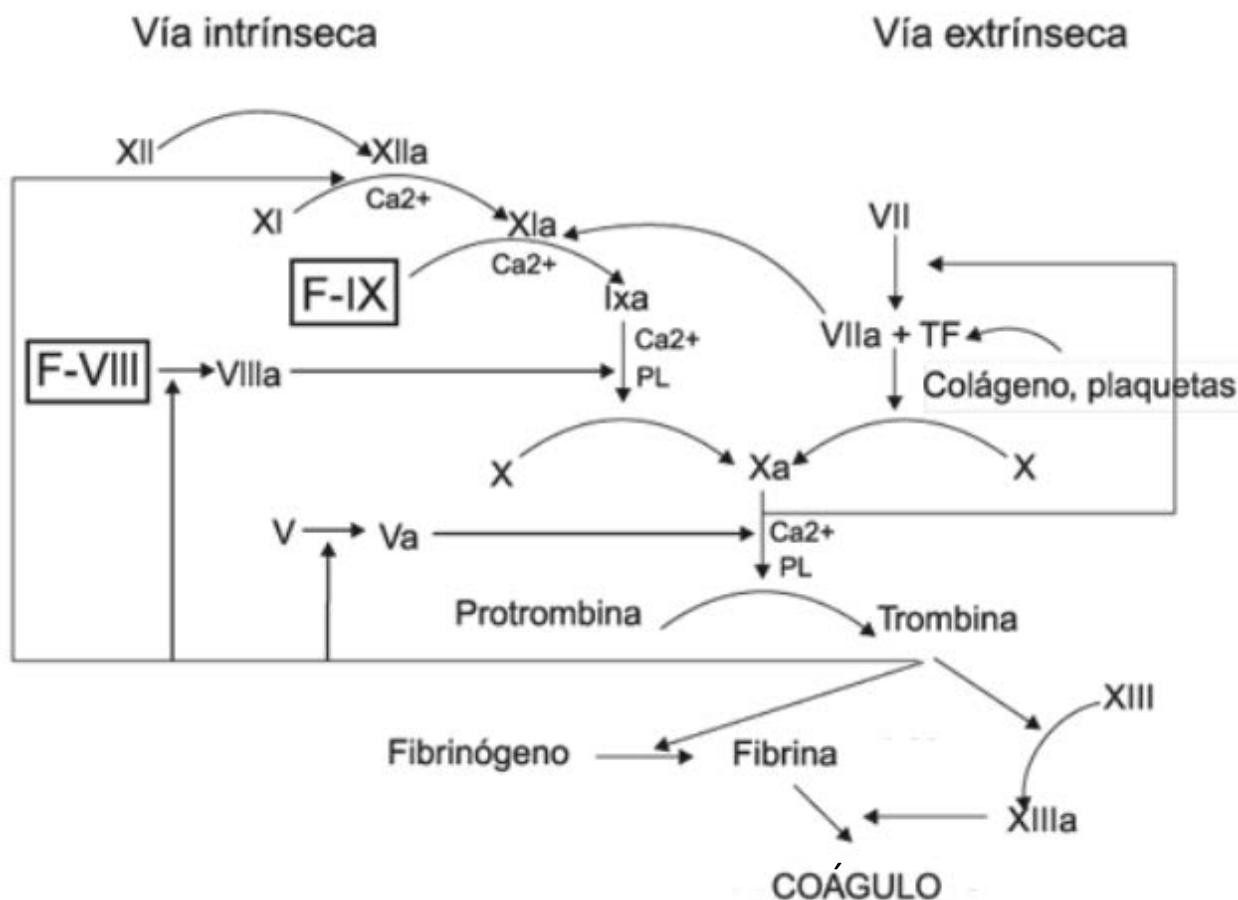
1.3.1 Modelo clássico

O modelo clássico da cascata de coagulação foi introduzido por Macfarlane e Davie & Ratnoff em 1964 e divide os eventos da coagulação em duas vias: a intrínseca, na qual todos os componentes estão presentes no sangue, e a extrínseca, na qual é necessária a presença do fator tissular (FT), proteína presente na membrana celular subendotelial. Nesse modelo, a ativação de um fator leva a ativação de outro fator até a eventual formação da trombina (FRANCO, 2001).

A via intrínseca se inicia após a interação do fator XII com a superfície negativa do endotélio, após um evento de lesão vascular. Além do fator XII, é necessária a presença do fator XI, da pré-caliceína e do cininogênio de alto peso molecular (HMWK). O FXIIa converte o FXI inativo em sua forma ativa. Esse por sua vez ativa o FIX. O fator FIX em conjunto com o FVIII ativado pela trombina e íons cálcio, na presença de fosfolipídeos carregados negativamente, formam um complexo que cliva o FX tornando-o ativo (FERREIRA et al., 2010).

A via extrínseca é desencadeada quando o tecido lesado libera fator tecidual (FT), o qual forma um complexo com o FVII na presença de íons cálcio. Esse complexo atua sobre o fator X convertendo-o em FX ativado. Assim sendo, tanto a via intrínseca como a via extrínseca convergem na formação do FX ativado. A partir daí ocorre a conversão de protrombina em trombina que por sua vez participa da conversão de fibrinogênio em fibrina, conforme ilustrado na figura a seguir (FERREIRA et al., 2010).

Figura 4: Modelo clássico da cascata da coagulação, proposto por Davie e Ratnoff em 1964 – modificado.



Fonte: (MORAN; VIELE 2005)

1.3.2 Conceito atual de coagulação

Atualmente considera-se a coagulação como um sistema multifacetado no qual participam componentes celulares e moleculares. Esse novo modelo é dividido em três etapas denominadas iniciação, amplificação e propagação (Figura 5) (HOFFMAN; MONROE, 2001).

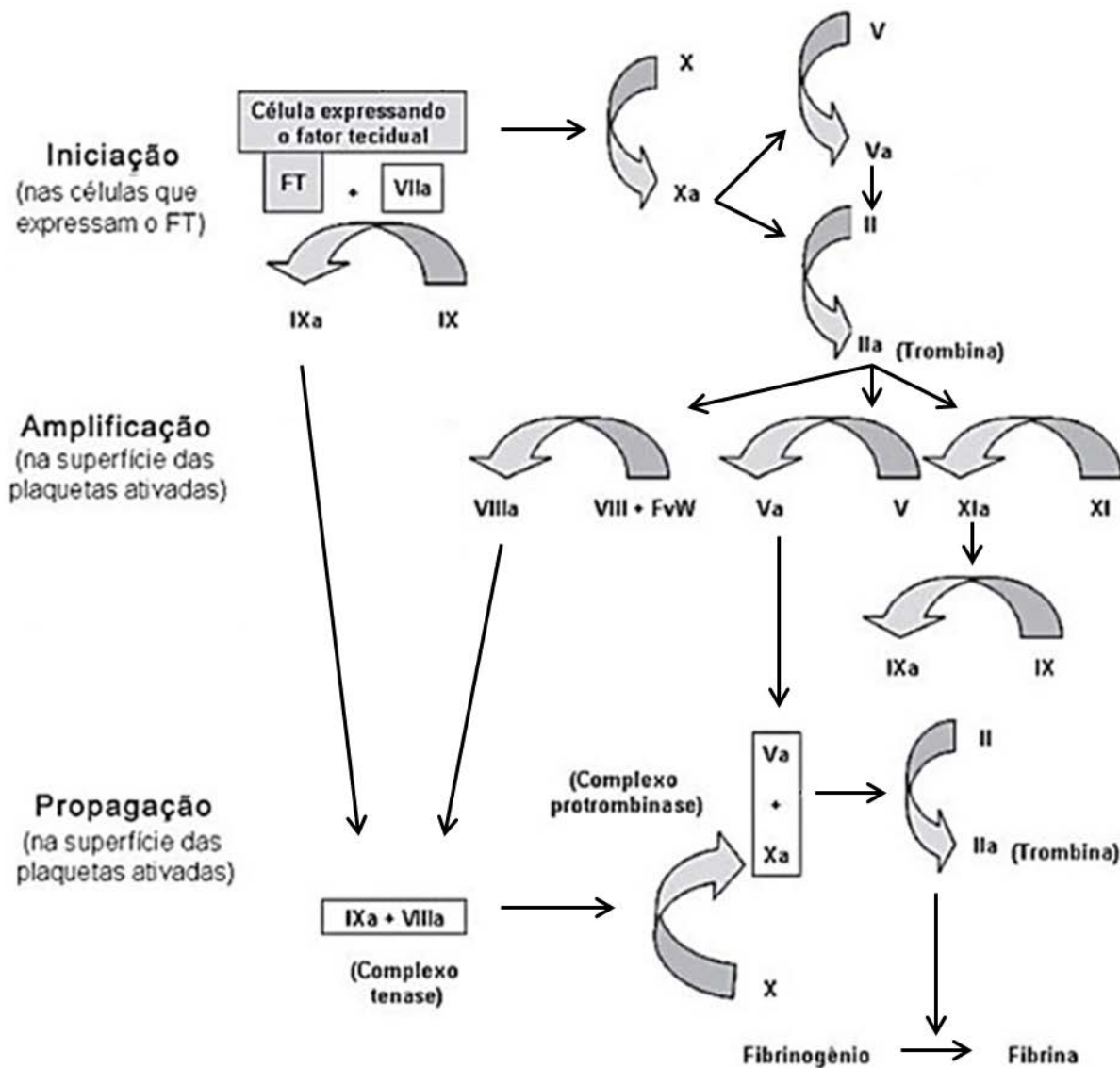
A fase de iniciação marca o início da coagulação sanguínea e se inicia quando uma lesão na parede do vaso sanguíneo expõe o fator tissular (FT) – uma proteína de membrana celular presente no tecido subendotelial e necessária para a iniciação da

cascata de coagulação – ao plasma sanguíneo. O fator VII presente no plasma se liga ao fator tissular e é ativado. O complexo formado pelo FVII/FT ativa tanto o fator X quanto o fator IX. O fator Xa ativa o fator V, que por sua vez se associa ao fator Xa e forma o complexo protrombinase (FXa/FVa). O complexo protrombinase tem papel importante tanto na ativação plaquetária quanto na ativação do fator VIII durante a fase de amplificação (HOFFMAN; MONROE, 2001).

Durante a fase de amplificação, a lesão vascular permite a adesão plaquetária a matriz extra-vascular no local da lesão. A adesão plaquetária ao colágeno subendotelial é mediada pela glicoproteína Ia/IIa e pelo FVW, que serve de ponte entre as plaquetas e a fibra de colágeno. O processo de ligação a matriz inicia a ativação das plaquetas e dos fatores V, VIII e XI. As plaquetas ativadas liberam FVW de alto peso molecular e fator V de seus grânulos alfa, esse último por sua vez é ativado pela trombina ou pelo fator Xa (HOFFMAN; MONROE, 2001).

Uma vez ativadas as plaquetas e os cofatores V e VIII que a elas permanecem ligados, é iniciada a fase de propagação, que é caracterizada por um aumento na geração de trombina. O complexo tenases (FVIIIa/IXa) formado quando o FIXa se liga ao seu receptor na superfície das plaquetas, ativa o fator X. O fator Xa associa-se ao fator Va e forma o complexo protrombinase (FXa/FVa). Nesse momento um grande número de plaquetas é recrutado para o local da lesão. Além disso, devido ao aumento na concentração dos fatores que compõem o complexo tenases (FVIIIa/IXa) e protrombinases (FXa/FVa), uma grande quantidade de protrombina é convertida em trombina que por sua vez converte fibrinogênio em fibrina, permitindo a polimerização de uma rede que resulta na formação de um coágulo estável de fibrina (HOFFMAN; MONROE, 2001).

Figura 5: Modelo atual da coagulação



Fonte: Modificado de (FERREIRA et al., 2010)

1.3.3 Fibrinólise

A fibrinólise é o processo que garante o restabelecimento do fluxo sanguíneo dentro do vaso por meio da remoção da rede de fibrina. O processo se inicia com a ativação do plasminogênio (PLG), uma pró-enzima inerte sintetizada principalmente no

fígado, que é convertida em plasmina por duas vias de ativação. A primeira é ativada pelo ativador tissular de PLG (tPA) que é produzido pela célula endotelial em resposta a ativação da coagulação. A segunda via depende do uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase), também produzido pela célula endotelial em resposta a ativação da coagulação. Assim o PLG é convertido em plasmina, uma serino protease que degrada a rede de fibrina em produtos solúveis (FRANCO, 2001).

Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação ao plasminogênio e promovem hidrólise de uma única ponte peptídica (Arg560-Val561), que resulta na formação da plasmina. Também participa dessa via a Anexina 2, que é secretada pelas células endoteliais e se liga tanto ao PLG quanto ao tPA, agindo como cofator na geração de plasmina. Além disso, parte da plasmina circulante é gerada por meio das proteínas coagulantes calicreína e FXIa que ativam diretamente o PLG (FRANCO, 2001).

Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, mas também o fibrinogênio, fator V e fator VIII, em condições fisiológicas, a fibrinólise se restringe a remoção do excesso de fibrina localizado no local da lesão de maneira controlada, não se estendendo de maneira sistêmica (FRANCO, 2001).

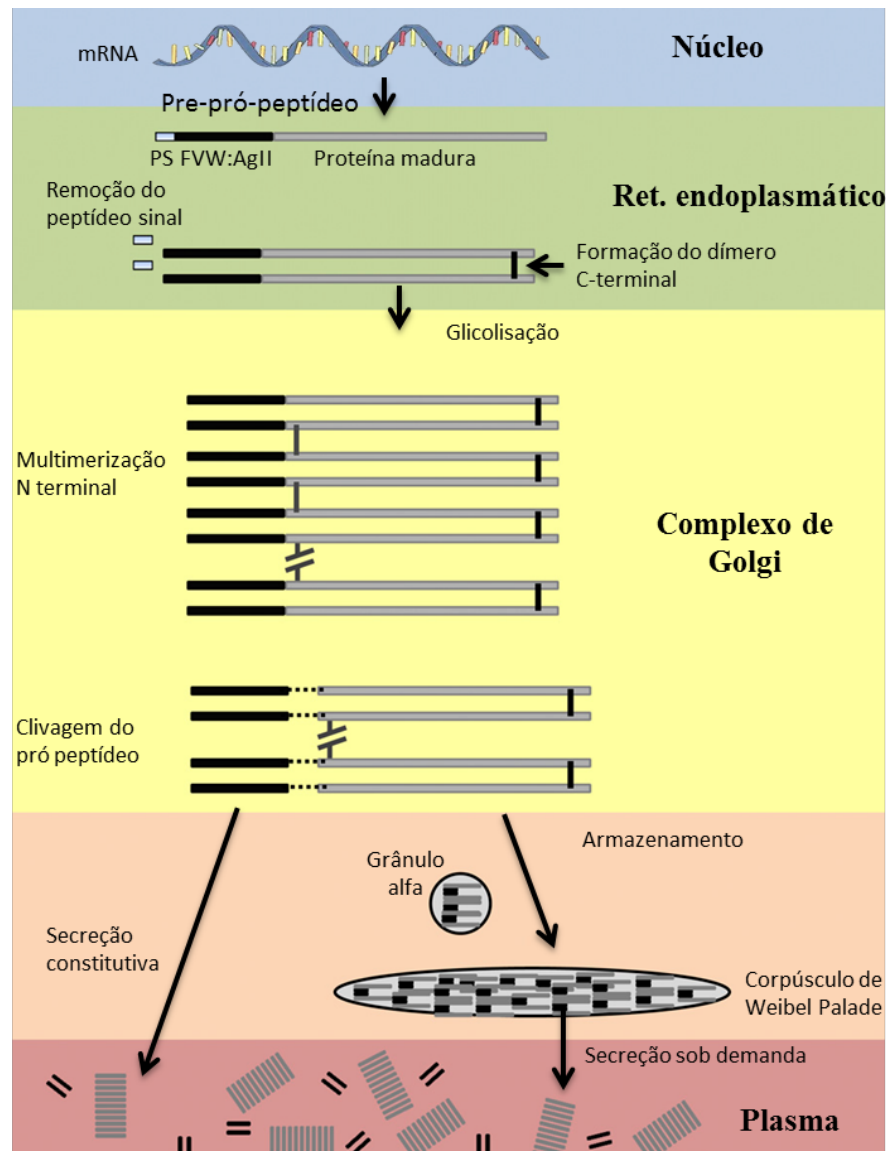
1.4 Fator de von Willebrand

O FVW é uma proteína multimérica de alto peso molecular envolvida na hemostasia, sendo responsável por mediar a adesão e agregação plaquetária em eventos de lesão vascular, além de ser a proteína carreadora do FVIII (LAWRIE et al., 2013).

O gene que codifica o FVW está localizado no braço curto do cromossomo 12, apresenta 178 kb e contém 52 éxons. Sua síntese ocorre nas células endoteliais e megacariócitos e envolve um número complexo de etapas, incluindo dimerização, polimerização, glicação e clivagem do pró-peptídeo (Figura 6) (VISCHER et al., 1999). No processo de síntese o mRNA codifica um precursor com 2813 aminoácidos, conhecido como pré-pró-FVW, que contém um peptídeo sinal composto por 22

aminoácidos, seguido de um pró-peptídeo de 741 aminoácidos conhecido como pró-FVW ou antígeno II, e uma subunidade madura de 2050 aminoácidos. Inicialmente ocorre a remoção do peptídeo sinal e são formados dímeros no retículo endoplasmático por meio de pontes dissulfeto formadas entre as regiões C-terminal de suas subunidades. O então pró-dímero segue para o complexo de golgi onde os dímeros são agrupados por ligações dissulfeto entre as porções N-terminal e modificados por glicação, formando os multímeros (GROENEVELD et al., 2014).

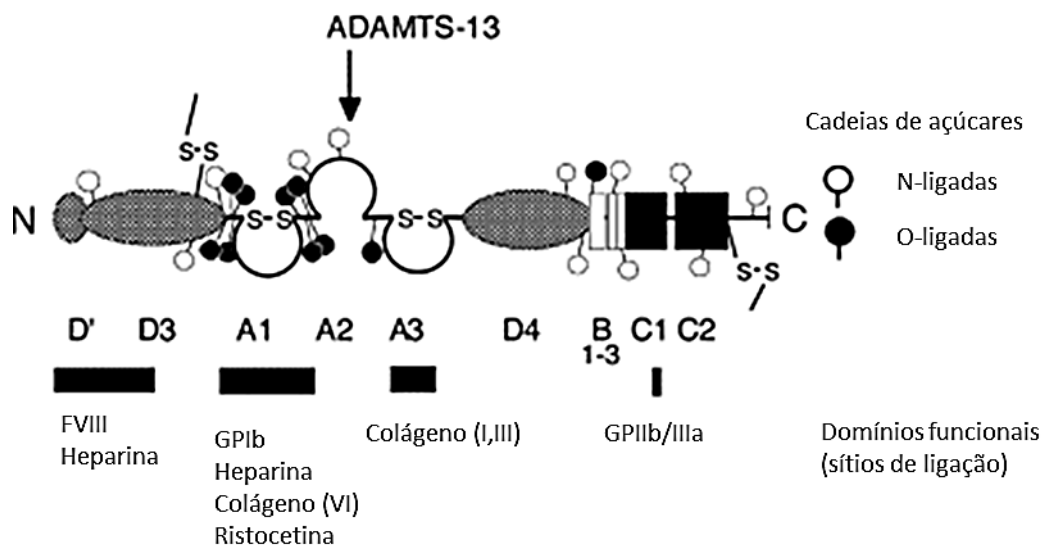
Figura 6: Síntese do Fator de von Willebrand



Fonte: (HABERICHTER, 2015)

Os multímeros do FVW apresentam tamanhos variados, sendo possivelmente a maior proteína solúvel. Sua subunidade principal tem 225kDa e suas subunidades são organizadas em multímeros de até 20.000kDa de massa molecular. Essas subunidades apresentam sítios de ligação para colágeno, heparina, fator VIII e glicoproteínas GPIIb e GPIIb/IIIa, presentes nas plaquetas (Figura 7). Os multímeros de maior tamanho têm um papel crucial na adesão plaquetária, por apresentarem maior número de sítios de ligação a essas glicoproteínas. Assim se explica que na ausência destes multímeros de alto peso molecular ocorram hemorragias (LAWRIE et al., 2013).

Figura 7: Estrutura e sítios de ligação da molécula do FVW.



Fonte: (MATSUI; HAMAKO, 2005).

Após sua síntese, o FVW tem destinos diferentes, dependendo de seu local de produção. Quando produzido pelas células endoteliais, é armazenado em estruturas denominadas corpúsculos de Weibel Palade e posteriormente secretado (HASSAN; SAXENA; AHMAD, 2012). Os corpúsculos de Weibel Palade são organelas de estoque das células endoteliais que armazenam e liberam o FVW, além de apresentarem um papel relacionado ao processo inflamatório, pois também armazenam P-selectina, uma proteína que funciona como uma molécula de adesão para leucócitos. Quando

produzido nos megacariócitos, o FVW é armazenado nos grânulos α e secretado em resposta a estímulos fisiológicos (JOÃO, 2001) como histamina, toxina Shiga, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-6 (IL-6) (TONACO et al., 2010).

No plasma o FVW forma um complexo com o Fator VIII, protegendo-o contra degradação proteolítica pela proteína C ativada, enquanto o pró-peptídeo ou antígeno II circula livre, já tendo se dissociado do FVW ainda no retículo endoplasmático. Tanto o FVW quanto o antígeno II são secretados em quantidades equimolares, porém apresentam meia-vida diferentes. Enquanto a meia-vida do FVW:AgII é de aproximadamente 2 horas, a meia-vida do FVW varia entre 8 e 12 horas (JOÃO, 2001).

O fator VIII inativo, carregado pelo FVW, é uma proteína que quando ativada converte o fator X em sua forma ativada, o fator Xa. Essa proteína é produzida em vários tecidos, entre eles fígado, rins, linfonodos e baço e, ao ser liberado na corrente sanguínea, se liga ao FVW com alta afinidade por meio de uma ligação entre o domínio D do FVW e a cadeia leve do FVIII, formando um complexo não covalente que impede a degradação do FVIII (LENTING et al., 1998). Esse complexo se desfaz quando o FVIII é clivado pela trombina e ativado, sofrendo uma mudança conformacional que reduz sua afinidade pelo FVW, culminando na liberação do FVIII no plasma (TERRAUBE; O'DONNELL; JENKINS, 2010).

Embora o FVW possa ser influenciado por alguns fatores como o grupo sanguíneo ABO, idade, hormônios e algumas condições patológicas, ele é, ainda assim, considerado um marcador clássico de lesão e/ou disfunção endotelial, uma vez que pode ser liberado em resposta a lesão vascular. Por esse motivo ele é utilizado no diagnóstico de doenças trombo hemorrágicas, como a Doença de von Willebrand, na qual deficiências no FVW comprometem a adesão plaquetária (LIP, 1997) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica, caracterizada por um aumento da agregação plaquetária que pode ser causado pelo aumento da concentração de FVW de alto peso molecular, que tem uma maior afinidade pelas plaquetas (TONACO et al., 2010).

No caso da Doença de von Willebrand, é possível identificar alterações quantitativas ou qualitativas no FVW. As alterações qualitativas mais comuns estão associadas a mutações genéticas que resultam na perda dos multímeros de peso molecular alto e intermediário, por alteração no transporte intracelular dos multímeros, por alterações na sua degradação proteolítica, pela diminuição da afinidade de ligação à GpIb ou ao fator VIII da coagulação, ou ainda pelo aumento da afinidade do FVW a GpIb. Nesse último caso, o aumento da afinidade do FVW pela GPIb está associado a um maior risco de hemorragia, pois os multímeros associam-se espontaneamente às plaquetas, e a GpIb deixa de estar livre para mediar a adesão plaquetária em caso de lesão (SADLER, 2005).

Existem ainda as alterações quantitativas do FVW, nas quais sua produção é reduzida, ou, em casos mais graves, inexistente. Embora alguns pacientes possam ser assintomáticos, a redução nos níveis do FVW causa diminuição da adesão plaquetária e, conseqüentemente, alterações da hemostasia (JOÃO, 2001).

A quantificação da proteína FVW pode ser feita por técnicas imunoenzimáticas ou turbidimétricas (PINOL et al., 2007). Na primeira é utilizada uma placa sensibilizada com anticorpos anti-FVW humano sob os quais se adiciona o soro ou plasma do paciente a ser testado. Em seguida são adicionados anticorpos policlonais anti-FVW humano marcado com peroxidase que se ligam aos anticorpos imobilizados. Adiciona-se o substrato Tetrametilbenzidina (TMB) e com isso desenvolve-se uma coloração cuja intensidade é medida em espectrofotômetro e é proporcional à concentração de FVW presente no meio (SADLER, 1994). Na segunda técnica a atividade do FVW é determinada pelo aumento da turbidez produzida pela aglutinação das partículas de látex em decorrência da interação entre o receptor GPIb do FVW e os anticorpos monoclonais (PINOL et al., 2007).

Ainda segundo Pinol (2007), a avaliação estrutural pode ser realizada por eletroforese, ou de forma mais específica, por *Western Immunoblotting* (LOPES; SOARES; MAEDA, 2002). Essas ferramentas permitem avaliar a distribuição multimérica do FVW, ou seja, a distribuição dos mesmos em relação ao seu tamanho (pequenos, intermediários ou grandes).

1.4.1 Pró- peptídeo do Fator de von Willebrand.

Conforme demonstrado na figura 4, o FVW é sintetizado como pré-pró-FVW, uma proteína precursora do FVW que contém um peptídeo sinal, o pró-peptídeo e a subunidade madura. Os pró-peptídeos de várias proteínas, como pró-somatostatina e mieloperoxidase apresentam papel funcional no processamento de suas proteínas maduras. Embora a função do FVW:AgII não esteja bem definida, é sabido que ele é necessário para a multimerização e armazenamento da proteína madura, uma vez que já foi demonstrado que o FVW expresso na ausência do pró-peptídeo não é armazenado nos corpúsculos de Weibel Palade (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

Quando clivado, o FVW:AgII permanece associado de maneira não covalente aos multímeros maduros e ambos são armazenados em grânulos intra-celulares como o corpúsculo de Weibel Palade e os grânulos α das plaquetas (WIT; VAN MOURIK, 2001).

Após sua secreção o pró-peptídeo circula de maneira livre no plasma em uma concentração de aproximadamente 1 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o FVW maduro apresenta-se em uma concentração de aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, essas proteínas apresentam meia-vida distintas. Enquanto o FVW apresenta uma meia-vida de aproximadamente 8 a 12 horas, esse valor se altera no caso do FVW:AgII para um período de 2 a 3 horas. Além disso, diferente do FVW maduro, o FVW:AgII parece não sofrer influência do grupo sanguíneo ABO, uma vez que não apresenta carboidratos fixos a sua estrutura (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

1.4.2 Relação entre o sistema ABO e as proteínas FVW, FVW:AgII e FVIII.

Vários fatores influenciam a concentração plasmática do Fator de von Willebrand, e dentre eles o grupo sanguíneo ABO é considerado um dos fatores de maior influência (SOUSA, 2004). Os valores laboratoriais normais para o FVW:Ag encontram-se entre 50–150 UI.dL^{-1} e sua referência normal é fixada em 100 UI.dL^{-1} .

(Quadro 3) (ODONNELL; LAFFAN, 2001). No entanto, vários autores apontam que indivíduos do grupo sanguíneo O apresentam uma concentração de FVW:Ag até 34% mais baixa quando comparados aos outros grupos sanguíneos, enquanto os indivíduos do grupo AB apresentam os maiores níveis de FVW entre todos os tipos sanguíneos, seguidos dos indivíduos do grupo B e A, respectivamente. Essas variações, conforme demonstradas no quadro abaixo, dificultam o diagnóstico de algumas condições, como a Doença de von Willebrand tipo I, na qual o paciente apresenta alterações quantitativas nos níveis plasmáticos de FVW, uma vez que em condições normais, a quantificação do FVW:Ag em indivíduos do grupo O pode estar abaixo de 50 UI.dL⁻¹.

Quadro 3 – Relação entre os fenótipos ABO e os níveis plasmáticos de FVW:Ag (UI. dL⁻¹) em estudo realizado com 328 indivíduos.

N=328 indivíduos	Grupo O	Grupo A	Grupo B	Grupo AB
FVW:Ag (UI.dL ⁻¹)	77,3	114,7	102,8	136,7

Fonte: (O'DONNELL; LAFFAN, 2001)

Os carboidratos do sistema de grupo sanguíneo ABO são expressos em vários tecidos. No FVW esses carboidratos são adicionados as cadeias de oligossacarídeos da região N-terminal no compartimento pós-Golgi das células endoteliais, antes da secreção do FVW. Essa glicação contempla aproximadamente 19% do peso do FVW e pode influenciar sua meia-vida, afetando seu catabolismo (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

Estudos sugerem que modificações na estrutura do FVW podem influenciar seu catabolismo. É sabido que o FVW circula no plasma em forma de multímeros de tamanhos heterogêneos, que são regulados pela atividade proteolítica de uma protease produzida no fígado chamada ADAMTS13 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina-13), que fisiologicamente cliva o FVW reduzindo seu peso molecular. Foi demonstrado que o sistema ABO é relevante para a proteólise do FVW pela ADAMTS13, possivelmente porque seu sítio de ligação no FVW é flanqueado por

sítios de glicação. Portanto, o sistema ABO também poderia influenciar o catabolismo do FVW alterando sua susceptibilidade a ADAMTS13 (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

Além do FVW, outras glicoproteínas plasmáticas que apresentam estruturas ABH são o fator VIII e as α -2-macroglobulinas. Segundo O'Donnell e Laffan (2001), indivíduos do grupo O apresentam atividade do FVIII (FVIII:C) reduzida quando comparados a outros indivíduos dos demais grupos sanguíneos (A, B e AB), embora entre esses não tenha sido identificada diferença significativa nos níveis de FVIII:C, (Quadro 4).

Quadro 4 – Relação entre os fenótipos ABO e os níveis plasmáticos FVIII:C (UI dL⁻¹) em estudo realizado em 328 indivíduos.

N=328 indivíduos	Grupo O	Grupo A	Grupo B	Grupo AB
FVIII:C (UI dL ⁻¹)	131,8	162,5	155,5	170,9

Fonte: (O'DONNELL; LAFFAN, 2001)

Já o pró-peptídeo do FVW (FVW:AgII) que é secretado em quantidades equimolares ao FVW parece não sofrer influência do sistema ABO (JENKINS; O'DONNELL, 2006).

Levando em consideração a relação entre o grupo sanguíneo ABO, o FVIII e o FVW maduro, o estudo do FVW:AgII torna-se relevante, uma vez que esse parece não sofrer influência do grupo ABO, o que o torna um forte candidato a marcador de lesão e disfunção endotelial.

2 OBJETIVOS

Estudar a associação do grupo sanguíneo ABO sobre as variáveis FVW:Ag e FVW:AgII em uma população de indivíduos saudáveis. Verificar a influência do sistema ABO sobre essas variáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – SP (HCFMUSP), no Banco de Sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. A população estudada foi composta por 117 doadores sadios, de ambos os sexos, separados posteriormente pelo grupo sanguíneo ABO em grupo “O” e “Não O”, gênero e idade.

3.1.1 Aspectos éticos

O desenho do estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 0614/10). As amostras (sangue venoso periférico) foram coletadas durante rotina do Banco de Sangue, portanto sem desconforto adicional para o doador.

3.2 Procedimentos laboratoriais

3.2.1 Reagentes

O *kit* para determinação do FVW:Ag foi obtido da Diagnóstica Stago (Asnières, França). A placa de ELISA foi obtida da Corning (Nova Iorque, EUA). Os anticorpos monoclonais utilizados para a determinação *in house* do FVW:AgII (CLB-Pro 35 e CLB-Pro 14.3) foram adquiridos da Cell Science (Cantom, EUA). A albumina bovina foi adquirida da Sigma (St. Louis, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de altíssimo grau de pureza.

3.2.2 Coleta com anticoagulante

A coleta do material (aproximadamente 10ml de sangue venoso periférico, coletado em citrato de sódio 3,2%, 1/10 v/v), foi realizada mediante consentimento do doador, durante procedimentos de rotina do Banco de Sangue.

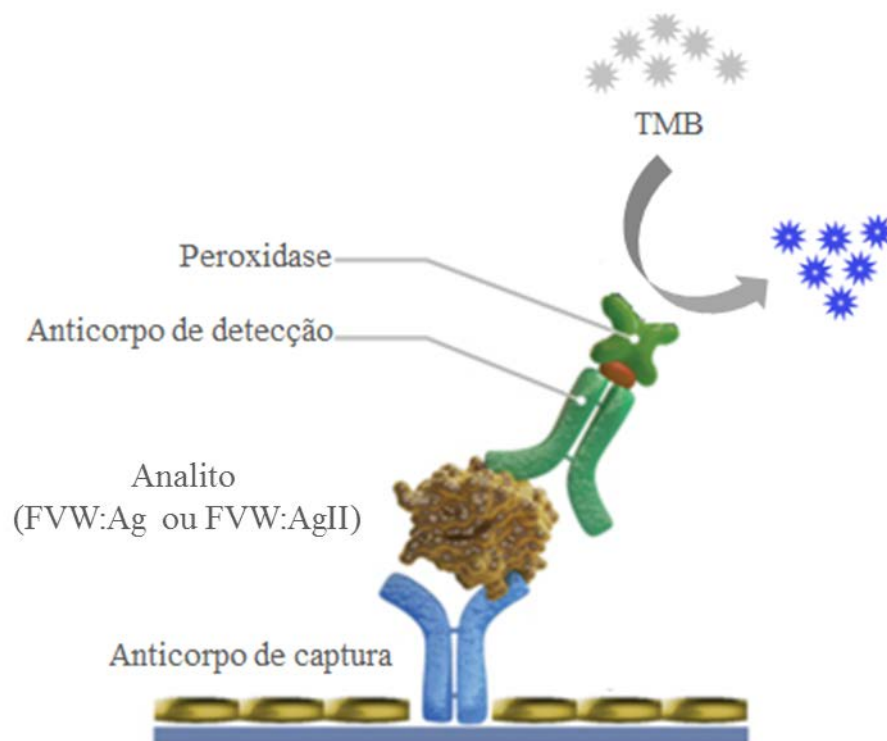
O sangue coletado foi centrifugado a 2900g durante 20 minutos para a obtenção do plasma que foi aliquoteado e congelado a -80°C até o momento da análise.

3.2.3 Determinação dos antígenos FVW:Ag e FVW:AgII

As determinações das concentrações de FVW:Ag e FVW:AgII foram realizadas por ELISA, sendo o FVW:AgII por ELISA in house e o FVW:Ag utilizando um kit comercial (Stago: Asserachrom VWF:Ag), de acordo com as especificações do fabricante.

O princípio do ensaio de ELISA, representado na figura 8, envolve a aplicação das amostras de plasma sobre uma placa sensibilizada com anticorpos anti-FVW humano (policlonal para o FVW:Ag e monoclonal para o FVW:AgII). O FVW presente na amostra de plasma se liga aos anticorpos anti-FVW fixados a placa, formando um complexo. Em seguida, são adicionados anticorpos policlonais anti-FVW humano ligados a peroxidase que se ligam aos antígenos imobilizados. Adiciona-se o substrato da peroxidase, solução de tetrametilbenzidina (TMB). A reação é interrompida acrescentando-se H_2SO_4 e a absorbância é obtida em leitor de ELISA em comprimento de onda 450nm, sabendo-se que a intensidade da coloração obtida é diretamente proporcional a concentração de FVW presente no meio. Utiliza-se uma curva de calibração com concentrações crescentes e conhecidas das proteínas analisadas que variam de 6,25 a 100UI.dL⁻¹. Os resultados são apresentados em UI.dL⁻¹.

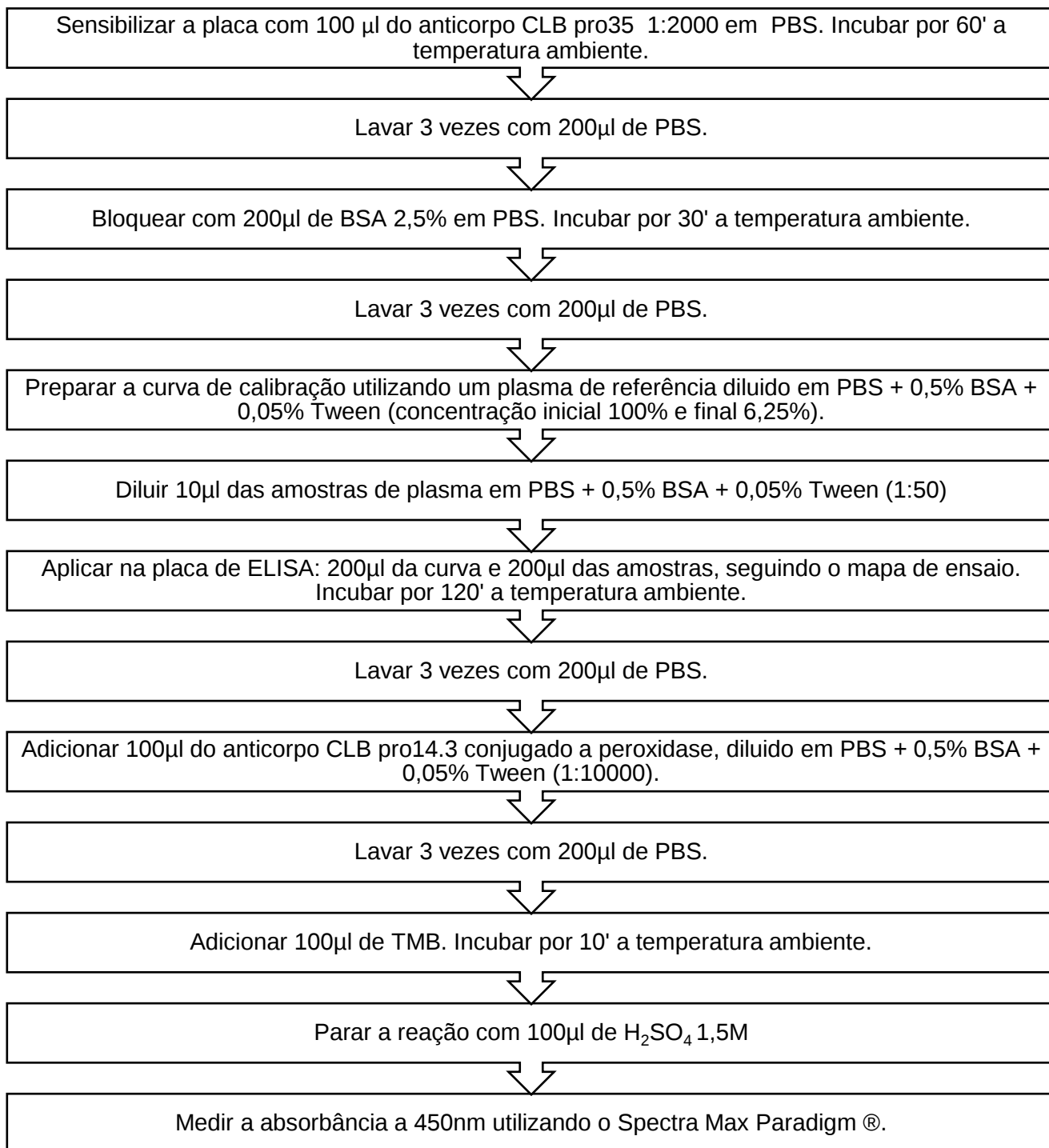
Figura 8: Esquema didático do princípio da técnica de ELISA.



Fonte: Domínio público

Diferente do ELISA comercial para o FVW:Ag em que a placa já vem sensibilizada, no ELISA para o FVW:AgII *in house* a placa é sensibilizada no laboratório utilizando um anticorpo monoclonal pro-VWFgII 763 CLB-Pro35, conforme fluxograma exibido na figura 9.

Figura 9: Técnica de ELISA para FVW:AgII, método *in house*.



PSB: tampão fosfato salino; BSA: albumina de soro bovino; TMB: tetrametilbenzidina

3.2.4 Cálculo da razão entre FVW:AgII/FVW:Ag

Utilizando as concentrações antigênicas do FVW:AgII e do FVW:Ag foi calculada a razão matemática entre essas proteínas.

3.3 Análise dos resultados

As variáveis analisadas no estudo foram testadas com relação à sua aderência à distribuição normal. Sendo a aderência satisfatória, os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Quando a aderência não foi satisfatória os resultados foram apresentados em mediana e percentis 25% e 75%. Para os procedimentos não paramétricos, as comparações entre dois grupos foram testadas utilizando o teste *Mann-Whitney*.

As comparações envolvendo mais de dois grupos foram feitas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) *Kruskal Wallis*. Quando o ANOVA mostrou que as médias dos grupos não eram iguais, utilizou-se o procedimento de comparações múltiplas de Dunn's para identificar quais grupos eram responsáveis por essas diferenças.

Para avaliar a presença de associação linear entre as variáveis em estudo, foram construídos diagramas de dispersão e calculados os coeficientes de correlação de *Spearman*.

A análise estatística e gráficos foram elaborados utilizando o "GraphPad Prism" (San Diego, CA, US) e as diferenças foram consideradas significantes quando o "p" encontrado foi inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

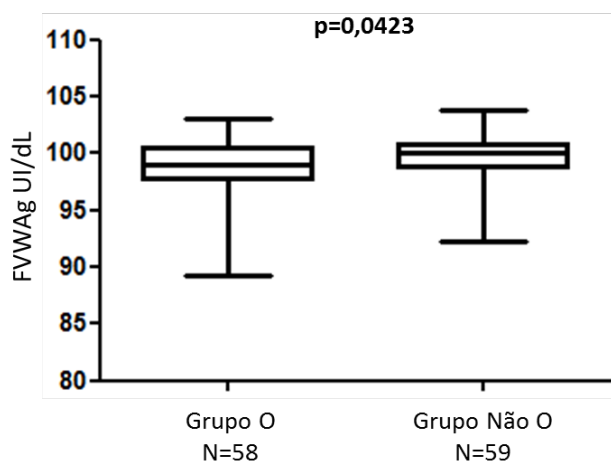
4.1 Características gerais da amostra

Foram incluídos 117 indivíduos saudáveis, doadores de sangue no Banco de Sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, sendo 52 (44,4%) do gênero feminino e 65 (55,5%) do gênero masculino, com mediana de idade de 38 anos, variando entre 22 e 69 anos. Esses doadores foram divididos de acordo com o grupo sanguíneo ABO em grupo “O” e “Não O”. O grupo “O” contou com 58 indivíduos (49,6%), sendo 25 do gênero feminino (43,1%) e 33 do gênero masculino (56,9%), com mediana de idade de 37 anos, variando entre 22 e 67. O grupo “Não O” contou com 59 indivíduos (50,4%), sendo 27 do gênero feminino (45,8%) e 32 do gênero masculino (54,2%), com mediana de idade de 40 anos, variando entre 24 e 69 anos. Os dados individuais dos 117 doadores estão apresentados no Apêndice, tabela A, páginas 50 a 52.

4.2 Proteína do Fator de von Willebrand (FVW:Ag)

A determinação da concentração plasmática do FVW:Ag apresentou uma diminuição significativa nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($98,64 \pm 2,95$ vs $99,66 \pm 1,84$ UI.dL⁻¹; $p=0,0423$), respectivamente (Figura 10). Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se no Apêndice, tabelas B e C, páginas 53 a 56.

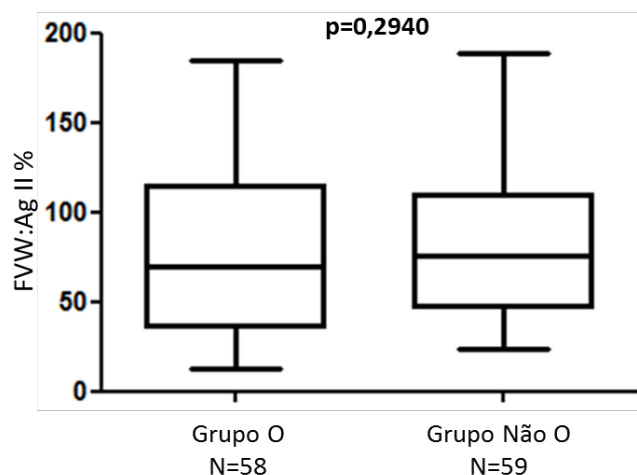
Figura 10: Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da determinação de FVW:Ag nos indivíduos dos grupos “O” e “Não O”. Teste *Mann Whitney*.



4.3 Pró-peptídeo do Fator de von Willebrand (FVW:AgII)

Na determinação da proteína FVW:AgII, não foi observada diferença significativa em sua concentração quando comparados os grupo “O” e “Não O” ($74,68 \pm 42,34$ vs $83,04 \pm 43,95\%$; $p=0,2940$), respectivamente (Figura 11). Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se no Apêndice, tabelas B e C, páginas 53 a 56.

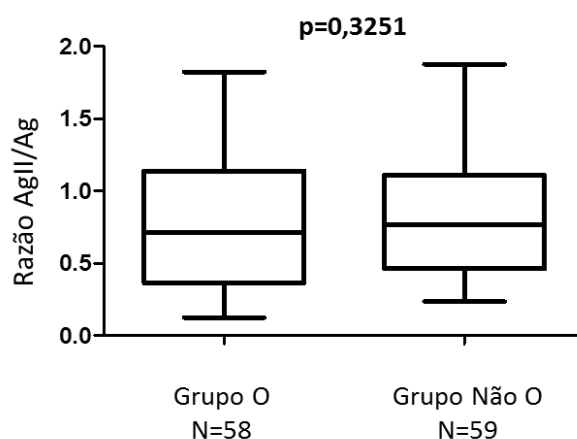
Figura 11: Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da determinação de FVW:AgII nos indivíduos dos grupos “O” e “Não O”. Teste *Mann Whitney*.



4.4 Razão e correlação entre FVW:AgII e FVW:Ag

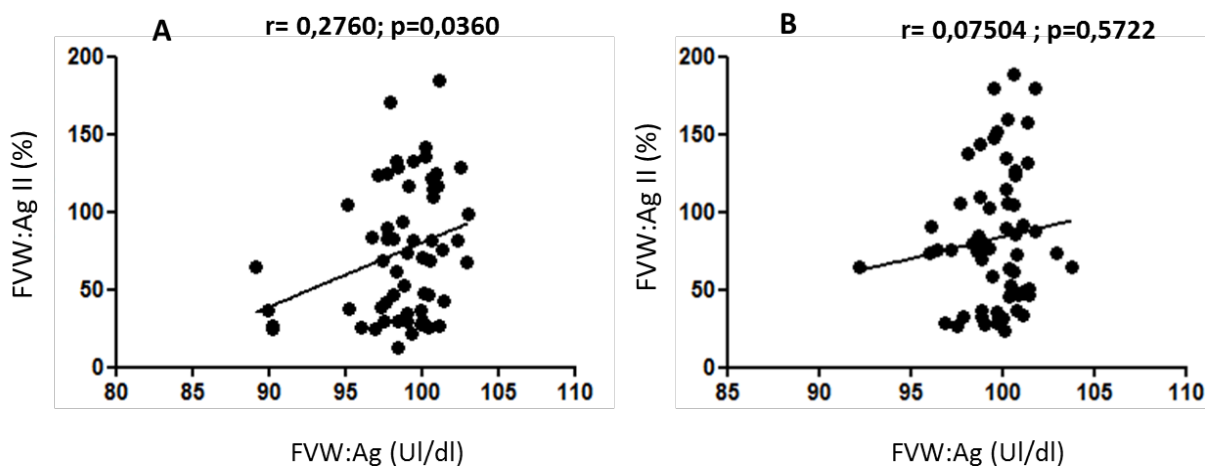
Utilizando as determinações das concentrações antigênicas, foi calculada a razão entre as proteínas FVW:AgII/FW:Ag. Nesse estudo não observamos diferença significativa na razão FVW:AgII/FVW:Ag entre indivíduos do grupo “O” e “Não O” ($0,75 \pm 0,42$ vs $0,83 \pm 0,44$; $p=0,3251$), respectivamente (Figura 12).

Figura 12: representação em *box plots* da razão entre as variáveis FVW:AgII/FVW:Ag. Teste *Mann Whitney*.



No estudo de correlação entre essas proteínas foi observada uma correlação positiva e significativa entre FVWAg x FVW:AgII no grupo “O” ($r= 0,2760$ e $p=0,0360$) e não significativa no grupo “Não O” ($r= 0,07504$ e $p=0,5722$); figura 13.

Figura 13: Análise individual do FVW:AgII (%) em função da concentração antigênica do FVW:Ag (UI/dl) em indivíduos “O” (A) e “Não O” (B). Teste *Spearman*.



A estratificação do grupo “Não O” em grupos A, B e AB permitiu que fosse verificada uma variação significativa na concentração de FVW:AgII entre os quatro grupos (O, A, B e AB; $p=0,0022$), sendo essa diferença significativa quando comparados os grupos O vs A e A vs B ($p<0,05$). A proteína FVW:Ag não apresentou variação significativa quando comparados os quatro grupos ($p=0,2080$). A razão entre as proteínas FVW:AgII/FVW:Ag apresentou diferenças significantes entre os grupos ($p=0,0025$), sendo essa variação significativa quando comparados os grupos O vs A e A vs AB ($p<0,05$); tabela 1.

Tabela 1: Representação da mediana e dos desvios padrão para as determinações das proteínas FVW:Ag e FVW:AgII nos grupos O, A, B e AB.

Variáveis	Grupo “O”	Grupo “Não O”			
	(N=58)	A (N=23)	B (N=24)	AB (N=12)	P*
FVW:Ag	98,64 ± 2,95	99,79 ± 2,30	99,55 ± 1,31	99,60 ± 1,72	0,2080
FVW:AgII	74,68 ± 42,34 *	104,64 ± 33,89*†	77,59 ± 46,19†	52,55 ± 33,90	0,0022
Razão FVW:AgII/FVW:Ag	0,75 ± 0,42*	1,05 ± 0,33*†	0,78 ± 0,46	0,53 ± 0,34†	0,0025

FVW:Ag: Fator de Von Willebrand, antígeno

FVW:AgII: Fator de Von Willebrand, pró-peptídeo

*ANOVA Kruskal-Wallis entre os 4 grupos.

** Dunn's $<0,05$

5 DISCUSSÃO

O FVW:Ag é um marcador de disfunção endotelial comumente utilizado no diagnóstico de distúrbios hemorrágicos, como a Doença de von Willebrand (DVW). Altos níveis dessa proteína também são associados a doenças vasculares e disfunção endotelial. Embora o seu pró-peptídeo já seja utilizado em centros especializados em hemostasia para diagnosticar alguns tipos de DVW, em geral, esse marcador não é muito empregado na prática clínica relacionada a disfunções endoteliais (MAHAT; AZAIDAH; MARAINA, 2015).

Uma vez que o FVW:Ag e o FVW:AgII são secretados em quantidades equimolares frente a um estímulo, e que o pró-peptídeo, diferente da proteína madura, não é consumido pela agregação plaquetária, o FVW:AgII seria um possível candidato a marcador de lesão endotelial. Sendo assim, é importante entender a fisiologia e as diferenças entre o FVW:Ag e o seu pró-peptídeo (MAHAT; AZAIDAH; MARAINA, 2015).

Segundo Song (2015), o grupo sanguíneo ABO está associado com o desenvolvimento de doenças coronarianas, acidentes vasculares e tromboembolismo venoso, em parte por influenciar os níveis de FVW e FVIII na circulação. Em nosso estudo investigamos a influência do sistema de grupo sanguíneo ABO sobre os níveis plasmáticos de FVW:Ag e FVW:AgII em indivíduos saudáveis. Cada monômero do FVW contém 12 sítios de N-glicação e 10 sítios de O-glicação em potencial. Inicialmente, carboidratos ABO foram detectados nas cadeias N-ligadas, chegando a ocupar 13% desses sítios, e recentemente foram identificados três sítios de O-glicação que são modificados pelo ABO (SONG et al., 2015).

Nossos resultados mostram uma diminuição na concentração antigênica do FVW:Ag nos indivíduos do grupo “O” em relação aos indivíduos do grupo “Não O”, o que é consistente com a literatura, conforme demonstrando por Gill et al. (1987) em um estudo com 1117 indivíduos normais que verificou que os níveis de FVW:Ag eram menores em indivíduos do grupo “O” em relação a indivíduos do grupo “AB”. Desse estudo surgiu a ideia de que a influência do sistema ABO sobre os níveis de FVW

dificultasse o diagnóstico da Doença de Von Willebrand do tipo 1, já que indivíduos do grupo O podem apresentar concentrações de FVW:Ag abaixo de 50 UI.dl^{-1} , que é considerado o limite inferior normal.

A explicação mais provável para a redução dos níveis de FVW em indivíduos do grupo sanguíneo O, segundo Franchini et al. (2007), envolve uma alteração em seu catabolismo. Foi demonstrado por Mohlke et al. (1999) que os oligossacarídeos presentes na molécula do FVW são relevantes para o processo de *clearance* hepático, tanto em modelos animais como em humanos. Alterações no padrão de glicação do FVW em camundongos que apresentavam uma expressão alterada do gene da N-acetilgalactosaminil transferase resultaram em uma redução nos níveis de FVW, provavelmente, segundo Mohlke et al. (1999), devido a um aumento em seu catabolismo.

Essa hipótese foi reforçada por um estudo mais recente conduzido por O'Donnell (2002) com 158 indivíduos que demonstrou que indivíduos do grupo "O" apresentam concentrações de FVW:Ag significativamente reduzidas quando comparados a indivíduos do grupo "A". Os autores quantificaram os determinantes antigênicos A e H, pertencentes ao grupo sanguíneo ABO e encontraram uma correlação positiva entre a expressão da transferase A, o número de cópias do antígeno A presentes no FVW e a concentração plasmática de FVW. Por outro lado, encontraram uma correlação inversa entre a quantidade de antígenos H expressos no FVW e os níveis plasmáticos de FVW em indivíduos do grupo O, os quais não apresentam o antígeno A. Com base nessas observações, a teoria de que a variação nas concentrações de FVW entre indivíduos de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO é resultado de uma diferença em seu catabolismo, e que esse processo é influenciado pela presença de carboidratos do grupo sanguíneo ABO vem sendo bem aceita (KLARMANN et al., 2010).

Nesse estudo foi possível verificar que, diferente da variável FVW:Ag, a concentração plasmática de FVW:AgII não variou de maneira considerável entre os grupos "O" e "Não O", o que é compatível com achados de outros estudos, como o de Nossent et al. (2006) que quantificou o FVW:AgII em indivíduos normais e em pacientes

anticoagulados após um evento de trombose venosa profunda e encontrou níveis similares de FVW:AgII nos indivíduos do grupo “O” e “Não O”.

Embora secretados em quantidades equimolares, o FVW:Ag e seu pró-peptídeo circulam na corrente sanguínea como proteínas independentes. Enquanto a meia-vida do FVW é de 8 a 12 horas, a do FVW:AgII é de aproximadamente 2 horas, provavelmente em consequência das diferenças estruturais entre as duas moléculas (ALBÁNEZ et al., 2016). Surge assim a hipótese de que a concentração plasmática do FVW:AgII não varie de maneira significativa entre os grupos sanguíneos ABO, como acontece com o FVW:Ag, devido as diferenças estruturais entre as duas moléculas, uma vez que o pró-peptídeo parece não carregar os antígenos ABO, como acontece no FVW. Sendo assim, a diferença entre grupos sanguíneos não influenciaria a avaliação do pró-peptídeo (MAHAT; A ZAIDAH; MARAINA, 2015).

Dessa maneira, a quantificação do pró-peptídeo, segundo van Mourik e Wit (2001), poderia proporcionar um meio para avaliar a ativação de células endoteliais *in vivo* de uma forma quantitativa e mais específica, uma vez que o pró-peptídeo, embora secretado em quantidade equimolar ao FVW, não se prende ao tecido conjuntivo subendotelial quando secretado, ou seja, seus níveis plasmáticos provavelmente refletem com mais precisão o processo de secreção endotelial do que os níveis de FVW, podendo assim ser um importante biomarcador de fase aguda.

Utilizando as determinações das concentrações antigênicas é possível calcular a razão entre as proteínas FVW:AgII/FVW:Ag. Segundo van Mourik e Wit (2001), uma vez que o FVW:Ag e o FVW:AgII são eliminados da circulação em tempos diferentes, é possível utilizar essa variável para avaliar a extensão da secreção pelas células endoteliais em um espaço de tempo e calcular a meia vida do FVW.

Uma elevação na razão entre FVW:AgII/FVW:Ag está relacionada com uma redução na meia-vida do FVW:Ag e é associada a alguns casos de DVW do tipo 1. Embora estudos demonstrem um aumento na razão entre FVW:AgII/FVW:Ag em indivíduos saudáveis do grupo “O” em relação a indivíduos do grupo “Não O” (MAHAT; A ZAIDAH; MARAINA, 2015) e atribuam essa variação a um aumento no catabolismo

do grupo “O” causada pela presença dos antígenos ABO (particularmente do antígeno H) (GALLINARO et al., 2008), nesse estudo não observamos diferença significativa na razão entre essas proteínas entre os grupos “O” e “Não O”, possivelmente porque devemos considerar que dentro do grupo “Não O” existe uma variedade de número de indivíduos dos demais tipos sanguíneos ABO (A, B, e AB), que sabemos conter porcentagens diferentes do antígeno H.

Com a intenção de entender melhor a relação entre as proteínas FVW:Ag e FVW:AgII nos grupos “O” e “Não O” foi feita uma análise individual da correlação entre essas proteínas. Observamos uma correlação positiva e significativa entre elas no grupo “O”, ao contrário do grupo “Não O”, no qual a correlação não se mostrou significativa, provavelmente porque no grupo “Não O” os diferentes fenótipos (A, B, e AB) tenham concentrações do antígeno H distintas entre si, o que não ocorre no grupo “O”.

Na análise do grupo “O” e “Não O” em seus fenótipos A, B e AB não verificamos diferenças entre os quatro fenótipos para a variável FVW:Ag, provavelmente em consequência do número reduzido de indivíduos em cada grupo.

Na análise da proteína FVW:AgII encontramos diferenças entre os quatro fenótipos ABO, sendo que os indivíduos do grupo “O” apresentaram uma menor concentração dessa proteína em relação ao fenótipo A e B. Podemos especular que embora o FVW:AgII não sofra influência direta do grupo sanguíneo ABO em sua estrutura, ele pode sofrer uma influência na sua síntese. Essa teoria torna-se plausível quando observamos que a análise da razão entre os quatro fenótipos apresenta-se, como já esperado, menor no grupo AB, já que esse tem uma maior concentração de FVW:Ag.

Foi possível observar uma variação significativa entre a razão FVW:AgII/FVW:Ag entre os grupos “O” e “A” e entre os grupos “A” e “AB”. Conforme mencionado anteriormente, a razão entre FVW:AgII/FVW:Ag está diretamente relacionada ao catabolismo do FVW:Ag. Já foi proposto que um aumento na depuração do FVW:Ag em indivíduos “O” estaria relacionada a presença dos antígenos H (GALLINARO et al., 2008). Da mesma maneira, a diferença entre as razões FVW:AgII/FVW:Ag entre os

grupos “A” e “AB” também estaria relacionada a densidade antigênica dos carboidratos ABO presentes no FVW, uma vez que foi demonstrado por Itsara et al (2015) que existe uma grande variação na densidade antigênica do glicano H entre os grupos sanguíneos.

Muitos estudos analisaram a relação entre o grupo ABO e tromboembolismos venosos, mas não existem muitos trabalhos publicados sobre a associação do grupo ABO e distúrbios hemorrágicos. Uma vez que os níveis de FVW são 25–35% mais baixos em indivíduos do grupo O (GILL et al., 1987), é razoável pensar que esses indivíduos tenham uma maior tendência de sangramento. Um estudo realizado por Horwich et al. (1966) em pacientes com úlcera duodenal apresentou uma prevalência maior de indivíduos do tipo sanguíneo O entre os pacientes que apresentaram sangramento. Em outro estudo com 1261 pacientes que apresentaram epistaxe, Reddy et al. (2008) observaram que pacientes do grupo “O” apareciam com mais frequência entre todos os pacientes admitidos. Apesar desses dados, essa relação ainda é controversa. Welsby et al (2007) estudaram 877 pacientes submetidos a cirurgia não emergencial da artéria coronária e não notaram um aumento nos eventos de sangramento dos indivíduos “O”, comparados aos demais grupos sanguíneos.

Durante os últimos anos é notado um significativo avanço na compreensão dos mecanismos entre as moléculas FVW, FVW:AgII e FVIII e suas relações entre si e com o sistema ABO. Os dados gerados pelo presente estudo contribuem para o entendimento dessas proteínas no cenário fisiológico. Dessa forma, julgamos que a progressiva compreensão dos mecanismos fisiológicos relacionados ao endotélio e hemostasia é necessária para a definição de novos marcadores de risco para doenças vasculares e para futuras aquisições no campo terapêutico.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem afirmar que, de fato, o sistema ABO influencia a concentração antigênica do FVW maduro e não a concentração do pró-peptídeo FVW:AgII, quando avaliados em indivíduos “O” e “não O”. Esse fato é reflexo da adição de carboidratos do sistema sanguíneo ABO ao FVW maduro, que influencia sua susceptibilidade a ADAMTS-13 e consequentemente sua meia-vida e concentração plasmática.

Já proteína FVW:AgII não sofre glicosilação, portanto sua meia-vida e concentração não são afetadas pelo sistema ABO. Sendo assim, o FVW:AgII seria um excelente candidato a biomarcador de lesão endotelial, embora sejam necessários mais estudos para entender o seu comportamento dentro dos quatro fenótipos sanguíneos O, A, B e AB.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Amit et al. ABO and Rh (D) group distribution and gene frequency; the first multicentric study in India. **Asian Journal Of Transfusion Science**, v. 8, n. 2, p.121-126, dez. 2014.
- ALBÁÑEZ, S. et al. Aging and ABO blood type influence VWF and FVIII levels through interrelated mechanisms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.14, n.1, p.62-77, fev. 2016.
- ATIRE, Fekadu Alemu. Distribution of ABO and Rh Blood Groups Among Students of Some Ethnic Groups at Dilla University, Ethiopia. **International Journal of Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p.8-15, fev. 2015.
- BAHIA, Luciana et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p.291-303, abr. 2006.
- BATISSOCO, Ana Carla; NOVARETTI, Marcia Cristina Zago. Aspectos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 1, p.47-58, mar. 2003.
- BÖHMIG, Georg A. et al. Strategies to overcome the ABO barrier in kidney transplantation. **Nat Rev Nephrol**, v.11, n.12, p.732-747, set. 2015.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of Oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CARPEGGIANI, Clara et al. ABO blood group alleles: A risk factor for coronary artery disease. An angiographic study. **Atherosclerosis**, v.211, n2, p.461-466, ago. 2010.
- EPSTEIN, Franklin H. et al. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes. **New England Journal Of Medicine**, v. 326, n. 4, p.242-250, jan. 1992.
- ESPER, Ricardo J et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovasc Diabetol**, v. 5, n. 1, p.4-19, 2006.

FERREIRA, Cláudia Natália et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.32, n. 5, p.416-421, 2010.

FRANCHINI, Massimo et al. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, v. 49, n. 4, p.137-149, ago. 2012.

FRANCO, Rendrik F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p.229-237, jun. 2001.

FUNG, Mark K. et al. **Technical Manual of the American Association of Blood Banks**. 18. ed. Boston: American Association Of Blood Banks (aabb), 2014.

GALLINARO, L. et al. A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. **Blood**, v.111, n.7, p.3540-3545, abr. 2008.

GILL, Jc et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. **Blood**, v.69, n.6, p.1691-1695, jun. 1987.

GIRIBELA, Cassiana R. G. et al. Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia as perspectivas. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v.18, p.17-32, jul. 2011.

GROENEVELD, Dafna J. et al. Storage and secretion of naturally occurring von Willebrand factor A domain variants. **British Journal Of Haematology**, v.167, n.4, p.529-540, ago. 2014.

GUIMARAES, Raphael Mendonça et al . Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v.37, n.2, p. 83-89, Feb. 2015.

HABERICHTER, S. L. Von Willebrand factor propeptide: Biology and clinical utility. **Blood Journal**, v. 126, n. 15, p. 1753–1761, 8 out. 2015.

HASSAN, Md. Imtaiyaz; SAXENA, Aditya; AHMAD, Faizan. Structure and function of von Willebrand factor. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.23, n.1, p.11-22, jan. 2012.

HOFFMAN, Maureane; MONROE, Dougald M. A Cell-based Model of Hemostasis. **Thrombosis And Haemostasis**, Chapel Hill, v.85, n.5, p.407-414, jun. 2001.

HORWICH, L et al. ABO blood groups in gastric bleeding. **Gut**, v. 680, n. 7, p.680-685, jun. 1966.

ITSARA, Andy et al. Complex Relationship of Blood Group H, ABO Glycans, and Von Willebrand Factor Levels. **Bloodjournal**, Washington, v.302, n.2, p.327-332, dez. 2015.

JENKINS, Vince P; O'DONNELL, James S. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion**, v. 46, n. 10, p.1836-1844, out. 2006.

JOÃO, Cristina. Doença de von Willebrand. **Medicina Interna**, v. 8, n. 1, p.28-36, set. 2001.

KLARMANN, Dieter et al. Association of ABO(H) and I blood group system development with von Willebrand factor and Factor VIII plasma levels in children and adolescents. **Transfusion**, v. 50, n. 7, p.1571-1580, fev. 2010.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; ASTER, John C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LAWRENCE L. K. LEUNG. **Overview of hemostasis**. 2007. ed. Stanford.

LAWRIE, A. S. et al. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. **Haemophilia**, v. 19, n. 2, p.338-342, out. 2013.

LENTING, Peter J. et al. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in view of its structure and function. **Blood**, v. 92, n. 11, p.3983-3996, dez. 1998.

LIP, G. Von Willebrand factor: A marker of endothelial dysfunction in vascular disorders. **Cardiovascular Research**, v. 34, n. 2, p.255-265, mai 1997.

LOPES, A.A.; SOARES, R.P.S.; MAEDA, N.Y.. A mathematical framework for group analysis of von Willebrand factor multimeric composition following luminography. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 11, p. 1259-1263, Nov. 2002.

MAHAT; A Zaidah,; MARAINA, C. Von Willebrand Factor Propeptide: A Potential Disease Biomarker Not Affected by ABO Blood Groups. **Biomarker Insights**, p.75-79, ago. 2015.

MATSUI, T.; HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1075–1087, ago 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand**. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/MANUAISHEMEPAR/Manual_de_diagnostico_tratamentodadoencadevonWillebrand.pdf>. Acesso em: 24 maio 2015.

MOHLKE, K. et al. Mvwf, a dominant modifier of murine von Willebrand factor, results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 111–20, fev 1999.

MORAN, T. A.; VIELE, C. S. Normal clotting. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 21, n. 4, p. 1–11, dez. 2005.

NOSSENT, A. et al. Von Willebrand factor and its propeptide: The influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 4, n. 12, p. 2556–62, out. 2006.

O'DONNELL, J. Amount of H Antigen Expressed on Circulating von Willebrand Factor Is Modified by ABO Blood Group Genotype and is a Major Determinant of Plasma von Willebrand Factor Antigen Levels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 22, n. 2, p.335-341, fev. 2002.

O'DONNELL, J.; LAFFAN, M. A.. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. **Transfus Med**, v.11, n.4, p.343-351, ago. 2001.

PINOL, M. et al. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. **Haematologica**, v. 92, n. 5, p.712-713, mai 2007.

REDDY, V. et al. Is there an association between blood group O and epistaxis? **The Journal of laryngology and otology**, v. 122, n. 4, p. 366–8, jun. 2007.

ROSENBERG, J. B. The role of the D1 domain of the von Willebrand factor propeptide in multimerization of VWF. **Blood**, v.100, n.5, p.1699-1706, mai 2002.

SADLER, J. Evan. New Concepts in Von Willebrand Disease. *Annu. Rev. Med.*, v. 56, n. 1, p.173-191, fev. 2005. Annual Reviews.

SMITH, Stephanie A.. The cell-based model of coagulation. **Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care**, v.19, n.1, p.3-10, fev. 2009.

SONG, Jaewoo et al. Quantitative Influence of ABO Blood Groups on Factor VIII and Its Ratio to von Willebrand Factor, Novel Observations from an ARIC Study of 11,673 Subjects. **Plos One**, v.10, n. 8, p.7-14, ago. 2015.

SOUSA, Norma C.. Estudo da relação entre os polimorfismos do gene ABO e os níveis circulantes do fator de von Willebrand e fator VIII. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p.290-291, 2004.

TERRAUBE, V; O'DONNELL, J. S; JENKINS, P. V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: Biological, clinical and therapeutic importance. **Haemophilia**, v. 16, n. 1, p.3-13, jan. 2010.

TONACO, Leandro C. et al. Púrpura trombocitopênica trombótica: O papel do fator von Willebrand e da ADAMTS13. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 2, p.155-161, mar 2010.

VISCHER, U.; MOERLOOSE, P. Von Willebrand factor: From cell biology to the clinical management of von Willebrand's disease. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 30, n. 2, p. 93–109, 10 ago. 1999.

WELSBY et al. ABO blood group and bleeding after coronary artery bypass graft surgery. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.18, n.8, p.781-785, mar. 2007.

WIT, Thalia Romani de; VAN MOURIK, Jan A.. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, n. 2, p.241-255, jun. 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Tabela contendo os dados individuais dos doadores inclusos no estudo.

ID	Gênero	Idade (anos)	Tipo Sanguíneo	FVWAg UI.dL ⁻¹	FVW:Ag II %	Razão AgII/Ag
1	Feminino	N/F	O+	100,745	109,176	1,084
2	Masculino	N/F	O+	102,550	128,951	1,257
3	Masculino	N/F	O+	97,745	89,541	0,916
4	Masculino	N/F	B+	98,906	69,684	0,705
5	Feminino	N/F	A+	100,330	105,530	1,052
6	Masculino	N/F	B+	98,771	109,747	1,111
7	Masculino	N/F	O-	99,430	132,390	1,331
8	Masculino	N/F	O-	97,714	124,247	1,272
9	Masculino	N/F	A+	100,590	104,767	1,042
10	Feminino	N/F	A+	98,687	84,388	0,855
11	Feminino	N/F	A+	101,394	157,210	1,550
13	Masculino	N/F	O+	99,077	73,937	0,746
14	Masculino	N/F	O+	100,208	141,625	1,413
15	Feminino	N/F	B+	100,626	188,990	1,878
16	Masculino	N/F	O+	97,126	123,298	1,269
17	Masculino	N/F	A+	100,300	159,961	1,595
18	Masculino	N/F	O-	97,971	170,322	1,738
19	Masculino	N/F	A+	98,094	137,423	1,401
20	Masculino	N/F	AB+	99,695	151,834	1,523
21	Masculino	N/F	A+	101,355	131,760	1,300
22	Masculino	N/F	O+	100,966	124,311	1,231
23	Masculino	N/F	A+	101,801	180,052	1,769
24	Feminino	N/F	O+	100,692	81,259	0,807
25	Masculino	N/F	A-	100,186	89,688	0,895
26	Masculino	N/F	B+	97,239	75,644	0,778
27	Feminino	N/F	A+	92,216	64,728	0,702
28	Feminino	N/F	A+	98,848	80,264	0,812
29	Feminino	N/F	O+	98,190	82,371	0,839
30	Masculino	N/F	O+	100,748	114,269	1,134
31	Masculino	N/F	B-	100,669	85,308	0,847
32	Masculino	N/F	AB+	96,107	90,632	0,943
33	Feminino	N/F	A-	100,725	123,458	1,226
34	Feminino	N/F	A+	98,753	143,347	1,452
35	Masculino	N/F	B+	99,581	147,252	1,479
36	Feminino	N/F	O-	98,739	93,214	0,944
37	Feminino	N/F	B+	99,519	179,655	1,805

ID	Gênero	Idade (anos)	Tipo Sanguíneo	FVWAg UI.dL ⁻¹	FVW:Ag II %	Razão AgII/Ag
40	Masculino	38	B+	100,679	126,226	1,254
42	Feminino	25	B+	100,823	73,149	0,726
44	Masculino	30	A+	101,105	91,572	0,906
45	Masculino	39	O+	95,164	105,136	1,105
47	Feminino	28	O+	101,074	116,317	1,151
48	Masculino	57	O+	100,622	121,417	1,207
49	Masculino	50	A-	98,375	79,775	0,811
52	Masculino	59	A+	99,300	102,573	1,033
53	Masculino	37	AB+	98,894	32,491	0,329
54	Masculino	25	O+	96,717	83,550	0,864
56	Masculino	27	O+	100,541	68,171	0,678
57	Masculino	31	A+	99,453	58,759	0,591
58	Feminino	40	B+	100,210	114,469	1,142
59	Feminino	37	O+	99,147	116,237	1,172
60	Masculino	50	B+	96,063	73,430	0,764
62	Masculino	36	AB+	101,131	49,101	0,486
63	Masculino	60	B+	100,099	23,768	0,237
64	Feminino	45	A+	102,930	73,715	0,716
65	Feminino	30	O+	89,184	64,774	0,726
66	Feminino	52	A+	98,605	74,500	0,756
68	Feminino	24	O+	98,328	61,403	0,624
70	Feminino	28	A-	100,174	135,160	1,349
72	Masculino	35	O+	102,304	81,933	0,801
73	Feminino	58	O-	100,233	135,900	1,356
77	Masculino	53	O+	101,138	184,482	1,824
79	Masculino	56	O+	98,321	132,733	1,350
80	Feminino	36	B+	97,724	105,221	1,077
83	Feminino	46	O+	98,489	128,547	1,305
84	Feminino	36	O+	98,842	53,163	0,538
85	Feminino	53	O+	99,435	81,528	0,820
87	Masculino	45	O+	101,186	27,009	0,267
89	Feminino	46	O+	101,458	42,697	0,421
90	Masculino	42	O-	99,920	36,645	0,367
91	Masculino	40	O+	99,942	27,467	0,275
92	Masculino	57	B+	100,439	52,534	0,523
93	Masculino	33	O+	100,116	47,649	0,476
95	Feminino	23	O-	101,312	75,337	0,744
96	Masculino	29	O+	90,216	24,784	0,275
97	Feminino	42	O+	97,617	41,689	0,427
98	Feminino	22	O+	100,086	70,595	0,705

ID	Gênero	Idade (anos)	Tipo Sanguíneo	FVWAg UI.dL ⁻¹	FVW:Ag II %	Razão AgII/Ag
99	Feminino	39	A+	101,802	87,753	0,862
101	Feminino	56	A+	103,803	64,954	0,626
102	Feminino	50	B+	100,651	61,436	0,610
104	Feminino	52	A+	96,430	75,331	0,781
109	Masculino	24	B+	99,332	76,499	0,770
113	Masculino	49	B+	99,698	28,541	0,286
115	Feminino	25	O+	97,702	83,066	0,850
116	Masculino	29	O+	97,494	68,470	0,702
120	Masculino	24	O+	89,993	36,296	0,403
122	Feminino	28	B+	101,486	46,859	0,462
124	Feminino	38	O+	102,992	67,543	0,656
125	Masculino	49	B+	100,402	64,106	0,638
127	Masculino	47	B+	98,852	36,637	0,371
128	Feminino	32	O+	103,063	98,537	0,956
132	Masculino	47	AB+	100,849	46,578	0,462
133	Masculino	40	O-	100,041	29,643	0,296
134	Feminino	50	O+	99,044	35,137	0,355
138	Masculino	27	O+	96,044	25,229	0,263
139	Feminino	49	O+	100,434	46,340	0,461
140	Feminino	43	AB+	97,903	32,234	0,329
142	Feminino	24	O+	99,388	21,715	0,218
145	Masculino	47	B+	99,058	27,958	0,282
148	Feminino	35	AB-	96,904	28,583	0,295
154	Masculino	44	B+	100,045	32,070	0,321
155	Feminino	25	B+	100,792	36,606	0,363
157	Feminino	26	O+	90,208	26,797	0,297
169	Masculino	67	O+	98,462	29,263	0,297
171	Masculino	66	O-	97,328	38,387	0,394
172	Masculino	39	O+	96,969	24,764	0,255
173	Masculino	34	AB+	100,351	45,301	0,451
179	Feminino	37	O-	97,520	30,115	0,309
182	Masculino	31	O+	95,288	37,241	0,391
184	Feminino	34	O+	99,053	29,256	0,295
186	Feminino	33	B+	97,569	26,389	0,270
188	Masculino	31	O+	98,448	12,390	0,126
189	Masculino	69	AB+	101,455	50,580	0,499
191	Masculino	57	O+	100,464	26,084	0,260
192	Masculino	46	O+	98,146	47,112	0,480
208	Feminino	37	AB+	101,158	34,118	0,337
214	Feminino	27	AB-	99,677	35,440	0,356

ID	Gênero	Idade (anos)	Tipo Sanguíneo	FVWAg UI.dL ⁻¹	FVW:Ag II %	Razão AgII/Ag
220	Feminino	30	AB+	101,146	33,747	0,334
	Média	39,963		99,155	78,897	0,794
	DP	11,734		2,504	43,365	0,432
	Mediana	38		99,581	73,937	0,746
	Mínimo	22		89,184	12,390	0,126
	Máximo	69		103,803	188,990	1,878

ID: identificação do doador no estudo; N/F: não fornecido; FVW:Ag: antígeno do FVW; FVW:AgII: antígeno do pró-peptídeo do FVW; UI.dL⁻¹: unidades internacionais por decilitro.

APÊNDICE B: tabela contendo as concentrações de FVW:Ag e FVW:AgII obtidas para cada doador do grupo O, a média e desvio padrão obtidos.

ID	Idade (anos)	FVW:Ag II %	FVWAg UI.dL ⁻¹	Razão AgII/Ag
1	N/F	109,176	100,745	1,084
2	N/F	128,951	102,550	1,257
3	N/F	89,541	97,745	0,916
7	N/F	132,390	99,430	1,331
8	N/F	124,247	97,714	1,272
13	N/F	73,937	99,077	0,746
14	N/F	141,625	100,208	1,413
16	N/F	123,298	97,126	1,269
18	N/F	170,322	97,971	1,738
22	N/F	124,311	100,966	1,231
24	N/F	81,259	100,692	0,807
29	N/F	82,371	98,190	0,839
30	N/F	114,269	100,748	1,134
36	N/F	93,214	98,739	0,944
45	39	105,136	95,164	1,105
47	28	116,317	101,074	1,151
48	57	121,417	100,622	1,207
54	25	83,550	96,717	0,864
56	27	68,171	100,541	0,678
59	37	116,237	99,147	1,172
65	30	64,774	89,184	0,726
68	24	61,403	98,328	0,624
72	35	81,933	102,304	0,801
73	58	135,900	100,233	1,356
77	53	184,482	101,138	1,824
79	56	132,733	98,321	1,350
83	46	128,547	98,489	1,305
84	36	53,163	98,842	0,538
85	53	81,528	99,435	0,820
87	45	27,009	101,186	0,267
89	46	42,697	101,458	0,421
90	42	36,645	99,920	0,367
91	40	27,467	99,942	0,275
93	33	47,649	100,116	0,476
95	23	75,337	101,312	0,744
96	29	24,784	90,216	0,275
97	42	41,689	97,617	0,427
98	22	70,595	100,086	0,705
115	25	83,066	97,702	0,850

ID	Idade (anos)	FVW:Ag II %	FVWAg UI.dL ⁻¹	Razão AgII/Ag
116	29	68,470	97,494	0,702
120	24	36,296	89,993	0,403
124	38	67,543	102,992	0,656
128	32	98,537	103,063	0,956
133	40	29,643	100,041	0,296
134	50	35,137	99,044	0,355
138	27	25,229	96,044	0,263
139	49	46,340	100,434	0,461
142	24	21,715	99,388	0,218
157	26	26,797	90,208	0,297
169	67	29,263	98,462	0,297
171	66	38,387	97,328	0,394
172	39	24,764	96,969	0,255
179	37	30,115	97,520	0,309
182	31	37,241	95,288	0,391
184	34	29,256	99,053	0,295
188	31	12,390	98,448	0,126
191	57	26,084	100,464	0,260
192	46	47,112	98,146	0,480
Média	38,590	74,680	98,644	0,754
D.P	12,025	42,341	2,950	0,423
Mediana	37	69,532	99,065	0,716
Mínimo	22	12,390	89,184	0,126
Máximo	67	184,482	103,063	1,824

ID: identificação do doador no estudo; N/F: não fornecido; FVW:Ag: antígeno do FVW; FVW:AgII: antígeno do pró-peptídeo do FVW; UI.dL⁻¹: unidades internacionais por decilitro.

APÊNDICE C: tabela contendo as concentrações de FVW:Ag e FVW:AgII obtidas para cada doador do grupo não O, a média e desvio padrão obtidos.

ID	Idade (anos)	FVW:Ag II %	FVWAg UI.L ⁻¹	Razão AgII/Ag
4	N/F	69,684	98,906	0,705
5	N/F	105,530	100,330	1,052
6	N/F	109,747	98,771	1,111
9	N/F	104,767	100,590	1,042
10	N/F	84,388	98,687	0,855
11	N/F	157,210	101,394	1,550
15	N/F	188,990	100,626	1,878
17	N/F	159,961	100,300	1,595
19	N/F	137,423	98,094	1,401
20	N/F	151,834	99,695	1,523
21	N/F	131,760	101,355	1,300
23	N/F	180,052	101,801	1,769
25	N/F	89,688	100,186	0,895
26	N/F	75,644	97,239	0,778
27	N/F	64,728	92,216	0,702
28	N/F	80,264	98,848	0,812
31	N/F	85,308	100,669	0,847
32	N/F	90,632	96,107	0,943
33	N/F	123,458	100,725	1,226
34	N/F	143,347	98,753	1,452
35	N/F	147,252	99,581	1,479
37	N/F	179,655	99,519	1,805
40	38	126,226	100,679	1,254
42	25	73,149	100,823	0,726
44	30	91,572	101,105	0,906
49	50	79,775	98,375	0,811
52	59	102,573	99,300	1,033
53	37	32,491	98,894	0,329
57	31	58,759	99,453	0,591
58	40	114,469	100,210	1,142
60	50	73,430	96,063	0,764
62	36	49,101	101,131	0,486
63	60	23,768	100,099	0,237
64	45	73,715	102,930	0,716
66	52	74,500	98,605	0,756
70	28	135,160	100,174	1,349
80	36	105,221	97,724	1,077
92	57	52,534	100,439	0,523
99	39	87,753	101,802	0,862

ID	Idade (anos)	FVW:Ag II %	FVWAg UI.L ⁻¹	Razão AgII/Ag
101	56	64,954	103,803	0,626
102	50	61,436	100,651	0,610
104	52	75,331	96,430	0,781
109	24	76,499	99,332	0,770
113	49	28,541	99,698	0,286
122	28	46,859	101,486	0,462
125	49	64,106	100,402	0,638
127	47	36,637	98,852	0,371
132	47	46,578	100,849	0,462
140	43	32,234	97,903	0,329
145	47	27,958	99,058	0,282
148	35	28,583	96,904	0,295
154	44	32,070	100,045	0,321
155	25	36,606	100,792	0,363
173	34	45,301	100,351	0,451
186	33	26,389	97,569	0,270
189	69	50,580	101,455	0,499
208	37	34,118	101,158	0,337
214	27	35,440	99,677	0,356
220	30	33,747	101,146	0,334
Média	41,595	83,042	99,657	0,833
D.P	11,161	43,955	1,836	0,438
Mediana	40	75,331	100,099	0,770
Mínimo	24	23,768	92,216	0,237
Máximo	69	188,990	103,803	1,878

ID: identificação do doador no estudo; N/F: não fornecido; FVW:Ag: antígeno do FVW; FVW:AgII: antígeno do pró-peptídeo do FVW; UI.dL⁻¹: unidades internacionais por decilitro.

ANEXO**ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa – CAPPesq.**

APROVAÇÃO

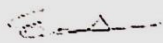
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/12/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0614/10**, intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DOS MULTÍMEROS DO FATOR DE VON WILLEBRAND E ATIVIDADE DA ADAMTS-13 EM PACIENTES COM SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA**" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Sergio Paulo Bydlowski**

Pesquisador (a) Executante: **Natália Mastantuono Nascimento**

CAPPesq, 09 de Dezembro de 2010


Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br