



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

DÉBORA SANTANA LARANJEIRA

Caracterização Fenotípica e Genotípica (*FvW* VNTR1, VNTR2 e VNTR3 intron 40) da Doença de von Willebrand em indivíduos da Bahia.

**Salvador
2012**

DÉBORA SANTANA LARANJEIRA

Caracterização Fenotípica e Genotípica (*FvW* VNTR1, VNTR2 e VNTR3 intron 40) da Doença de von Willebrand em indivíduos da Bahia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Vitória Adorno

**Salvador
2012**

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Laranjeira, Débora Santana.

Caracterização fenotípica e genotípica (*FvW* VNTR1, VNTR2 e VNTR3 intron 40) da Doença de Von Willebrand em indivíduos da Bahia / Débora Santana Laranjeira. - 2012. 70 f. : il.

Inclui apêndices.

Orientadora: Profª Drª Elisângela Vitória Adorno.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2012.

1. Von Willebrand, Doença de. 2. Von Willebrand, Fator de. 3. Doenças hemorrágicas. 4. Sangue - Distúrbios da coagulação. 5. Polimorfismo (Genética). I. Adorno, Elisângela Vitória. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 616.157
CDU - 616.151.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



TERMO DE APROVAÇÃO

DÉBORA SANTANA LARANJEIRA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA (FVW VNTR1 VNTR2 E VNTR3 INTRON 40) DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND EM INDIVÍDUOS DA BAHIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 27 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr.ª Elisângela Vitória Adorno
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. José Pereira de Moura Neto
Universidade Federal do Amazonas

Dr.ª Marilda de Souza Gonçalves
Universidade Federal da Bahia

Apoio Financeiro:

O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – fapesb com N° do Edital 004/2009 e N° do Termo de Outorga 040/2009. A autora foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Auxílio 147554/2010-1).

A Deus,

Pela vida e por todas as bênçãos que me acontecem a cada dia; pela fé que me torna mais próxima Dele e me permite romper as barreiras; pelo amor que me conforta e me permite o melhor desta vida;

Aos meus amados pais, Vilton e Edsa, por todo amor incondicional, apoio, orgulho e por se esforçarem para que eu tivesse sempre o melhor;

Aos meus queridos irmãos Vilton e Lucas pela amizade e por fazerem a minha vida mais bonita;

A Vitor por abrilhantar os meus dias, por todo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

- À Professora **Elisângela Vitória Adorno**, minha orientadora, pela oportunidade, orientação, pela paciência, pelos ensinamentos e incentivos;
- Aos queridos do Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular – ATGC, em especial Professora **Marilda Gonçalves** pelo acolhimento em seu laboratório; **Mari Ney** pela amizade, **Raíra, Ayala e Jean** pelo auxílio na realização deste trabalho;
- A minha linda amiga **Suellen** por ter sido minha grande companheira no laboratório e por sempre poder contar com sua ajuda;
- A todos os estagiários, técnicos e, em especial, a bioquímica **Maria da Paixão** e a técnica **Marilene** do Laboratório de Hematologia.
- Aos queridos do Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular (LPBM) da FIOCRUZ, em especial **Silvana**, por todo apoio na plataforma de sequenciamento e por todo carinho que sempre me acolheu;
- Aos voluntários pela participação e aos pais pelo consentimento da inclusão de seus filhos neste estudo;
- À coordenadora do HEMOBA, **Dra. Anelisa Streva**, por autorizar o estudo com os pacientes atendidos neste centro;
- À **Dr^a Larissa Rocha** por disponibilizar os prontuários dos pacientes para o estudo;
- À Faculdade de Farmácia-UFBA por proporcionar a realização deste estudo;
- Ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia pela oportunidade de realizar este estudo;
- Aos professores do mestrado pelos ensinamentos ao longo do curso;
- Aos colegas de turma do mestrado por todos os momentos de aprendizagem e conversas em especial, **Ana Paula Caires**, pelos momentos de estudo e amizade;
- Ao CNPQ e FAPESB pelo apoio financeiro;
- E àqueles que, mesmo não citados, colaboraram direta ou indiretamente para este trabalho.

LARANJEIRA, Débora Santana. **Caracterização fenotípica e genotípica (FvW VNTR1, VNTR2 e VNTR3 intron 40) da Doença de Von Willebrand em indivíduos da Bahia**. 2012. 70 f. il. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Salvador, Universidade Federal da Bahia, 2012.

RESUMO

A doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum descrito na literatura, sendo caracterizada pela deficiência nos níveis ou função do fator de von Willebrand (FvW). O gene *FvW* está localizado no cromossomo 12 e possui um número variável de repetições em *tandem* do tipo ATCT (VNTR)_n no intron 40. O objetivo do estudo foi caracterizar fenotípica e genotipicamente a DvW em indivíduos de Salvador-Bahia. A casuística foi composta por 21 indivíduos com diagnóstico de DvW atendidos na Fundação HEMOBA e 69 indivíduos da população geral. As informações clínicas dos indivíduos foram obtidas em prontuários e/ou questionários epidemiológicos. A análise dos VNTRs do intron 40 foi realizada através da reação da polimerase em cadeia (PCR) e os fragmentos analisados por eletroforese capilar, em sequenciador automático (AppliedBio-Systems); os demais testes laboratoriais foram realizados em equipamentos automatizados, exceto o Ag:FvW que foi determinado por método imunológico. A análise estatística foi desenvolvida no programa EpiInfo versão 6.0 e GraphPad Prism 5.0. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com DvW e grupo controle para as concentrações do Ag:FvW (39,5% e 74,5%, respectivamente; $p < 0,001$, teste t de Student não pareado); as concentrações do FVIII (42,9% e 70,7%, respectivamente; $p < 0,001$, teste t de Student não pareado) e para a relação do TTPa (1,30 minutos e 1,0 minuto, respectivamente; $p < 0,001$, teste t de Student não pareado). O FvW:RCo nos indivíduos com DVW apresentou média de 24,8%; 57,1% dos indivíduos com DvW foram do tipo 1 e 42,9% do tipo 2. As freqüências de internações e transfusões entre os indivíduos com DVW foram maiores entre aqueles com níveis de FvW:RCo menores que 20% ($p < 0,01$, ANOVA). O estudo do VNTR1 demonstrou freqüências mais elevadas para os alelos 4 (36,2%) e 5 (68,1%); o VNTR2 para os alelos 3 (55,1%) e 4 (52,2%) e o VNTR3 para o alelo 2 (37,7%), 3 (52,2%) e 4 (37,7%). O alelo 3 do VNTR3 esteve associado com níveis mais elevados do Ag:FvW nos indivíduos com DVW ($p < 0,01$, teste ANOVA), sugerindo um quadro clínico mais leve; entretanto, o alelo 5 do VNTR1 e o alelo 4 do VNTR2 estiveram associados à ocorrência de hemorragia pós-trauma. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou a importância da realização de mais estudos envolvendo os polimorfismos no intron 40 do gene *FvW*, bem como da sua associação a outras investigações laboratoriais, a fim de confirmar a influência dos alelos específicos sobre o perfil clínico e, futuramente, utilizá-los como marcador prognóstico na DvW.

Palavras-chaves: Doença de von Willebrand; Fator de von Willebrand; Polimorfismo gênico; Distúrbio hemorrágico.

LARANJEIRA, Débora Santana. **Phenotypic and Molecular Characterization of Von Willebrand Disease in Bahia** 2012. 70 f. il. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Salvador, Universidade Federal da Bahia, 2012.

ABSTRACT

The von Willebrand disease (vWD) resulting from quantitative or qualitative deficiency of von Willebrand factor (vWF). The gene *vWF* is located on chromosome 12 and has a variable number of tandem repeats type ATCT (VNTR)_n in intron 40. The aim of the study was characterized phenotypic and genotypically vWD in individuals of Salvador-Ba. It consisted of 21 individuals diagnosed with VWD and treated at HEMOBA and 69 individuals from the general population. Clinical information was obtained from medical records and / or epidemiological questioner. Analysis of VNTRs in intron 40 was carried out by polymerase chain reaction (PCR) and the fragments were run on a capillary electrophoretic in automated sequencer (Applied Bio-Systems). The laboratory tests were carried out on automated equipment, except vWF:Ag that was determined by immunological method. Statistical analysis was performed using EpiInfo software version 6.0 and GraphPad Prism 5.0. The results showed statistically significant differences between subjects with vWD and control group for FvW:Ag levels (39.5% and 74.5% respectively, $p < 0.001$, Student's t-test unpaired), FVIII (42.9% and 70.7% respectively, $p < 0.001$, Student's t-test unpaired) and the aPTT (1.30 and 1.0 minutes, respectively, $p < 0.001$, Student's t-test unpaired). The vWF:RCo levels in individuals with vWD was 24.8%; 57.1% of the individuals with DvW were type 1 and 42.9% type 2. The frequencies of hospitalization and transfusion were higher in those which vWF:RCo levels were below 20% ($p < 0.01$, ANOVA). The study of VNTR1 analysis showed higher frequencies of alleles 4 (36.2%) and 5 (68.1%); for VNTR2 alleles 3 (55.1%) and 4 (52.2%) and for VNTR3 allele 2 (37.7%), 3 (52.2%) and 4 (37.7%). Allele 3 of VNTR3 was associated with higher levels of FvW:Ag in individuals with vWD ($p < 0.01$, ANOVA), suggesting milder clinical cases. Allele 5 of the VNTR1 and allele 4 of VNTR2 were associated with bruising. Thus, this study demonstrated the importance of further studies involving polymorphisms in intron 40 of vWF gene as well as their association with other laboratory investigations to confirm the influence of alleles on the clinical profile, and eventually use them as a prognostic hallmark of vWD.

Key Words: von Willebrand disease; von Willebrand factor; Gene polymorphism; Bleeding disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag:FvW	Antígeno do fator de von Willebrand
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
dATP	(deoxiadenosina trifosfato)
dCTP	(deoxicitidina trifosfato)
dGTP	(deoxiguanosina trifosfato)
dTTP	(deoxitimidina trifosfato)
dNTP	(desoxirribonucleosídeos trifosfato)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
DvW	Doença de von Willebrand
DvW-TP	Doença de von Willebrand tipo plaquetário
EDTA	sal di-sódico do ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
FvW	fator de von Willebrand
FvW:RCo	Atividade do cofator da ristocetina
FVIII	Fator VIII da coagulação
GpIb	Glicoproteína palquetária Ib
GpIb/IX	Glicoproteína palquetária Ib/IX
GpIIb/IIIa	Glicoproteína palquetária IIb/IIIa
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
MAPM	Multímeros de Alto Peso Molecular

LISTA DE ABREVIATURAS

pb	Pares de base
PCRe	Proteína C Reativa
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RIPA	Agregação Plaquetária Induzida por Ristocetina
Rpm	rotações por minuto
RR	Risco relativo
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris-HCl	Tampão Tris do ácido clorídrico
TS	tempo de sangramento
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VNTR	Número variável de repetição em <i>tanden</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de multidomínios da proteína FvW demonstrando o peptídeo de sinal, sítios de ligação para o FVIII (D' e D3), sítio de ligação para Gp1b (A1), colágeno (A1 e A3), heparina (A1), sítio de ligação da ADAMTS-13 (A2) e sítio de ligação para $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	18
Figura 2 – Demonstração do papel do FvW no processo hemorrágico.....	19
Figura 3 – Representação gráfica dos valores médios para os testes laboratoriais contagem de plaquetas, relação do TTPa, FVIII da coagulação e Ag:FvW nos grupos estudados.....	41
Figura 4 – Representação gráfica da correlação de Pearson entre FVIII e Ag:FvW nos indivíduos com DvW.....	42
Figura 5 – Eletroferograma do VNTR1.	45
Figura 6 – Eletroferograma do VNTR2.....	45
Figura 7 – Eletroferograma do VNTR3.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação e definição da doença de von Willebrand segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia.....	26
Tabela 2 – Desenho dos <i>primers</i> e seus marcadores fluorescentes.	34
Tabela 3 – Percentual dos principais eventos hemorrágicos nos indivíduos com DvW	38
Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos testes laboratoriais nos indivíduos com DvW e nos indivíduos controles.....	40
Tabela 5 – Classificação da DvW baseada na relação RCo:FvW / Ag:FvW	43
Tabela 6 – Associação entre as concentrações do Ag:FvW e FvW:RCo com eventos de internação e uso de hemocomponentes dos indivíduos com DvW.....	44
Tabela 7 – Frequências alélicas dos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 dos indivíduos com DVW e população geral.....	47
Tabela 8 – Comparação da frequência alélica dos indivíduos com DvW e indivíduos da população geral	48
Tabela 9 – Frequência de Heterozigose para os polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3.....	48
Tabela 10 – Associação entre alelos mais frequentes dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 e as concentrações médias e o desvio-padrão do Ag:FvW.....	49
Tabela 11 – Associação entre Grupo Sanguíneo e alelos mais frequentes do VNTR1, VNTR2 e VNTR3 dos indivíduos com DvW.....	50
Tabela 12 – Associação entre alelos mais frequentes dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 com hemorragia pós-trauma dos indivíduos com DvW....	51

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONCEITO E HISTÓRIA DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND	15
1.2 PREVALÊNCIA DA DVW	16
1.3 FATOR DE VON WILLEBRAND	16
1.3.1 Caracterização do FvW	16
1.3.2 Função do FvW	18
1.3.3 Concentração Plasmática do FvW	20
1.3.4 Análise molecular do gene do FvW	21
1.4 CLASSIFICAÇÃO DA DVW.....	22
1.4.1 DvW Tipo 1	22
1.4.2 DvW Tipo 2	23
1.4.3 DvW Tipo 3	24
1.5 DIAGNÓSTICO DA DvW.....	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 CASUÍSTICA.....	30
4.1.1 Aspectos Éticos	30
4.1.2 População estudada	30
4.1.3 Desenho do estudo	31
4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO	31
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	34
4.4 ESTUDO MOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2, VNTR3 DO INTRON 40 NO GENE) <i>FvW</i>	34
4.4.1 Estudo dos polimorfismos VNTR1 e VNTR2 do intron 40	35
4.4.2 Estudo do polimorfismo VNTR3 do intron 40	35
4.4.3 Análise dos VNTRs do intron 40	36
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS	37
5.2 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DOS INDIVÍDUOS	38
5.3 CLASSIFICAÇÃO DA DvW PARA OS INDIVÍDUOS ESTUDADOS	42
5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES DO Ag:FvW E FvW:RCo E EVENTOS HEMORRÁGICOS DOS INDIVÍDUOS COM DVW	43

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES DO Ag:FvW E FvW:RC ₀ COM EVENTOS DE INTERNAÇÃO, TRANSFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES E PRESENÇA DE OUTRAS PATOLOGIAS NOS INDIVÍDUOS COM D _v W.....	43
5.6 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 e VNTR3 DO INTRON 40 NO GENE <i>FvW</i> NOS INDIVÍDUOS COM D _v W NA POPULAÇÃO GERAL	44
5.7 ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE HETEROZIGOSE PARA OS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 DO INTRON 40 DOS INDIVÍDUOS COM D _v W E DA POPULAÇÃO GERAL	48
5.8 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 DO INTRON 40 DO GENE <i>FvW</i> E CONCENTRAÇÕES DO FVIII, Ag:FvW E FvW:RC ₀	49
5.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS MAIS FREQUENTES DO VNTR1, VNTR2 e VNTR3 DO INTRON 40 DO GENE DO FvW E O GRUPO SANGUÍNEO	50
5.10 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS MAIS FREQUENTES DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 E EVENTOS HEMORRÁGICOS DOS INDIVÍDUOS COM D _v W	51
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO E HISTÓRIA DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND

A doença de von Willebrand (DvW) foi descrita em 1926 pelo médico finlandês Dr. Erik von Willebrand, sendo considerado o distúrbio hemorrágico hereditário mais frequente entre os seres humanos (von WILLEBRAND, 1926). Essa patologia apresenta herança autossômica dominante ou recessiva e resulta na alteração qualitativa ou quantitativa do fator de von Willebrand (FvW) (CECIL, 2001). Entretanto, embora seja uma condição rara, existe a forma adquirida da doença, que está associada a outras condições clínicas, como doenças autoimunes e uso de medicamentos (NICHOLS et al., 2009).

Os primeiros relatos da doença ocorreram em indivíduos de uma mesma família residentes do arquipélago de Aaland, ilhas do mar Báltico entre Suécia e Finlândia. A família era composta por 66 membros, sendo que destes, 24 relatavam sangramentos mucocutâneos intensos, destacando-se o caso de uma jovem, que sangrou até a morte durante seu quarto ciclo menstrual (BARBOSA et al., 2007). Quatro outros membros dessa família faleceram por desordens hemorrágicas; na época, essa doença foi denominada pseudohemofilia. No entanto, diferente da hemofilia, Dr. von Willebrand verificou o acometimento em ambos os sexos (ROBERTSON et al., 2008).

Os sintomas da doença variam de um indivíduo para outro, podendo ocorrer sangramentos leves, moderados ou intensos, a depender do tipo da DvW. Os sintomas hemorrágicos compreendem sangramento cutâneo, em mucosa, gengiva, epistaxe, por ferimento, pós-trauma, pós-extração dentária, pós-cirurgia, menometrorragia em mulheres e sangramento no trato gastrointestinal (LILLICRAP, 2007). No entanto, muitas vezes, o indivíduo pode ter a doença e ser assintomático, tornando difícil o seu diagnóstico; entretanto, alguns desses indivíduos após a ocorrência de distúrbios hemorrágicos, em especial devido a traumas externos ou procedimentos cirúrgicos a DvW passa a ser uma hipótese clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008)

1.2 PREVALÊNCIA DA DVW

A prevalência da DvW descrita em estudos populacionais nos Estados Unidos da América e na Itália é de 1,0% (SADLER et al.; 2006, FEDERICI, 2009; NICHOLS et al.,2009). Estudos recentes têm sugerido que a prevalência da DvW entre os indivíduos que procuram serviço médico com sintomas hemorrágicos é de 1/10.000 casos, semelhante à prevalência da hemofilia A (ROBERTSON et al., 2008).

A prevalência da DvW no Brasil, considerada o distúrbio hemorrágico mais frequente na literatura mundial, está abaixo do percentual esperado. Rezende e colaboradores (2009) verificaram que, aproximadamente, 11.000 casos de coagulopatias foram registrados no Brasil durante o ano de 2007, dos quais, 62,7% correspondiam a hemofilia A; 11,7% a hemofilia B; 21,2% referentes à DvW; 2,4% a outras coagulopatias e 2,0% sem diagnóstico. A frequência menor da DvW em relação a hemofilia A descrita no Brasil, pode ser decorrente do subdiagnóstico da doença. Além disso, os estados brasileiros com maior número de casos registrados são: São Paulo (24,2%), Rio de Janeiro (21,2%) e Minas Gerais (14,8%), resultados que podem refletir a presença de fontes diagnósticas mais completas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; REZENDE, et al. 2009).

1.3 FATOR DE VON WILLEBRAND

1.3.1 Caracterização do FvW

O FvW é uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular sintetizada pelas células endoteliais, megacariócitos e plaquetas (WAGNER, 1984; SPORN, 1985). O gene FvW está localizado no braço curto do cromossomo 12, contendo 178 Kilobases (Kb), sendo composto por 52 exons, que variam de tamanho entre 1,3 Kb (exon 28) a 40 pares de base (pb) (exon 50) (MANCUSO, 1989). Além do cromossomo 12, há um pseudogene presente no cromossomo 22, que duplica a sequência gênica do FvW para os exons 23-24 com 97% de homologia (MANCUSO, 1991). A presença deste pseudogene, somada a grande extensão do gene FvW, torna complexa a análise molecular (LILLICRAP, 2007).

A clonagem e caracterização do gene FvW foram realizadas em 1985, que foi estudado, simultaneamente, por quatro grupos. Desde então, esses estudos têm facilitado o entendimento da base molecular da doença (LYNCH, 1985), com grande número de polimorfismos no gene FvW, incluindo polimorfismos na região promotora, na sequência de introns e exons (ROBERTSON et al., 2008). A DvW é caracterizada por alterações nos níveis e/ou na função do FvW, os quais são decorrentes de mutações no gene que codifica essa proteína (RYDZ et al., 2012).

A síntese do FvW é complexa, sendo, inicialmente, traduzido em pré-pró-molécula, que é um polipeptídeo precursor, contendo 2813 aminoácidos com 360 Kilodaltons (KDa) de massa molecular. O pré-pró-FvW consiste de um peptídeo de sinal com 22 aminoácidos, um pro-polipeptídeo com 741 aminoácidos com 95 KDa (domínios D1 e D2); e uma subunidade madura do FvW, que apresenta os domínios D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 com 2050 aminoácidos com 250 KDa (Figura 1) (BONTHRON et al., 1986).

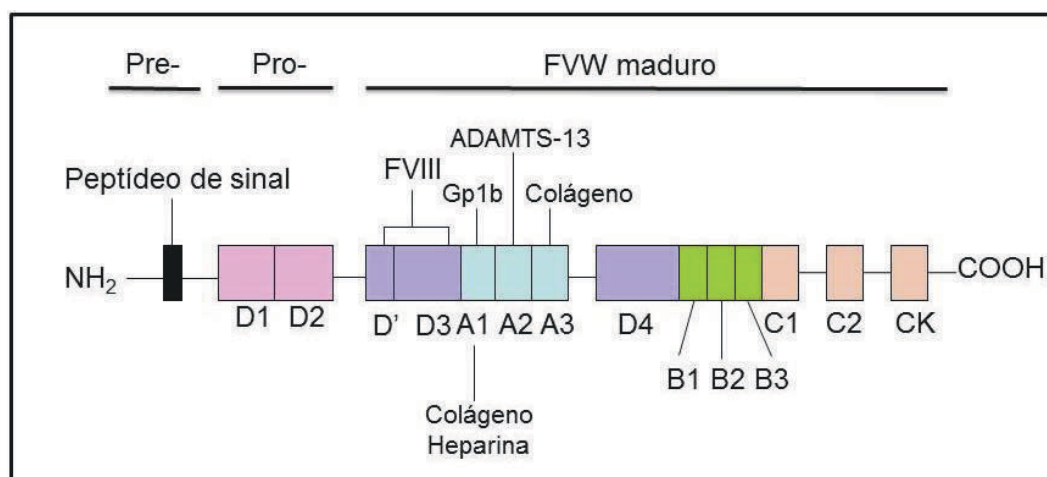
O peptídeo de sinal é removido no retículo endoplasmático, formando o monômero pró-FvW. Este sofre glicosilação para formação posterior de ligações dissulfídicas intramoleculares entre os domínios cisteína na região carboxila terminal, formando-se, então, os dímeros (WANG et al., 2011). No complexo de Golgi, os dímeros formam os multímeros, que possuem massa molecular variando de 500 KDa a 2000 KDa, decorrente de ligações dissulfídicas que envolvem os domínios D' e D3 da região amino-terminal de cada subunidade madura (SADLER, 2006; WANG et al., 2011). O pró-peptídeo sofre proteólise e os multímeros podem ser secretados no plasma, apresentando os sítios adesivos importantes para a função homeostática do FvW (Figura 1) ou serem armazenados nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais ou nos grânulos alfa das plaquetas e megacariócitos (WAGNER, 1984; SPORN, 1985; TITANI, 1986).

Através de estudos histológicos em tecidos de animais, foi observado que a expressão do FvW é, significativamente, maior em células endoteliais de veias, comparado com as células endoteliais de artérias (TERRAUBE et al. 2009). Além disso, alguns estímulos como hipóxia, histamina, trombina e fibrina, induzem a liberação plasmática dos multímeros armazenados nos grânulos (TSAI et al, 1991). O FvW maduro é, portanto, uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular (RUGGERI, 1981). Ao ser liberado no plasma, o multímero de alto peso molecular

sofre proteólise por uma desintegrina e metaloprotease com domínio trombospondina (ADAMTS-13), sob a influência da cascata da coagulação, ocorrendo clivagem entre resíduos de aminoácidos tirosina 1605 e metionina 1606 do domínio A2 da proteína (DONG, 2002).

A proteólise do FvW pela ADAMTS-13 limita a formação do trombo plaquetário e a deficiência desta protease, faz com que os multímeros de altíssimo peso molecular circulem no plasma da mesma forma como foram secretados, levando à doença conhecida por Púrpura Trombocitopênica Trombótica (TSAI, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Figura 1 – Estrutura de multidomínios da proteína FvW demonstrando o peptídeo de sinal, sítios de ligação para o FVIII (D' e D3), sítio de ligação para Gp1b (A1), colágeno (A1 e A3), heparina (A1), sítio de ligação da ADAMTS-13 (A2) e sítio de ligação para α IIb β 3



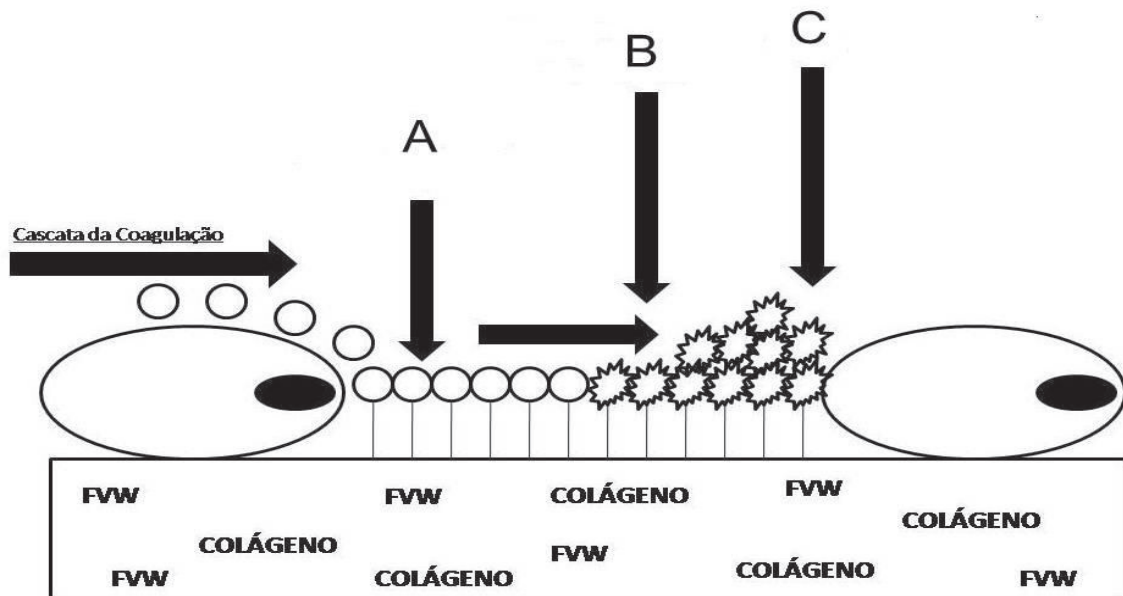
Adaptado de Lillicrap, 2007

1.3.2 Função do FvW

O FvW é essencial para os processos homeostáticos apresentando duas funções principais, uma na hemostasia primária, promovendo a iniciação e progressão da formação do trombo, a partir do momento em que o FvW se liga à glicoproteína da membrana da plaqueta GPIb/IX, resultando na ativação plaquetária e expondo outras glicoproteínas da membrana da plaqueta como a GPIIb/IIIa, que também se ligam ao FvW, permitindo a agregação e adesão plaquetária ao

subendotélio lesado (figura 2) (ROBERTSON et al., 2008). A segunda função do FvW está associada a hemostasia secundária, ao se ligar ao fator VIII (FVIII) da coagulação estabilizando-o e protegendo-o da ação das proteases plasmáticas, principalmente, a proteína C ativada (KOEDAM, 1988; ROBERTSON et al., 2008).

Figura 2 – Demonstração do papel do FvW no processo hemorrágico. (A) demonstra o rolamento das plaquetas ao longo da superfície de células endoteliais e adesão ao local da lesão vascular através de ligações do receptor GpIb/IX da membrana plaquetária com o FvW do subendotélio; (B) plaquetas aderidas tornam-se ativadas e expressam o receptor de membrana GpIIb/IIIa, ligando-se ao FvW e ao fibrinogênio plasmático, consolidando a adesão; (C) agregação plaquetária



Adaptado de Robertson et al., 2008

O FVIII liga-se aos domínios D' e D3 do FvW com afinidade alta. Entre os resíduos 1672-1689 aminoácidos da região N-Terminal ácida da cadeia leve do FVIII, encontra-se o local crítico da interação deste com o FvW, cuja remoção da região N-terminal ácida da cadeia leve reduz a afinidade do FVIII pelo FvW (FAY, 2004; TERRAUBE et al., 2009).

A molécula do FvW pode se ligar a molécula de FVIII em uma proporção de 1:1; entretanto, as concentrações plasmáticas destas duas moléculas são diferentes,

com excesso de FvW em relação ao FVIII, uma vez que nem todo FvW encontra-se ligado ao FVIII (TERRAUBE et al., 2009).

1.3.3 Concentração Plasmática do FvW

As concentrações plasmáticas do FvW, em indivíduos normais são de 10 µg/mL, que correspondem a 100%. No entanto, pode haver variação entre os indivíduos de 5µg/mL a 20 µg/mL(50%-200%) Estas variações são influenciadas por diversos fatores genéticos e ambientais (ROBERTSON et al., 2008).

O sistema sanguíneo ABO é um dos fatores genéticos que influencia as concentrações do FvW. Indivíduos portadores do alelo “O” apresentam concentrações inferiores, reduzindo seus níveis em 25%, quando comparados àqueles do grupo sanguíneo não-O (ROBERTSON et al., 2008; TERRAUBE et al. 2009). Indivíduos com os alelos “A” e “B” codificam glicosiltransferase A e B, convertendo o antígeno H na membrana dos eritrócitos em determinantes A e B; já os indivíduos com alelo “O”, por não apresentarem esta enzima, continuam a expressar nas superfícies dos eritrócitos o antígeno H, (SOUSA et al., 2007).

Embora, não esteja esclarecido o mecanismo pelo qual os níveis do FvW tornam-se reduzidos em portadores do alelo “O”, existe hipótese de que a expressão do antígeno H favoreça a degradação do FvW pela ADAMTS-13 (SOUSA et al., 2007).

Além do grupo sanguíneo, a idade também influencia nas concentrações do FvW. Os recém-nascidos apresentam concentrações bastante elevadas desta glicoproteína e, após os seis meses de idade, alcançam concentrações semelhantes aos dos indivíduos adultos normais (ROBERTSON et al., 2008). Além disso, as concentrações também aumentam com o aumento da idade (TERRAUBE et al. 2009).

Existe ainda, uma variabilidade genética dependente do grupo étnico do indivíduo. Alguns estudos têm demonstrado concentrações mais elevadas do FvW e FVIII em indivíduos afro-descendentes, quando comparado aos caucasianos (TERRAUBE et al., 2009).

Em relação aos fatores ambientais, hormônios e estresse influenciam bastante as concentrações do FvW, elevando os seus níveis de duas a cinco vezes

em períodos de estresse fisiológicos, como em exercícios físicos e situações de desmaios, ou até mesmo durante o ciclo menstrual e em uso de contraceptivos orais e gravidez (KADIR, 2006; ROBERTSON et al., 2008).

O aumento das concentrações séricas do FvW também está associado a alguns estados patológicos, como o diabetes melito, infarto, hepatopatias colagenoses, neoplasias malignas e outras que cursam com aumento da proliferação e dano vascular (XAVIER, 2010). Condições infecciosas também podem elevar os níveis plasmáticos do FvW (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

1.3.4 Análise molecular do gene do FvW

A estrutura do gene FvW foi descrita pela primeira vez por Mancuso e colaboradores (1989), que observaram que o intron 40 apresentava um número variável de repetições em *tandem* (VNTR) do tipo (ATCT)_n, caracterizando um polimorfismo de comprimento (MAZZINI et al., 2000). Em 1990 e 1992 foram descritas duas novas regiões de repetição no intron 40, sendo designadas VNTR2 e VNTR3, respectivamente (AMSTEL et al., 1990; KIMPTON et al., 1992). Cumming e colaboradores (1991) verificaram que o número de sequências de repetição do tipo TCTA para o VNTR1 variou de 5 a 11 vezes, sendo o tamanho do fragmento de 98 a 122 pares de base; já para o VNTR2 verificaram variação de 9 a 15 repetições, com fragmentos compreendendo de 154 a 178 pares de base; Kimpton e colaboradores (1992) verificaram um número de 9 a 15 repetições para o VNTR3.

As três regiões de repetição, especialmente o VNTR3, são bastante informativas, com várias frequências de heterozigotos de 75% a 86% (STANDEN et al. 1990; CASAÑA et al. 1995). Além disso, estas regiões permitem o rastreamento dos principais subtipos da doença e são importantes nos casos de diagnóstico pré-natal, análise de segregação gênica e estudos das famílias de portadores de DvW (FEDERECI et al., 2009; NICHOLS et al., 2009).

No Brasil, ainda são poucos os estudos sobre estas regiões de repetição. Pena e colaboradores (1994) no estudo dos VNTR1 e VNTR2 encontraram 7 e 8 repetições, respectivamente. Zago e colaboradores (1996) estudaram o VNTR1 em quatro grupos étnicos da população brasileira e observaram a presença de 8 alelos

da repetição ATCT variando de 5 a 12 vezes. Mazzini e colaboradores (2000) estudaram os VNTR1, VNTR2, e VNTR3 em indivíduos caucasoides da população brasileira e em pacientes com a DvW e verificaram frequências elevadas de heterozigose. Além disso, encontraram um alelo com 14 repetições ATCT no VNTR1, o qual ainda não havia sido descrito e descreveram para o VNTR3 um alelo novo com 7 repetições.

A análise molecular da DvW tem sido utilizada, desde 1990, para confirmar alterações no FvW nos casos dos subtipos 2 da doença. A detecção dessas regiões de repetição é facilitada pela amplificação seletiva, utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR) (CASAÑA et al., 1995).

A base genética da doença tem sido foco de estudos recentes na população canadense e européia. A mutação mais frequentemente encontrada em ambos os estudos foi a substituição de uma tirosina por uma cisteína no códon 1584 (Tir1584Cis) (KEENEY et al., 2008). Aproximadamente, 10% a 20% dos pacientes diagnosticados DvW tipo 1 que apresentaram esta mutação, cursaram com uma clínica mais grave. Ao longo do gene, foram identificadas mutações do tipo *nonsense* em 65% dos casos (JAMES, 2007; GOODEVE, 2007; ROBERTSON et al., 2008).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DA DVW

A DvW tem sido classificada em três diferentes tipos, segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia. O tipo 1 é caracterizado pela redução parcial do FvW (deficiência quantitativa parcial); o tipo 2 é causado pela alteração da funcionalidade do fator (deficiência qualitativa); o tipo 3 é representado pela ausência virtual da glicoproteína FvW (ROBERTSON et al., 2008).

1.4.1 DvW Tipo 1

O tipo 1 da DvW corresponde a 60 a 80% dos casos descritos, apresentando herança autossômica dominante. A doença é caracterizada pela deficiência do FvW em níveis que variam de leve a moderado, sendo o diagnóstico considerado complexo, uma vez que diversos fatores influenciam os níveis do FvW, podendo

tornar-se reduzidos entre indivíduos com a forma leve da DvW, como também entre pessoas saudáveis (FEDERICI, 2009). Além disso, a história familiar de sangramentos pode estar ausente e os sintomas de sangramentos podem ser discretos ou imperceptíveis dificultando o diagnóstico. Dessa forma, sugere-se o diagnóstico do Tipo 1 da DvW, nos casos do FvW está reduzido a níveis inferiores a 15% (<0,15IU/mL), embora não seja um consenso mundial (ROBERTSON et al., 2008).

Em crianças, seguem-se dois padrões para o diagnóstico: níveis reduzidos do FvW com história de sangramentos mucocutâneos e níveis reduzidos do FvW sem história de sangramento excessivo, provavelmente, devido à ausência de situações traumáticas como cirurgias, extrações dentárias entre outras (ROBERTSON et al., 2008).

1.4.2 DvW Tipo 2

O tipo 2 da DvW é caracterizado pela deficiência qualitativa do FvW, com herança autossômica dominante ou recessiva, a depender do sítio funcional onde se encontra a mutação, correspondendo de 10 a 30% dos casos de DvW. Este se assemelha ao tipo 1, podendo apresentar sangramentos mucocutâneos excessivos, porém difere pela presença de história familiar de sangramento. Este grupo é subdividido em 2A, 2B, 2M e 2N (LILLICRAP, 2007).

O subtipo 2A, que apresenta herança autossômica dominante, corresponde a 10% de todos os casos da DvW e os multímeros de peso molecular intermediário ou alto podem ou não ser formados. Mais de 50 mutações do tipo *missense* foram encontradas nos domínios D2, A1, A2 e região C-terminal da proteína, resultando em um defeito na síntese dos multímeros de peso molecular alto, ou em um multímero mais suscetível à lise plasmática pela ADAMTS-13 (LYONS et al., 1992; LILLICRAP, 2007). Diante disso, os multímeros sofrem proteólise precoce no plasma, comprometendo a capacidade de ligação do FvW à glicoproteína de membrana plaquetária Gplb e a adesão plaquetária ao subendotélio exposto (LILLICRAP, 2007).

O subtipo 2B, que possui herança autossômica dominante, é o resultado de mutações *missense* no domínio A1 do FvW, que aumentam a afinidade deste pela

GpIb plaquetária. Consequentemente, os níveis plasmáticos dos multímeros de peso molecular alto encontram-se reduzidos, por conta da resposta exacerbada à agregação plaquetária (LILLICRAP, 2007; ROBERTSON et al., 2008).

Outra condição que também se assemelha ao subtipo 2B é o distúrbio hemorrágico hereditário conhecido por DvW-tipo plaquetário (DVW-TP), ou pseudo-DvW. Esta condição é decorrente de mutações no gene Gp1b localizado no cromossomo 17 resultando no ganho de função, ou seja, no aumento da capacidade de ligação da glicoproteína ao FvW. Portanto, essa patologia apresenta tanto os testes laboratoriais, quanto a clínica semelhantes ao subtipo 2B (ROBERTSON et al., 2008). A distinção entre a DvW-TP e o subtipo 2B da DvW é realizada por testes de agregação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA), uma vez que DvW-TP apresenta o teste RIPA normal (FRANCHINI et al., 2008).

No subtipo 2M (“M” relacionado a multímero) 16 mutações *missense* foram identificadas no domínio A1, porém em locais distintos daquelas descritas no subtipo 2B. Embora, todos os multímeros estejam presentes, ocorre redução da capacidade de ligação à GpIb devido a função anormal destes. O subtipo 2M assemelha-se ao subtipo 2A por ter a capacidade de ligação comprometida com a Gp1b comprometida e por apresentar os níveis normais dos multímeros (LILLICRAP, 2007).

O subtipo 2N (“N” de Normandia, país onde foi descrito o primeiro caso) é decorrente de mutações *missense* nos domínios D’ a D3, que modulam a capacidade de ligação do FvW ao FVIII, tornando-a reduzida ou ausente; apresenta herança autossômica recessiva e até o momento foram descritas, aproximadamente, 20 mutações. O perfil da doença depende do códon mutante, sendo a mutação mais frequente a do códon 854, que está associada a níveis mais baixos do FVIII (LILLICRAP, 2007).

1.4.3 DvW Tipo 3

O tipo 3 da DvW possui herança autossômica recessiva, sendo a forma menos frequente da DvW (1 a 5%), com prevalência de 1/1.000.000 (NICHOLS et al., 2009). A DvW tipo 3 caracteriza-se por manifestações hemorrágicas intensas e

níveis bastante reduzidos ou indetectáveis do FvW, com redução significativa do FVIII no plasma (RYDZ et al., 2012).

Indivíduos com a DvW o tipo 3 cursam com sangramentos musculares e nas articulações, semelhantes aos indivíduos com hemofilia A, uma vez que são encontrados menos de 10% de FVIII no plasma (ZAGO et al., 2001; SADLER et al., 2006; Ministério da Saúde, 2008; ROBERTSON et al., 2008).

Na DvW tipo 3, ocorrem deleções gênicas, inserções gênicas, mutações *nonsense*, *missense* e alterações durante o *splicing* do mRNA. Diversos estudos detectaram a presença de mais de 80 mutações, que resultam na adição ou remoção de resíduos de cisteína, interrompendo a síntese do FvW (LILLICRAP, 2007). Essa condição está associada ao desenvolvimento de aloanticorpos, devido a transfusões recorrentes para repor FVIII e FvW (ROBERTSON et al., 2008). A tabela 1 apresenta um resumo da classificação da DvW.

1.5 DIAGNÓSTICO DA DvW

O diagnóstico da DvW baseia-se na presença de três condições, as quais incluem história pessoal de sangramento cutâneo e mucoso excessivo; história familiar de manifestações hemorrágicas; avaliação laboratorial que demonstre alteração qualitativa ou quantitativa do FvW (NICHOLS et al., 2009). Entre as provas de avaliação da hemostasia utilizadas para o diagnóstico da DvW estão o tempo de sangramento (TS), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), tempo de protrombina (TP) e contagem de plaqueta, que são testes de triagem (Ministério da Saúde, 2008, FEDERECI et al., 2009; NICHOLS et al., 2009). A depender dos resultados encontrados nos testes de triagem, mais a presença dos sintomas hemorrágicos, são realizados testes específicos para avaliar as concentrações e função do FvW. Para isto, são realizados os testes de determinação do antígeno do FvW (FvW:Ag), determinação da atividade do cofator da ristocetina (vWF:RCo) , determinação da atividade coagulante do FVIII (fator VIII), teste de agregação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA), análise de multímeros do FvW e análise molecular do gene FvW (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A DvW apresenta variabilidade genética e heterogeneidade clínica importantes, o que dificulta o seu diagnóstico. Assim, a maioria dos casos necessita de uma investigação laboratorial extensa. Talvez, por esses motivos, somados ao pouco conhecimento dos profissionais de saúde, bem como a dificuldade na implementação dos testes laboratoriais para o diagnóstico, a DvW seja subdiagnosticada em muitas regiões do país.

Tabela 1 – Classificação e definição da doença de von Willebrand segundo a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia

Classificação	Definição	Diagnóstico Laboratorial
Tipo 1	Deficiência quantitativa do FvW e presença dos MAPM	FvW:RCo/Ag:FvW \geq 0,7
Tipo 2	Deficiência qualitativa do FvW	FvW:RCo/Ag:FvW $<$ 0,7
Tipo 2A	Deficiência qualitativa, ausência dos MAPM e redução da ligação a Gp1b	RIPA $>$ 1,2mg/mL Ausência dos MAPM
Tipo 2B	Afinidade aumentada do FvW a Gp1b e presença dos MAPM	RIPA $<$ 0,8 mg/mL
Tipo 2M	Redução da ligação a Gp1b; presença do MAPM	RIPA $>$ 1,2 mg/mL Presença dos MAPM
Tipo 2N	Afinidade reduzida do FvW ao FVIII	FVIII/Ag:FvW $<$ 1 FVIII reduzido Ag:FvW normal
Tipo 3	Ausência do FvW	Ag:FvW $<$ 1U/dL
Pseudo-DVW	FvW normal e alteração da Gp1b.	RIPA $>$ 1,2 mg/mL

(Adaptado de NICHOLS et al., 2008)

2 JUSTIFICATIVA

A DvW é caracterizada pela redução nos níveis plasmáticos ou alteração da função do FvW. A concentração plasmática dessa glicoproteína pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, os quais podem estar associados, não somente à presença da DvW, mas também à sua gravidade, tornando o diagnóstico dessa condição bastante complexo (ROBERTSON et al., 2008).

As funções do FvW são atribuídas aos seus domínios estruturais, denominados de D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-B1-B2-B3-C1-C2. A proteína madura ou ativa não apresenta os propolipeptídeos D1 e D2 e consiste em 2050 resíduos de aminoácidos. O FvW sofre diversas modificações pós-traducional, resultando em um multímero composto de várias subunidades com tamanhos diferentes, sendo considerado fundamental no processo normal da hemostasia (SADLER et al., 1998; LILLICRAP, 2007; TERRAUBE et al., 2009).

O gene FvW está localizado no cromossomo 12 e até o presente momento, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica não estão completamente esclarecidos. Atualmente, sabe-se que diversos polimorfismos na região do gene FvW estão associados a alterações nos níveis de expressão gênica. Entretanto, diante do grande número de fatores modificadores, deve-se considerar que, em alguns casos de DvW, pode ocorrer segregação com outros *loci* genéticos (ROBERTSON et al., 2008; TERRAUBE et al., 2009).

O estudo de três segmentos do intron 40 com um número variável de repetições em tandem (VNTRs), região gênica altamente polimórfica, tem apresentado considerável significância para a determinação de haplótipos, em função da variabilidade genética entre diferentes grupos étnicos (MAZZINI et al., 2000). Assim, o estudo dessa região contribui para investigações na medicina forense, nas análises de segregação gênica de famílias com DvWe no diagnóstico pré-natal de DvW grave (tipo 3).

Apesar de a DvW ser considerada o distúrbio hemorrágico mais comum, as publicações nacionais, permanecem reduzidas. No Brasil, poucos estudos têm sido realizados sobre a DvW, incluindo a análise molecular do FvW. Em 2000, SIMON e colaboradores estudando três exons do FvW em três populações brasileiras de

origem étnica diferente e descreveram poucos haplótipos entre os ameríndios, quando comparados aos brasileiros de origem europeia e africana. SIMON e ROISENBERG (2004) estudaram quatro mutações associadas ao tipo 2N da DvW entre brasileiros (homens com diagnóstico de hemofilia A e mulheres com história de sangramentos) e concluíram que muitos pacientes têm sido diagnosticados de forma errônea como portadores de hemofilia A.

Diante disso, esses dados confirmam o espectro complexo da patologia associada aos níveis reduzidos do FvW, demonstrando a necessidade da realização de estudos que envolvam a caracterização genotípica, considerando outros fatores genéticos e ambientais (específicos ou não da população) que podem estar envolvidos na gênese da doença, em especial em uma população como a do estado da Bahia, cujo grau de miscigenação racial é bastante elevado. Dessa forma, a realização do presente estudo contribuirá para descrever a DvW no Estado da Bahia, uma vez que tem como o principal objetivo a caracterização genotípica e fenotípica da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a doença de von Willebrand em uma população da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de polimorfismos no intron 40 do gene FvW;
- Caracterizar o perfil clínico dos indivíduos baseado nos eventos hemorrágicos, de internação, transfusão de hemocomponentes e presença de outras patologias;
- Caracterizar o perfil hematológico dos indivíduos participantes do estudo;
- Correlacionar o perfil clínico dos indivíduos, com os dados genotípicos e hematológicos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Aspectos Éticos

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA, em outubro de 2010, sob registro CEP 061/09. Todos os pacientes incluídos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam um questionário epidemiológico. O sigilo e privacidade do sujeito na coleta dos dados e na publicação dos resultados foram e serão garantidos neste estudo.

Os registros do estudo, tais como questionários epidemiológicos, documentação de exames complementares, TCLEs estão armazenados em arquivos específicos no Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia - UFBA. Nenhum participante foi remunerado ou pagou por qualquer teste laboratorial realizado neste estudo.

4.1.2 População estudada

No período de Janeiro a Fevereiro de 2012, foram estudados 21 indivíduos com suspeita e/ou diagnóstico da DvW, provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). No mesmo período, foram estudados 69 indivíduos saudáveis da população geral atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, no qual foram realizadas determinações do grupo sanguíneo e estudos de polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 do intron 40 do *FvW*. Parte deste grupo, correspondendo a 21 indivíduos, foi utilizada como controle para os pacientes, sendo pareados por idade, sexo e etnia.

O critério de inclusão para pacientes e indivíduos da população geral foi a assinatura do TCLE e o preenchimento do questionário epidemiológico. Quando menor de idade, o TCLE foi assinado pelo responsável legal.

O critério de exclusão para ambos os grupos foi a recusa em assinar o TCLE. Além disso, para os indivíduos sadios foram também adotados como critérios de exclusão o uso de medicamentos que interferisse na função plaquetária, tais como antiinflamatórios não esteroidais (AINES), anticoagulantes; presença de doenças inflamatórias, infecciosas, neoplásicas, hemorrágicas e mulheres gestantes.

4.1.3 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal, no qual os indivíduos foram entrevistados apenas uma vez, sendo neste momento coletadas todas as informações pertinentes às análises, bem como coletados 10mL de sangue periférico para determinação dos testes laboratoriais.

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO

Os testes laboratoriais realizados para os pacientes e controles foram:

Testes de triagem

- Contagem de Plaquetas

O sangue foi coletado em anticoagulante EDTA e analisado no equipamento Cell Dyn-Ruby (Abbott Diagnostics, Illinois, EUA) para contagem de plaquetas.

- Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa)

O teste foi utilizado para análise da via intrínseca da coagulação, sendo determinado no equipamento Destiny Plus (Trinity Biotech, Texas, EUA), utilizando-se plasma pobre em plaquetas, obtido a partir da centrifugação a 15 minutos / 3000 rpm do sangue coletado em anticoagulante citrato de sódio, utilizando-se os seguintes reagentes: um tampão estabilizador de CaCl_2

0,02M (TriniCLOT™ TTPa, Bray, Irlanda) e fosfolípidos purificados (TriniCLOT™ TTPa, Bray, Irlanda). Para validação do teste, foram utilizados um controle normal (TriniCHECK Control 1, Bray, Irlanda) com o tempo de 30,6 segundos; e um controle com tempo prolongado (TriniCHECK Control 2, Bray, Irlanda) de 59,3 segundos. Além disso, foi utilizado um tempo padrão, 30,8 segundos, obtido de um pool de amostras consideradas normais, para cálculo da relação teste/padrão (*ratio*).

Testes confirmatórios

- Determinação do antígeno de von Willebrand (Ag:FvW)

O teste foi realizado pelo método de enzima imunoensaio adsorvente (ELISA), através do *Kit* Asserachrom FvW:Ag (DIAGNOSTICA STAGO, França), que utiliza anticorpos de coelhos anti-FvW humano. A amostra analisada foi plasma pobre em plaquetas, a partir do sangue coletado em anticoagulante citrato de sódio. Todas as amostras foram dosadas em duplicata e os resultados, expressos em percentual, obtidos a partir da interpolação das absorbâncias das amostras testes em curva de calibração construída de acordo com as instruções do fabricante.

- Dosagem do FVIII (FVIII)

O método para determinação do FVIII foi o coagulométrico, sendo determinado no equipamento Destiny Plus (Trinity Biotech, Texas, EUA), utilizando-se plasma pobre em plaquetas, a partir de sangue coletado em anticoagulante citrato de sódio. Os reagentes utilizados foram: plasma humano deficiente de FVIII (TriniCLOT Factor VIII, Bray, Irlanda) e reagente de TTPa (TriniCLOT™ TTPa, Bray, Irlanda). Os resultados foram obtidos a partir de uma curva de calibração, estabelecida de acordo com as instruções do fabricante e expressos em porcentagem.

- Atividade do cofator da ristocetina (FvW:RCo)

O teste que avalia a função do FvW foi realizado no Laboratório de Coagulação do Hemoba e necessitou de plasma rico em plaquetas, obtido através da centrifugação a 10 minutos / 900 rpm do sangue coletado em anticoagulante citrato de sódio e foi determinado pelo método coagulométrico no equipamento agregômetro Chrono-log (Biomédica), de acordo com instruções do fabricante, sendo realizado, apenas nos indivíduos com DvW.

Outros Testes Laboratoriais

- Determinação do Grupo Sanguíneo

O grupo sanguíneo foi determinado por técnica manual em tubo, na qual 100 µL do sangue foram lavadas e centrifugadas com 2 mL de NaCl (0,85%) por três vezes. Em seguida, o concentrado de hemácias foi resuspenso em 1 mL de salina e testado com os anticorpos monoclonais anti-A, anti-B e anti-D (EBRAM, São Paulo, Brasil) para a verificação da presença ou ausência de aglutinação.

- Proteína C reativa (PC Reativa)

O método utilizado para realização desse teste foi a nefelometria em imunoanalisador automatizado IMMAGE[®] (Beckman Coulter Ins., California, USA).

Os 69 indivíduos da população geral foram utilizados para a análise genotípica dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 do intron 40 do FvW e para determinação do grupo sanguíneo. Portanto, os testes de triagem e os específicos da DvW foram realizados em 21 indivíduos utilizados como grupo controle.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 200 µl de sangue periférico, utilizando-se o método Flexigene DNA Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

4.4 ESTUDO MOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2, VNTR3 Do INTRON 40 No Gene) *FvW*

A análise molecular dos polimorfismos VNTR1, VNTR2, VNTR3 no intron 40 do gen *FvW* foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) marcados com fluorescência e utilizando como marcador de pares de base o LIS 500 (tabela 2), que permitiram a amplificação seletiva de sequências específicas pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (CUMMING et al. 1991; CASAÑA et al., 1995;)

Após amplificação, os produtos obtidos foram analisados por eletroforese capilar. Esta técnica consiste na separação de analitos, carregados eletricamente, sendo baseado nas diferentes propriedades eletroforéticas, após serem submetidos a um campo elétrico (MIRANDA et al., 2002).

Tabela 2 – Desenho dos *primers* e seus marcadores fluorescentes.

Polimorfismos	Localização	PCR <i>Primers</i> 5'→ 3'	Reativo Fluorescente
VNTR 1	1890-1991	CTA TTT ATC ATC TAT CCT CTA * GAG ACA GAT AGA TAC ATA CAT **	6-FAM
VNTR 2	2215-2380	TGT ACC TAG TTA TCT ATC CTG* GTG ATG ATG ATG GAG ACA GAG**	VIC
VNTR 3	1640-1759	CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC* GGA CAG ATG ATA AAT ACA ATG GAT GG**	NED

**Primer* direto, ** *Primer* reverso, 6-FAM (6' carboxyfluorescein), VIC (corante fluorescente identificado na medusa Victoria), NED

4.4.1 Estudo dos polimorfismos VNTR1 e VNTR2 do intron 40

A reação da PCR destinada à pesquisa dos polimorfismos VNTR1 e VNTR2 presentes no intron 40 foi realizada em tampão contendo Tris-HCl pH 8,4; 1,5mM de $MgCl_2$; 2mM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, EUA)); 25 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico; 0,3 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (INVITROGEN - Carlsbad, Califórnia, EUA) Triton 100X a 10%; água livre de DNase e RNase e 2 μ L do DNA genômico para um volume final de 50 μ L. A reação foi realizada em termociclador (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA) e consistiu de 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C a 1 minuto; 55°C a 1 minuto; e 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos. O tamanho dos fragmentos esperados para o VNTR1 variaram de 98 a 130 pb e para o VNTR2 variam de 154 a 178 pb, de acordo com Cumming e colaboradores (1991).

4.4.2 Estudo do polimorfismo VNTR3 do intron 40

A reação da PCR destinada à pesquisa do polimorfismo VNTR3 do intron 40 foi realizada em tampão contendo Tris-HCl pH 8,4; 1,5 mM de $MgCl_2$; 2 mM da mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, EUA)); 30 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico; 0,3 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (INVITROGEN - Carlsbad, Califórnia, EUA) Triton 100X a 10%; água para PCR (GIBCO - Carlsbad, Califórnia, EUA) e 2 μ L do DNA genômico para um volume final de 50 μ L. A reação foi realizada em termociclador (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA) e consistiu de 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C a 1 minuto; 51°C a 1 minuto; e 72°C por 30 segundos e um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos. O tamanho dos fragmentos esperados para o VNTR1 variaram de 138 a 162 pb de acordo com Kimpton e colaboradores (1992).

4.4.3 Análise dos VNTRs do intron 40

A análise dos VNTRs do intron 40 foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – FIOCRUZ – Ba, utilizando-se 1 μL do produto do PCR que foi adicionado a 8,5 μL de formamida com 0,5 μL de marcador de pares de base LIS 500 (50-500 pb) (Applied Bio-Systems, Califórnia, EUA). Em seguida, as amostras foram submetidas a um choque térmico de 96°C por 5 minutos e o produto do PCR foi separado por eletroforese capilar no analisador ABI Prism 3100 Genetic (Applied Bio-Systems, Califórnia, EUA). Para analisar o tamanho dos fragmentos do DNA foi utilizado o software Gene Scan (Applied Bio-Systems, Califórnia, EUA) correlacionando com o marcador fluorescente de pb LIS 500.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa EpiInfo versão 6.04, e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Estas consistiram em estudos exploratórios, para conhecer as distribuições das variáveis. Neste momento foram calculadas as medidas de tendência central, como médias e medianas; e as medidas de dispersão, como desvio padrão e variância.

O outro tipo de análise foi a comparativa entre o grupo dos indivíduos com doença e o grupo controle. Diante da normalidade de distribuição, utilizou-se o teste t de Student não pareado, para comparar as médias dos testes laboratoriais Ag:FvW; FvW:RCo; FVIII; contagem de plaquetas e relação do TTPa entre os dois grupos. Os testes qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar a homogeneidade entre as proporções, sendo que este último foi utilizado quando foram encontradas frequências inferiores a 5.

Foram considerados estatisticamente significativos os valores de p inferiores a 0,05. Todas as probabilidades dos testes foram feitas para um nível de significância de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS

Foram analisados 21 indivíduos com DvW e 69 indivíduos da população geral, dos quais, 21 foram utilizados como grupo controle, pareados quanto à idade, sexo e etnia. A mediana da idade dos indivíduos com a DvW foi 16 anos (mínima 5 anos e máxima 74 anos). Destes, 11 (52,4%) eram do sexo feminino e 10 (47,6%) do sexo masculino. Entre as mulheres avaliadas, apenas duas (2) (18,2%) utilizavam contraceptivos orais. Foi observado que 10 (47,6%) eram caucasoides e 11 (52,4%) negroides.

Os 69 indivíduos da população geral apresentaram mediana de idade 32 anos, sendo a idade mínima quatro (4) e a máxima 69 anos. Destes, 49 (71,0%) eram do sexo feminino e 20 (29,0%) do sexo masculino. Apenas 7 (10,1%) relataram algum evento hemorrágico em toda a vida.

A análise dos eventos hemorrágicos em familiares dos indivíduos com DvW demonstrou que 7 (33,3%) não relataram familiares com sintomas hemorrágicos; um (1) (4,8%) relatou que apenas o pai apresentava sintomas hemorrágicos; dois (2) (9,5%) apenas mãe e irmão; dois (2) (9,5%) pai e irmão; três (3) (14,4%) apenas irmão e 6 (28,6%) apenas a mãe com relato de eventos hemorrágicos. A tabela 3, mostra os percentuais dos principais eventos hemorrágicos nos indivíduos com DvW, sendo que os mais frequentes foram hemorragia pós-trauma, presente em 16 (76,2%) indivíduos, pós-tratamento dentário em 11 (52,4%), epistaxe em 7 (33,3%) e gengivorragia em 6 (28,6%). Entre as 11 mulheres estudadas, 6 estavam em idade fértil, sendo que duas (2) (33,3%) com menometrorragia. No grupo controle não foi relatada a presença pessoal ou de familiares com sintomas hemorrágicos.

Tabela 3 – Percentual dos principais eventos hemorrágicos nos indivíduos com DvW

Eventos Hemorrágicos	n (%)
Pós-cirurgia	4 (19)
Gengivorragia	6 (28,6)
Epistaxe	7 (33,3)
Pós-tratamento dentário	11 (52,4)
Pós- trauma	16 (76,2)
Outros	3 (14,3)

(n) número de indivíduos

A análise da frequência de internação e uso de hemocomponentes nos indivíduos com DvW demonstrou que 6 (28,6%) indivíduos nunca foram internados e 15 (71,4%) precisaram de internação. Além disso, 14 (66,7%) nunca fizeram uso de hemocomponentes e 7 (33,3%) necessitaram desta terapia, sendo que 6 (85,7%) por 1 ou 2 vezes e apenas um (1) (14,3%) mais de 4 vezes. Em relação aos indivíduos controles, nenhum precisou de internação ou transfusões sanguíneas, por qualquer motivo.

5.2 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DOS INDIVÍDUOS

Em relação ao grupo sanguíneo, 15 (71,4%) pessoas com DvW pertenciam ao grupo “O”; cinco (5) (23,8%) o grupo “A” e um (1) (4,8%) pertencia ao grupo “B”. Em relação ao grupo controle, 9 indivíduos (42,9%) o grupo “O”; 8 (38,1%) o grupo “A”; 1(4,8%) “AB” e 3 (14,3%) ao “B”.

Nos 69 indivíduos da população geral, o grupo sanguíneo “O” foi encontrado em 30 indivíduos (43,5%); o grupo “A” em 26 (37,7%); o grupo “B” em 12 (17,4%) e o “AB” em apenas 1 indivíduo (4,8%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a frequência de distribuição dos grupos sanguíneos entre os indivíduos ($p=0,43$; Kruskal-Wallis).

A proteína C reativa apresentou uma média de $2,1 \pm 1,3$ mg/dL nos indivíduos com DvW e de $2,77$ mg/dL ($\pm 1,84$) no grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,33$, teste t de Student não pareado) (tabela 4).

A média do número de plaquetas nos indivíduos com a DvW foi 278 ± 64 mil/mm³ e para os controles a média foi $246 \pm 56,4$ mil/mm³ ($p=0,08$, teste t de Student não pareado) (tabela 4) (figura 3 A).

A análise do TTPa para os indivíduos com DvW revelou média de $40,9 \pm 5,7$ segundos; a média da relação TTPa(s) do teste / TTPA(s) padrão foi $1,30 \pm 0,18$. Foi observado que quatro (4) (19,9%) indivíduos apresentaram a relação do TTPa $\geq 1,5$, com média de $1,60 \pm 0,08$. Em contrapartida, a média do TTPa dos controles foi $31,2 \pm 2,0$ segundos; a média da relação do TTPa foi igual a $1,0 \pm 0,06$, com diferença estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo de pessoas com DvW ($p < 0,01$, teste t de Student não pareado) (tabela 4) (figura 3B).

A média do FVIII para os indivíduos com DvW foi $42,9 \pm 26,5\%$ e para o grupo controle foi $70,7 \pm 28,6\%$ com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$, teste t de Student não pareado) (tabela 4). Entretanto, mesmo apresentando uma média mais elevada, foi verificado que entre os indivíduos do grupo controle, quatro (4) (19,0%) apresentaram concentração do FVIII inferior a 50%, estando abaixo do valor normal (50 - 150%). As concentrações médias do FVIII para os indivíduos com DvW foi $51,4 \pm 35,6\%$ para o sexo masculino e $42,2 \pm 25,7\%$ para o sexo feminino, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p=0,50$, teste ANOVA) (figura 3C); para os indivíduos do grupo controle as concentrações médias do FVIII foram $83,0 \pm 45,1\%$ e $67,4 \pm 20,2\%$, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,50$, Kruskal-Wallis). A concentração do FVIII não diferiu entre os indivíduos com diferentes grupos sanguíneos ($p=0,83$, Kruskal-Wallis).

A média da concentração do Ag:FvW foi de $39,5 \pm 17,7\%$ para os indivíduos com DvW e de $74,5 \pm 4,23\%$ para o grupo controle com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$, teste t de Student não pareado) (tabela 4). Foi observado que a concentração média do Ag:FvW para os indivíduos com DvW não diferiu entre os sexos, sendo de $39,6 \pm 17,8\%$ e $39,4 \pm 17,7\%$, respectivamente ($p=0,98$, ANOVA); para os indivíduos do grupo controle a concentração média foi de $74,8 \pm 3,65\%$ e de $74,2 \pm 4,98\%$, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,74$, ANOVA). Entretanto, quatro (4) (19,0%) indivíduos com DvW, apresentaram níveis do Ag:FvW dentro do valor de normalidade (50 - 150%), sendo que destes, duas (2) eram mulheres e apenas uma (1) (50%) estava em uso de contraceptivo oral. As concentrações plasmáticas do Ag:FvW também não diferiram entre aqueles com

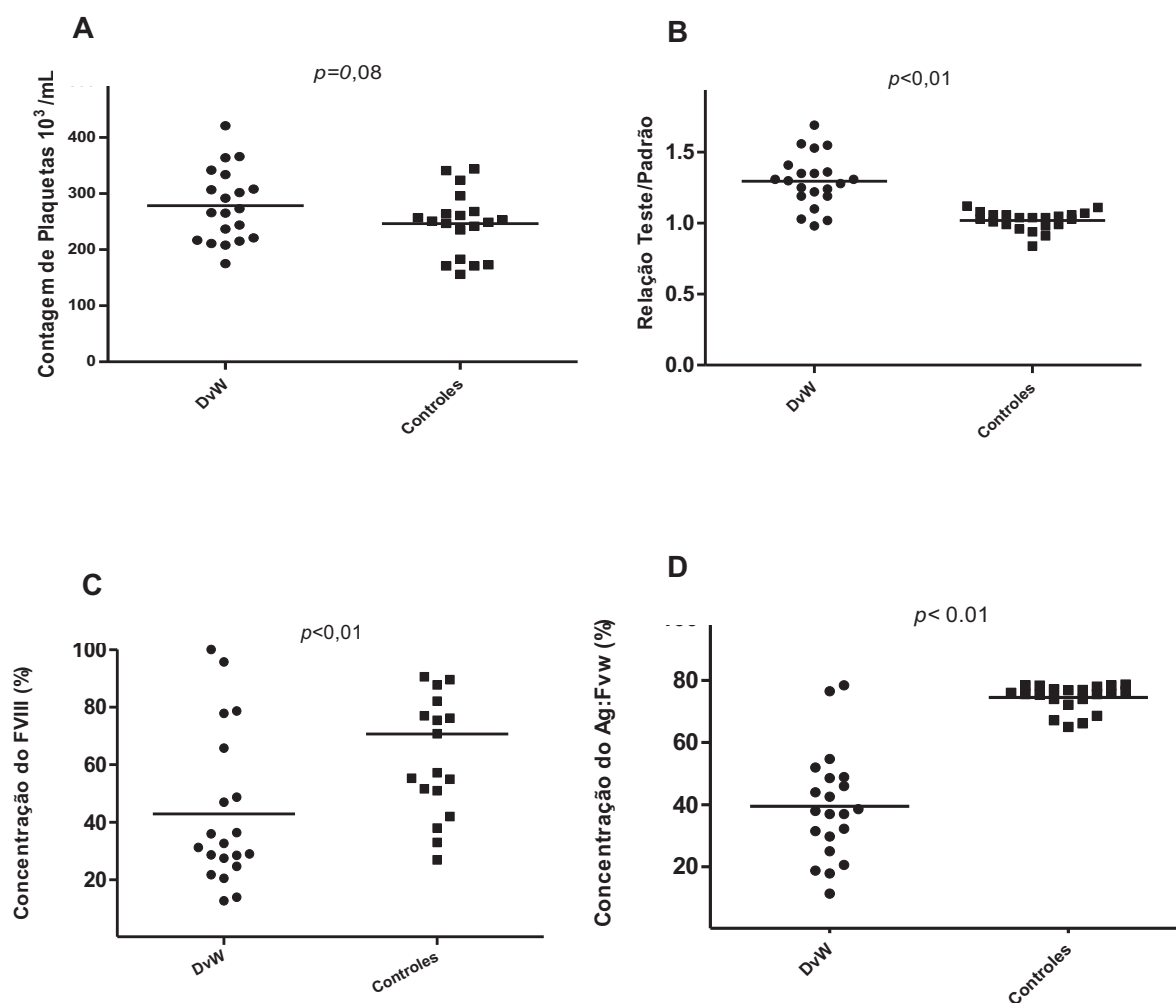
grupos sanguíneos “O” e não “O” entre indivíduos com DvW e grupo controle ($p=0,97$, ANOVA; $p=0,09$, ANOVA, respectivamente). Para os indivíduos com DvW não foi observada diferença nos níveis do Ag:FvW entre os caucasóides ($34,5 \pm 14,3\%$) e negróides ($36,4 \pm 11,3\%$) ($p=0,76$, ANOVA); da mesma forma, não houve diferença entre caucasóides ($75,3 \pm 4,65\%$) e negróides ($74,2 \pm 3,86\%$) do grupo controle ($p=0,82$, ANOVA). Todos os indivíduos do grupo controle, inclusive os que apresentaram concentrações inferiores aos níveis normais de FVIII ($< 50\%$), apresentaram concentrações normais do Ag:FvW (figura 3D).

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos testes laboratoriais nos indivíduos com DvW e nos indivíduos controles

Testes Laboratoriais	Pacientes (M \pm DP)	Controles (M \pm DP)	Valor de p^*
PCR (mg/dL)	2,1 \pm 1,3	2,77 \pm 1,84	0,33
Plaquetas (mil/mm ³)	278 \pm 64	246 \pm 56,4	0,08
TTPa (s)	40,9 \pm 5,7	31,2 \pm 2,0	<0,01
Relação TTPa	1,30 \pm 0,18	1,0 \pm 0,06	< 0,01
FVIII (%)	42,9 \pm 26,5	70,7 \pm 28,6	< 0,01
Ag:FvW (%)	39,5 \pm 17,31	74,5 \pm 4,23	< 0,01
FvW:RCo (%)	24,8 \pm 12,9	-	-

(M) Média; (DP) desvio-padrão; (*) teste t de Student não pareado; (s) segundos.

Figura 3 – Representação gráfica dos valores médios para os testes laboratoriais contagem de plaquetas, relação do TTPa, FVIII da coagulação e Ag:FvW nos grupos estudados. A - Valor médio do número de plaquetas entre os indivíduos com DvW e grupo controle (278 mil/mm³ e 246 mil/mm³, respectivamente) ($p=0,08$, teste t de Student); B – Concentração média da relação do TTPa entre os indivíduos com DvW e grupo controle (1,30 e 1,0 segundos, respectivamente) ($p<0,01$, teste t de Student); C – Concentração média do FVIII da coagulação entre os indivíduos com DvW e grupo controle (42,9% e 70,7%, respectivamente) ($p<0,01$, teste t de Student) e D – Concentração média do Ag:FvW entre os indivíduos com DvW e grupo controle (39,5% e 74,5%, respectivamente) ($p<0,01$, teste t de Student).

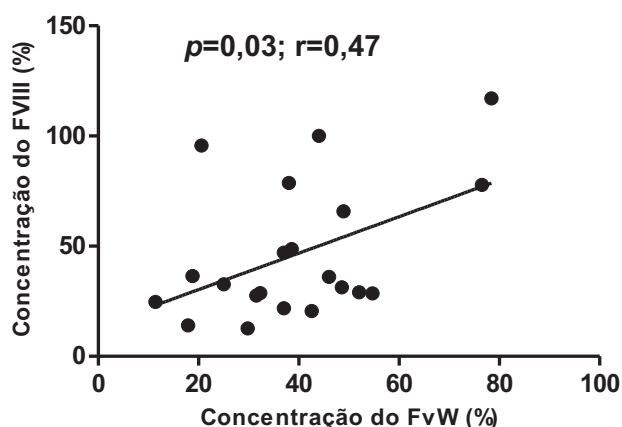


As concentrações plasmáticas do FvW:RCo nas pessoas com DvW foram $24,8 \pm 12,9\%$ (tabela 4), sendo que apenas um (1) (4,8%) indivíduo apresentou níveis dentro da normalidade (50 – 150%). Este teste não foi realizado no grupo controle. Não houve diferença nos níveis de FvW:RCo entre pessoas do grupo sanguíneo “O” ($27,1 \pm 18,9\%$) e não “O” ($35,8 \pm 11,4\%$) ($p=0,32$, ANOVA). Da mesma forma, não foi observada diferença entre os caucasóides ($25,4 \pm 16,7\%$) e

negróides ($24,3 \pm 9,3\%$) ($p=0,85$, ANOVA); bem como entre o sexo feminino ($27,6 \pm 15,0\%$) e masculino ($21,7 \pm 10,2\%$) ($p=0,31$, ANOVA).

As concentrações do FVIII e Ag:FvW dos indivíduos com DvW demonstraram correlação positiva (figura 4).

Figura 4 – Representação gráfica da correlação de Pearson entre FVIII e Ag:FvW nos indivíduos com DvW.



5.3 CLASSIFICAÇÃO DA DvW Para Os Indivíduos Estudados

Foi observado que para as concentrações do Ag:FvW, 17 (80,9%) indivíduos com DvW apresentaram valores abaixo da normalidade, sugerindo deficiência quantitativa do FvW (tipo 1); 4 (19%) indivíduos apresentaram concentração normal ou limítrofe, sugerindo deficiência qualitativa do FvW (tipo 2). A análise da relação FvW:RCo / Ag:FvW revelou níveis $\geq 0,7$ para 12 (57,1%) sugerindo que estas sejam pertencentes ao tipo 1; e 9 (42,9%) ao tipo 2 da DvW, cuja relação FvW:RCo / Ag:FvW foi $< 0,7$ (tabela 5). No entanto, dentre os classificados como tipo 1 da DvW, 6 (50%) apresentaram níveis do Ag:FvW dentro da normalidade; e dos classificados como tipo 2 da doença, três (3) (33,3%) apresentaram níveis do Ag:FvW abaixo da normalidade. Nenhum indivíduo foi classificado como tipo 3, visto que não apresentou concentração do Ag:FvW inferior a 1%.

Tabela 5 – Classificação da DvW baseada na relação RCo:FvW / Ag:FvW

Classificação Sugerida	Relação RCo:FvW / AgFvW	Indivíduos DvW n (%)
Tipo 1	> 0,7	12 (57,1)
Tipo 2	< 0,7	9 (42,9)

(n) número de indivíduos

5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES DO Ag:FvW E FvW:RCo E EVENTOS HEMORRÁGICOS DOS INDIVÍDUOS COM DVW

As associações entre as concentrações do Ag:FvW e do FvW:RCo com os principais eventos hemorrágicos entre os indivíduos com DvW, tais como, epistaxe, gengivorragia, pós-traumas, pós-extração dentária, pós-cirurgia, menometrorragia, não revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,78$; $p=0,28$, respectivamente, Kruskal-Wallis H).

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÕES DO Ag:FvW E FvW:RCo COM EVENTOS DE INTERNAÇÃO, TRANSFUSÃO DE HEMOCOMPONENTES E PRESENÇA DE OUTRAS PATOLOGIAS NOS INDIVÍDUOS COM DVW

Os níveis do Ag:FvW não diferiram entre os indivíduos que necessitaram de internação ($38,0\% \pm 12,8$) e os que não internaram ($38,1\% \pm 19,0$) ($p=0,60$, teste ANOVA); também, não houve diferença entre os níveis do Ag:FvW dos indivíduos que precisaram de hemocomponentes ($36,0\% \pm 15,0$) e aqueles que não utilizaram ($41,2\% \pm 18,4$) ($p=0,53$, teste ANOVA). Da mesma forma, os níveis do Ag:FvW não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os que apresentaram outras patologias ($37,0 \pm 11,3\%$) e aqueles que não apresentaram ($40,6 \pm 18,9\%$) ($p=0,59$, teste ANOVA) (tabela 6). Entretanto, observou-se que os indivíduos que precisaram de internação apresentaram concentrações inferiores do FvW:RCo ($26,5\% \pm 9,3$), em relação àqueles que não internaram ($35,5 \pm 15,5$) ($p<0,01$, teste ANOVA). Da mesma forma, os indivíduos que necessitaram de hemocomponentes, apresentaram concentração média do FvW:RCo inferior ($16,5\% \pm 7,6$) aos que não receberam hemocomponentes ($28,9\% \pm 13,3$) ($p=0,03$, teste ANOVA). No entanto, a

concentração do FvW:RCo não diferiu entre os que apresentaram ou não outras patologias ($16,6 \pm 6,2\%$ e $27,4 \pm 13,6\%$, respectivamente) ($p=0,11$, teste ANOVA) (tabela 6).

Tabela 6 – Associação entre as concentrações do Ag:FvW e FvW:RCo com eventos de internação e uso de hemocomponentes dos indivíduos com DvW

Evento	n (%)	Ag:FvW (%) M ± DP	FvW:RCo (%) M ± DP
Internação			
Presença	15 (71,4)	38,0 ±12,8	26,5 ±9,3
Ausência	6 (28,6)	38,1 ±19,0	35,5 ±15,5
p (valor)*		0,60	<0,01
Hemoterapia			
Presença	7 (33,3)	36,0 ±15,0	16,5 ±7,6
Ausência	14 (66,7)	41,2 ±18,4	28,9 ±13,3
p (valor)*		0,53	0,03
Outra Patologia			
Presença	5 (23,8)	37,0 ±11,3	16,6 ±6,2
Ausência	16 (76,2)	40,6 ±18,9	27,4 ±13,6
p (valor)*		0,59	0,11

(n) número de indivíduos; (M) Média; (DP) desvio-padrão; (*) teste ANOVA

5.6 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 e VNTR3 DO INTRON 40 NO GENE FvW NOS INDIVÍDUOS COM DvW NA POPULAÇÃO GERAL

Os eletroferogramas para o VNTR1, VNTR2 e VNTR3 estão descritos nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente.

Figura 5 – Eletroferograma do VNTR1. Os picos em laranja representam o marcador fluorescente de pares de base LIS 500; os picos em azul representam a amostra amplificada, utilizando o primer marcado com 6-FAM. A – indivíduo heterozigoto, apresentando amplificação dos picos com 94pb (alelo 4) e 102pb (alelo 6); B – indivíduo homozigoto, apresentando amplificação de pico único com 94pb (alelo 4). M – marcador de pb.

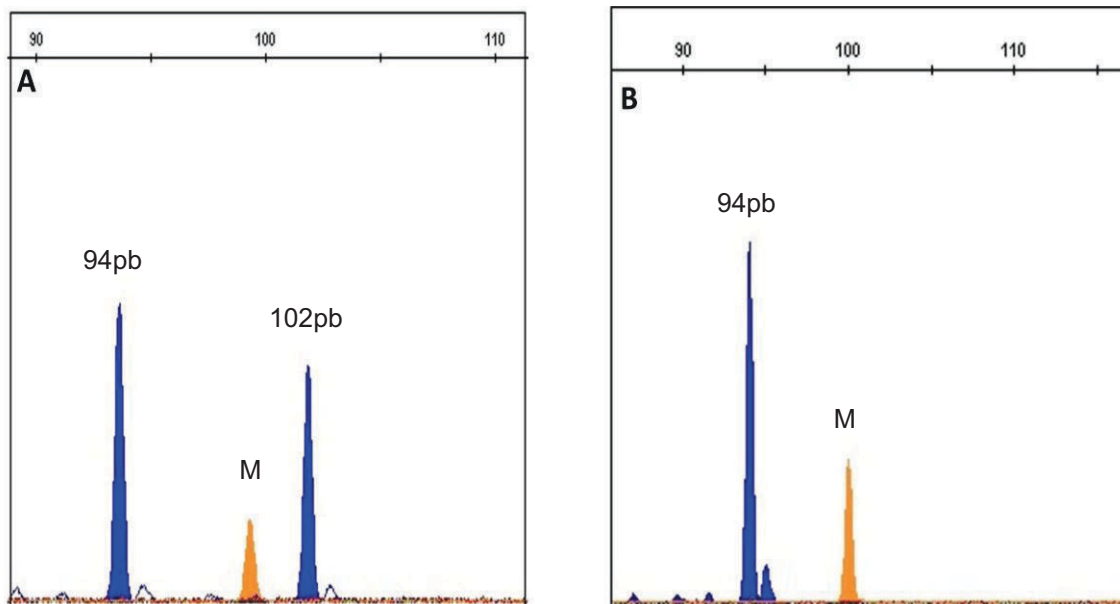


Figura 6 – Eletroferograma do VNTR2. Os picos em laranja representam o marcador fluorescente de pares de base LIS 500; os picos em verde representam a amostra amplificada, utilizando o primer marcado com VIC. C – indivíduo heterozigoto, apresentando amplificação dos picos com 162pb (alelo 4) e 166pb (alelo 3); D – indivíduo homozigoto, apresentando amplificação de pico único com 162pb (alelo 4). M – marcador pb.

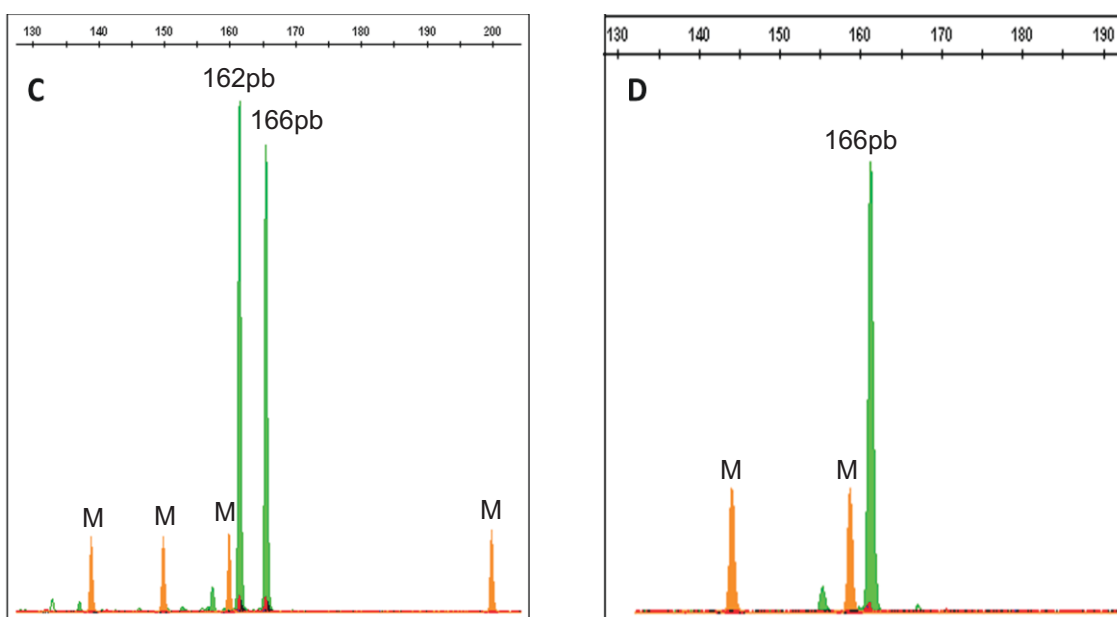
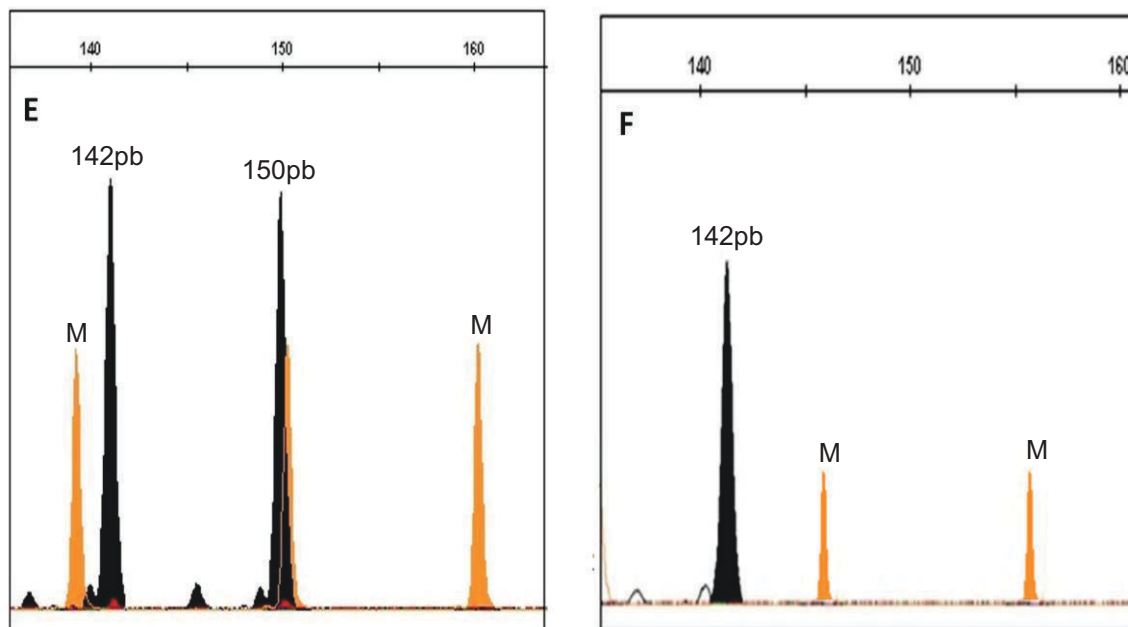


Figura 7 – Eletroferograma do VNTR3. Os picos em laranja representam o marcador fluorescente de pares de base LIS 500; os picos em preto representam a amostra amplificada, utilizando o primer marcado com NED. A – indivíduo heterozigoto, apresentando amplificação dos picos com 142pb (alelo 2) e 150pb (alelo 4); B – indivíduo homozigoto, apresentando amplificação de pico único com 142pb (alelo 2). M – marcador pb.



As frequências alélicas encontradas para os três VNTRs estão demonstradas na tabela 7. A análise do VNTR1 demonstrou frequência mais elevada dos alelos 4 e 5 (21,4% e 40,5% respectivamente); para o VNTR2, os alelos mais frequentes foram o 3 e 4 (40,5% e 30,9%, respectivamente) e para o VNTR3 os alelos mais frequentes foram, também, o 3 e o 4 (35,7% e 30,9%, respectivamente). A frequência alélica dos VNTRs do intron 40 nos indivíduos da população geral foi semelhante quando comparado ao grupo com DvW, sendo descritos os alelos 4 (36,2%) e 5 (68,1%) para o VNTR1; os alelos 3 (55,1%) e 4 (52,2%) para o VNTR2 e 2 (37,7%), 3 (52,2%) e 4 (37,7%) para o VNTR3.

Tabela 7 – Frequências alélicas dos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 dos indivíduos com DVW e população geral

Análise de 42 cromossomos dos indivíduos com DVW

VNTR1			VNTR2			VNTR3		
Alelo	pb	n (%)	Alelo	pb	n (%)	Alelo	pb	n (%)
4	94	9 (21,4)	1A	178	1 (2,4)	1A	134	1 (2,4)
5	98	17 (40,5)	1	174	2 (4,8)	1	138	4 (9,5)
6	102	3 (7,1)	2	170	4 (9,5)	2	142	3 (7,1)
8	110	5 (11,9)	3	166	17 (40,5)	3	146	15 (35,7)
9	114	3 (7,1)	4	162	13 (30,9)	4	150	13 (30,9)
10	118	5 (11,9)	5	158	2 (4,8)	5	154	6 (14,2)
			6	154	2 (4,8)			
			7	150	1 (2,4)			

Análise de 138 cromossomos indivíduos da população geral

VNTR1			VNTR2			VNTR3		
Alelo	pb	n (%)	Alelo	pb	n (%)	Alelo	pb	n (%)
4	94	25 (36,2)	1	174	7 (10,1)	1	138	11 (15,9)
5	98	47 (68,1)	2	170	7 (10,1)	2	142	26 (37,7)
6	102	8 (11,6)	3	166	38 (55,1)	3	146	36 (52,2)
7	106	1 (1,4)	4	162	36 (52,2)	4	150	26 (37,7)
8	110	13 (24,6)	5	158	8 (11,6)	5	154	16 (23,2)
9	114	13 (18,8)	6	154	8 (11,6)	6	158	3 (4,30)
10	118	14 (20,3)	7	150	4 (5,8)	7	162	1 (1,40)

(pb) pares de base

A análise comparativa entre os alelos mais frequentes para os VNTRs analisados nos indivíduos com DVW e indivíduos da população geral não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (tabela 8).

Tabela 8 – Comparação da frequência alélica dos indivíduos com DvW e indivíduos da população geral

VNTRs	Indivíduos DVW n (%)	População geral n (%)	p (valor)*
VNTR1			
Alelo 4	9 (21,4)	25 (18,1)	0,79
Alelo 5	17 (40,4)	47 (34,0)	0,56
VNTR2			
Alelo 3	18 (42,6)	38 (27,5)	0,09
Alelo 4	13 (30,9)	36 (26,1)	0,67
VNTR 3			
Alelo 3	15 (35,7)	36 (26,0)	0,30
Alelo 4	13 (30,9)	26 (18,8)	0,14

(n) número de alelos; (*) teste χ^2

5.7 ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE HETEROZIGOSE PARA OS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 DO INTRON 40 DOS INDIVÍDUOS COM DVW E DA POPULAÇÃO GERAL

Na tabela 9 são apresentadas as frequências de heterozigose dos três polimorfismos estudados. Na população geral, a análise do VNTR1 revelou uma frequência de 84,0% de heterozigose; o VNTR2 apresentou 65,0% e a análise do VNTR3 demonstrou uma frequência de 74,0%. Nos indivíduos com DVW estudados, a frequência de heterozigose foi de 62,0% para o VNTR1, 62,0% para o VNTR2 e 81,0% para o VNTR3.

Tabela 9 – Frequência de Heterozigose para os polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3

GRUPO ESTUDADO	HETEROZIGOSE	HETEROZIGOSE	HETEROZIGOSE
	VNTR1 n (%)	VNTR2 n (%)	VNTR3 n (%)
População Geral *	58 (84)	45 (65)	51 (74)
Indivíduos DVW **	13 (62)	13 (62)	17 (81)

(*) 69 indivíduos analisados; (**) 21 indivíduos analisados

5.8 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 DO INTRON 40 DO GENE *FvW* E CONCENTRAÇÕES DO FVIII, Ag:FvW E FvW:RCo

As análises comparativas entre todos os alelos descritos para o VNTR1, VNTR2 e VNTR3 e as concentrações do FVIII e FvW:RCo, não demonstraram diferença estatisticamente significativa, porém a análise entre o alelo 4 do VNTR3 e a relação do TTPa demonstrou uma média maior (1,4) entre os indivíduos com o alelo 4, quando comparado aos indivíduos que não apresentaram este alelo (1,0) ($p=0,02$, Teste Kruskal Wallis). Além disso, os indivíduos com o alelo 3 do VNTR3 apresentaram níveis mais elevados do Ag:FvW, com média de $50,4 \pm 16,2\%$ que aqueles que não apresentaram este alelo, cuja média foi de $29,5 \pm 11,5\%$ ($p<0,01$, teste ANOVA) (tabela 10). Entretanto, não houve diferença nas concentrações médias do FvW:RCo entre os indivíduos que apresentaram ou não o alelo 3 do VNTR3 ($p=0,30$, ANOVA).

Tabela 10 – Associação entre alelos mais frequentes dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 e as concentrações médias e o desvio-padrão do Ag:FvW

VNTRs	n (%)	Média (%) Ag:FvW	DP	p (valor)*
VNTR1				
Alelo 4				
Presente	6 (28,6)	38,6	$\pm 13,9$	0,89
Ausente	15 (71,4)	39,8	$\pm 18,9$	
Alelo 5				
Presente	13 (61,9)	41,4	$\pm 15,5$	0,53
Ausente	8 (38,1)	36,3	$\pm 20,5$	
VNTR2				
Alelo 3				
Presente	12 (57,1)	41,7	$\pm 14,0$	0,62
Ausente	9 (42,9)	37,7	$\pm 21,9$	
Alelo 4				
Presente	11 (52,4)	41,3	$\pm 19,0$	0,73
Ausente	10 (47,6)	38,4	$\pm 17,0$	
VNTR 3				
Alelo 3				
Presente	13 (61,9)	50,4	$\pm 16,2$	<0,01
Ausente	8 (38,1)	29,5	$\pm 11,5$	
Alelo 4				
Presente	11(52,4)	36,0	$\pm 13,5$	0,47
Ausente	10 (47,6)	42,1	$\pm 20,4$	

(n) número de indivíduos; (%) percentual de indivíduos; (DP) Desvio padrão; (*) teste ANOVA.

A associação entre todos os alelos dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 com as concentrações do FVIII e do Ag:FvW dos indivíduos do grupo controle não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

5.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS MAIS FREQUENTES DO VNTR1, VNTR2 e VNTR3 DO INTRON 40 DO GENE DO FvW E O Grupo Sanguíneo

Não foi observada associação entre os alelos mais freqüentes dos polimorfismos dos VNTRs e o grupo sanguíneo dos indivíduos com DvW, exceto, para o alelo 3 do VNTR2, que foi encontrado em todos os indivíduos do grupo A ($rr=1,83$, IC 95%, $p=0,03$, teste exato de Fisher) (tabela 11); para o grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os alelos e o grupo sanguíneo.

Tabela 11 – Associação entre Grupo Sanguíneo e alelos mais frequentes do VNTR1, VNTR2 e VNTR3 dos indivíduos com DvW

VNTRs	GS O	GS A	p (valor)*
	n / total (%)	n / total (%)	
VNTR1			
Alelo 4	6/15 (100)	0/5 (0)	0,26
Alelo 5	9/15 (75)	3/5 (25)	1,00
VNTR2			
Alelo 3	6/15 (54,5)	5/5 (45,5)	0,03
Alelo 4	9/15 (81,8)	2/5 (18,2)	0,62
VNTR3			
Alelo 3	9/15 (69,2)	4/5 (30,8)	0,06
Alelo 4	7/15 (70)	3/5 (30)	1,00

(n) número de indivíduos; (GS) grupo sanguíneo; (%) percentual de indivíduos; (*) teste exato de Fisher.

5.10 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ALELOS MAIS FREQUENTES DOS POLIMORFISMOS VNTR1, VNTR2 E VNTR3 E EVENTOS HEMORRÁGICOS DOS INDIVÍDUOS COM DvW

A análise entre os alelos dos VNTRs e a ocorrência de eventos hemorrágicos demonstrou que a hemorragia pós-trauma esteve presente em todos os indivíduos que apresentaram o alelo 5 do VNTR1 ($rr=5,3$, IC 95%, $p<0,01$, teste exato de Fisher), bem como em todos os indivíduos portadores do alelo 4 do VNTR2 ($rr=3,2$, IC 95%, $p=0,02$, teste exato de Fisher) (tabela12). No entanto, não houve associação entre os demais alelos e os eventos hemorrágicos.

Tabela 12 – Associação entre alelos mais frequentes dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 com hemorragia pós-trauma dos indivíduos com DvW

VNTRs	(n)	Hemorragia Pós-trauma n (%)		valor* de p	RR	IC 95%
		Positivo	Negativo			
VNTR1						
Alelo 4	5	3 (60%)	2 (40%)	0,25	0,62	0,22-1,69
Alelo 5	13	13 (100%)	-	<0,01	5,3	1,92-14,7
VNTR2						
Alelo 3	11	10 (90%)	1(10%)	0,21	2	0,86-4,67
Alelo 4	11	11 (100%)	-	0,02	3,2	1,55-6,62
VNTR3						
Alelo 3	13	11 (84,5%)	2(15,5%)	0,59	1,6	0,47-5,42
Alelo 4	11	9 (81,8%)	2(18,2%)	1	1,14	0,37-3,53

(n) número de indivíduos, (rr) risco relativo; (IC) intervalo de confiança; (*) teste exato de Fisher

6 - DISCUSSÃO

A doença de von Willebrand é um distúrbio hemorrágico hereditário caracterizado pela alteração qualitativa ou quantitativa do FvW (ZHAO, 2012). As principais funções do FvW são promover a adesão plaquetária no local da lesão vascular e ligar-se ao FVIII da coagulação, protegendo-o da ação de proteases plasmáticas. A DvW é classificada em tipo 1 (deficiência quantitativa parcial do FvW); tipo 2 (deficiência da função) e tipo 3 (deficiência virtual do FvW) de acordo com a história pessoal e/ou familiar de sangramentos associados aos dados laboratoriais (RYDZ & JANES, 2012).

No presente estudo, foram analisados 21 indivíduos provenientes da Fundação HEMOBA com diagnóstico da DvW. O HEMOBA é o centro responsável por atender e acompanhar pessoas com doenças hemorrágicas, entre outras doenças hematológicas, em todo o estado da Bahia. Foram analisados, também, 69 indivíduos da população geral, atendidos na Faculdade de Farmácia-UFBA, sendo que destes, 21 foram utilizados como controle dos indivíduos com DvW, pareados por idade, sexo e etnia.

Não foi demonstrada diferença na frequência dos gêneros entre os indivíduos com DvW, tendo sido encontrado 52,4% para o sexo feminino. É descrito na literatura, que as concentrações plasmáticas do Ag:FvW e FVIII podem ser influenciadas por doenças de base inflamatória, infecciosa ou neoplásica; além disso, fatores hormonais, tais como, uso de contraceptivos orais, gestação e reposição hormonal elevam os níveis do Ag:FvW (TERRAUBE et al., 2009; RYDZ & JANES, 2012). Por conta disso, Mazzini e colaboradores (2000) estudaram o perfil molecular e laboratorial apenas de indivíduos do sexo masculino, a fim de evitar interferência decorrente do fator hormonal sobre as concentrações dos fatores. Entretanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os sexos e as concentrações de FVIII nos indivíduos com DvW.

As concentrações do Ag:FvW parecem estar aumentadas entre negros, como descrito por Robertson e colaboradores (2008) e Terraube e colaboradores (2009). Entretanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de Ag:FvW e a etnia dos indivíduos com DvW. Esses dados podem ter sido

decorrentes da taxa elevada de miscigenação racial observada na população estudada formada por europeus, ameríndios e negros (AZEVEDO, 1984).

A análise de familiares com sintomas hemorrágicos demonstrou que 33,3% dos indivíduos com DvW não apresentavam parentes com distúrbios hemorrágicos. Este fato é comum entre indivíduos que apresentam a forma leve da DvW, que muitas vezes, cursam assintomáticos tornando o diagnóstico desses casos bastante complexo e, geralmente, a suspeita da doença ocorre após um evento hemorrágico, consequência de um processo cirúrgico, ou procedimento mais invasivo (JAMES, 2012). O espectro clínico e laboratorial amplo encontrado no tipo 1 da DvW é resultado de variações nas concentrações do FvW, podendo ser observados indivíduos com a DvW que cursam com níveis próximos à normalidade, como também indivíduos sadios que apresentam redução mínima das concentrações do fator (ROBERTSON, 2008).

Foi observado que em 28,6% dos indivíduos com DvW, apenas a mãe apresentava sintomas hemorrágicos. Muitas vezes, o principal sintoma apresentado entre as mulheres é a menometrorragia. Conforme descrito, existe uma maior probabilidade de o gênero feminino apresentar sintomatologia mais precoce, decorrente do processo menstrual (JAMES, 2007). Aproximadamente, 13% das mulheres que cursam com menometrorragia são diagnosticadas com DvW (KADIR et al., 2012). Neste estudo, esse evento esteve presente em 33,3% das mulheres diagnosticadas com DvW. Esse percentual está de acordo com o encontrado em outros estudos, que relataram frequência de 30% a 74% destes eventos hemorrágicos (KADIR et al., 2012; RYDZ, 2012).

Aproximadamente, 71,4% dos indivíduos com DvW necessitaram de internação, a qual pode ter sido decorrente de um evento hemorrágico maior, refletindo a necessidade de tratamento hospitalar. Considerando, também, os sintomas da doença e sabendo que a intensidade do sangramento é variável entre os indivíduos, alguns casos são resolvidos com a reposição de FvW e FVIII, que muitas vezes, precisa ser realizado em um centro especializado. Estima-se que 6% dos casos de epistaxe necessitam de intervenção médica para contenção do sangramento (STRONG, 1995). Aproximadamente, 33,3% dos indivíduos com DvW analisados no presente estudo, apresentaram epistaxe. Esse percentual foi inferior

ao descrito na literatura, que é de 63%, provavelmente devido ao tamanho da amostra analisada (RYDZ, 2012).

Entre os indivíduos que precisaram de transfusão de hemocomponentes, 85,7% necessitaram de 1 a 2 vezes e apenas 14,3% precisaram mais de 4 vezes. Esses resultados confirmam que o perfil clínico da maioria dos indivíduos com DvW estudados é mais leve, condizente com os tipos 1 e 2 da doença, descritos no presente estudo. Não foi encontrado o tipo 3 da DvW, cuja estimativa é de 1 a 5% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em relação ao grupo sanguíneo, foi observada frequência mais elevada do grupo "O" (71,4%) nos indivíduos com a doença, que no grupo controle (42,9%), embora sem significância estatística. A frequência do grupo sanguíneo, dos indivíduos estudados, está de acordo com a frequência da população (JAMES et al., 2007). Embora, esteja bem estabelecido na literatura que os indivíduos do grupo "O" apresentam concentrações menores do Ag:FvW e FVIII, no presente estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (SOUSA et al., 2007; TERRAUBE et al., 2009). Entretanto, é necessária a realização da genotipagem do sistema ABO, a fim de confirmar esses dados, uma vez que foi realizada, apenas, a fenotipagem dos grupos sanguíneos.

A contagem de plaquetas é um método de triagem e apresenta-se normal na maioria das pessoas com DvW, exceto, para o tipo 2B da DvW, no qual pode ocorrer uma leve plaquetopenia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Neste estudo não foi encontrada diferença significativa entre a média das plaquetas dos indivíduos com DvW.

O tempo de sangramento (TS) é, também, um método de triagem, o qual avalia a integridade da função plaquetária e da parede celular. Existem duas técnicas para avaliar o TS, a técnica de Duke e a de Ivy; entretanto, a mais recomendada é a de Ivy, por tratar-se de um método padronizado. Embora, o TS faça parte dos testes contemplados pelo SUS no diagnóstico da DvW, este não foi utilizado neste estudo, visto que apresenta sensibilidade e especificidade baixas, sem valor significativo diante dos demais testes de triagem (ROBERTSON et al., 2008; NICHOLS et al., 2009). Na DvW, o TS pode apresentar-se normal ou prolongado e algumas condições clínicas, tais como doenças plaquetárias,

vasculites e até uso de medicamentos podem alterar a função plaquetária e interferir no resultado do teste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O teste de ligação do FvW ao colágeno é um teste confirmatório da DvW que avalia a função do FvW. Embora esteja reduzido em todos os tipos da DvW, pode apresentar-se normal no tipo 2M. Desta forma, auxilia no diagnóstico de subtipos da doença, principalmente, nas situações em que a análise de multímeros não pode ser realizada. Esse teste é bastante utilizado em países da Europa. Entretanto, não é difundido no Brasil e nos Estados Unidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A relação TTPa teste / TTPa padrão é um método de triagem, que analisa a relação do TTPa do paciente em segundos, por um TTPa padrão, obtido a partir de uma mistura de plasmas com TTPa normais. Embora o nível normal desse teste não exclua a DvW, neste estudo, a relação do TTPa diferiu entre os indivíduos com DvW e grupo controle.

Na DvW, geralmente, os níveis do FVIII e do Ag:FvW estão diminuídos, exceto em alguns casos do tipo 2. No presente estudo, a concentração média do Ag:FvW estava reduzida, quando comparada a do grupo controle; da mesma forma, a concentração média do FVIII nos indivíduos com DvW foi menor que no grupo controle, demonstrando uma correlação positiva entre ambos. Foi observado que quatro (4) indivíduos do grupo controle apresentaram concentrações do FVIII menores que 50%, embora apresentassem Ag:FvW e TTPa normais. No entanto, o resultado do TTPa, que é utilizado como teste de triagem, pode não estar prolongado em casos leves da DvW, mesmo quando os níveis de FVIII encontram-se reduzidos. O resultado do TTPa torna-se prolongado, quando o FVIII está inferior a 35% (KADIR, 2012).

A Classificação da DvW é baseada nos dados clínicos e achados laboratoriais e o Manual de diagnóstico e tratamento da DVW do Ministério da Saúde (2008) propõe a utilização da relação $FvW:RCO / Ag:FvW \geq 0,7$ para a classificação da DvW em tipo 1 e $< 0,7$ para os tipos 2 da doença. Entretanto, Federici e colaboradores (2008), após adotarem a relação $FvW:RCO / Ag:FvW < 0,6$ como preditivo de anormalidade do FvW, em um estudo realizado na Itália, relataram que muitos indivíduos classificados como tipo 1 da DvW, foram reclassificados como tipo 2. Assim, utilizando o critério laboratorial para a classificação da DvW proposto pelo Ministério da Saúde, o presente estudo encontrou 57,1% dos indivíduos com

diagnóstico sugestivo do tipo 1 e 42,9% de indivíduos com diagnóstico sugestivo do tipo 2. A utilização da relação $FvW:RCO / Ag:FvW < 0,6$, sugerida por Federici e colaboradores (2008), não alterou os resultados encontrados. Além disso, no presente estudo, não foram encontrados indivíduos classificados com DvW tipo 3, os quais, apresentam níveis do Ag:FvW inferiores a 1% e FVIII inferiores a 10%; esses dados estão de acordo com a literatura, a qual refere como o tipo 3 da DvW como o mais raro, sendo descrito de 1 a 5% de todos os casos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Os níveis do Ag:FvW estão diminuídos nos tipos quantitativos da DvW (tipos 1 e 3) e normais ou limitrofes no tipo qualitativo (tipo 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Entretanto, no presente estudo, levando-se em consideração a concentração do Ag:FvW, observou-se que entre os indivíduos classificados como tipo 1 da DvW, 50% apresentaram níveis do Ag:FvW dentro da normalidade; e entre os classificados como tipo 2 da DvW, 33,3% apresentaram níveis do Ag:FvW abaixo da normalidade. Esses resultados demonstram que os níveis do Ag:FvW são muito variáveis e, portanto, não deve ser utilizado sozinho para classificar a doença, sendo necessários outros testes que avaliam a função do FvW, bem como uma avaliação clínica paralela à laboratorial.

Neste estudo, o tipo 2 da DvW não foi subclassificado, uma vez que seria necessário realizar dois testes adicionais: a agregação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA) e a análise de múltímeros. O RIPA avalia a agregação plaquetária diante de concentrações diferentes da ristocetina ($<0,8$ mg/dL e $>1,2$ mg/dL). A maioria dos indivíduos com DvW apresenta baixa resposta ao (RIPA), ou seja, a agregação das plaquetas só ocorre em concentrações maiores da ristocetina (1,2mg/dL), exceto, nos indivíduos com o subtipo 2B da DvW, onde ocorre afinidade alta entre FvW e Gp1b, tornando-os hiper-responsivos à ristocetina, de forma que concentrações baixas ($<0,8$ mg/dL) deste indutor são capazes de agregar as plaquetas. Logo, o RIPA é o teste utilizado para o diagnóstico diferencial entre os subtipos 2A e 2B. No tipo 1 da DvW, o RIPA pode estar normal ou discretamente reduzido e, portanto, não é o teste de escolha para o diagnóstico ou exclusão desse tipo da doença (ROBERTSON et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A análise de multímeros permite analisar a estrutura do FvW, através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Desta forma, este teste auxilia a diferenciação dos tipos 2 da DvW, visto que no tipo 1, os multímeros estão presentes, porém em concentrações reduzidas; no tipo 2, os multímeros de peso molecular alto estão ausentes, exceto no subtipo 2M; e no tipo 3, todos os multímeros estão ausentes (ROBERTSON et al., 2008).

A análise das concentrações do Ag:FvW e FvW:RCo dos indivíduos com DVW, revelou que, apenas, 19,0% apresentaram níveis dentro dos valores normais de referência para o Ag:FvW (50 - 150%) e 4,8% para FvW:RCo (50 - 150%). E, a relação entre as concentrações desses fatores e os principais eventos hemorrágicos apresentados pelos indivíduos, não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Esses resultados estão de acordo com os descritos por James e colaboradores (2007), que ao analisarem 387 indivíduos da população canadense, que apresentavam o tipo 1 da DvW, também não encontraram associações sobre o fenótipo de hemorragia e os níveis de Ag:FvW. Os resultados encontrados podem ser decorrentes do perfil dos indivíduos analisados, uma vez que foi estudada a forma mais leve da DvW, cujos sintomas hemorrágicos são menos frequentes. Dessa forma, o estudo de um número elevado de casos mais graves da doença pode contribuir para esclarecer melhor a relação entre os níveis do Ag:FvW e a ocorrência de eventos hemorrágicos.

No presente estudo, a associação das concentrações do Ag:FvW com os eventos de internação, uso de hemocomponentes e presença de outras patologias, não demonstrou diferença significativa. Entretanto, observou-se que a média do FvW:RCo foi menor entre aqueles que precisaram de internação e transfusão. Esse achado demonstra que o FvW:RCo é um teste importante para o diagnóstico e acompanhamento do indivíduo com DvW, devendo ser realizado em todos aqueles com suspeita da doença, uma vez que os níveis do Ag:FvW podem estar normais, porém com a função alterada.

Neste estudo, foram analisadas as frequências dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 do intron 40 do gene *FvW*, em 21 indivíduos com DvW e em 69 indivíduos da população geral. O estudo desses polimorfismos iniciou-se na década de 90, quando Peake e colaboradores identificaram a sequência de repetição do tipo (ATCT)_n. A partir de então, a análise molecular tornou-se foco de estudos em

diversos países, como ferramenta importante para avaliar indivíduos com a forma grave da DvW, bem como para o diagnóstico prenatal e identificação de familiares heterozigotos, através da identificação de deleções gênicas ou da presença de fragmentos anormais (STANDEN et al., 1990; CUMMING et al., 1991; CASAÑA et al., 1995). Entretanto, no Brasil, ainda são poucos os estudos realizados; Pena e colaboradores (1994) e Zago e colaboradores (1996), foram os primeiros a caracterizar o VNTR1 na população brasileira e apenas no ano 2000, os três VNTRs foram estudados por Mazzini e colaboradores, em uma população caucasóide de ascendência italiana e espanhola.

A análise do VNTR1 demonstrou frequências menores para os alelos 6 (11,6%) e 7 (1,4%), quando comparados a outros estudos, nos quais foram descritos como os mais frequentes (CUMMING et al., 1991; MAZZINI et al., 2000). No presente estudo, os alelos mais frequentes foram o 5 (40,5%) e o 4 (21,4%) nos indivíduos com DvW, bem como na população geral (68,1% e 36,2%, respectivamente), sendo que o alelo 4 do VNTR1 nunca fora descrito em outras populações e o alelo 5 foi apenas encontrado na população inglesa estudada por Cumming e colaboradores (1991). Esses dados sugerem uma característica da população estudada, provavelmente, consequência da forte influência de povos negros, no estado da Bahia, diferindo de outros autores brasileiros, que ao estudarem indivíduos caucasóides de ascendência europeia, encontraram frequências alélicas semelhantes àqueles descritos em estudos da Inglaterra e Espanha (PEAK et al., 1990; PENA et al., 1994; CASAÑA et al., 1995; MAZZINI et al., 2000).

Em relação ao VNTR2, foram encontrados 8 alelos diferentes nos indivíduos com DvW, que variavam do alelo 1A ao alelo 7. Cumming e colaboradores, em 1991, foram os primeiros a identificar o alelo 1A, e desde então, este alelo não foi relatado por outros autores. Neste estudo, os alelos mais frequentes para o VNTR2 nos indivíduos com DvW e na população geral foram os alelos 3 e 4 (40,5% e 30,9%; 55,1% e 52,2%, respectivamente), entretanto, o alelo 1A foi encontrado apenas nos indivíduos com DvW. Esses resultados encontram-se de acordo com outros estudos brasileiros e europeus. Pena e colaboradores (1994) ao analisarem indivíduos brasileiros caucasóides, também encontraram frequência mais elevada do alelo 4 (35,5%) e do alelo 3 (19,4%); Mazzini e colaboradores (2000) identificaram na população de São Paulo frequências mais elevadas do alelo 4, sendo de 50%

para os indivíduos com DvW e 34,3% para o grupo controle; Casaña e colaboradores (1995) encontraram na população da Espanha frequências mais elevadas dos alelos 4 e 3 com 39,4% e 31,8%, respectivamente. Dessa forma, a análise do VNTR2 demonstrou similaridade entre outros estudos, sugerindo uma conservação maior deste polimorfismo entre as populações.

Em relação ao VNTR3, foram encontrados 6 alelos diferentes para os indivíduos com DvW, sendo os mais frequentes os alelos 3 e 4 com 35,7% e 30,9%, respectivamente. Além disso, foi encontrado o alelo, denominado de 1A, com 134 pb, não identificado em outros estudos. Nos indivíduos da população geral, foram encontrados 7 alelos diferentes, sendo os mais frequentes o alelo 3 (52,2%), seguido pelos alelos 2 e 4 com frequências de 37,7%. Esses dados são semelhantes aos descritos por Casaña e colaboradores (1995), que identificaram sete alelos, sendo os mais frequentes os alelos 3, 4, 5 e 6. Mazzini e colaboradores (2000) encontraram seis alelos nos indivíduos com DvW, sendo os alelos mais frequentes o 3, 4 e 5; e oito alelos no grupo controle, sendo os mais frequentes os alelos 4 (27,4%) e 5 (26,4%). Em nosso estudo não houve diferença nas frequências alélicas nos indivíduos com DvW e na população geral.

Em relação à frequência de heterozigose dos indivíduos estudados foi encontrada 84% para o VNTR1, diferente do descrito por Cumming e colaboradores (1991), que encontraram 77%; Pena e colaboradores (1994) 72%; e Casaña e colaboradores (1995) 75%. Provavelmente, essa diferença seja devido ao tipo de população estudada, reafirmando a miscigenação racial elevada no Estado da Bahia. Para o VNTR2, a heterozigose foi de 65%, inferior aos valores encontrados por Pena e colaboradores, em 1994; e Casaña e colaboradores (1995), (78% e 73%, respectivamente). Entretanto, foi semelhante a frequência de 66% descrita por Cumming e colaboradores (1991) e Mazzini e colaboradores (2000). O VNTR3 apresentou frequência de 74%, sendo inferior a observada por Casaña e colaboradores, em 1995, e Mazzini e colaboradores, em 2000, (86% e 81%, respectivamente).

Assim, as diferenças encontradas para as frequências alélicas e de heterozigose para os VNTRs, podem ter sido decorrentes do método utilizado para identificá-los. Neste estudo, a técnica adotada para análise dos fragmentos obtidos por PCR foi a eletroforese capilar, a qual utiliza *primers* e marcador de pares de

base marcados com fluorescência, além de um *software* específico para análise dos resultados. A técnica utilizada pelos demais autores foi a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), que embora seja bastante utilizada para a separação de bandas com diferenças pequenas de comprimento, não se mostra ideal para a análise de VNTRs, cuja diferença no comprimento dos fragmentos, muitas vezes, é de apenas quatro pares de base, dificultando a sua análise. Além disso, os autores relatam que a presença de bandas inespecíficas, produzidas no PCR, durante a corrida em PAGE poderia comprometer as análises e dificultar a identificação dos alelos. Por esses motivos, optou-se pela técnica de eletroforese capilar, que permitiu separação e análise dos fragmentos mais eficiente, além de ser um método rápido, reproduzível, com exatidão elevada e que utiliza pouco volume de amostra, mostrando-se ideal para a análise de regiões de microssatélite (PEAKE, 1990; JAGER et al., 2001; OTHMAN et al, 2007).

O VNTR3 tem sido descrito como a região mais polimórfica do intron 40, sendo considerado o marcador mais informativo para identificação de parentescos, aconselhamento genético e para identificação individual de casos graves (CASAÑA et al., 1995). O nível de informação obtido pelos VNTR1 e VNTR2 é menor, conforme a literatura, mas quando associado ao VNTR3 tornam-se ferramentas importantes. Neste estudo, o VNTR1 mostrou-se um marcador importante, visto que apresentou frequência elevada para o alelo 4, o qual nunca fora descrito, sugerindo que este pode ser específico da população e poderá ser utilizado, futuramente, como uma ferramenta importante para estudos antropológicos.

A associação dos alelos do VNTR1, VNTR2 e VNTR3 com as concentrações do FVIII, Ag:FvW e FvW:RCo, nos indivíduos com DvW, não revelou diferença estatisticamente significativa, exceto, para o alelo 3 do VNTR3. Os indivíduos com o alelo 3 do VNTR3 cursaram com concentrações do Ag:FvW mais elevadas (50,4%) que aqueles que não apresentaram o alelo (29,5%). Desta forma, a fim de confirmar a participação do alelo 3 do VNTR3 como um fator protetor na DvW, devem ser realizados mais estudos envolvendo um número maior de participantes, bem como, de casos mais graves, correlacionando a presença deste alelo com os níveis do Ag:FvW e o perfil clínico dos indivíduos. No grupo controle, nenhuma diferença significativa foi observada durante a análise dos alelos com as concentrações dos testes acima citados.

A análise dos alelos mais frequentes do VNTR1, VNTR2 e VNTR3 do intron 40 do gene *FvW* com o grupo sanguíneo revelou que todos os indivíduos com DvW e grupo sanguíneo “A” apresentaram o alelo 3 do VNTR2. Dessa forma, esses estudos reforçam a necessidade de estudos envolvendo a genotipagem do grupo sanguíneo e sua correlação com os alelos estudados.

A análise da frequência alélica dos polimorfismos VNTR1, VNTR2 e VNTR3 com os eventos hemorrágicos, demonstrou que todos os indivíduos que apresentaram o alelo 5 do VNTR1 e o alelo 4 do VNTR2, apresentaram frequência maior de hemorragia pós-trauma. Entretanto, para a validação da influência dos alelos dos VNTRs sobre a clínica dos indivíduos com DvW, seriam necessários estudos semelhantes envolvendo outras populações, assim como o aumento do número de participantes, para compreendermos melhor a relação entre os alelos dos VNTRs e os eventos hemorrágicos, a fim de, no futuro, estabelecê-los como marcadores moleculares de risco ao agravo da DvW.

A prevalência da DvW descrita em estudos populacionais é de 1,0%, semelhante a prevalência da Hemofilia A (SADLER et al.; 2006, FEDERICI et al., 2009; RYDZ & JANES, 2012). Rodeghiero e colaboradores (1987), em um estudo epidemiológico analisaram 1281 crianças em duas cidades do norte da Itália e a prevalência da DvW estimada para sua população foi de 0,8%; Werner e colaboradores (1993) avaliaram 600 crianças e adolescentes de origens multiétnica nos Estados Unidos da América e encontraram uma prevalência de 1,3% da DvW.

O primeiro estudo de prevalência da DvW no Brasil foi realizado no Rio Grande do Sul por Fischer e colaboradores (1989), no qual foi analisado apenas a forma grave da doença. Mazzini e colaboradores (2000) avaliaram no Estado de São Paulo 795 doadores de sangue do sexo masculino e a prevalência da doença foi de 1,63%.

No Brasil a DvW, parece ser subdiagnosticada, visto que em 2007, o percentual de registros da DvW (21,2%) foi três vezes menor que o da hemofilia (62,7%) de um total de 10.982 casos de coagulopatias registrados (REZENDE et al., 2009). Entretanto, de acordo com a Coordenação de Política Nacional de Sangue e Hemoderivados, o registro de novos casos aumentou em 2009 para 14.348 portadores de doenças hemorrágicas, das quais 1.546 correspondem a casos novos de DvW; 1.380 casos novos de Hemofilia A e 268 casos novos de Hemofilia B.

Embora, os registros de casos novos de doença sejam crescentes no Estado da Bahia, o percentual de notificações ainda precisa melhorar, uma vez que está três vezes menor, quando comparado aos registros de Hemofilia A. Esses dados podem refletir a falta de conhecimento da doença pela equipe de saúde, bem como a falta de implementação do diagnóstico laboratorial em centros especializados ou até mesmo fontes notificadoras precárias. Isso pode ser verificado, ao comparar o registro de casos novos em regiões mais desenvolvidas do país, como o Sudeste; a prevalência mais elevada da DvW é encontrada em São Paulo (24,2%), Rio de Janeiro (21,2%) e Minas Gerais (14,8%) (Ministério da Saúde, 2008; REZENDE et al., 2009).

Dessa forma, é importante a realização de mais estudos sobre a DvW para avaliar a prevalência da doença na população geral, o perfil clínico dos indivíduos e, desta forma, analisar a viabilidade de descentralizar o diagnóstico e expandi-lo para outras microrregiões do estado da Bahia. Além disso, são necessários mais estudos de caracterização do genótipo nessa população, a fim de auxiliar na implementação de novos marcadores prognósticos e conferir maior acessibilidade ao tratamento e acompanhamento das pessoas com doenças hematológicas.

7 - CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica da DvW, através da análise dos dados clínicos, laboratoriais e moleculares dos indivíduos com a doença e indivíduos sadios em indivíduos de Salvador – Bahia. Assim, o presente trabalho levou às seguintes conclusões:

1. A maioria dos indivíduos com DvW estudados apresentou um quadro clínico leve, com classificação sugestiva do tipo 1 e 2 da doença, dos quais 33,3% não relataram a ocorrência de familiares com distúrbios hemorrágicos, confirmando a sua heterogeneidade.
2. Os indivíduos com DvW apresentaram concentrações do FvW, do FVIII e da relação TTPa menores que as do grupo controle. Entretanto, esses parâmetros laboratoriais, isoladamente, não devem ser utilizados para o diagnóstico da DvW, uma vez que alguns indivíduos apresentaram níveis normais desses testes.
3. A presença de eventos hemorrágicos não teve associação com os níveis do Ag:FvW e FvW:RCo. Entretanto, a frequência de internação e uso de hemocomponentes foi maior nos indivíduos que apresentaram níveis menores ou iguais a 20% do FvW:RCo, sugerindo que este teste laboratorial seja importante, não somente para o diagnóstico, como também para o acompanhamento dos indivíduos com a doença.
4. A análise do VNTR1 demonstrou a ocorrência de 7 alelos diferentes que variaram do 4 ao 10, com frequência mais elevada para os alelos 4 e 5. O alelo 4 foi identificado pela primeira vez, sugerindo ser uma característica específica da população estudada, o qual poderá ser utilizado como ferramenta para estudos antropológicos. O alelo 5 foi encontrado com maior frequência nos indivíduos com hemorragia pós-trauma.
5. A análise do VNTR2 demonstrou a ocorrência de 8 alelos diferentes que variaram do 1A ao 7, com frequência mais elevada para os alelos 3 e 4. A

freqüência de hemorragia pós-trauma também foi mais elevada entre os portadores do alelo 4, sugerindo que a presença dos alelos 5-VNTR1 e 4-VNTR2 podem conferir um quadro clínico mais grave entre os indivíduos com DvW.

6. A análise do VNTR3 demonstrou a ocorrência de 8 alelos diferentes que variaram de 1A a 7, com freqüência mais elevada para os alelos 3 e 4. Os indivíduos portadores do alelo 3 apresentaram concentrações mais elevadas do Ag:FvW, sugerindo ser um fator de proteção para os indivíduos com DvW.

Desta forma, os resultados confirmam a heterogeneidade fenotípica e genotípica dos indivíduos com DvW, justificando a realização de estudos adicionais, que investiguem a participação dos alelos dos VNTRs do intron 40 do gene do FvW e dos demais parâmetros laboratoriais no desenvolvimento clínico da doença.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO E.S., SOUSA M. Multivariate study of birth weight and maternal heterozygosity for sickle cell anemia in Bahia, Brazil. **Human Heredity**, v. 34, p. 40-5, 1984.

BARBOSA F.T.; CUNHA R.M.; BARBOSA L.T. Von Willebrand's disease and anesthesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 315-323, 2007.

BONTHRON D.T.; HANDIN R.I.; KAUFMAN R.J.; WASLEY L.C.; ORR E.C.; MITSOCK L.M.; EWENSTEIN B.; LOSCALZO J.; GINSBURG D.; ORKIN S.H. Structure of pré-pro Von willebrand factor and its expression in heterologous cells. **Nature**, v. 324, p. 270-273, 1986.

CASAÑA P.; MARTINEZ F.; AZNAR J.A. Practical Application of Three Polymorphic Microsatellites in Intron 40 of the Human Von Willebrand Factor Gene. **Haemostasis**, v. 25, p. 264-271, 1995.

KESSLER C.M. Deficiência dos fatores de coagulação. IN CECIL. Tratado de Medicina Interna. 21. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001. V.1 cap. 185. p. 1121.

CUMMING A.M.; ARMSTRONG J.G.; PENDRY K.; BURN A.M.; WENSLEY R.T. Polymerase chain reaction amplification of two polymorphic simple repeat sequences within the von Willebrand factor gene: application to family studies in von Willebrand disease. **Human Genetics**, v. 89, p. 194-198, 1991.

DONG J.F. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. **Blood**, v. 100, p. 4033-9, 2002.

FAY P.J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. **Blood**, v. 18, p. 1-15, 2004.

FRANCHINI M.; MONTAGNANA M.; LIPPI G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects PF platelet-type Von Willebrand disease. **International Journal of Laboratory Hematology**. 2008;30:91-94.

FEDERICI A.B.; CANCIANI M.T. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. **Haematologica**, v. 94,p. 610-5, 2009.

FISCHER R.R. Inheritance and prevalence of von Willebrand's disease severe form in a Brazilian population. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.12, p. 293-301, 1989.

GOODEVE A.; EIKENBOOM J.; CASTAMAN G. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 of von Willebrand disease.(MCMDM-1VWD). **Blood**, v. 109, p. 112-21, 2007.

JAGER A.V.; TAVARES M.F. Simultaneous determination of cations by capillary electrophoresis: fundamentals and applications. **Quimica Nova**, v. 24, p. 363-373, 2001.

JAMES P.D.; NOTLEY C.; HEGADORN C.; LEGGO J.; TUTTLE A.; TINLIN S. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. **Blood**, v. 109, p. 145-54, 2007.

JAMES P.D.; LILLICRAP D. von Willebrand disease: Clinical and laboratory lessons learned from the large vom Willebrand disease studies. **American Journal of Hematology**, v.87, p. S4-S11, 2012.

KADIR R.A.; CHI C. Women and vomWillebrand disease: controversies in diagnosis and management. **SeminThrombosis Hemostasy**, v. 32 p. 605-15, 2006.

KEENEY S.; BOWEN D.; CUMMING A.; ENAYATA S.; GOODEVES A.; HILL M. The molecular analysis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctor's Organisation Haemophilia Genetics Laboratory Network. **Haemophilia**, v. 14, p. 1099-1111, 2008.

KOEDAM J.; MEIJERS J.C.; SIXMA J.J. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, p. 1236-43, 1988.

KIMPTON C.; WALTON A.; GILL P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. **Human Molecular Genetic**, v. 1 p. 287, 1992.

LILLICRAP D. Von Willebrand disease - phenotype versus genotype: deficiency versus disease. **Thrombosis Research**, v. 120 p. S11-6, 2007.

LIPPI G. ; FRANCHINI M. ; SALVAGNO G.L. ; MONTAGNANA M. ; POLI G. ; GUIDI G.C. Correlation between von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor ristocetin activity and factor VIII activity in plasma. **Journal Thrombosis Thrombolysis**, v. 26 p. 150-153, 2008.

LYNCH D.C.; ZIMMERMAN T.S.; COLLINS C.J. Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: Authentication by a new method. **Cell**, v. 41 p. 49-56, 1985.

LYONS S.E. ; BRUCK M.E. ; BOWIE E.J.W. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267 p. 4424-30, 1992.

MANCUSO D.J., TULEY E.A.; WESTFIELD L.A. Structure of the gene for human von Willebrand factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 19514-24, 1989.

MANCUSO D.J. ; TULEY E.A.; WESTFIELD L.A. ; LESTER-MANCUSO T.L.; LE BEAU M.M. ; SORACE J.M.; SADLER J.E. Human von Willebrand factor gene and pseudogene : structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. **Biochemistry** , v.30 p. 253-69, 1991.

MAZZINI J.; HACKEL C.; ANNICHINO-BIZZACCHI J.M. Allelic frequencies of three VNTRs in intron 40 of the human von Willebrand factor gene in types 1, 2, and 3 von Willebrand disease patients and controls of a Brazilian population. **Thrombosis Research**, v. 100, p. 489-94, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento da Doença de Von Willebrand p. 43, 2008.

MIRANDA C.E.S; CARRILHO E.; GERVASIO A.P.; GINÉ M.F. Flow injection analysis – capillary electrophoresis hyphenated systems (FIA-CE): challenges, applications and perspectives. **Química Nova**, v.25 p. 412-419, 2002.

NICHOLS W.L.; RICK M.E.; ORTEL T.L.; MONTGOMERY R.R. Transient neonatal acquired von Willebrand syndrome due to transplacental transfer of maternal monoclonal antibodies. **Pediatric Blood Cancer**, v. 20, p. 366-70, 2009.

NICHOLS W.L.; RICK M.E.; ORTEL T.L.; MONTGOMERY R.R.; SADLER J.E.; YAWN B.P.; JAMES A.H.; HULTIN M.B.; MANCO-JOHNSON M.J.; WEINSTEIN M. Clinical and laboratory diagnosis of Von Willebrand disease: A synopsis of the 2008 NHLBI/NIH guidelines. **American Journal of Hematology**, v. 84 p. 366-370, 2009.

OTHMAN M.; ELBATARNY H.; BYRNE C.; O'SHAUGHNESSY D.F. von Willebrand Factor Short Sequence Repeat Locus 2 (Intron 40) Consists of Three Polymorphic Subloci. **Acta of Haematology**, v. 117, p. 177-180, 2007.

PEAKE I.R.; BOWEN D.; BIGNELL P.; LIDDELL M.D.; SADLER J.E.; STANDEN G.; BLOOM A.L. Family studies and pre natal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable tandem repeat region of the von Willebrand factor gen. **Blood**, v. 76, p. 555-561, 1990.

PENA S.D.J.; SOUZA K.T.; ANDRADE M.; CHAKRABOTY R. Allelic association of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. **Genetics**, v. 91, p. 723-727, 1994.

PLOOS van AMSTEL H.K.; REITSMA P.H. Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF. **Nucleic Acids Reserch**, v.18, p. 4957, 1990.

REZENDE S.M.; PINHEIRO K.; CARAM C.; GENOVEZ G.; BARCA D. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: first report. **Haemophilia**, v. 15, p. 142-9, 2009.

ROBERTSON J.; LILLICRAP D.; JAMES P.D. Von Willebrand disease. **Pediatric Clinic North America**, v. 55, p. 377-92, 2008.

RODEGHIERO F.; CASTAMAN G.; DINI E. Epidemiological Investigation of the Prevalence of von Willebrand's Disease. **Blood**, v. 69, p. 454-459, 1987.

RYDZ,N.; JAMES, P.D. Why is my patient bleeding or bruising? **Hematology Oncology Clinic North America**, v. 26, p. 321-344, 2012.

RUGGERI Z.; ZIMMERMAN T. The complex multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor. **Blood**, v. 57, p. 1140-3, 1981.

SADLER J.E.; BUDDE U.; EIKENBOOM J.C. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von WillebrandFactor.**Journal of Thrombosis Haemostasy**, v.4, p. 2103-14, 2006.

SADLER J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrandfactor. **Annual Review of Biochemistry**, v, 67, p. 395-424, 1998.

SHEN B.W.; SPIEGEL P.C.; CHANG C.H. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. **Blood**, v. 111, p. 1240-7, 2008.

SIMON D.; BANDINELLI E. ; ROISENBERG I. Von Willebrand factor gene polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. **Human Biololy**, v. 72, p. 1055-63, 2000.

SIMON D.; ROISENBERG I. Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. **Haemophilia**, v.10, p. 473-6, 2004.

SOUSA N.C.; ANICCHINO-BIZZACCHI J.M.; LOCATELLI M.F.; CASTRO V.; BARJAS-CASTRO M.L. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrandfactor. **Haematologica**, v. 92, p. 236-9, 2007.

SPORN L.A. ; CHAVIN S.I. ; MARDER V.J. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, p. 1140-3, 1985.

STANDEN G.R.; BIGNELI P.; BOWEN D.J.; PEAKE I.R.; BLOOM A.L. Family study in von Willebrand's disease by analysis of restriction fragments length polymorphisms and anIntragenic variable number tandem repeat (VNTR) sequence. **British Journal of Haematology**, v. 76, p. 242-249, 1990.

TERRAUBE V. ; O'DONNELL J.S.; JENKINS P.V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. **Haemophilia**, v. p. 1-11, 2009.

TITANI K.; KUMAR S.; TAKIO K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. **Biochemistry**, v. 25, p. 3171-84, 1986.

TSAI H.M.; NAGEL R.L.; HATCHER V.B.; SEATON A.C.; SUSSMAN I.I. The high molecular weight from the endothelial cell von willebrand factor is released by the regulated pathway. **British Journal of Haematology**, v. 79, p. 239-245, 1991.

TSAI H.M. High titers of inhibitors of von willebrand factor-cleaving metalloproteinase in a fatal case of acute thrombotic thrombocitopenicpurpura. **American Journal of Haematololy**, v. 65, p. 251-255, 2000.

Von WILLWBRAND E.A. Hereditar pseudohefemofili. Fin Lakaresallsk Handl, v. 67, p. 7-12, 1926.

WAGNER D.D.; MARDER V.J. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. **Journal Cell Biology**, v. 99, p. 2123-30, 1984.

WANG J.W.; VALENTIJM K.M.; BOER H.C.; DIRVEN R.J.; ZONNEVELD A.J. Intracellular storage and regulated secretion of von Willebrand factor in quantitative von Willebrand disease. **Journal Biology Chemistry**, v. 286, p. 24180-24188, 2011.

WERNER E.J.; BROXSON E.H.; TUCKER E.L. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. **The Journal of Pediatrics**, v. 123, p. 893-8, 1993.

XAVIER N.L.; CAVALLEIRO J.A.; SILVA A.J. Plasmatic Von willebrand factor measurement and clinical variables as prognostic factors of breast cancer. **Revista HCPA**, v. 30, p. 105-110, 2010.

ZAGO M.A.; SILVA W.A.; MARLI H.; TAVELLA S, SANTOS E.B.; GUERREIRO J.F.; FIGUEIREDO M.S. Interpopulational and intrapopulational Genetic Diversity of Amerindians as Revealed by Six Variable Tandem Repeat. **Human Heredity**, v. 42, p. 274-289, 1996.

ZAGO M.A.; FALCÃO R.P.; PASQUINI R.P. Hematologia: Fundamentos e Práticas. 1 ed. p. 1081, 2001.

ZHAO Y.; GU Y.; JI S.; YANG J.; YU Z.; RUAN C. Development of a ELISA method for testing VWD ristocetin cofactor activity with improved sensitivity and reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. **European Journal of Haematology**, v. 88, p. 439-445, 2012.