Daniela Flosi Valadares

**A relação do sistema sanguíneo ABO com o Fator de von Willebrand e
o seu pró-peptídeo (FVWpp)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

**SÃO PAULO
2019**

Daniela Flosi Valadares

**A relação do sistema sanguíneo ABO com o Fator de von Willebrand e
o seu pró-peptídeo (FVWpp)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**SÃO PAULO
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Valadares, Daniela Flosi

A relação do sistema sanguíneo ABO com o Fator de von Willebrand e o seu pró-peptídeo (FVWpp) / Daniela Flosi Valadares. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Fator de von Willebrand
2.Coagulação sanguínea 3.Hemostasia 4. Lesões do sistema vascular 5.Sistema do grupo sanguíneo ABO
6.Pró-peptídeo FVWpp

USP/FM/DBD-461/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Valadares DF. *A relação do sistema sanguíneo ABO com o fator de von Willebrand e o seu pró-peptídeo (FVWpp)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr

Instituição:

Julgamento: _____

Prof. Dr

Instituição:

Julgamento: _____

Suplentes:

Prof. Dr

Instituição:

Julgamento: _____

Prof. Dr

Instituição:

Julgamento: _____

Esse trabalho é dedicado aos meus amados pais.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por se fazer presente em todos os dias de minha vida e a minha família por possibilitarem que eu aceitasse essa oportunidade.

Aos meus professores Dr. Sérgio Dr^a Rosangela pela disponibilidade e ensinamentos.

Agradeço aos colegas de laboratório e da Fundação Pró Sangue pela assistência e ensinamentos diários.

E finalmente, mas não menos importante, agradeço aos doadores de sangue da Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo, sem os quais esse estudo não existiria.

Obrigada!

Resumo

Valadares DF. *A relação do sistema sanguíneo ABO com o fator de von Willebrand e o seu pró-peptídeo (FVWpp)* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O Fator de von Willebrand (FVW) é uma proteína envolvida na hemostasia, responsável por mediar a adesão e agregação plaquetária em eventos de lesão vascular. Essa proteína é sintetizada na forma de pré-pró-FVW e contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo conhecido como FVWpp e uma subunidade madura. O FVW é considerado um marcador clássico de lesão endotelial, embora seus níveis possam ser influenciados por algumas condições como sexo, idade e o tipo sanguíneo ABO. Já o seu pró-peptídeo parece não sofrer influência desse grupo sanguíneo. Nesse trabalho investigamos a influência do sistema sanguíneo ABO sobre o FVW antígeno (FVW:Ag), atividade (FVW:CB e FVW:RCo), pró-peptídeo (FVWpp) e sobre o fator VIII (FVIII:c) em uma população de 430 indivíduos saudáveis divididos inicialmente em grupos "O" e Não O" e posteriormente de acordo com o tipo sanguíneo em A, B, AB e O. As determinações de FVW:Ag, FVWpp e FVW:CB foram realizadas por ELISA e as determinações de FVW:RCo e FVIII:c por método automatizado (ACL Top 300®). Foi observada uma diminuição no FVW:Ag em indivíduos do tipo sanguíneo "O" em comparação com indivíduos Não O (89 ± 15 vs 96 ± 15 UI / dL, respectivamente; $p < 0,001$). Também foi observada uma diminuição no FVW:RCo (85 ± 20 vs $107 \pm 27\%$; $p < 0,001$), FVW:CB (93 ± 27 vs $107 \pm 27\%$; $p < 0,001$) e FVIII:C (92 ± 27 vs $113 \pm 28\%$; $p < 0,001$) nesses mesmos indivíduos. Já o propeptídeo FVWpp não variou significativamente entre os grupos. Também mostramos que o FVW: CB é influenciado pelos níveis de FVW:Ag em indivíduos O, mas não em indivíduos Não O, enquanto o FVW:RCo é influenciado pelos níveis de FVW:Ag em indivíduos Não O, mas não em O. A adição do FVWpp e da razão FVWpp/FVW:Ag às análises não altera essa correlação. Assim, nossos resultados mostram uma diminuição no antígeno e nas atividades do FVW, seja determinado pelo cofator de ristocetina (FVW: RCo) ou ligação ao colágeno (FVW: CB) e na atividade do FVIII em indivíduos O, como observado em outras populações. Além disso, o FVWpp não é influenciado pelo sistema sanguíneo ABO, o que reforça seu papel como um potencial biomarcador capaz de refletir alterações fisiopatológicas em várias condições clínicas associadas à lesão endotelial.

Descritores: Fator de von Willebrand; Coagulação sanguínea; Hemostasia; Lesões do sistema vascular; Sistema do grupo sanguíneo ABO; Pró-peptídeo FVWpp.

Abstract

Valadares DF. *Plasma von Willebrand factor and factor VIII in a healthy brazilian population association with ABO blood groups* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Von Willebrand Factor (VWF) is a protein involved in hemostasis, responsible for mediating platelet adhesion and aggregation in events of vascular injury. This protein is synthesized as pre-pro-VWF and contains a signal peptide, a propeptide known as FVWpp, and a mature subunit. VWF is considered a classic marker of endothelial injury. VWF levels may be influenced by gender, age and ABO blood type. VWF propeptide, on the other hand, does not seem to be influenced by blood group. Here we investigated the influence of ABO blood system on VWF antigen (VWF:Ag), VWF activity, determined by ristocetin cofactor (VWF:RCo) or collagen binding (VWF:CB), VWF propeptide (VWFpp), and factor VIII activity (FVIII:C) in a Brazilian population of 430 healthy individuals. VWF:Ag, VWFpp and VWF:CB were determined by ELISA. VWF:RCo and FVIII:C were determined by automated methods. Our results show a decrease in VWF:Ag in blood type "O" subjects compared with "Non-O" individuals (89 ± 15 vs 96 ± 15 IU/dL, respectively; $p < 0.001$). A decrease was also observed in VWF:RCo (85 ± 20 vs $107 \pm 27\%$; $p < 0.001$), VWF:CB (93 ± 27 vs $107 \pm 27\%$; $p < 0.001$) and FVIII:C (92 ± 27 vs $113 \pm 28\%$; $p < 0.001$). VWFpp did not change significantly between groups. We also show that VWF:CB is influenced by VWF:Ag in O individuals but not in non-O individuals while VWF:RCo is influenced by VWF:Ag in non-O individuals but not in O individuals. Adding VWFpp and VWFpp/VWF:Ag to the analyses does not change this correlation. Thus, our results show a decrease in VWF antigen and activities, whether determined by ristocetin cofactor (FVW: RCo) or collagen binding (FVW: CB), and FVIII in O individuals, as observed in other populations. Additionally, VWFpp is not influenced by ABO blood system, which reinforces its role as a potential biomarker capable of reflecting pathophysiological changes in various clinical conditions associated with endothelial injury.

Descriptors: von Willebrand factor; Blood coagulation; Hemostasis; Vascular system injuries; ABO blood system; VWF propeptide VWFpp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura dos carboidratos do sistema sanguíneo ABO.....	14
Figura 2: Síntese do Fator de von Willebrand.....	17
Figura 3: Esquema da estrutura do FVW, mostrando os carboidratos N e O ligados como círculos escuros e claros, respectivamente.....	18
Figura 4: Esquema didático do princípio da técnica de ELISA de captura sanduíche.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência fenotípica do Sistema de Grupo ABO (percentual) em diversas populações.....	15
Tabela 2: Relação entre os fenótipos ABO e os níveis plasmáticos de FVW:Ag (%) em estudo realizado com 249 indivíduos.....	21
Tabela 3: Influência do FVW:Ag, FVW:pp e sua razão nas atividades FVW:CB e FVW:RCo.....	36
Tabela 4: Influências do FVW:Ag, FVWpp e sua razão sobre FVIII:C.....	36
Tabela 5: Fator de von Willebrand e fator VIII em indivíduos dos sexos masculino e feminino.....	37
Tabela 6: Resultado das determinações de FVW:Ag, FVWpp, FVW:RCo, FVW:CB e FVIII em indivíduos acima e abaixo de 38 anos.....	37

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	9
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Sistema sanguíneo ABO	13
1.2 Fator de von Willebrand.....	15
1.2.1 Pró- peptídeo do Fator de von Willebrand	17
1.3 Fator FVIII da coagulação	18
1.4 Relação entre o sistema ABO e as proteínas FVW, FVWpp e FVIII.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Casuística	22
3.1.1 Tamanho da amostra	22
3.1.2 População estudada.....	22
3.1.3 Aspectos éticos	22
3.2 Coleta das amostras	23
3.3 Procedimentos laboratoriais.....	23
3.3.1 Determinação dos antígenos FVW:Ag e FVWpp	23
3.3.2 Determinação da atividade do Fator de von Willebrand	24
3.3.3 Determinação da atividade do FVIII	25
3.4 Análise dos resultados	25
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Características gerais da amostra.....	27
4.2 Determinação das proteínas FVW:Ag e FVWpp.....	28
4.3 Determinação da atividade do FVW	31
4.4 Determinação do FVIII	33
4.5 Regressão multivariada	Error! Bookmark not defined.
4.6 Análise das variáveis em relação ao sexo e idade	36
5 DISCUSSÃO	38
1 CONCLUSÕES.....	46

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	55
ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico cujo objetivo é manter o sangue em estado fluido sob condições normais e reagir a uma lesão vascular evitando sangramentos. Vários fatores estão envolvidos nesse processo, entre eles plaquetas e proteínas que se ativam para a formação de um tampão homeostático impedindo o sangramento em um evento de lesão vascular¹.

A hemostasia se divide basicamente em dois processos que ocorrem simultaneamente e de forma interligada. A hemostasia primária refere-se à agregação de plaquetas que são ativadas e se aderem entre si e ao local da lesão. A hemostasia secundária refere-se à deposição de fibrina, uma proteína fibrosa que sofre polimerização sobre as plaquetas formando uma malha que fortalece e estabiliza o coágulo sanguíneo¹.

O Fator de von Willebrand (FVW) é uma proteína fundamental para esse processo, uma vez que atua como ponte entre plaquetas e o tecido endotelial, além de transportar e proteger o Fator VIII da coagulação², proteína essencial no processo de geração de trombina. O FVW é produzido por células endoteliais e megacariócitos na forma de pré-pró-FVW, uma proteína precursora do FVW que contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo e uma subunidade madura. Durante o processo de síntese, ocorre a clivagem do pró-peptídeo e são liberadas duas moléculas, o pró-peptídeo (FVWpp ou FVW:AgII) e o FVW maduro (FVW:Ag)³.

O FVW é um marcador de disfunção endotelial clássico, apresentando significância clínica no diagnóstico e acompanhamento de doenças vasculares⁴. Seus níveis plasmáticos podem, no entanto, sofrer influência de algumas variáveis, como idade, sexo, gravidez, raça⁵ e o grupo sanguíneo ABO⁶. Recentemente, estudos vêm propondo outros marcadores para a avaliação de disfunções endoteliais³, entre eles o FVWpp que poderia ser útil em várias condições clínicas associadas a potenciais episódios trombóticos.

1.1 Sistema sanguíneo ABO

Os antígenos do sistema ABO são moléculas de carboidratos associadas a lipídios, proteínas e a superfície de diversas células, como hemácias e as que revestem o trato gastrointestinal, respiratório e reprodutivo⁴.

Esses antígenos são resíduos de açúcares que são adicionados a superfície das células por glicosiltransferases específicas codificadas no *locus* ABO. Essas glicosiltransferases adicionam esses açúcares sobre uma estrutura precursora, o antígeno H, que é sintetizado a partir da enzima α -2-L-fucosiltransferase e é geneticamente independente do gene ABO⁷.

O sistema ABO apresenta 4 fenótipos principais: A, B, AB e O. Os antígenos A e B são sintetizados a partir das glicosiltransferases A (1,3-N-acetilgalactosaminil transferase) e B (α -1,3-galactosil-transferase), que adicionam sobre o antígeno H, respectivamente, um açúcar N-acetil galactosamina ou uma galactose. Indivíduos do grupo AB apresentam ambas estruturas, enquanto o genótipo O não produz uma transferase ativa, ou seja, indivíduos desse grupo apresentam apenas o antígeno H da estrutura precursora⁴.

Figura 1 - Estrutura dos carboidratos do sistema sanguíneo ABO.

Fonte: Modificada de BÖHMIG et al, 2015.

Os antígenos ABO estão presentes desde o nascimento, embora o recém-nascido não produza anticorpos ABO até por volta dos 3 meses de idade. O número de cópias desses antígenos difere entre indivíduos e é determinado pela atividade das glicosiltransferases A e B que varia nos diversos subgrupos do sistema ABO.

A frequência dos antígenos ABO varia em diferentes populações, conforme quadro abaixo que apresenta dados de estudos conduzidos na população brasileira⁸, chinesa⁹, indiana¹⁰, etíope¹¹ e italiana¹² e mostra que o fenótipo O apresenta-se quase sempre como o mais presente e AB como o fenótipo mais raro, com alguma variação na frequência de indivíduos dos tipos A e B.

Tabela 1 -Frequência fenotípica do Sistema de Grupo ABO (percentual) em diferentes populações.

Fenótipo	Frequência Fenotípica %				
	Brasileiros N=2372	Chineses N=3832034	Indianos N=9686	Etíopes N=209	Italianos N=4901
O	50,67	30,4	37,12	44,49	43,31
A	32,17	30,53	22,88	26,32	41,4
B	13,45	29,47	32,26	26,32	44,23
AB	3,71	9,7	7,74	2,87	4,16
Total	100	100	100	100	100

Fonte: BAIOSCHI et. Al., 2007; LIU et. al., 2017; AGRAWAL et al., 2014; ATIRE, 2015 e CARPEGIANI et al., 2010.

Além de sua importância na medicina transfusional, o sistema sanguíneo ABO influencia de maneira significativa o processo de hemostasia, conforme descrito por Preston e Barr¹³ em 1964 e confirmado por estudos subsequentes. Essa influência é refletida nos níveis plasmáticos de duas glicoproteínas da coagulação, o FVW e o Fator VIII da coagulação¹⁴. Embora esse mecanismo não esteja bem estabelecido, estudos sugerem que modificações estruturais em uma proteína, como a adição de carboidratos do sistema sanguíneo ABO, poderiam influenciar em seu catabolismo e consequentemente em sua meia-vida¹⁵.

1.2 Fator de von Willebrand

O FVW é uma glicoproteína produzida por células endoteliais e plaquetas cuja função é mediar a adesão e agregação plaquetária em eventos de lesão vascular, além de ser a proteína carreadora do FVIII. Uma vez sintetizado, parte do FVW é secretado constitutivamente e parte é armazenado no corpúsculo de Weibel Palade e nos grânulos alfa das plaquetas, de onde é liberado em resposta a uma série de estímulos homeostáticos e inflamatórios, incluindo mas não limitado a adrenalina, difosfato de adenosina, histamina, trombina e a desmopressina análoga de vasopressina (DDAVP)¹⁶.

O gene que codifica o FVW está localizado no braço curto do cromossomo 12, apresenta 178 kb e contém 52 éxons. Para sua síntese (Figura 2) o mRNA codifica um precursor conhecido como pré-pró-FVW, que contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo conhecido como FVWpp e uma subunidade madura. Inicialmente ocorre a remoção do peptídeo sinal e são formados dímeros no retículo endoplasmático por meio de pontes dissulfeto entre as subunidades. O então pró-dímero segue para o complexo de Golgi onde os dímeros são agrupados por ligações dissulfeto e modificados por glicosilação, formando os multímeros¹⁷.

Figura 2 - Síntese do Fator de von Willebrand.

Fonte: Modificado de HABERICHTER, 2015.

No plasma o FVW forma um complexo com o Fator VIII, protegendo-o contra degradação proteolítica pela proteína C ativada, enquanto o FVWpp circula livre, já tendo se dissociado do FVW ainda no retículo endoplasmático por ação da furina. Tanto o FVW quanto o FVWpp são secretados em quantidades equimolares, porém apresentam meia-vida diferentes. Enquanto a meia-vida do FVWpp é de aproximadamente 2 horas, a meia-vida do FVW varia entre 8 e 12 horas¹⁸.

Os multímeros do FVW apresentam tamanhos variados, sendo possivelmente a maior proteína solúvel. Sua subunidade principal apresenta sítios de ligação para colágeno, heparina, fator VIII e glicoproteínas GPIb e GPIIb/IIIa, presentes nas plaquetas (Figura 3). Os multímeros de alto peso molecular armazenados e liberados dos corpúsculos de Weibel-Palade são a forma mais ativa do FVW e apresentam um papel crucial na adesão plaquetária. Para manter o equilíbrio homeostático, uma

metaloprotease denominada ADAMTS-13 (uma desintegrina e metaloproteinase com um motivo Thrombospondina tipo 13) cliva o FVW multimérico em fragmentos menores, controlando seu potencial trombótico e participando indiretamente da sua depuração⁶.

Figura 3 - Estrutura do FVW, esquematizada, mostrando os carboidratos N e O ligados como círculos escuros e claros, respectivamente.

Fonte: Gogia, S., & Neelamegham, S. (2015) - GPIIb: glicoproteína Ib, subunidade alfa. GPIIb/IIIa glicoproteína IIb-IIIa. A/C/D representam os domínios do Fator de von Willebrand.

1.2.1 Pró- peptídeo do Fator de von Willebrand

Conforme mostrado na figura 2, o FVW é sintetizado como pré-pró-FVW, uma proteína precursora do FVW que contém um peptídeo sinal, um pró-peptídeo e uma subunidade madura. Embora a função do FVWpp não esteja bem definida, é sabido que ele é necessário para a multimerização e armazenamento da proteína madura, uma vez que já foi demonstrado que o FVW expresso na ausência do pró-peptídeo não é armazenado nos corpúsculos de Weibel-Palade¹⁹.

Recentemente, o FVWpp plasmático tem sido proposto como uma alternativa para a avaliação de disfunções vasculares de células endoteliais, uma vez que ele oferece vantagens distintas em relação ao FVW:Ag. Ao contrário do FVW, o FVWpp não se liga ao tecido conjuntivo subendotelial ou às plaquetas e encontra-se em concentrações reduzidas no plasma, devido a sua meia-vida curta. Como resultado, seus níveis refletem mais precisamente a secreção endotelial e a relação entre FVWpp e FVW:Ag pode,

portanto, ser usada para avaliar as taxas de síntese, secreção e depuração do FVW em condições fisiológicas e/ou patológicas²⁰.

Diversos estudos vem demonstrando a importância do FVW como um biomarcador relevante no acompanhamento de doenças vasculares, tanto na antecipação de um possível evento clínico como no prognóstico e mortalidade dessas doenças. Dessa maneira o FVWpp poderia ser mais um aliado no monitoramento de fenômenos trombóticos por meio de testes em série na tentativa de prever um evento vascular agudo³.

1.3 Fator FVIII da coagulação

O fator VIII de coagulação sanguínea é uma glicoproteína essencial para a hemostasia secundária. Em um evento de lesão vascular, o FVIII sofre a ativação proteolítica pela trombina ou pelo fator Xa e se liga a superfície de plaquetas ativadas, onde serve como cofator para o fator de serina protease IXa, permitindo a conversão de Fator X em sua forma ativa²¹.

O gene do fator VIII está localizado no cromossomo X e apresenta 180 Kb sendo um dos maiores genes conhecidos. Esse gene sintetiza uma proteína que contém um peptídeo sinal e uma proteína madura de 2.332 aminoácidos²².

Vários tecidos têm o potencial de expressar o gene do fator VIII, incluindo baço, linfonodos, fígado e rim. Durante sua síntese, seu precursor é translocado para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi onde sofre glicosilação e proteólise levando a alteração de sua estrutura inicial em um heterodímero de duas cadeias, pesada (A1-a1-A2-a2-B) e leve (a3-A3-C1-C2) que permanecem associadas de forma não covalente através do domínio A1 e A3²¹.

Imediatamente após sua liberação, o heterodímero do fator VIII se liga a sua proteína transportadora, o FVW, para formar um complexo não covalente. Cada monômero de FVW é capaz de ligar uma molécula de fator VIII com alta afinidade e essa ligação evita a ligação prematura do fator VIII aos componentes do complexo de ativação do fator X e

o torna menos suscetível a degradação proteolítica por várias proteases, entre elas a proteína C ativada. Essa ligação entre as duas proteínas, no entanto, não protege o fator VIII contra a clivagem pela trombina, que resulta na perda da ligação com o FVW e na conversão do fator VIII em sua forma ativa²².

1.4 Relação entre o sistema ABO e as proteínas FVW, FVWpp e FVIII

Há muito se discute a associação entre o grupo sanguíneo ABO e coagulação sanguínea, refletida especificamente nos níveis plasmáticos de duas glicoproteínas, o FVW e o FVIII. Durante a translocação dos monômeros do FVW pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi, sua estrutura é modificada pela adição de carboidratos. Cada monômero do FVW contém 12 sítios de N-glicosilação e 10 sítios de O-glicosilação, parte dos quais é modificado por determinantes ABO que ocupam até 13% das cadeias N-ligadas e uma parte menor das cadeias O-ligadas no FVW.

Foi demonstrado que indivíduos do grupo O apresentam uma redução significativa nos níveis plasmáticos de FVW em comparação a indivíduos não-O (A, B e AB), sendo que 66% dessas variações são decorrentes de mutações e 30% estão associadas ao efeito do grupo sanguíneo²³. Consequentemente, os níveis plasmáticos do FVIII da coagulação seriam também afetados pelo sistema ABO, uma vez que essa proteína é transportada e protegida da depuração pelo FVW⁶.

Os valores laboratoriais normais para o FVW:Ag encontram-se entre 50–150 UI.dL⁻¹ e sua referência normal é fixada em 100 UI.dL⁻¹ (Tabela 2)²⁴. No entanto, vários autores apontam que indivíduos do grupo sanguíneo O apresentam uma concentração de FVW:Ag até 25% mais baixa quando comparados aos outros grupos sanguíneos^{23; 25; 26}, enquanto os indivíduos do grupo AB apresentam os maiores níveis de FVW entre todos os tipos sanguíneos, seguidos dos indivíduos do grupo A e B – tabela 3. Essas variações podem dificultar o diagnóstico de algumas condições, como a doença de von Willebrand tipo I, na qual o paciente apresenta alterações quantitativas nos níveis

plasmáticos de FVW, uma vez que em condições normais, os níveis de FVW:Ag em indivíduos do grupo O podem estar abaixo de 50 UI.dL⁻¹.

Tabela 2 – Relação entre os fenótipos ABO e os níveis plasmáticos de FVW:Ag (%) em estudo realizado com 249 indivíduos.

Tipo Sanguíneo N=249	Grupo O N=83	Grupo A N=81	Grupo B N=69	Grupo AB N=16
FVW:Ag(%)	88,1	110,2	109,1	113,9

Fonte: Wang et al., 2017.

A habilidade de sintetizar e adicionar carboidratos aos diferentes tecidos é determinada geneticamente e varia entre indivíduos. Essa variação é refletida no número de cópias de antígenos ABH que varia entre os indivíduos dos tipos A, B, AB e O²⁷. O'Donnell²⁴ demonstrou que existe uma correlação positiva entre a expressão da transferase A, o número de cópias do antígeno A presentes no FVW e sua concentração plasmática. Assim, foi proposto que a presença dos carboidratos ABH influenciaria a depuração do FVW e consequentemente seus níveis plasmáticos.

Diferente do FVW, o pró-peptídeo FVWpp parece não sofrer influência do sistema ABO, o que faria dele um importante marcador de lesão endotelial por ser menos influenciável que o FVW isolado²³. Apesar disso, sua quantificação ainda é limitada a laboratórios de pesquisa e/ou centros de hemostasia especializados.

Diante desse cenário, o presente estudo foi conduzido para investigar a relação entre o grupo sanguíneo ABO e os níveis de FVW e seu pró-peptídeo numa população brasileira com o objetivo de fornecer dados sobre o comportamento dessas proteínas em nossa população.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar a associação do grupo sanguíneo ABO sobre o FVW antígeno, atividade e pró-peptídeo em uma população de indivíduos saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a associação do sistema sanguíneo ABO sobre as variáveis FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB, FVWpp e FVIII:C em indivíduos saudáveis dos fenótipos A, B, AB e O.
- Verificar a relação entre as variáveis estudadas nos grupos sanguíneos ABO (A, B, AB e O).
- Verificar a relação entre as variáveis estudadas por sexo e faixas etárias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em uma das variáveis a serem estudadas (FVW:Ag), variável essa conhecida em nosso laboratório. Nesse sentido foram arbitradas as seguintes condições:

- Probabilidade de erro de primeira espécie (alfa): 0,05
- Poder do teste: 80%
- Característica do teste: bicaudal
- Grau de liberdade: infinito

Arbitradas as condições acima, foi definido que os indivíduos do estudo seriam divididos em quatro grupos, de acordo com seu tipo sanguíneo (A, B, AB ou O), cada grupo contendo no mínimo 42 indivíduos.

3.1.2 População estudada

O presente estudo foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram analisadas de plasma de 430 indivíduos, doadores de sangue na Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo. Essas amostras foram separados e analisados de acordo com o grupo sanguíneo ABO, sexo e idade.

3.1.3 Aspectos éticos

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP) sob o número 1.754.118 – anexo A, página 73.

3.2 Coleta das amostras

Foram coletados de cada indivíduo aproximadamente 10ml de sangue venoso periférico, em citrato de sódio 3,2%, 1/10 v/v. A coleta foi realizada durante procedimentos de rotina do banco de sangue, sem desconforto adicional ao doador.

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

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Determinação dos antígenos FVW:Ag e FVWpp

As determinações das concentrações de FVW:Ag e FVWpp foram realizadas por ELISA. O FVWpp foi determinado por ELISA *in house*, utilizando um par de anticorpos (CLB-Pro 35 e CLB-Pro 14.3) adquiridos da Cell Science (Cantom, EUA). O FVW:Ag foi determinado utilizando um *kit* comercial (Stago: Asserachrom VWF:Ag®), de acordo com as especificações do fabricante.

O princípio do ensaio de ELISA, representado na figura 4, envolve a aplicação das amostras de plasma sobre uma placa sensibilizada com anticorpos anti-FVW humano (policlonal para o FVW:Ag e monoclonal para o FVWpp). O FVW presente na amostra de plasma se liga aos anticorpos anti-FVW fixados a placa, formando um complexo. Em seguida, são adicionados anticorpos policlonais anti-FVW humano conjugados a peroxidase que se ligam aos antígenos imobilizados. Adiciona-se o substrato da peroxidase, solução de tetrametilbenzidina (TMB). A reação enzimática é interrompida acrescentando-se H₂SO₄ e a absorbância é obtida em leitor de ELISA em comprimento de onda 450nm, sabendo-se que a intensidade da coloração obtida é diretamente proporcional a concentração de FVW presente no meio. Utiliza-se uma curva de calibração com concentrações crescentes e conhecidas das proteínas analisadas que

variam de 6,25 a 100UI.dL⁻¹. Os resultados são apresentados em UI.dL¹. Valores de referência: 50 a 160 UI/dL (FVW:Ag)²⁸ e 60 a 140% (FVWpp)²⁹

Figura 4 - Esquema didático do princípio da técnica de ELISA de captura “sanduíche”.

Domínio público. TMB: tetrametilbenzidina.

O controle inter e intra ensaio dos experimentos foi realizado utilizando um controle comercial fornecido pela Diagnostica Stago® e um *pool* preparado a partir do plasma coletado de 40 indivíduos, 20 homens e 20 mulheres, durante rotina do Banco de Sangue, sem desconforto adicional ao doador.

3.3.2 Determinação da atividade do Fator de von Willebrand

A determinação da atividade biológica do FVW foi realizada por dois métodos, ligação ao colágeno (FVW:CB), que avalia a ligação do FVW ao colágeno através do seu domínio A3, e cofator de ristocetina (FVW:RCo) que avalia a interação do FVW através do domínio A1 com partículas de látex revestidas por um fragmento recombinante do

receptor plaquetário GPIIb, na presença do antibiótico ristocetina. O primeiro foi realizado por ELISA, utilizando um kit comercial (Asserachrom® VWF:CB) de acordo com as especificações do fabricante e o segundo foi realizado por meio de método automatizado utilizando o equipamento Instrumental Laboratory ACL Top 300®.

Valores de referência: 60 a 160% (FVW:CB)³⁰ e 60 a 240% (FVW:RCO)³¹

3.3.3 Determinação da atividade do FVIII

A atividade do FVIII foi determinada por kit comercial HemosIL™ utilizando o equipamento Instrumental Laboratory ACL Top 300®. A atividade é determinada por um teste de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) modificado, no qual o plasma teste é diluído e adicionado ao plasma deficitário em fator VIII. A correção do tempo de coagulação prolongado do plasma deficitário é proporcional à atividade do fator no plasma da amostra testada, obtida a partir de uma curva de calibração.

Valores de referência: 50 a 150%³²

3.4 Análise dos resultados

A avaliação estatística desse estudo foi realizada com base em uma análise inicial exploratória. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS® para Windows.

As variáveis analisadas foram testadas com relação à sua aderência à distribuição normal pelo método Kolmogorov-Smirnov. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP.

Os testes t-Student e Mann-Whitney foram utilizados para comparar as variáveis quantitativas entre os grupos (O e não O) e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as variáveis entre os grupos A, B, AB e O. A correlação de Spearman e / ou

Pearson foi utilizada para a análise entre variáveis e a regressão linear multivariada foi utilizada para estabelecer a relação entre variáveis em diferentes grupos.

Para a análise das variáveis estudadas em relação à idade os indivíduos foram divididos em dois grupos, considerando a mediana das idades de 38 anos.

As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Este estudo é do tipo transversal. Foram incluídos 430 indivíduos, doadores de sangue no Banco de Sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. As análises realizadas nesse estudo estão detalhadas no fluxograma a seguir (**Figura 5**) e os dados de todos os indivíduos participantes, assim como os valores individuais e as medidas de tendência central estão apresentados no Apêndice, páginas 56 a 66.

Figura 5—Fluxograma com as análises realizadas para o estudo.

FVW:Ag, FVWpp, FVW:CB e FVW:RCo: Fator de von Willebrand antígeno, pró-peptídeo, ligação ao colágeno e cofator de ristocetina, respectivamente. FVIII:C: atividade do Fator FVIII.

4.1 Características gerais da amostra

Foram analisadas amostras de 430 indivíduos, sendo 184 (42,7%) do sexo feminino e 246 (57,2%) do sexo masculino, com idade mediana de 38 anos, variando entre 17 e 69 anos. Esses indivíduos foram inicialmente divididos de acordo com o grupo sanguíneo ABO em grupo “O” e “Não O”. O grupo “O” contou com 176 indivíduos (40,2%), sendo 75 do sexo feminino (42,6%) e 101 do sexo masculino (57,4%), com idade mediana de 36 anos, variando entre 18 e 69. O grupo “Não O” contou com 254 indivíduos (59,8%), sendo 109 do sexo feminino (42,9%) e 145 do sexo masculino (57,1%), com idade

mediana de 39 anos, variando entre 18 e 69 anos. Doze indivíduos foram removidos do estudo por não apresentarem resultado da tipagem sanguínea. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes em relação a sexo e idade entre os grupos O e Não O.

Uma vez analisados os grupos “O” e “Não O”, esse último foi dividido em três subgrupos para que os indivíduos fossem analisados de acordo com o seu tipo sanguíneo. Os detalhes de cada grupo estão apresentados na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6: Divisão dos indivíduos de acordo com sexo e tipo sanguíneo ABO.

Para análise das variáveis estudadas em relação a idade os indivíduos foram divididos em dois grupos utilizando a mediana das idades (38 anos) como ponto de corte.

4.2 Determinação das proteínas FVW:Ag e FVWpp

A concentração plasmática do FVW:Ag apresentou uma diminuição significativa nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($89,01 \pm 15,01$ vs $96,70 \pm 15,20$ UI/dL; $p < 0,001$), respectivamente. A estratificação do grupo “Não O” em grupos A, B e AB permitiu que fosse verificada uma variação significativa na concentração de FVW:Ag entre os quatro grupos (O, A, B e AB; $p < 0,001$), sendo essa diferença significativa quando comparados os grupos O vs A e O vs B ($p < 0,05$) -Figura 7.

Figura 7 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos de FVW:Ag entre indivíduos “O” e “Não O” (A) e por tipo sanguíneo (B).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis.

Em relação ao FVWpp, não foi observada diferença de concentração significativa entre os grupo “O” e “Não O” ($103,83 \pm 36,18$ vs $107,74 \pm 40,15\%$; $p=0,609$), ou entre os quatro grupos ($p=0,118$) – Figura 8.

Figura 8 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos de FVWpp entre indivíduos “O” e “NãoO” (C) e por tipo sanguíneo (D).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis.

A razão entre as proteínas FVWpp/FVW:Ag não apresentou diferenças significantes entre os grupos “O” e “Não O” ($p=0,588$) ou quando analisada entre os quatro grupos sanguíneos ($p=0,330$) – Figura 9.

Figura 9 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da razão FVWpp/FVW:Ag em indivíduos “O” e “Não O” (E) e por tipo sanguíneo ABO (F).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis.

Na análise da correlação do pró-peptídeo FVWpp em função da concentração antigênica do FVW foi observada uma correlação significativa e positiva nos grupos “O” ($p=0,03$ e $r=0,30$) e “Não O” ($p=0,01$ e $r=0,22$); Figura 10.

Figura 10 - Análise individual do FVWpp (%) em função da concentração antigênica de FVW:Ag (UI/dL) em indivíduos “O” (S) e “Não O” (T).

Teste Spearman

4.3 Determinação da atividade do FVW

A atividade do Fator de von Willebrand por Ristocetina (FVW:RCo) apresentou uma diminuição significativa nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($84,54 \pm 19,51$ vs $107,06 \pm 27,45\%$; $p < 0,001$), respectivamente. Na estratificação do grupo “Não O” em grupos A, B e AB foi observada uma variação significativa na determinação de FVW:RCo entre os quatro grupos (O, A, B e AB; $p < 0,001$), sendo essa diferença significativa entre os grupos O vs A, O vs B e O vs AB ($p < 0,05$) – Figura 11.

Figura 11 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da determinação de FVW:RCo nos indivíduos “O” e “Não O” (G) e por tipo sanguíneo (H).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis.

Da mesma maneira, foi observada uma diminuição da atividade por ligação ao colágeno (FVW:CB) nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($92,94 \pm 27,07$ vs $106,66 \pm 27,07\%$; $p < 0,001$), respectivamente. Uma vez estratificado o grupo “Não O” em grupos A, B e AB, foi verificada uma variação significativa de FVW:CB entre os quatro grupos (O, A, B e AB; $p < 0,001$), especificamente entre os grupos O vs A, O vs B, O vs AB ($p < 0,05$) - Figura 12.

Figura 12 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da determinação de FVW:CB nos indivíduos “O” e “Não O” (I) e por tipo sanguíneo (J).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis.

4.4 Determinação do FVIII

A atividade do FVIII apresentou uma diminuição significativa nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O” ($92,45 \pm 27,01$ vs $112,57 \pm 27,91\%$; $p < 0,001$), respectivamente. Na estratificação do grupo “Não O” em grupos A, B e AB foi observada uma variação significativa na determinação de FVIII:C entre os quatro grupos (O, A, B e AB; $p = 0,001$), sendo essa diferença significativa entre O vs A e O vs B ($p < 0,05$). Figura 13.

Figura 13 - Representação da mediana, dos percentis 25% e 75% e dos valores extremos da determinação de FVIII:C nos indivíduos dos grupos “O” e “Não O” (K) e por tipo sanguíneo (L).

Testes Mann Whitney e ANOVA Kruskal-Wallis. $p < 0,05$.

4.5 Análise de regressão

A análise de regressão multivariada mostrou uma associação significativa entre a variável FVW:Ag e os níveis de FVW:CB em indivíduos do grupo O ($R^2=0,124$; $p=0,012$). A adição do FVWpp não altera essa relação. Não foi observada relação significativa entre FVW:Ag e FVWpp e a atividade FVW:CB em indivíduos não O – tabela 4.

Em relação a FVW:RCo foi observada uma associação significativa entre os níveis de FVW:Ag e essa variável em indivíduos do grupo Não O ($R^2=0,127$; $p=0,004$). A adição do FVWpp à análise altera discretamente a associação mencionada acima. Não foi observada relação significativa do FVW:Ag e FVWpp sobre FVW:RCo em indivíduos do tipo O – tabela 4.

Tabela 3: Influência do FVW:Ag, FVW:pp e sua razão nas atividades FVW:CB e FVW:RCo.

Variável dependente (FVW:CB)	Tipo O		Tipo Não O	
	R²	p	R²	p
FVW:Ag	0,124	0,012	0,030	0,570
FVW:Ag; FVWpp	0,129	0,039	0,100	0,547
Variável dependente (FVW:RCo)	R²	p	R²	p
FVW:Ag	0,194	0,070	0,127	0,004
FVW:Ag; FVWpp	0,313	0,060	0,187	0,002

Abreviação: FVW:Ag (antígeno de fator de von Willebrand), FVWpp (propeptídeo de fator de von Willebrand),

A análise de regressão multivariada mostrou que o FVW:Ag influencia significativamente os níveis de FVIII:C em indivíduos do tipo O ($R^2 = 0,331$; $p < 0,001$). A adição do FVWpp à análise não altera essa relação. Não foi observada relação significativa entre FVW:Ag e FVWpp e FVIII:C em indivíduos não O.

Tabela 4: Influências do FVW:Ag, FVWpp e sua razão sobre FVIII:C.

Variável dependente (FVIII:C)	Tipo O		Tipo Não O	
	R²	p	R²	p
FVW:Ag	0,331	<0,001	0,015	0,346
FVW:Ag; FVWpp	0,360	0,001	0,037	0,320

Abreviação: FVW:Ag (antígeno de fator de von Willebrand), FVWpp (propeptídeo de fator de von Willebrand).

4.6 Análise das variáveis em relação a sexo e idade

As variáveis FVW:Ag, FVWpp, FVW:RCo, FVW:CB e FVIII:C não variaram de maneira significativa entre indivíduos dos sexos masculino e feminino; tabela 4. Os dados de todos os indivíduos, valores individuais e medidas de tendência central estão apresentados no Apêndice, páginas 56 a 66.

Tabela 5: Fator de von Willebrand e fator VIII em indivíduos dos sexos masculino e feminino.

Variável	Masculino média±DP	Feminino média±DP	<i>p</i>
FVW:Ag (UI/dL)	92±15	95±16	0,117
FVWpp (UI/dL)	108±38	104±39	0,424
FVW:CB (%)	101±28	101±27	0,708
FVW:RCo (%)	94±25	100±27	0,117
FVIII:C (%)	102±29	106±30	0,438

Abreviação: FVW:Ag (antígeno de fator de von Willebrand), FVWpp (propeptídeo de fator de von Willebrand), FVWpp/FVW:Ag (razão entre propeptídeo e antígeno de fator de von Willebrand), FVW:CB (atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno), FVW:RCo (atividade de fator de von Willebrand por Ristocetina), FVIII:C (atividade de Fator VIII)

Em relação à idade, foi observado um aumento significativo nas determinações de FVW:Ag, FVW:RCo e FVIII:C em indivíduos acima de 38 anos de idade - tabela 5. Já as variáveis FVWpp e FVW:CB não apresentaram diferenças significantes entre indivíduos acima e abaixo de 38 anos de idade.

Tabela 6: Resultado das determinações de FVW:Ag, FVWpp, FVW:RCo, FVW:CB e FVIII em indivíduos acima e abaixo de 38 anos.

Variáveis	Até 38 anos média±DP	Acima de 38 anos média±DP	<i>p</i>
FVW:Ag (UI/dL)	89±15	96±16	0,001
FVWpp (%)	111±75	116±68	0,375
FVW:CB (%)	99±29	105±31	0,100
FVW:RCo (%)	93±33	104±36	0,004
FVIII:C (%)	101±32	117±41	0<,0001

Abreviação: FVW:Ag (antígeno de fator de von Willebrand), FVWpp (propeptídeo de fator de von Willebrand), VWF:CB (atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno), FVW:RCo (atividade de fator de von Willebrand por Ristocetina), FVIII:C (atividade de Fator VIII).

5 DISCUSSÃO

Existem algumas evidências que o tipo sanguíneo ABO possa desempenhar um papel no risco de desenvolvimento de algumas doenças, incluindo doenças cardiovasculares⁴. Segundo Dentali e colaboradores, indivíduos “Não O” são mais presentes entre pacientes que apresentam tromboembolismo venoso³³ e trombose arterial³⁴. Em relação a eventos de sangramento, embora alguns estudos tenham demonstrado uma maior prevalência de indivíduos O entre pacientes que apresentaram sangramento gastrointestinal, os resultados são conflitantes^{35; 36}.

O mecanismo responsável por essa associação está relacionado a influência que o sistema sanguíneo ABO exerce na hemostasia, particularmente nos níveis de FVW e FVIII, que são ambos reconhecidos fatores de risco pró-trombóticos³⁷ e podem estar associados ao desenvolvimento de doenças coronarianas, acidentes vasculares e tromboembolismo venoso³⁸.

Nossos resultados mostram um aumento na concentração antigênica de FVW:Ag, FVW:RCo, FVW:CB e FVIII:C nos indivíduos do grupo “Não O” em relação aos indivíduos do grupo “O”. Já o FVWpp não variou entre os grupos “O” e “Não O”, resultados compatíveis com os encontrados na literatura^{6; 26; 39}.

O mecanismo de influência do ABO sobre o FVW ainda não é totalmente esclarecido e existem algumas hipóteses para justificar essa influência. Os monômero do FVW contém sítios de N e O-glicosilação que desempenham um papel na depuração dessa proteína⁴⁰. Carboidratos ABO ocupam até 13% desses sítios de N-glicosilação e modificam pelo menos três sítios de O-glicosilação⁴¹.

Foi demonstrado que os oligossacarídeos presentes na molécula do FVW são relevantes para o processo de *clearance* dessa proteína, uma vez que alterações no padrão de glicosilação do FVW em camundongos em decorrência da expressão alterada do gene da N-acetilgalactosaminil transferase resultaram em uma redução nos níveis de FVW, provavelmente, devido a um aumento em seu catabolismo⁴².

Essa hipótese foi novamente apresentada em estudos mais recentes de O'Donnell e colaboradores²⁴ que correlacionaram a presença de antígenos H com um aumento da depuração do FVW e sugeriram que esse processo seria mediado por receptores hepáticos específicos para glicoproteínas que apresentam fucose. Assim, indivíduos "O" apresentariam um aumento na depuração do FVW.

Outro possível mecanismo de influência do ABO sobre o FVW estaria relacionado a ação da ADAMTS-13, que cliva o FVW no domínio A2 e regula sua composição multimérica. A incubação *in vitro* de multímeros de alto peso de FVW com essa metaloprotease resulta na degradação do FVW em multímeros de baixo peso molecular⁴³. Bowen⁴⁴ demonstrou que os níveis de FVW são maiores em indivíduos "Não O". Em contrapartida, a susceptibilidade do FVW a ADAMTS-13 é menor nesses indivíduos, o que teria um impacto direto na quebra dos multímero e consequentemente na depuração do FVW.

Uma vez que o sítio de ligação da ADAMTS-13 ao FVW é flanqueado por sítios de glicosilação, surgiu a hipótese que a presença de carboidratos ABO influenciaria a proteólise do FVW pela ADAMTS-13. McGrath e colaboradores⁴⁵ demonstraram que a remoção das cadeias de glicanos N ligadas do FVW plasmático aumenta a proteólise dessa proteína pela ADAMTS13.

Além de analisar as diferenças no antígeno FVW e na atividade entre os grupos sanguíneos O e não O, também investigamos a influência desse tipo sanguíneo entre os quatro fenótipos ABO (A, B, AB, O) e encontramos uma diferença significativa nas concentrações de FVW:Ag, entre o tipo sanguíneo O e os demais tipos sanguíneos (A, B e AB), mas nenhuma diferença significativa foi observada entre esses três últimos grupos especificamente.

Atividade do FVW

A atividade do FVW pode ser avaliada por dois métodos distintos. O ensaio de cofator de ristocetina (FVW:RCo), que mede a aglutinação de plaquetas mediada por FVW na presença de ristocetina³¹ e o ensaio por ligação ao colágeno (FVW:CB), que

avalia a capacidade dos multímeros do FVW de se ligarem ao colágeno exposto no endotélio⁴⁶.

Nesse estudo avaliamos a atividade do FVW por ristocetina e ligação ao colágeno e observamos uma diminuição significativa em sua atividade em indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O”. Essa diminuição foi observada independente do método utilizado e é compatível com outros estudos que encontraram resultados semelhantes em outras populações^{47; 48}

É sabido que tanto a atividade por ristocetina quanto por ligação ao colágeno são afetadas pelo tamanho dos multímeros⁴⁹. Bowen⁴⁴ avaliou a atividade do FVW (FVW:CB) em indivíduos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O e observou uma correlação inversa entre os resultados obtidos para o FVW:CB e a proteólise pela ADAMTS-13, evidenciada pela perda de multímeros de alto peso que foi mais aparente em indivíduos “O” em relação aos indivíduos dos demais fenótipos. Dessa maneira, um dos mecanismos de influência do ABO sobre a atividade do FVW seria mediado pela susceptibilidade dos diferentes tipos sanguíneos (ABO) a ADAMTS-13.

Outro estudo conduzido por Jenkins²³ e colaboradores demonstrou que modificações estruturais no FVW, como a remoção dos antígenos ABH, poderiam influenciar na concentração plasmática do FVW:Ag e em sua função biológica. Sarode e colaboradores⁴⁹ observaram uma redução na atividade do FVW por ristocetina seguida da remoção enzimática dos antígenos A e B, mas diferente do nosso estudo, não observaram variação na atividade por ligação ao colágeno.

Em um estudo sobre a relação dos padrões de glicosilação do FVW com a sua susceptibilidade a ação da ADAMTS-13, Mc'grath e colaboradores⁴⁵ purificaram amostras de FVW humano de indivíduos dos tipos sanguíneos AB e O e as trataram com neuroaminidases, enzimas que clivam ligações glicosídicas. Os autores observaram que a proteólise por ADAMTS-13 do FVW não tratado, representada pela sua atividade por ligação ao colágeno é mais acelerada no FVW do O em relação ao AB e que essa diferença desaparece uma vez que as amostras são tratadas com neuroaminidases, demonstrando um caráter protetor dos carboidratos contra a ação da ADAMTS-13 e o seu reflexo na atividade da proteína.

Devido à variabilidade interlaboratorial do ensaio de FVW:RCo, estudos vem propondo o FVW:CB como uma opção a essa técnica⁵⁰. Em nosso estudo os níveis de FVW:Ag se correlacionaram de maneira significativa a atividade por ristocetina nos indivíduos “Não O”, resultado compatível com a literatura⁴⁷. Já no ensaio de atividade por ligação ao colágeno, essa correlação apenas foi observada no grupo “O”, diferente de outros autores que demonstraram tal correlação em ambos os grupos²⁶. A razão para esse comportamento entre os grupos O e não O ainda precisa ser investigada, mas o fato de os antígenos AB serem relevantes para a ligação do FVW às plaquetas, conforme demonstrado por Sarode e colaboradores³¹, pode explicar nossos resultados.

FVIII

Os níveis plasmáticos de FVIII sofrem influência de alguns fatores como idade¹⁵, diabetes mellitus, insulina plasmática elevada⁵¹, e o sistema sanguíneo ABO, cujo efeito sobre o FVIII, que tem seus níveis plasmáticos reduzidos em indivíduos “O”, já está bem estabelecido¹⁵. Nesse estudo observamos uma diminuição significativa na concentração de FVIII:C nos indivíduos do grupo “O” em relação ao grupo “Não O”, resultados que corroboram com dados da literatura^{15; 26}.

Os resultados da análise de regressão multivariada também mostraram que o VWF:Ag influencia significativamente os níveis de FVIII: C em indivíduos do tipo O. A adição de VWFpp e da razão VWFpp/ VWF:Ag à análise não altera a influência mencionada. Não foi observada influência significativa das variáveis VWF:Ag, VWFpp e da razão sobre os níveis de FVIII:C em indivíduos não O.

Apesar da influência do ABO sobre o FVIII já ser conhecida, a presença ou ausência de carboidratos ABH ligados a sua estrutura ainda é controversa^{39; 52}. Estudos concordam que a variação em sua concentração plasmática entre os fenótipos ABO está provavelmente ligada a variação na concentração do FVW:Ag³⁹. Dados obtidos através do estudo da farmacocinética do FVIII recombinante infundido em babuínos demonstraram que sua meia-vida é semelhante à do fator VIII derivado de plasma, sugerindo que possíveis estruturas ABH no FVIII circulante não influenciam em sua depuração plasmática, e que o efeito ABO no FVIII é mediado principalmente pelo FVW³⁹.

FVWpp

O FVWpp é secretado em conjunto com o FVW:Ag, em quantidades equimolares, mediante a ativação endotelial, podendo dessa maneira ser utilizado como um possível biomarcador³. Diferente do FVW:Ag, nesse estudo não observamos diferença significativa na concentração de FVWpp entre indivíduos “O” e “Não O”, resultados compatíveis com a literatura^{3; 19}. Enquanto níveis reduzidos do FVW:Ag em indivíduos O estão associados a um aumento do *clearance* dessa proteína, em indivíduos saudáveis, o FVWpp não varia entre os diferentes tipos sanguíneos, uma vez que não apresenta carboidratos ABO em sua estrutura³.

Embora sejam sintetizados a partir de um mesmo precursor, o FVW:Ag e o FVWpp são encontrados no plasma de forma independente e apesar de serem secretados em quantidades equimolares, apresentam uma meia vida distinta. Assim, a determinação paralela de FVW:Ag e FVWpp pode ser utilizada na diferenciação de lesão endotelial crônica e aguda. Em pacientes com lesão endotelial aguda, como a que ocorre em pacientes com púrpura trombocitopenica trombótica, sepse e síndrome hemolítico urêmica, tanto o FVW:Ag como o FVWpp se mostram elevados⁵³. Ao contrário, em casos de lesão crônica, como é o caso em pacientes com diabetes e doença arterial periférica (DAOP) o FVWpp se mostra apenas ligeiramente elevado, não acompanhando os níveis de FVW:Ag¹⁹.

A quantificação do FVWpp também pode ser útil na avaliação de lesão vascular droga induzida. Devido à sua curta meia-vida em relação ao FVW:Ag e ao fato dessa proteína não se ligar ao tecido endotelial ou a plaquetas quando secretada, seus níveis, quando elevados, refletem melhor a extensão do dano uma vez que essas células são ativadas²⁰.

O FVWpp também pode ser utilizado para avaliar a síntese, secreção e depuração do FVW. Uma redução nos níveis de FVWpp indica uma redução na síntese ou secreção do FVW enquanto um aumento na razão FVWpp/FVWAg indica que o FVW está sendo rapidamente eliminado do plasma, característica da Doença de von Willebrand do tipo 1C⁴⁴. Embora estudos demonstrem uma elevação na razão FVWpp/FVW:Ag em indivíduos do grupo “O”³ atribuída a um aumento no catabolismo do

FVW:Ag, nesse estudo não observamos diferença significativa na razão entre essas proteínas entre os grupos “O” e “Não O”.

Na análise da correlação do FVWpp em função da concentração antigênica do FVW:Ag foi observada uma correlação positiva em ambos os grupos, porém essa correlação se mostrou mais efetiva nos indivíduos “O”, possivelmente porque a meia-vida do FVWpp mais se assemelha a do FVW:Ag nesse grupo.

Influência de idade e sexo

Muitos estudos demonstram uma mudança na hemostasia com o avanço da idade, particularmente no que diz respeito a fatores da coagulação⁵⁴. É sabido que as concentrações plasmáticas de alguns desses fatores, como o fibrinogênio, fator V, fator VII e fator VIII aumentam paralelamente ao processo de envelhecimento, o que poderia explicar o aumento do risco de doenças cardiovasculares em idosos⁵⁴. Nossos resultados mostram um aumento nos níveis de FVW:Ag, FVW:RCo e FVIII:C em indivíduos acima de 38 anos de idade, resultados compatíveis com a literatura¹⁵.

Muitos estudos associam o aumento de concentração do fator VIII com mudanças no seu catabolismo relacionadas principalmente a uma redução na expressão de seus receptores de depuração⁵⁴. No entanto, um estudo mais recente de Albánéz e colaboradores⁵⁵ demonstrou que um aumento na expressão do gene do FVIII em camundongos idosos estaria relacionado ao aumento de concentração dessa proteína observado com a progressão da idade.

O efeito do envelhecimento nos níveis plasmáticos de FVW também já foi relatado. Recentemente, Coppola⁵⁶ e colaboradores relataram um aumento significativo nos níveis de FVW antígeno e atividade de cofator de ristocetina em um estudo com 74 centenários em comparação a 110 indivíduos controles mais jovens, embora o mecanismo responsável por essas alterações não esteja completamente esclarecido. De maneira similar ao que ocorre com o FVIII, Albánéz e colaboradores⁵⁵ demonstraram também um aumento na expressão do gene do FVW que explicaria o aumento de concentração dessa proteína em idosos.

Outro mecanismo que explicaria o aumento do FVW com a progressão da idade está relacionado a atividade da ADAMTS-13. Estudos demonstram que o aumento do FVW observado com a idade não é acompanhado pelo aumento da ADAMTS-13^{54; 57}.

Um estudo recente de Albanéz e colaboradores¹⁵ demonstrou que os efeitos da idade e do tipo sanguíneo ABO se somam para contribuir com o aumento do FVW. Foi demonstrado que entre os grupos de indivíduos “O” e “Não O”, o segundo grupo apresentou maior aumento de FVW e FVIII com a progressão da idade. Os autores relacionaram essa diferença a meia vida do FVW. Embora o FVW tenha apresentado um aumento com a idade em ambos os grupos, esse aumento foi mais significativo no grupo Não O. Os autores também quantificaram os carboidratos ABH presentes no FVW e observaram uma associação positiva entre os seus níveis, a concentração de FVW e a idade. Essa diferença no padrão de glicosilação explicaria o aumento da meia vida do FVW uma vez que a proteína ficaria menos susceptível a ação da ADAMTS-13.

A influência do sexo sobre o FVW ainda não está bem esclarecida. Embora alguns estudos tenham demonstrado que possa existir uma influência do sexo sobre a coagulação^{58; 59}, em nosso estudo, assim como em outros estudos recentes com indivíduos saudáveis^{26; 60}, não foram observadas diferenças significantes nas variáveis estudadas entre indivíduos dos sexos feminino e masculino.

Considerações

O FVW:Ag é um marcador endotelial comumente utilizado no diagnóstico da doença de von Willebrand (DVW). É sabido que em indivíduos saudáveis os níveis de FVW:Ag chegam a ser até 25% menor dentre os indivíduos do grupo sanguíneo O. Em relação a DVW do tipo I, é sabido que alguns indivíduos podem apresentar níveis de FVW limítrofes (30–60UI/dL) que não necessariamente se relacionam com um histórico de sangramento. Nesse caso, os níveis de FVW podem estar sendo influenciados pelo tipo sanguíneo ABO. Assim, o uso do FVW:Ag ajustado de acordo com o tipo sanguíneo, somado ao histórico de sangramento e familiar, se torna essencial quando utilizado como uma ferramenta de diagnóstico⁶¹.

Em relação a hemofilia A, é comum a administração profilática de FVIII no cenário perioperatório e por algum tempo após uma cirurgia para manter a hemostasia⁶². Estudos demonstram que essa é uma estratégia que precisa ser melhorada, uma vez que já foram relatados casos de dose excessiva ou insuficiente^{63; 64} devido a estratégia atual que se baseia apenas no peso e em uma estimativa de *clearance*, sem considerar outras características individuais, como o tipo sanguíneo.

Hazendonk e colaboradores⁶² demonstraram que 45% e 33% dos pacientes estiveram em algum momento, abaixo ou acima do alvo terapêutico, respectivamente. Dentre eles, pacientes do tipo sanguíneo O estiveram mais presentes entre os casos de subdosagem e entre os indivíduos que apresentaram complicações hemorrágicas graves, sugerindo que o tipo sanguíneo pode representar um aumento no risco de complicações para esses pacientes. Além disso, se as faixas terapêuticas tivessem sido adequadamente mantidas, uma redução de 44% no consumo de FVIII, segundo os autores, teria sido possível.

O sistema sanguíneo ABO vem sendo associado com variações nos níveis de FVW, conforme reforçado nesse estudo. Nossos resultados tem implicações para o tratamento de pacientes com Doença de von Willebrand e hemofilia A, particularmente aqueles que apresentam tipo sanguíneo O. Também é relevante para pacientes idosos tratados com DDAVP que podem apresentar uma redução no *clearance* de FVW.

Visto a influência do sistema sanguíneo ABO sobre o FVW, é importante ressaltar que o FVWpp não sofre influência desse tipo sanguíneo, o que reforça sua importância como um biomarcador em potencial, capaz de refletir alterações fisiopatológicas em várias condições clínicas associadas à lesão endotelial.

6 CONCLUSÕES

Estudos da influência do sistema sanguíneo ABO na população brasileira normal são escassos. Nossos resultados mostram que o sistema sanguíneo ABO influencia a concentração plasmática de FVW, sua atividade, seja ela determinada por cofator de ristocetina (FVW:RCo) ou ligação ao colágeno (FVW:CB) e a atividade do FVIII. Essa influência é observada entre indivíduos dos grupos “O” e “Não O” e também entre os quatro fenótipos analisados (A, B, AB e O) e em ambos os casos, indivíduos O apresentaram níveis menores de FVW antígeno e atividade em relação aos demais indivíduos.

Além disso, nossos resultados mostram que os níveis de FVW influenciam sua atividade por ligação ao colágeno (FVW:CB) em indivíduos do tipo sanguíneo O, ao passo que para a FVW:RCo, essa influência é observada apenas em indivíduos Não O. O motivo para essa variação ainda precisa ser esclarecido. A adição do FVWpp e da razão FVWpp/FVW:Ag à análise não altera esses resultados.

Em relação ao FVWpp, podemos afirmar que ele não sofre influência do sistema sanguíneo ABO, portanto, seus níveis não variam entre os grupos “O” e “Não O” ou entre os quatro fenótipos ABO.

Podemos ainda afirmar que o FVW é influenciado pela progressão da idade. Essa influência é refletida em seus níveis plasmáticos e em sua atividade que aumentam em indivíduos acima de 38 anos. Já em relação ao sexo, não observamos variações significativas nos níveis de FVW:Ag, FVW:CB, FVW:RCo ou FVIII:C entre esses indivíduos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a susceptibilidade do FVW plaquetário e circulante a ação da ADAMTS-13 e relacioná-la a presença de açúcares N e O ligados.

Relacionar o padrão de glicosilação do FVW à sua susceptibilidade a ADAMTS-13.

REFERÊNCIAS

- ¹ GALE, A. J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. **Toxicol Pathol**, v. 39, n. 1, p. 273-80, Jan 2011. ISSN 1533-1601. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119054>.
- ² KAWECKI, C.; LENTING, P.; DENIS, C. **von Willebrand factor and inflammation**: J Thromb Haemost. 15: 1285-1294 p. 2017.
- ³ NOSSENT, A.Y., VAN MARION, V., VAN TILBURG, N.H., ROSENDAAL, F.R., BERTINA, R.M., VAN MOURIK, J.A. and EIKENBOOM, H.C.J. (2006), von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 4: 2556-2562.
- ⁴ RIZZO, C.; CARUSO, C.; VASTO, S. Possible role of ABO system in age-related diseases and longevity: a narrative review. **Immun Ageing**, v. 11, p. 16, 2014. ISSN 1742-4933. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512760>.
- ⁵ PAYNE, A. B. et al. High factor VIII, von Willebrand factor, and fibrinogen levels and risk of venous thromboembolism in blacks and whites. **Ethn Dis**, v. 24, n. 2, p. 169-74, 2014. ISSN 1049-510X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804362>.
- ⁶ XIA, L. et al. **Association of ABO blood groups with von Willebrand factor, factor VIII and ADAMTS-13 in patients with lung cancer**: ONCOLOGY LETTERS. 14: 3787-3794 p. 2017.
- ⁷ BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, p. 47-58, 2003.
- ⁸ BAIOCHI, E. et al. **Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO e RHD em puérperas e seus recém-nascidos.**: Rev Assoc Med Bras. 56: 44-46 p. 2007.
- ⁹ LIU, J. et al. Frequencies and ethnic distribution of ABO and RhD blood groups in China: a population-based cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 7, n. 12, p. e018476, Dec 2017. ISSN 2044-6055. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203504>.
- ¹⁰ AGRAWAL, A. et al. ABO and Rh (D) group distribution and gene frequency; the first multicentric study in India. **Asian J Transfus Sci**, v. 8, n. 2, p. 121-5, Jul 2014. ISSN 0973-6247. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161353>.

- 11 ATIRE, F. A. Distribution of ABO and Rh Blood Groups Among Students of Some Ethnic Groups at Dilla University, Ethiopia. **International Journal of Genetics and Genomics**, v. 3, n. 1, p. 8-19, 2015.
- 12 CARPEGGIANI, C. et al. ABO blood group alleles: A risk factor for coronary artery disease. An angiographic study. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 2, p. 461-6, Aug 2010. ISSN 1879-1484. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371059>>.
- 13 PRESTON, A. E.; BARR, A. THE PLASMA CONCENTRATION OF FACTOR VIII IN THE NORMAL POPULATION. II. THE EFFECTS OF AGE, SEX AND BLOOD GROUP. **Br J Haematol**, v. 10, p. 238-45, Apr 1964. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14141622>>.
- 14 FRANCHINI, M. et al. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 49, n. 4, p. 137-49, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1549-781X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22856614>>.
- 15 ALBÁNEZ, S. et al. Aging and ABO blood type influence von Willebrand factor and factor VIII levels through interrelated mechanisms. **J Thromb Haemost**, v. 14, n. 5, p. 953-63, May 2016. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26875505>>.
- 16 GOGIA, S.; NEELAMEGHAM, S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. **Biorheology**, v. 52, n. 5-6, p. 319-35, 2015. ISSN 1878-5034. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26600266>>.
- 17 GROENEVELD, D. J. et al. Storage and secretion of naturally occurring von Willebrand factor A domain variants. **Br J Haematol**, v. 167, n. 4, p. 529-40, Nov 2014. ISSN 1365-2141. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103891>>.
- 18 CASONATO, A.; DAIDONE, V.; PADRINI, R. Assessment of von Willebrand factor propeptide improves the diagnosis of von Willebrand disease. **Semin Thromb Hemost**, v. 37, n. 5, p. 456-63, Jul 2011. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102187>>.
- 19 HABERICHTER, S. L. von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. **Blood**, v. 126, n. 15, p. 1753-61, Oct 2015. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215113>>.
- 20 BROTT, D. A. et al. Evaluation of von Willebrand factor and von Willebrand factor propeptide in models of vascular endothelial cell activation, perturbation, and/or injury. **Toxicol Pathol**, v. 42, n. 4, p. 672-83, Jun 2014. ISSN 1533-1601. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24499802>>.

- 21 DALM, D. et al. Dimeric Organization of Blood Coagulation Factor VIII bound to Lipid Nanotubes. **Sci Rep**, v. 5, p. 11212, Jun 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26082135>.
- 22 SHEN, B. W. et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1240-7, Feb 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965321>.
- 23 JENKINS, P. V.; O'DONNELL, J. S. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion**, v. 46, n. 10, p. 1836-1844, 2006. ISSN 1537-2995.
- 24 O'DONNELL, J. et al. Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 2, p. 335-341, 2002. ISSN 1079-5642.
- 25 GALLINARO, L. et al. A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3540-5, Apr 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245665>.
- 26 WANG, Z. et al. Influences of ABO blood group, age and gender on plasma coagulation factor VIII, fibrinogen, von Willebrand factor and ADAMTS13 levels in a Chinese population. **PeerJ**, v. 5, p. e3156, 2017. ISSN 2167-8359. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28382235>.
- 27 MCGRATH, R. T. et al. Expression of terminal alpha2-6-linked sialic acid on von Willebrand factor specifically enhances proteolysis by ADAMTS13. **Blood**, v. 115, n. 13, p. 2666-73, Apr 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965639>.
- 28 CHAN, C. H. et al. The effect of shear stress on the size, structure, and function of human von Willebrand factor. **Artif Organs**, v. 38, n. 9, p. 741-50, Sep 2014. ISSN 1525-1594. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234758>.
- 29 BORCHIELLINI, A. et al. Quantitative analysis of von Willebrand factor propeptide release in vivo: effect of experimental endotoxemia and administration of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in humans. **Blood**, v. 88, n. 8, p. 2951-8, Oct 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8874191>.
- 30 ZHOU, J. et al. [Application of collagen-binding assay for von Willebrand disease]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 35, n. 1, p. 126-9, Jan 2004. ISSN 1672-173X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981837>.

- 31 PATZKE, J.; FAVALORO, E. J. Laboratory Testing for von Willebrand Factor Activity by Glycoprotein Ib Binding Assays (VWF:GPIb). **Methods Mol Biol**, v. 1646, p. 453-460, 2017. ISSN 1940-6029. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28804847>>.
- 32 CASTELLONE, D. D.; ADCOCK, D. M. Factor VIII Activity and Inhibitor Assays in the Diagnosis and Treatment of Hemophilia A. **Semin Thromb Hemost**, v. 43, n. 3, p. 320-330, Apr 2017. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272962>>.
- 33 DENTALI, F. et al. Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. **Semin Thromb Hemost**, v. 38, n. 5, p. 535-48, Jul 2012. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740183>>.
- 34 _____. ABO blood group and vascular disease: an update. **Semin Thromb Hemost**, v. 40, n. 1, p. 49-59, Feb 2014. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381150>>.
- 35 BAYAN, K. et al. Clarifying the relationship between ABO/Rhesus blood group antigens and upper gastrointestinal bleeding. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 5, p. 1029-34, May 2009. ISSN 1573-2568. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716867>>.
- 36 RIAZ, C. F. ABO blood type as a risk factor for secondary post-tonsillectomy haemorrhage. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 12, p. 1459; author reply 1459-60, Dec 2010. ISSN 1872-8464. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889218>>.
- 37 FRANCHINI, M.; LIPPI, G. The intriguing relationship between the ABO blood group, cardiovascular disease, and cancer. **BMC Med**, v. 13, p. 7, Jan 2015. ISSN 1741-7015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592962>>.
- 38 SONG, J. et al. Quantitative Influence of ABO Blood Groups on Factor VIII and Its Ratio to von Willebrand Factor, Novel Observations from an ARIC Study of 11,673 Subjects. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0132626, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26244499>>.
- 39 O'DONNELL, J.; LAFFAN, M. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. **Transfusion Medicine**, v. 11, n. 4, p. 343-351, 2001. ISSN 1365-3148.
- 40 O'SULLIVAN, J. M. et al. N-linked glycan truncation causes enhanced clearance of plasma-derived von Willebrand factor. **J Thromb Haemost**, v. 14, n. 12, p. 2446-2457, 12 2016. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27732771>>.

- 41 FRANCHINI, M. et al. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. **Thromb J**, v. 5, p. 14, Sep 2007. ISSN 1477-9560. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894864>>.
- 42 MOHLKE, K. L. et al. MvWF, a dominant modifier of murine von Willebrand factor, results from altered lineage-specific expression of a glycosyltransferase. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 111-20, Jan 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989502>>.
- 43 FURLAN, M.; ROBLES, R.; LÄMMLE, B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4223-34, May 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639781>>.
- 44 BOWEN, D. J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 1, p. 33-40, Jan 2003. ISSN 1538-7933. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871537>>.
- 45 MCGRATH, R. T. et al. Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4107-10, Dec 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106205>>.
- 46 A, C. et al. **Von Willebrand factor collagen binding activity in the diagnosis of von Willebrand disease: an alternative to ristocetin co-factor activity ?**: Br J Haematol. 112: 578-583 p. 2001.
- 47 MILLER, C. H. et al. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 10, p. 2191-7, Oct 2003. ISSN 1538-7933. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521604>>.
- 48 AKIN, M. et al. The influence of the ABO blood type on the distribution of von Willebrand factor in healthy children with no bleeding symptoms. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 18, n. 3, p. 316-9, Jun 2012. ISSN 1938-2723. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949039>>.
- 49 SARODE, R. et al. **R ole of A and B blood group antigens in the e xpression of adhesi v e acti vity of v on W illebrand factor**. 109: 857-864 p. 2000.
- 50 RIDDELL, A. F. et al. Use of the collagen-binding assay for von Willebrand factor in the analysis of type 2M von Willebrand disease: a comparison with the ristocetin cofactor assay. **Br J Haematol**, v. 116, n. 1, p. 187-92, Jan 2002. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841416>>.

- 51 RIOS, D. R. et al. Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS13 and factor VIII in patients undergoing hemodialysis. **J Thromb Thrombolysis**, v. 33, n. 4, p. 416-21, May 2012. ISSN 1573-742X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466813>.
- 52 KLARMANN, D. et al. Association of ABO(H) and I blood group system development with von Willebrand factor and Factor VIII plasma levels in children and adolescents. **Transfusion**, v. 50, n. 7, p. 1571-80, Jul 2010. ISSN 1537-2995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210927>.
- 53 VAN MOURIK, J. A.; ROMANI DE WIT, T. Von Willebrand factor propeptide in vascular disorders. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 1, p. 164-71, Jul 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487004>.
- 54 FAVALORO, E. J.; FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age - a narrative review. **Semin Thromb Hemost**, v. 40, n. 6, p. 621-33, Sep 2014. ISSN 1098-9064. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25099191>.
- 55 ALBÁÑEZ, S. et al. **Age-Related Increases in Plasma Factor VIII and Von Willebrand Factor in a C57BL/6 Mouse Model Are Associated with Increased Factor VIII and Von Willebrand Factor Gene Expression and Reduced Expression of the Clearance Receptor, Stabilin-2**: Blood. 124 2014.
- 56 COPPOLA, R. et al. Von Willebrand factor in Italian centenarians. **Haematologica**, v. 88, n. 1, p. 39-43, Jan 2003. ISSN 0390-6078. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551825>.
- 57 KOKAME, K. et al. **von Willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio increases with age in a Japanese population**: Journal Thrombosis and Haemostasis 2011.
- 58 VAN DER VORM, L. N. et al. Analytical characterization and reference interval of an enzyme-linked immunosorbent assay for active von Willebrand factor. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211961, 2019. ISSN 1932-6203. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30759116>.
- 59 CONLAN, M. G. et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Thromb Haemost**, v. 70, n. 3, p. 380-5, Sep 1993. ISSN 0340-6245. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8259533>.
- 60 FAVALORO, E. J. et al. Reassessment of ABO blood group, sex, and age on laboratory parameters used to diagnose von Willebrand disorder: potential influence on the diagnosis vs the potential

association with risk of thrombosis. **Am J Clin Pathol**, v. 124, n. 6, p. 910-7, Dec 2005. ISSN 0002-9173. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416741>>.

- 61 NITU-WHALLEY et al. **Type 1 von Willebrand disease — a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history**: British Journal of Haematology. 108 2001.
- 62 HAZENDONK, H. C. et al. Perioperative treatment of hemophilia A patients: blood group O patients are at risk of bleeding complications. **J Thromb Haemost**, v. 14, n. 3, p. 468-78, Mar 2016. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26714028>>.
- 63 BIDLINGMAIER, C.; DEML, M. M.; KURNIK, K. Continuous infusion of factor concentrates in children with haemophilia A in comparison with bolus injections. **Haemophilia**, v. 12, n. 3, p. 212-7, May 2006. ISSN 1351-8216. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16643203>>.
- 64 BATOROVA, A.; MARTINOWITZ, U. Intermittent injections vs. continuous infusion of factor VIII in haemophilia patients undergoing major surgery. **Br J Haematol**, v. 110, n. 3, p. 715-20, Sep 2000. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997985>>.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Tabela contendo os dados de todos os indivíduos inclusos no estudo.

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
1	Feminino	O+		100,74	109,79	91,55		
2	Masculino	O+		102,55	131,29	136,44		
3	Masculino	O+		97,74	85,68	70,52		
4	Masculino	B+		98,91	68,07	98,28	105,10	102,30
5	Feminino	A+		100,33	105,90	72,40		
6	Masculino	B+		98,77	111,58	90,39		
7	Masculino	O-		99,43	135,12	84,07	97,70	84,40
8	Masculino	O-		97,71	136,70	66,28		
9	Masculino	A+		100,59	105,04		93,10	92,90
10	Feminino	A+		98,69	83,60	101,73	97,20	81,10
11	Feminino	A+		101,39	117,77	95,53		
12	Feminino	B+		103,58	159,17	112,14		
13	Masculino	O+		99,08	72,36	68,45		
14	Masculino	O+		100,21	114,29	68,05		
15	Feminino	B+		100,63		102,92	114,90	122,50
16	Masculino	O+		97,13	125,07	78,64	62,90	61,10
17	Masculino	A+		100,30	165,30	63,79	92,90	191,40
18	Masculino	O-		97,97	176,87	100,24	84,00	79,20
19	Masculino	A+		98,09	140,58	86,02		
20	Masculino	AB+		99,69	136,56	108,19		
21	Masculino	A+		101,35	134,31	99,16	94,60	84,40
22	Masculino	O+		100,97	126,21	94,62		
23	Masculino	A+		101,80	114,52	78,48		
24	Feminino	O+		100,69	108,15	88,88		
25	Masculino	A-		100,19	89,11	96,45		
26	Masculino	B+		97,24	74,13	100,72		
27	Feminino	A+		92,22	62,70	59,59		
28	Feminino	A+		98,85	79,15	62,65		
29	Feminino	O+		98,19	81,18		75,50	67,60
30	Masculino	O+		100,75	115,37	86,20	63,80	56,10
31	Masculino	B-		100,67	78,55	102,94		
32	Masculino	AB+		96,11	80,70		82,20	72,00
33	Feminino	A-		100,72	125,76	103,53	105,90	75,40
34	Feminino	A+		98,75	146,98	76,16	110,40	104,20

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
35	Masculino	B+		99,58	151,29	81,46	92,50	98,20
36	Feminino	O-		98,74	92,98	133,83		
37	Feminino	B+		99,52	187,24	70,51	158,10	178,70
38	Masculino	A+	27	101,63	274,27	104,96	106,70	111,10
39	Masculino	O+	57	102,88	93,89			
40	Masculino	B+	39	100,68	126,34	88,21		
42	Feminino	B+	26	100,82	57,61	138,55		
43	Feminino	B+	27		182,22	109,56	115,80	154,10
44	Masculino	A+	31	101,10	91,74	62,64		
45	Masculino	O+	40	95,16	66,85	68,02		
46	Masculino	A-	33	79,93	44,06	93,98		
47	Feminino	O+	29	101,07	117,51	57,16		
48	Masculino	O+	58	100,62	120,03	62,14	110,50	116,60
49	Masculino	A-	51	98,37	79,77	153,44	90,60	99,30
50	Feminino	A+	36	125,79	117,24	102,47	107,60	76,70
51	Feminino	A+	56	126,98		115,76	103,60	109,20
52	Masculino	A+	60	99,30	102,80	82,17	103,80	127,60
53	Masculino	AB+	38	98,92		62,76	115,50	152,10
54	Masculino	O+	26	96,72	68,70	48,85	66,70	81,70
55	Feminino	A+	28	140,24	305,05	101,49	167,20	56,20
56	Masculino	O+	28	100,54	63,09	116,10	57,00	59,30
57	Masculino	A+	32	99,45	58,04	94,88	96,60	119,50
58	Feminino	B+	41	100,21	114,54	77,30	105,10	148,30
59	Feminino	O+	38	99,15	117,47	74,09	107,40	103,10
60	Masculino	B+	51	96,06	73,42	70,47	105,60	149,50
61	Feminino	O+	29	106,89	251,40	86,27	92,10	106,50
62	Masculino	AB+	37	101,13		78,79	111,00	117,90
63	Masculino	B+	61	100,10		93,67	92,10	110,10
64	Feminino	A+	46	102,93	73,71	97,59	82,00	88,50
65	Feminino	O+	31	89,18	62,76	75,24		
66	Feminino	A+	53	98,60	74,64	85,68	110,80	377,80
67	Feminino	O+	35	111,60	112,24	108,07	106,90	139,80
68	Feminino	O+	25	98,33	59,29	77,78	92,30	99,80
70	Feminino	A-	29	100,17	135,14	105,80	116,60	127,00
71	Masculino	A+	37	101,95	161,77	90,84	105,00	84,80
72	Masculino	O+	36	102,30	77,93	70,65		
73	Feminino	O-	59	100,23	138,87	123,52		
74	Masculino	O+	48	104,96	118,24	86,04	79,40	80,80
75	Feminino	O+	20	67,64	178,30	67,21	52,20	60,50
76	Masculino	A+	42	135,98	98,08	91,71	86,40	138,70
77	Masculino	O+	54	101,14	154,12	101,47	157,70	206,90

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
78	Masculino	A+	32	103,64		85,40	85,40	106,50
79	Masculino	O+	57	98,32	108,20	130,12	124,90	110,50
80	Feminino	B+	37	97,72	105,29	106,16	166,40	138,40
81	Masculino	A+	59	115,34	128,37	93,30	87,50	104,00
82	Masculino	O+	24	50,19	34,85	54,22	45,50	42,30
83	Feminino	O+	47	98,49	130,79	80,85		
84	Feminino	O+	37	98,84	53,26	67,63	58,10	64,90
85	Feminino	O+	54	99,44	81,52	83,67	89,40	101,90
86	Masculino	O+	41	80,89		44,23		
87	Masculino	O+	46	101,19		78,48	79,80	89,20
88	Masculino	A+	42	118,54		102,25		
89	Feminino	O+	47	101,46	42,83	93,06	82,50	110,10
90	Masculino	O-	43	99,92	36,64	68,68	73,90	96,70
91	Masculino	O+	41	99,94		84,23	81,20	87,10
92	Masculino	B+	58	100,44		96,02	105,40	116,60
93	Masculino	O+	34	100,12		144,46	114,50	168,30
94	Masculino	O+	43	96,84	217,10	81,30	91,80	116,60
95	Feminino	O-	24	101,31	75,33	89,48	81,10	90,60
96	Masculino	O+	30	90,22		68,28	60,40	52,00
97	Feminino	O+	43	97,62	41,68	65,80		95,10
98	Feminino	O+	23	100,09	70,61	103,77	75,10	66,80
99	Feminino	A+	40	101,80	87,76	103,06	119,40	117,50
100	Feminino	A-	48	126,58		96,74		
101	Feminino	A+	57	103,80	64,94	81,23	92,60	85,00
102	Feminino	B+	51	100,65	61,43	102,82	113,40	99,00
103	Masculino	A+	62	85,80	72,68	66,26	69,50	91,40
104	Feminino	A+	53	96,43	75,34	106,59		
105	Masculino	O+	35	60,32	62,11	46,12	45,20	59,70
106	Feminino	A+	51	120,81	185,34	85,16	99,60	125,50
107	Masculino	O-	47	133,26	255,47	95,68	116,60	145,80
108	Feminino	A+	53	148,00		111,35	310,00	183,30
109	Masculino	B+	25	99,33		117,64	180,10	157,30
110	Masculino	A+	56	125,27	283,68	78,58	103,50	116,60
111	Masculino	O+	37	86,96		60,15	67,00	99,80
112	Feminino	O+	22	93,14	88,67	68,13	79,30	117,50
113	Masculino	B+	50	99,70		102,47	91,80	91,40
114	Feminino	A+	39	100,45	114,74	72,41	91,00	137,50
115	Feminino	O+	26	97,70	83,05	95,14	52,00	59,70
116	Masculino	O+	30	97,49		71,86		
117	Feminino	A+	42	123,44	88,80	75,73	105,00	109,20
118	Feminino	A+	32	124,26	69,52	86,01	105,30	126,60

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
119	Feminino	A+	41	112,18	106,20	75,27	88,70	95,90
120	Masculino	O+	25	89,99		62,87	42,60	45,00
121	Feminino	O+	23	109,29	273,30	76,61	105,90	101,50
122	Feminino	B+	29	101,49		90,41	97,70	111,00
123	Feminino	A+	51	148,25	184,31	83,38	178,80	164,80
124	Feminino	O+	39	103,02	67,70	68,92	83,50	115,60
125	Masculino	B+	50	100,40		112,34	157,60	158,60
126	Feminino	O+	32	81,68		64,42	45,00	46,00
127	Masculino	B+	48	98,85		85,92	96,20	113,70
128	Feminino	O+	33	103,06	98,52	84,32	73,70	105,70
129	Masculino	A+	27	90,26	82,12	62,44	75,30	81,10
130	Feminino	A+	55	104,31		60,88	81,90	92,90
131	Feminino	O-	47	102,23	155,15	69,04	92,90	110,10
132	Masculino	AB+	48	100,85		100,45	117,10	131,90
133	Masculino	O-	41	100,04		73,09	84,30	90,30
134	Feminino	O+	51	99,04		72,02	91,50	133,00
135	Masculino	O-	44	99,10	177,18	62,46	83,20	123,90
136	Feminino	O+	25	78,99		98,13	49,60	83,00
137	Feminino	A+	32	104,41	169,59	80,84	88,10	100,20
138	Masculino	O+	28	96,04		61,14	56,90	70,90
139	Feminino	O+	50	100,43		85,86	91,50	92,10
140	Feminino	AB+	44	97,90		71,24	87,00	127,60
141	Masculino	O+	26	88,10		57,61	61,00	74,30
142	Feminino	O+	25	99,39		42,59	80,20	102,30
143	Masculino	A+	35	98,91	102,76	107,10	114,10	103,20
144	Feminino	A+	35	101,33	48,57	93,28	104,10	100,80
145	Masculino	B+	48	99,06		79,24	82,00	110,10
146	Masculino	A+	38	103,92	62,99	61,62	82,60	107,40
147	Masculino	A+	44	102,99	61,18	68,70	96,20	143,40
148	Feminino	AB-	36	96,90		79,35	104,80	104,80
149	Masculino	A+	43	102,32	89,33	115,52	87,40	91,40
150	Masculino	O+	64	94,25		77,28	77,50	84,40
151	Feminino	O+	24	102,59		66,01	68,90	69,20
152	Masculino	A+	31	99,58	34,06	88,95	80,50	85,70
153	Feminino	A+	38	103,08	83,60	122,46	195,40	108,80
154	Masculino	B+	45	101,33		88,94	113,30	305,80
155	Feminino	B+	26	100,79		89,70	119,50	171,20
156	Feminino	A+	36	106,40		129,10	133,40	153,40
157	Feminino	O+	27	90,21		67,31	79,20	90,60
158	Masculino	A+	35		71,01	69,82	88,20	136,40
159	Feminino	A+	31	102,53	198,52	74,47	108,40	133,00

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
160	Masculino	A+	46	100,98	76,66	102,24	106,50	142,20
161	Masculino	A+	20	104,82	241,99	104,02	111,80	135,30
162	Masculino	A+	62	102,98	277,24	104,22	177,90	121,50
163	Masculino	A+	51	101,20	210,44	96,81	114,60	147,00
164	Masculino	A-	27	71,15	157,26	88,99	85,30	95,10
165	Masculino	A-	41	84,03	214,94	106,87	110,30	133,00
166	Masculino	A+	39	81,49	98,58	90,40	83,70	121,50
167	Feminino	A+	27	91,60	252,89	105,51	103,20	101,50
168	Masculino	O+	25	69,49		94,02	78,80	78,50
169	Masculino	O+	68	98,46		69,94	69,10	78,50
170	Masculino	A+	33	90,45	155,36	100,25	106,80	97,50
171	Masculino	O-	67	97,33		71,94		
172	Masculino	O+	40	96,97		60,53		
173	Masculino	AB+	35	100,35		86,41	99,50	110,10
174	Masculino	A+	42	67,65		48,92		
175	Feminino	O+	21	99,46		98,91	97,60	131,90
176	Masculino	A+	31	105,01	272,39	99,90	179,80	97,80
177	Feminino	O-	46	97,42		101,58	107,00	117,60
178	Masculino	A+	66	93,44	284,75	83,15	98,50	100,70
179	Feminino	O-	38	97,52		76,03	80,80	93,60
180	Feminino	A+	47	102,29	275,97	103,97	115,00	100,80
181	Feminino	A+	50	81,34		100,03		
182	Masculino	O+	32	95,29		45,40	70,40	83,00
183	Feminino	A+	46	73,74		97,82		
184	Feminino	O+	35	99,05		79,57	94,00	92,10
186	Feminino	B+	34	97,57			97,60	64,50
187	Feminino	A+	21	82,40		90,29		
188	Masculino	O+	32	98,45		65,70		
189	Masculino	AB+	70	101,46		75,00	102,50	89,20
190	Masculino	B+	30	73,10	269,56	95,18	77,80	83,00
191	Masculino	O+	58	100,46		70,19		
192	Masculino	O+	47	98,15		68,95		
193	Masculino	A-	30	99,33		101,96		
195	Feminino	O+	20	61,76		95,59	69,40	66,60
196	Feminino	O+	25			68,21	49,00	50,80
197	Masculino	A+	47	106,17		105,06		
198	Masculino	A+	44	100,35		101,01		
199	Feminino	O-	37	58,51		79,50	64,60	68,20
200	Masculino	A+	38	68,99		100,87		
201	Masculino	A+	66	79,00		103,68		
202	Masculino	O+	50	62,10		92,91	56,60	52,40

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
203	Masculino	A+	38	91,17		96,87		
204	Masculino	A+	29	74,94	54,19	95,28	90,30	73,70
205	Masculino	O+	49	51,69		91,94	67,10	53,20
206	Masculino	A+	34	75,81		95,68	62,40	64,00
207	Masculino	O+	26	83,34		100,00	101,00	92,90
208	Feminino	AB+	38	101,16		68,87	91,30	98,20
209	Masculino	A+	32	59,39		47,93	58,20	87,10
210	Masculino	O+	33	71,69		95,62	97,70	81,70
211	Feminino	O+	36	81,04		101,84	92,70	110,10
212	Feminino	O+	30	89,10		101,83	118,80	135,30
213	Feminino	O+	34				118,00	175,60
214	Feminino	AB-	28	99,68		67,72	110,50	105,70
215	Masculino	O+	35	82,17		91,74	100,80	119,50
216	Masculino	O+	39	86,94			103,30	114,70
217	Feminino	B+	34	59,57	69,95	82,11	79,70	83,70
218	Masculino	O+	26	94,35			104,60	81,80
219	Masculino	A+	28	133,62		97,56	119,30	117,50
220	Feminino	AB+	31	101,15		104,44	109,20	85,00
221	Feminino	O+	36	46,18		92,63	54,40	58,70
222	Feminino	A+	42	97,47		99,65	84,30	104,00
223	Feminino	A+	20	93,08		116,57	103,70	109,20
224	Masculino	O+	44	63,45		76,20	69,10	94,70
225	Feminino	O+	43	65,90		129,30	81,90	118,50
226	Masculino	O+	33	61,89		99,66		
227	Masculino	O+	55	91,82		136,27	111,50	88,60
228	Masculino	A+	50	103,11		129,20	75,60	106,50
229	Feminino	A+	31	93,77		106,27	115,80	164,10
230	Masculino	O+	35	84,53		155,19	83,09	90,60
231	Masculino	A+	45	90,78		115,94	71,90	104,00
232	Masculino	AB+	34	101,33	44,26	122,63		81,70
233	Feminino	B+	25	99,05	126,34	98,42		122,50
234	Masculino	A+	24	118,21				
235	Masculino	O+	-	90,33		124,02	105,50	172,20
236	Masculino	O+	24	59,23			57,30	79,80
237	Feminino	A+	69	101,55		118,21	84,30	127,60
238	Feminino	A+	35	65,70		104,19	104,60	123,50
239	Masculino	O+	33	86,05		91,28	82,30	102,30
240	Feminino	B+	29	99,55	218,14	98,52	161,80	164,10
241	Masculino	B+	24	101,03	177,94	93,54	109,00	97,50
242	Feminino	O+	30			161,22	100,40	86,60
243	Masculino	O+	39	64,77		95,46	62,30	68,50

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
244	Feminino	A-	49	84,77		146,42	111,20	158,60
245	Masculino	O+	38	78,30		86,52	67,60	79,50
246	Masculino	O+	22	92,00		99,98	92,20	141,50
247	Masculino	O+	39	99,43		118,83	101,00	126,60
248	Feminino	A+	55	100,05		129,46	113,30	137,50
249	Feminino	A+	48	136,80		101,06	115,70	123,50
250	Masculino	O+	29	69,77		112,83	73,20	64,50
251	Masculino	B+	-	111,23	420,81		163,00	143,40
252	Masculino	A+	34	82,42		103,17	81,20	109,20
253	Masculino	A+	63	98,97		105,49	109,50	194,70
254	Masculino	O+	45	76,79		95,84	83,80	111,00
255	Masculino	O+	40	87,12		97,50	80,90	113,70
256	Masculino	A+	42			152,60		
257	Feminino	B+	32	90,27	172,77	96,54	99,30	90,60
258	Masculino	A-	63	90,40		143,18	96,70	101,50
259	Feminino	O+	35					
260	Masculino	AB+	65	85,92	103,75		100,00	110,10
261	Masculino	A+	42	118,96		124,70	86,30	96,40
262	Feminino	A+	54	89,40		77,79	90,60	181,80
263	Masculino	A+	54	99,45		99,72	164,80	181,80
264	Masculino	AB+	35	102,40	142,53	113,31	107,00	171,20
265	Feminino	A+	36	68,26		54,70	55,60	104,80
266	Masculino	O+	41	91,24		127,76	75,40	92,10
267	Feminino	A+	41	82,92		106,89	96,90	113,70
268	Feminino	A+	33	91,33		84,66	77,90	84,40
269	Masculino	AB+	26	60,57			61,80	85,00
270	Masculino	A+	45	104,78		105,38	118,20	172,70
271	Masculino	O+	30	85,14		79,80	70,90	73,10
272	Masculino	O+	20	84,92		60,28	114,80	116,60
273	Feminino	O+	52	103,32		114,23	98,60	118,50
274	Feminino	O+	32	90,16		109,72	95,10	118,50
275	Masculino	A+	18	85,70		94,75		
276	Feminino	A+	18	117,30		138,23		
277	Feminino	A+	22	99,72		111,20		
278	Feminino	B+	18	77,03	308,19		79,50	101,50
279	Feminino	O-	18	68,42		98,44	69,20	114,70
280	Masculino	A+	18	103,73	104,49	109,52	101,80	95,90
281	Feminino	O+	19	62,53		88,03	77,10	81,70
282	Feminino	B+	33	109,72	165,06	139,86	193,30	171,20
283	Feminino	A+	58	82,56		90,08	68,00	73,70
284	Masculino	O+	49	82,43		74,02	90,90	88,50

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
285	Feminino	A+	58	115,13		99,00		
286	Masculino	A+	52	90,92		138,45		
287	Feminino	A+	39	59,05		180,84		
288	Masculino	O+	28	61,21		84,73	107,40	90,60
289	Masculino	A+	43	141,74		123,24		
290	Masculino	B+	44	111,38			182,60	139,80
292	Masculino	O+	46	69,24		118,95	71,00	
293	Feminino	O+	21	91,22		111,81	91,20	201,60
294	Feminino	O-	39	73,35		95,48	78,30	101,50
295	Masculino	A+	45	84,74		111,36		
296	Masculino	O+	23	85,06		112,98	76,90	87,10
297	Masculino	A+	38	68,98		115,23		
298	Feminino	O+	20	78,51		75,42	86,10	87,10
299	Masculino	B-	50	77,33	84,68	75,34	95,40	102,30
300	Feminino	B+	68	99,57	88,06	125,00	116,00	147,00
301	Masculino	O+	44	65,39		63,10	77,90	99,00
302	Feminino	O+	42	103,72		104,53	95,30	125,50
303	Masculino	A+	56	99,21		66,68		
305	Feminino	O+	59	81,77		124,79		
306	Masculino	A+	37	60,81		59,36		
307	Masculino	O+	28	45,48		42,78	51,70	65,50
308	Masculino	O+	41	77,99		106,23	94,60	109,20
309	Masculino	O+	36	110,32		102,77	115,80	148,30
310	Masculino	O-	37	88,25				
311	Masculino	O+	36	86,31		69,86	71,20	88,50
312	Masculino	A+	39	75,76		62,18		
313	Masculino	O+	35	59,51		69,11	76,50	99,80
315	Masculino	AB+	34	98,27		111,93	103,30	95,90
316	Masculino	O+	35	76,17		86,55	98,60	109,20
317	Feminino	A+	52	78,64		73,34		
318	Masculino	O+	34	89,73		117,12	84,80	100,70
321	Feminino	O+	29	77,17		89,96	78,30	59,30
322	Feminino	A+	27	130,06		97,44		
323	Feminino	O+	28	58,15		77,58	65,70	66,60
324	Feminino	AB-	24	88,53	91,51	125,58	98,30	109,20
325	Feminino	O+	30			97,85	50,40	47,80
326	Feminino	B+	37	93,51	146,71	127,14	98,20	92,90
328	Masculino	O-	69			161,47	92,70	89,20
329	Feminino	O+	36			171,82	101,50	104,80
330	Masculino	O+	44			140,17	81,10	111,00
331	Masculino	O+	27			123,05	69,40	99,80

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
333	Feminino	AB+	39	77,56	68,72	114,74	94,20	97,50
335	Masculino	O-	35			160,10	111,90	140,70
337	Masculino	O-	22			127,45	78,50	93,20
338	Feminino	O-	35			135,75	91,00	88,90
339	Feminino	O+	63			144,97	90,60	104,20
340	Masculino	O-	65			157,20	112,00	118,50
342	Masculino	O+	55			160,98	119,50	123,40
346	Masculino	O+	18			115,49	60,10	92,90
348	Feminino	B+	20	81,15	134,86	129,02	91,20	76,70
349	Feminino	B-	46	80,66		146,07	92,50	93,60
350	Masculino	O+	24			172,45	89,50	153,40
351	Masculino	O+	18			92,91	59,30	69,80
353	Feminino	O+	37				106,00	174,20
354	Feminino	O+	55				118,30	183,30
356	Masculino	B+	39	102,59	219,61	115,39	115,70	
358	Masculino	O+	62				63,70	62,20
361	Masculino	O-	19				67,60	69,30
362	Masculino	B+	41	96,57	164,18	124,77	104,90	143,40
363	Masculino	O+	35				105,10	79,00
365	Feminino	O+	44				104,00	79,60
366	Feminino	O+	36			87,99	70,00	64,20
367	Feminino	O+	36			110,43	73,00	72,60
368	Feminino	O-	46			111,44	97,30	75,40
370	Feminino	O-	26				67,30	70,30
375	Feminino	O+	61				107,30	76,00
376	Masculino	O+	27				81,50	82,20
382	Masculino	O+	40				108,50	91,00
383	Masculino	B+	53	108,30	191,36	128,07	169,30	
384	Feminino	A+	55			153,37		
388	Feminino	O+	24				78,10	144,60
390	Feminino	B+	38	70,16	46,47	99,07	84,60	110,10
391	Masculino	O+	48				65,40	74,30
392	Feminino	O+	43				86,50	136,40
400	Feminino	A+	47	106,81		170,14		
401	Feminino	A-	36	98,10		182,06		
402	Feminino	B+	46	83,93	56,78	145,70	108,00	143,00
407	Feminino	A-	26	80,44		159,03		
409	Masculino	A+	47	83,42		143,25	88,60	80,40
418	Masculino	A+	52	55,43		82,34		
421	Masculino	A+	21	90,77		140,63		
422	Masculino	A+	31	49,21		124,65		

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
424	Feminino	B+	43	84,56	71,28	126,06	102,40	128,50
425	Masculino	A+	30	104,90		166,22		
426	Feminino	O+	32	78,98				
430	Masculino	A+	50	75,23				
431	Masculino	A+	39	93,78		168,59		
433	Masculino	A+	40	92,18				
434	Masculino	A+	20	97,46		169,60		
438	Feminino	A+	56	85,18		165,37		
439	Masculino	AB+	56	104,53	93,47	138,15	190,40	147,00
440	Feminino	A+	53	94,56				
442	Feminino	B+	37	98,30	123,35	129,79	102,90	129,80
443	Feminino	B-	47	102,71	105,19	166,93	177,90	165,50
444	Masculino	B+	50	99,87	234,07	142,68	159,10	128,70
452	Masculino	A+	27	93,95		157,69		
456	Masculino	A+	63	78,66				
459	Masculino	B+	69	101,71		220,75		
461	Masculino	A-	-	97,43		155,41		
462	Masculino	A+	47	65,30		146,10		
467	Masculino	O+	35	97,99		133,34	67,50	69,80
468	Masculino	O+	58				79,80	68,70
469	Feminino	O+	48				81,10	84,40
472	Masculino	AB-	47	75,85		107,88	101,70	135,30
473	Feminino	AB+	-	63,12		95,30		
474	Masculino	AB+	-	118,38		140,44		
475	Masculino	AB+	43	81,20	64,36	170,64	105,50	122,50
476	Feminino	B+	63	101,55		107,80	118,50	125,50
477	Feminino	AB+	31	100,91	37,35	171,33	200,70	
478	Feminino	B	20	97,51	52,63	110,78	107,20	
482	Masculino	A+	47	112,74		167,77		
483	Feminino	B+	44	95,59		101,30	97,10	157,30
485	Masculino	AB+	38	93,18		96,10	105,90	205,10
486	Feminino	AB+	32	98,28		105,73	94,90	122,50
487	Feminino	B+	46	87,89		119,76	109,20	96,70
488	Masculino	AB+	27	99,77	70,68	127,25	156,90	
489	Feminino	A+	21	86,83				
490	Masculino	B+	21	73,74		98,28	83,90	95,40
491	Masculino	A+	22	69,52		113,08		
493	Masculino	B+	28		50,74	99,82	90,60	95,40
494	Feminino	B+	35	101,14		121,08	185,50	124,40
495	Feminino	O+	50				106,40	91,40
498	Feminino	O+	45				56,20	72,60

Amostra	Gênero	Tipo Sanguíneo	Idade	FVWAg UI/dL	FVWpp %	FVW:CB %	FVW:Rco %	FVIII%
501	Masculino	B+	37	100,40	47,36	106,91	107,20	96,20
502	Masculino	AB+	59	100,82	203,80	129,45	268,20	223,80
503	Feminino	B-	47	100,60		124,97	102,80	63,70
504	Masculino	B+	50	102,78	59,21	158,90	182,30	133,90
505	Masculino	B+	31	99,87	122,75	137,07	241,80	120,40
506	Masculino	O+	41				105,50	79,20
509	Masculino	B+	50	94,82	77,42	120,33	100,70	73,70
511	Masculino	B+	62	101,63	118,77	150,70	122,30	102,50
512	Feminino	B+	48	101,34	83,95	170,47	104,90	110,20
513	Masculino	B+	44	101,62	145,16	138,83	216,50	99,30
514	Masculino	AB+	56	97,59	42,78	121,13	100,30	134,10
515	Feminino	B+	55	92,51			65,50	63,70
516	Masculino	AB-	-	101,61	137,46		106,60	99,00
517	Masculino	B+	37	99,51	186,53	100,89	103,30	103,30
518	Masculino	B-	21	94,45	127,60	121,24	96,30	84,40
519	Feminino	B+	28	102,72	102,60	157,64	141,30	129,80
520	Masculino	B+	29	100,79	142,47	153,85	107,00	110,10
521	Feminino	AB+	44	100,35	122,20	133,58	186,00	188,10
522	Feminino	B+	36	95,62	67,63	135,76	109,50	77,20
523	Masculino	B+	47	97,37		127,79	91,70	106,50
524	Feminino	B+	28	100,63		139,51	190,70	183,30
525	Masculino	B-	31	98,62		151,38	103,90	119,50
526	Masculino	B+	44	89,26		81,60	100,60	123,50
527	Masculino	B+	38	96,32		112,37	92,00	113,70
528	Masculino	B+	39	94,48		97,20	92,00	113,70
529	Masculino	B+	30	86,62		114,10		
530	Masculino	B+	40	95,94		73,24	113,20	141,00
Média			39,30	94,00	122,28	101,51	99,40	108,75
Mediana			38,00	98,35	106,05	98,44	95,40	102,30
DP			12,08	15,70	66,75	29,44	34,02	37,52

APÊNDICE B: Manuscrito submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Thrombosis Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: TR-D-19-00884R1

Title: von Willebrand factor and factor VIII in a healthy Brazilian population. Association with ABO blood groups

Article Type: Letter to the Editors-in-Chief

Section/Category: Platelets and Cell Biology

Corresponding Author: Professor Sergio Paulo Bydlowski, M.D.,Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo Medical School

First Author: Daniela Valadares

Order of Authors: Daniela Valadares; Rosangela R Soares; Giovanna Di Giacomo; Tânia Rocha; Cadiele O Reichert; Sergio Paulo Bydlowski, M.D.,Ph.D

Keywords: von Willebrand factor; ABO blood groups, VWF propeptide; factor VIII

Abbreviations: VWF:Ag, von Willebrand factor antigen; VWFpp, von Willebrand factor propeptide; VWF:CB, von Willebrand factor collagen binding; VWF:RCo, von Willebrand factor Ristocentin cofactor; FVIII:C, factor FVIII activity

von Willebrand factor (VWF) is an adhesive glycoprotein synthesized in megakaryocytes and endothelial cells [1] whose function is to mediate platelet adhesion and aggregation in events of vascular injury [2]. It is also a classical marker of endothelial dysfunction, presenting clinical significance in vascular diseases and hemostatic disturbances [3].

VWF is synthesized as pre-pro-VWF, a precursor which contains a signal peptide, a propeptide (VWFpp), and a mature subunit. During its synthesis the signal peptide is removed and dimers are formed. VWFpp is then cleaved and, in the Golgi complex, the VWF dimers are grouped in multimers [4]. Both molecules are secreted in equimolar amounts, but have different half-lives [4]. VWF plasma levels are a result of protein secretion and clearance. VWF clearance is mediated by ADAMTS-13, which cleaves VWF into smaller fragments [4]. VWF is also a carrier protein for FVIII, making FVIII less susceptible to proteolytic degradation [5].

VWF plasma levels are influenced by several factors, such as age, gender, pregnancy, race and ABO blood group. ABO blood system antigens are complex carbohydrate molecules found on the surface of red blood cells as well as in other cells such as platelets. These antigens are produced by glycosyltransferases encoded by the ABO gene. A and B antigens are synthesized by transferases A and B, which add an N-acetylgalactosamine or a galactose, respectively, to a precursor carbohydrate known as the H antigen. In subjects of AB group both structures are found.

In contrast, the O allele is enzymatically inactive, meaning that in blood type O individuals only the H antigen is found. ABO blood group exerts major influence on hemostasis particularly by influencing the levels of VWF and FVIII, which are both recognized prothrombotic risk factors and may be associated with several diseases [6,7]. Increased levels of VWF and FVIII have been observed in non-O blood type (A, B and AB) individuals, compared with those with O blood type [6]. It has been suggested that the presence of carbohydrates similar to the blood group antigens A, B and H on the VWF structure protects it from proteolytic degradation by ADAMTS-13 and may affect VWF clearance and, indirectly, FVIII levels [8].

Unlike VWF, VWFpp seems unaffected by the ABO blood system. In fact, VWFpp has been proposed as a more sensitive marker for the evaluation of endothelial cell dysfunction as it does not bind to the subendothelial connective tissue or platelets and has a shorter half-life [9].

As a result, VWFpp levels could more accurately reflect endothelial VWF secretion [9]. Studies on the relationship between ABO blood systems, VWF and FVIII in healthy Brazilian individuals are almost lacked. Here we described, in a Brazilian healthy population, the levels of VWF:Ag, VWFpp, and VWF and FVIII activities and their association with ABO blood types.

A cross-sectional observational study was performed in 430 healthy blood donors. The study population included 246 males (57%) and 184 females (43%) between 17 and 69 years old (mean, 38 years). This work was approved by the Institutional Research Ethics Committee (# 1.754.118). All subjects signed an informed consent.

Blood was drawn from the antecubital vein in sodium citrate (1:10, v/v). ABO blood type was determined by hemagglutination on an Immucor Neo Iris® analyzer. Subjects were initially grouped according to blood types in groups A (32%), B (19%), AB (7%) and O (42%) and subsequently in groups O (41%) and non-O (59%).

VWF:Ag was measured with a Stago®: Asserachrom VWF:Ag assay kit (Asnières-sur-Seine, France). VWFpp was measured by ELISA method using Anti-VWF propeptide monoclonal antibody and HRP-conjugated detecting antibody (Cell Science® CLB-Pro 35 and CLB-Pro 14.3-HRP, Canton, USA). VWF activity was determined by ristocetin cofactor (VWF:RCo) and collagen binding (VWF:CB). VWF:RCo and FVIII activity were determined on an ACL TOP coagulation analyzer (Instrumentation Laboratories®, Bedford USA). VWF:CB was determined by ELISA using type III collagen (Abcam™).

The Kolmogorov-Smirnov test was used to characterize data distribution. Student's t-test and the non-parametric Mann–Whitney U test were used to compare the quantitative variables between groups (O and non-O). KruskalWallis test was used to compare groups (A, B, AB and O). Spearman and/or Pearson correlation were used for analysis between variables. Multivariate linear regression was used to establish the relationship between variables in different groups. $P \leq 0.05$ values were considered significant. A SPSS software (IBM SPSS version 22.0) was used for all analyses.

VWF:Ag, VWFpp, VWF:RCo, VWF:CB and FVIII:C were not different between males and females (data not shown), similarly to most reports [6,8].

VWF:Ag, VWF:CB, VWF:RCo and FVIII:C were lower in blood type O when compared with the other blood types (A, B and AB) but no differences were observed among A, B, and AB groups (data not shown). There were no significant ABO-related differences in VWFpp levels among the four phenotypes. Therefore, data on VWF and FVIII were here assembled in O and non-O groups.

VWF antigen and activities, and FVIII:C levels, all were significantly lower in blood type O individuals compared to non-O blood type (Table 1), confirming previous studies in other populations [6,8]. These results may be due to the difference in glycosylation patterns between O and non-O individuals. It is known that glycosylation accounts for 19% of VWF weight, which includes ABO determinants [4]. This carbohydrate moiety affects VWF susceptibility to the proteolytic action of ADAMTS13, which is described as being faster in blood group O individuals, which would translate into a faster rate of VWF cleavage in low molecular weight multimers and consequently on VWF clearance [10]. This may also explain the difference in VWF activity between O and non-O individuals. No significant ABO-related difference was found in VWFpp levels between O and non-O individuals (Table 1), in agreement with previous studies [8,9].

Our findings are supported by other studies [6,8] that suggest that changes in FVIII levels are most likely dependent on changes in VWF levels, since FVIII and VWF form a complex which protects FVIII from premature degradation.

Odds ratio (OR) were used to test a possible association between serum VWF:Ag in O and non-O blood groups (Table 1). The median was used as the cutoff point to divide the biochemical parameters. Interestingly, our results demonstrated that blood type O individuals are 2 times more likely to have decreased serum VWF:Ag (IU / dL) (OR: 2.33; IC: 1.519 - 3.567) compared to non-O individuals. Moreover, similar results were found for VWF:CB (%) (OR:2.95; IC: 1.929 - 4.517); VWF:RCo (%) (OR: 1.59; IC: 1.035 - 2.451), and FVIII:C (%) (OR:2.81; 1.478 - 5.348), showing that blood type O individuals are also likely to have a decrease in these parameters as opposed to non-O individuals. This is particularly relevant for the diagnosis of type I von Willebrand disease (VWD) as some subjects may have borderline VWF levels (35-50 IU / dL) due to their blood type.

While reduced levels of VWF:Ag in blood type O individuals has been associated with an increase in VWF clearance, in healthy individuals FVWpp did not vary between different blood types, as ABO antigens are not found in its structure [4,10].

Using univariate regression analysis it has been shown that VWF:Ag significantly influences VWF:RCo in O and non-O individuals (Fig. 1B,C), and also in group A ($R^2 = 0.131$; $p=0.008$). It was also observed that VWF:Ag significantly influences VWF:CB levels in O individuals (Fig. 1F) as well as in group B ($R^2 = 0.098$; $p=0.03$), but not in non-O individuals (Fig. 1E). The results of the univariate regression analysis also showed that VWF:Ag significantly influences FVIII:C levels in subjects of O group (Fig. 1I) but has no influence in those of non-O group (Fig. 1H). The reason for this behavior among groups and between O and non-O individuals remains to be investigated.

In conclusion, our results show an association of ABO blood groups and VWF and FVIII in a Brazilian population. Specifically, a decrease in VWF antigen and activities, whether determined by ristocetin cofactor or collagen binding, and FVIII activity in O individuals. We have also shown that VWF:Ag significantly influences VWF:CB in B and O subjects, and FVW: RCo in all individuals, except B and AB groups. VWF:Ag significantly influences FVIII:C levels in all individuals. The reason for this behavior remains to be investigated, although the presence or lack of A and/or B antigen in VWF molecule could be responsible for the observed results. VWFpp was shown to not be influenced by the ABO blood system which reinforces its importance as a potential biomarker which could be used in parallel to VWF:Ag in clinical practice.

Author Contributions

Conceptualization, R.R.P.S., and S.P.B.; writing-original draft preparation, D.F.V., R.R.P.S., G.D.G., T.R., and C.O.R.; writing-review and editing, D.F.V., C.O.R., and S.P.B.; supervision, S.P.B.; funding acquisition, R.R.P.S. and S.P.B.

Acknowledgements and funding

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Fluidos Complexos (INCT-FCx); and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT-Regenera), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), all from Brazil.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Table 1. VWF antigen, propeptide and activities, and FVIII:C in healthy individuals of O and non-O blood types

	Type non-O (N = 254)			Type O (N = 176)			<i>P</i> value ⁽¹⁾	<i>P</i> value ⁽²⁾
	<i>Mean ± SD</i>	<i>OR</i>	<i>CI:95%</i>	<i>Mean ± SD</i>	<i>OR</i>	<i>CI:95%</i>		
VWF: Ag (UI/dL)	96 ± 15	0.47	0.639 — 0.864	89 ± 15	2.33	1.519 — 3.567	<0.001	<0.001
VWF: pp (%)	108 ± 40	1.00	0.622 — 1.573	106 ± 36	0.92	0.521 — 1.864	0.965	0.609
VWF: CB (%)	107 ± 27	0.66	0.559 — 0.781	93 ± 27	2.95	1.929 — 4.517	<0.001	<0.001
VWF: RCo (%)	107 ± 27	0.41	0.342 — 0.644	85 ± 20	1.59	1.035 — 2.451	0.034	<0.001
FVIII: C (%)	113 ± 28	0.63	0.480 — 0.850	92 ± 27	2.81	1.478 — 5.348	0.001	<0.001

Data are presented as mean ± SD

(1) *P* value= distribution of categorical variables by Chi square Test.(2) *P* value = comparison between the averages *Type non-O* and *Type O* groups by Whitney U Test. OR: Odds Ratio; CI: 95%: Confidence Interval 95%; N = number of individuals

FIGURE 1 Influence of VWF:Ag on VWF:RCo (A-C), VWF:CB (D-F), and FVIII:C (G-I) activity levels in individuals of groups O and non-O. Univariate regression analysis.

REFERENCES

1. Lopes AA, Peranovich TM, Maeda NY, Bydlowski SP. Differential effects of enzymatic treatments on the storage and secretion of von Willebrand factor by human endothelial cells. *Thromb Res.* 2001;101:291-297.
2. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, Natale F, Bianchi R, Crisci M, et al. The role of von Willebrand factor in vascular inflammation: from pathogenesis to targeted therapy. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5620314.
3. Lopes AA, Maeda NY, Bydlowski SP. Abnormalities in circulating von Willebrand factor and survival in pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1998;105:21-26.
4. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood.* 2015;125:2019-2028.
5. Soares RP, Chamone DA, Bydlowski SP. Factor VIII gene inversions and polymorphisms in Brazilian patients with haemophilia A: carrier detection and prenatal diagnosis. *Haemophilia.* 2001;7:299-305.
6. Song J, Chen F, Campos M, Bolgiano D, Houck K, Chambless LE, Wu KK, Folsom AR, Couper D, Boerwinkle E, Dong JF. Quantitative influence of ABO blood groups on factor VIII and its ratio to von Willebrand factor, novel observations from an ARIC study of 11,673 subjects. *PLoS One.* 2015;10:e0132626.
7. Nascimento NM, Bydlowski SP, Soares RP, de Andrade DC, Bonfá E, Seguro LP, Borba EF. ABO blood group in primary antiphospholipid syndrome: influence in the site of thrombosis? *J Thromb Thrombolysis.* 2015;40:374-8.
8. Albáñez S, Ogiwara K, Michels A, Hopman W, Grabell J, James P, Lillicrap D. Aging and ABO blood type influence von Willebrand factor and factor VIII levels through interrelated mechanisms. *J Thromb Haemost.* 2016;14:953-63.
9. Haberichter SL. von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. *Blood.* 2015;126:1753-61.
10. O'Sullivan JM, Aguila S, McRae E, Ward SE, Rawley O, Fallon PG, Brophy TM, Preston RJ, Brady L, Sheils O, Chion A, O'Donnell JS. N-linked glycan truncation causes enhanced clearance of plasma-derived von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2016;14:2446-57.

*E-MAIL ADDRESS: SPBYDLOW@USP.BR (S.P. BYDLOWSKI)

ANEXO

ANEXO A: Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO DO SISTEMA SANGÜÍNEO ABO COM O FATOR DE VON WILLEBRAND E O SÊU PRO-PEPTÍDEO (FVW:AGII)

Pesquisador: Sergio Paulo Bydlowski

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59438016.8.0000.0088

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.754.118

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto é detalhada e clara o suficiente para a compreensão de seus objetivos e métodos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eventual influência dos fatores dos grupos sanguíneos do sistema ABO sobre o fator de Von Willebrand, envolvido na hemostasia, a fim de esclarecer se o pró-peptídeo desse fator está livre dessa influência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo utilizará material previamente colhido em outros projetos, não ocasionando novas intervenções nem riscos aos doadores. Não há benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem ótimas condições técnicas de obtenção de dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A dispensa de apresentação de TCLE justifica-se pela preservação da confidencialidade e por não propor novas intervenções, uma vez que o estudo é retrospectivo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto tem todas as condições de ser aprovado pela comissão.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.754.118

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776444.pdf	01/09/2016 13:17:19		Aceito
Outros	cadastro_online_final.pdf	01/09/2016 13:16:59	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_final.pdf	01/09/2016 13:15:33	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	16/08/2016 12:13:41	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 30 de Setembro de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)