NATÁLIA MASTANTUONO NASCIMENTO

Atividade enzimática da ADAMTS-13 e padrão de fragmentação do fator de von Willebrand em crianças hipoxêmicas portadoras de cardiopatias congênitas

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: Profº. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Natália Mastantuono

Atividade enzimática da ADAMTS-13 e padrão de fragmentação do fator de von Willebrand em crianças hipoxêmicas portadoras de cardiopatias congênitas / Natália Mastantuono Nascimento. -- São Paulo, 2010.

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: Sergio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.ADAMTS-13 2.Anóxia 3.Trombose 4.Fator de von Willebrand 5.Subunidades do Fator de von Willebrand 6.Cardiopatias congênitas

USP/FM/DBD-287/10

*À Deus,
por sempre iluminar os
meus caminhos*

*Esta dissertação é dedicada à minha família,
meu alicerce,
presença permanente em minha vida.*

*Aos meus pais, **Renê** e **Elisabete**, que muitas vezes
abdicaram de suas vontades para que eu chegasse até
aqui, por sempre investirem na minha educação, por
me apoiarem em tudo, e principalmente por seu amor,
minha eterna gratidão.*

*Aos meus queridos irmãos, **Fábio** e **Bruno**, meus
motivos de alegrias, pelo carinho constante.*

*Aos meus avós, **Lucrezia** e **Giuseppe**, por seus
ensinamentos, pelo apoio nos momentos mais difíceis,
e principalmente pelo carinho.*

*Ao meu grande amor, **Paulo**, por estar sempre ao meu
lado, me apoiando e incentivando, por me fazer mais
feliz a cada dia, e principalmente por seu amor e
carinho.*

*A família é a base da sociedade e o lugar onde as
pessoas aprendem pela primeira vez os valores que
lhes guiam durante toda sua vida.*

Papa João Paulo II

À queridíssima amiga Rô, Dra. Rosângela de Paula Silva Soares, minha tutora dentro do laboratório, por seu apoio incondicional desde a escrita do projeto, padronização das técnicas e até a leitura final deste trabalho, por seus conselhos, seu exemplo de profissionalismo e dedicação aos seus ideais, por suas palavras e gestos de carinho e por você ser a pessoa fantástica que é! Meus sinceros agradecimentos a você, querida amiga, que me ensinou a trabalhar com ética e dedicação, e o seu exemplo ajudou que despertasse em mim o “bichinho da pesquisa”. Tenho certeza que levarei os seus ensinamentos para o resto da vida. Acredito que não existem palavras o suficiente para expressar o meu agradecimento.

As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski**, pela orientação, pela oportunidade de realizar de um sonho, pela confiança em mim depositada, e por todo o apoio e sugestões a este estudo.

À querida amiga **Naná, Dra. Nair Yukie Maeda**, por todas as sugestões dadas não só a este trabalho, como principalmente para o meu crescimento profissional. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e pelas boas risadas nos bons momentos. Pelo exemplo de profissionalismo e dedicação a pesquisa. Mas acima de tudo, pela nossa amizade!

Ao **Prof. Dr. Antônio Augusto Barbosa Lopes**, por todo o apoio durante este estudo, por ser um exemplo de professor e minha inspiração didática, e principalmente por nossa amizade.

À amiga **Aninha, Dra. Ana Maria Thomás**, pela seleção dos pacientes, pelos agendamentos de coleta, por ter me apresentado a pessoas importantes para o desenvolvimento deste estudo, e principalmente por nossa amizade.

À **Dra. Solange Gimenez Copolla**, por todo auxílio prestado durante as minhas idas à REC-1, por seu carinho e atenção.

Às queridas amigas **Nina (Eponina Nunes de Mello Bastos) e Janete (Janete Ferreira Hironaka)**, pelo auxílio imprescindível durante as coletas, pelo exemplo de dedicação e carinho aos pacientes, e principalmente por nossa amizade.

À **equipe de enfermagem** da enfermaria do quinto andar e da REC-I do InCor pelo auxílio prestado durante as coletas.

Aos membros da banca de qualificação, **Dra. Juliana Pereira, Dra. Vânia Maris Morelli e Prof. Dr. Antônio Augusto Barbosa Lopes** por todas as importantíssimas sugestões feitas a esta dissertação.

À querida **Dra. Maria Aparecida Basile** por todas as suas sugestões, pelo exemplo de amor ao ensino e por tudo o que aprendi durante sua disciplina e estágio supervisionado, e claro, por nossa amizade.

À amiga **Cleidinha, Cleide Menarbin Appolonio** por sua importantíssima ajuda na finalização deste trabalho, e principalmente por seu carinho.

À querida amiga **Ná, Edna Ferreira da Silva**, minha segunda mãe, por sempre me encorajar nos momentos mais difíceis da vida, por suas constantes palavras de carinho, por se dedicar ao máximo para que eu tivesse uma excelente educação, e principalmente por seu carinho e amor.

Aos queridos amigos **Kelly Bonamini** e **Gustavo Barroso**, que acompanharam esta jornada desde o início, pelas constantes palavras de conforto e carinho, e por nossa amizade.

Aos meus dois companheiros de aprendizagem na bancada, **João Henrique** e **Fernando Vilela**, pelo carinho e amizade.

À querida **Bruninha, Bruna Trevisani**, que me trouxe novas energias nos momentos mais tensos da escrita desta dissertação, pelo seu carinho e por nossa amizade.

Ao **Magna, Antônio Carlos Magnanelli**, por ter me passado um pouco do seu conhecimento sobre cálculos e preparo de soluções e por suas sugestões.

Ao querido **Joel, Joel Marques Bispo**, por estar sempre de prontidão para me auxiliar no que fosse preciso, pelo seu carinho e por nossa amizade.

Aos amigos do laboratório: **Adriana, Andréia, Bruno, Carola, Carolina, Débora, Denise, Felipe, Jorge, Karoline, Linah, Luciana, Pâmela e Rita**, pelo carinho.

À **FAPESP**, financiadora deste projeto de pesquisa, processo nº 05/59890-9, e à **CAPES** pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Aos **pacientes**, meus pequeninos... sem a colaboração dos quais seria impossível a realização deste estudo.

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente deste estudo.

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.....

Antoine Saint-Exupéry

*Ao desejo de crescimento, deve aliar-se
o esforço contínuo e o devotamento às
idéias renovadoras.*

Joanna de Ângelis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Fator de von Willebrand (FVW).....	2
1.2 ADAMTS-13 (<i>a <u>d</u>esintegrin-like and <u>m</u>etalloprotease with <u>t</u>hrombospondin type I motif</i>).....	7
1.3 Disfunção endotelial e hipóxia.....	13
1.4 Cardiopatias congênitas cianogênicas.....	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 CASUÍSTICA.....	22
3.1 População estudada.....	22
3.2 Grupos de pacientes	25
3.3 Desenho do estudo	25
3.4 Aspectos éticos	26
4 MÉTODOS.....	28
4.1 Coleta de amostras	28
4.1.1 Coleta com anticoagulante.....	28
4.1.2 Coleta com anticoagulante e inibidores de protease	28
4.2 Procedimentos laboratoriais.....	28
4.2.1 Reagentes.....	28
4.2.2 Determinação do antígeno do fator de von Willebrand (FVW:Ag)	29

4.2.3 Determinação da atividade da protease ADAMTS-13	29
4.2.3.1 Preparo da membrana de diálise	30
4.2.3.2 Preparo da amostra	30
4.2.3.3 Ensaio da atividade da protease ADAMTS-13.....	31
4.2.3.4 Avaliação da presença de inibidores da ADAMTS-13....	32
4.2.4 Análise das subunidades do FVW plasmático	33
4.2.4.1 Imunoprecipitação do FVW plasmático.....	33
4.2.4.2 Determinação de proteínas do imunoprecipitado.....	35
4.2.4.3 Composição das subunidades do FVW plasmático – <i>Western immunoblotting</i>	36
4.2.4.4 Análise densitométrica das subunidades do FVW	38
4.2.5 Variáveis laboratoriais gerais	39
4.3 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	42
5.1 Variáveis laboratoriais gerais	49
5.2 Saturação periférica de oxigênio	53
5.3 Análise quantitativa do fator de von Willebrand (FVW:Ag).....	55
5.4 Análise funcional da protease ADAMTS-13	57
5.5 Análise da presença de inibidores da protease ADAMTS-13.....	59
5.6 Análise da composição das subunidades do FVW plasmático	60
5.7 Análise das possíveis correlações entre a saturação periférica de oxigênio, atividade da ADAMTS-13 e FVW	67
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	88
8 ANEXOS	91
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE ABREVIATURAS

<	Menor que
≥	Maior ou igual
$\alpha\text{IIb}\beta 3$	Integrina plaquetária $\alpha\text{IIb}\beta 3$
aa	Aminoácidos
ADAM	Uma desintegrina e metaloproteinase
ADAMTS	Uma desintegrina e metaloproteinase com domínios Trombospondina
CEC	Circulação extra-corpórea
CUB	Complemento C1r/C1s, <i>urchin</i> , <i>Bone morphogenetic protein 1</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido edético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Imunoensaio enzimático
ET-1	Endotelina-1
FVIII	Fator anti-hemofílico; Fator VIII da coagulação
FVW	Fator de von Willebrand
FVW:Ag	Antígeno do fator de von Willebrand
GP1b	Glicoproteína plaquetária 1b
Kb	kilobase
kDa	kilodaltons
NEM	N-etilmaleimida

NO	Óxido nítrico
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1
PDGF	Fator de crescimento derivado da plaqueta
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
SDS	Sulfato de dodecil sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SUH	Síndrome urêmica hemolítica
TBS-T	Tampão Tris salina com Tween-20
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático da síntese do FVW	4
Figura 2.	Diagrama esquemático da estrutura da ADAM, ADAMTS e ADAMTS-13	8
Figura 3.	Diagrama esquemático da estrutura da ADAMTS-13	9
Figura 4.	Diagrama esquemático das proteínas FVW e ADAMTS-13, com seus respectivos domínios, a localização de ligação da ADAMTS-13 no FVW e a forma como a ADAMTS-13 efetua a clivagem fisiológica do FVW	10
Figura 5.	Etapas da purificação do FVW plasmático	35
Figura 6.	Variáveis hematócrito, hemoglobina e plaquetas dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia	51
Figura 7.	Saturação periférica de oxigênio (SpO_2) nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia	54
Figura 8.	Concentração antigênica do FVW (FVW:Ag) em média e o desvio padrão nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos	

momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia	56
Figura 9. Atividade da ADAMTS-13 em média e o desvio padrão nos pacientes portadores de cardiopatias congenitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia	58
Figura 10. <i>Western immunoblotting</i> representativo da composição das subunidades do FVW plasmático em controles (<i>pool</i>) e dos pacientes portadores de cardiopatias congenitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias	60
Figura 11. Densidade normalizada da subunidade principal do FVW (225 kDa) em pacientes portadores de cardiopatias congenitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias	62
Figura 12. Densidade normalizada do fragmento de 176 kDa do FVW em pacientes portadores de cardiopatias congenitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias	63
Figura 13. Densidade normalizada do fragmento de 140 kDa do FVW em pacientes portadores de cardiopatias congenitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias	64

Figura 14. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 (%) em função da saturação periférica de oxigênio SpO ₂ (%) nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, considerando os grupos A e B	68
Figura 15. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da concentração do FVW:Ag, nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, considerando os grupos A e B	70
Figura 16. Análise individual da densidade normalizada do fragmento 176 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13, considerando os grupos A e B	72
Figura 17. Análise individual da densidade normalizada do fragmento 140 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13, considerando os grupos A e B	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica	23-24
Tabela 2. Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pré (basal), e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	44
Tabela 3. Pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 48 horas de cirurgia, quantidade de dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento pós 48 horas de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	46
Tabela 4. Pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 30 dias de cirurgia, quantidade de dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento pós 30 dias de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	47
Tabela 5. Frequência em porcentagem da tipagem sanguínea do grupo ABO dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas dos grupos A e B.	52
Tabela 6. Frequência em porcentagem da presença de inibidores de ADAMTS-13 nos momentos Pré, Pós 48 horas e Pós 30 dias nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas dos grupos A e B.	59

Tabela 7. Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pré (basal), e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	92-93
Tabela 8. Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 48 horas de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	94-95
Tabela 9. Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 30 dias de cirurgia, e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)	96-97
Tabela 10. Determinação do antígeno do FVW (FVW:Ag)	98
Tabela 11. Determinação da atividade da ADAMTS-13	99
Tabela 12. Avaliação da presença de Inibidores de ADAMTS-13	100
Tabela 13. Determinação de proteínas do imunoprecipitado do FVW	101
Tabela 14. Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pré (basal)	102
Tabela 15. Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pós 48 horas de cirurgia	103
Tabela 16. Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pós 30 dias	104

RESUMO

Nascimento, NM. Atividade enzimática da ADAMTS-13 e padrão de fragmentação do Fator de von Willebrand em crianças hipoxêmicas portadoras de cardiopatias congênitas [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

A hipóxia é capaz de alterar muitos mecanismos bioquímicos nas células endoteliais. Dentre eles, a indução da expressão endotelial de moléculas de adesão, como o fator de von Willebrand (FVW) que, em resposta ao estímulo, é secretado em sua forma mais ativa na interação com as plaquetas, o que pode resultar em trombose. Nas condições fisiológicas, o padrão multimérico do FVW no plasma é essencialmente determinado pela ADAMTS-13 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina). Este estudo teve como objetivo verificar se a atividade da enzima ADAMTS-13, assim como as características do FVW relacionáveis a ela, poderiam estar alteradas na presença de hipoxemia comparativamente à condição de oxigenação normal. Este estudo longitudinal envolveu 56 pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, em idades entre um e sete anos, candidatos ao tratamento cirúrgico. Os pacientes foram avaliados no pré-cirúrgico (basal), no pós-operatório imediato (pós 48 horas) e após 30 dias de cirurgia, e foram divididos em dois grupos (A e B) baseado na saturação periférica de oxigênio (SpO₂) no momento pós 30 dias. Foram determinados o antígeno do FVW e a análise das suas subunidades, a atividade da ADAMTS-13 e a presença de inibidores da ADAMTS-13. Os pacientes de ambos os grupos apresentaram aumento significativo da SpO₂, da concentração antigênica do FVW e da atividade da ADAMTS-13 nos momentos pós 48 horas e pós 30 dias em comparação com o momento pré (basal). As densidades normalizadas da subunidade principal do FVW (225 kDa) e do fragmento de 176 kDa apresentaram

tendência ao aumento nos momentos pós 48 horas e pós 30 dias nos dois grupos. A razão entre a atividade da ADAMTS-13 e o FVW estava menor do que 1 no momento pós 48 horas, indicando consumo da enzima; entretanto, no momento pós 30 dias a razão fica 1:1, e o FVW se aproxima dos valores de referência. Verificamos ainda que 29% destes pacientes apresentaram inibidores contra a ADAMTS-13 no momento pré-operatório. Ainda explorando as variáveis SpO₂, FVW:Ag, atividade da ADAMTS-13 e a composição das subunidades do FVW, foi feito um estudo de correlação linear entre estas variáveis. Observamos uma baixa correlação entre a enzima ADAMTS-13 e o FVW:Ag, e da enzima com os fragmentos do FVW de 176 e 140 kDa, principalmente no grupo B. No grupo A, esta correlação no momento pós 48 horas mostrou tendência a ser negativa. A maioria dos pacientes apresentou melhoras na saturação periférica de oxigênio. O aumento das variáveis estudadas no pós-operatório imediato pode ter ocorrido em função da cirurgia, que provavelmente ocasionou um quadro de lesão endotelial com inflamação, indicando que pode existir um equilíbrio entre o FVW e a ADAMTS-13 em níveis fisiológicos. Entretanto, este equilíbrio pode ser quebrado quando ocorre aumento do FVW, provavelmente por consumo da enzima. Parece-nos, portanto, que a ADAMTS-13 pode funcionar como um mecanismo de proteção a estes pacientes com tendência à trombose.

Descritores: 1 - ADAMTS-13; 2 – Anóxia; 3 – Trombose; 4 - Fator de Von Willebrand; 5 - Subunidades do Fator de von Willebrand; 6 - Cardiopatias congênitas.

SUMMARY

Nascimento, NM. ADAMTS-13 enzymatic activity and Von Willebrand factor subunit proteolysis in children with cyanotic congenital heart disease [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Hypoxia has been shown to alter several biochemical mechanisms in endothelial cells. In addition, hypoxia induces the endothelial expression of adhesion molecules, including von Willebrand factor (VWF). Increased release of high-molecular-weight VWF multimers is associated with higher risk for thrombotic events. In physiological conditions, the multimeric pattern of plasma VWF is essentially determined by the action of ADAMTS-13 (a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 domains). The aim of this study was to investigate if ADAMTS-13 activity and VWF subunit fragments were altered by hypoxia in cyanotic congenital heart disease. Fifty-six patients (age 1 to 7 years) with cyanotic congenital heart disease admitted to the Heart Institute for heart surgery were included in this longitudinal study. Patients were evaluated before (baseline) corrective surgery, postoperative 48 hours and postoperative 30 days. Patients were classified in two groups (A and B) based on the peripheral oxygen saturation after 30 days surgery. VWF antigenic concentration, VWF subunit composition, ADAMTS-13 activity and presence of ADAMTS-13 inhibitors were determined. Peripheral oxygen saturation, VWF:Ag and ADAMTS-13 activity were all increased significantly in both groups, in postoperative 48 hours and postoperative 30 days in comparison with baseline moment. Normalized density of VWF main subunit (225 kDa) and proteolytic fragment with 176 kDa tended to increase in postoperative 48 hours and postoperative 30 days in both groups. The rate between ADAMTS-13 activity and VWF:Ag was lower than 1 in postoperative 48 hours, indicating of enzyme consumption; however, in the postoperative 30 days the rate was 1:1 and VWF:Ag values were near those of reference. 29% of patients presented

ADAMTS-13 inhibitors at the baseline moment. A study of correlation among variables as peripheral oxygen saturation, VWF:Ag, VWF subunit composition and ADAMTS-13 was done. It was observed that ADAMTS-13 correlated slightly positively with VWF:Ag and with VWF fragments 176 and 140 kDa, mainly in group B; in group A, the correlation at postoperative 48 hours tended to be negative. Most of the patients improved their peripheral oxygen saturation. The increased value of variables observed in postoperative 48 hours can be explained by the endothelial injury and inflammation caused by the surgery itself. This indicates an equilibrium between VWF:Ag and ADAMTS-13 in physiological conditions. However, this equilibrium could disappear when VWF is increased, probably by enzyme consumption. We conclude that ADAMTS-13 can act as a protective mechanism in these patients with thrombotic tendency.

Descriptors: 1 - ADAMTS-13; 2 – Anoxya; 3 – Thrombosis; 4 - von Willebrand factor; 5 – von Willebrand factor subunits; 6 - Congenital heart disease.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fator de von Willebrand (FVW)

O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica sintetizada pelos megacariócitos e células endoteliais. Está presente no plasma, no subendotélio, nos grânulos α das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. O gene do FVW está localizado no braço curto do cromossomo 12 (GINSBURG et al., 1985), e possui 178 kb e 52 exons (MANCUSO et al., 1989).

A síntese da molécula do FVW é complexa (Figura 1). Primeiramente é formado o pré-pró-FVW, que é um polipeptídeo precursor que contém 2813 aminoácidos (aa), de aproximadamente 360 kDa de massa molecular. O pré-pró-FVW consiste de um peptídeo sinalizador com 22 aa, o pró-peptídeo conhecido como von Willebrand antígeno II com 741 aa e aproximadamente 95 kDa de massa molecular e a subunidade madura do FVW que possui os domínios D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2 com 2050 aa e aproximadamente 250 kDa de massa molecular (BONTHRON et al., 1986). No retículo endoplasmático, o peptídeo sinalizador é removido, formando o monômero pró-FVW que sofre glicosilação para formação posterior de ligações dissulfídicas entre os domínios cisteína na região carboxila terminal, formando os dímeros. No complexo de Golgi, os dímeros formam multímeros que possuem de 500 kDa a 20000 kDa de massa molecular, através de ligações dissulfídicas envolvendo os domínios D3 da

região amino-terminal de cada subunidade madura (SADLER, 2005). O pró-peptídeo é então proteolizado e os multímeros são secretados para o plasma ou estocados em grânulos secretórios da célula endotelial chamados de corpúsculos de Weibel-Palade, ou das plaquetas denominados grânulos α (WAGNER, 1990). Os multímeros armazenados nos grânulos secretórios serão posteriormente secretados quando houver estímulo por *shear stress*, trombina, fibrina, hipóxia e/ou histamina (TSAI et al., 1991).

A subunidade madura do FVW possui os sítios de ligação: domínio D'-D3 para o FVIII circulante (fator anti-hemofílico; fator VIII da coagulação); domínio A1 para a glicoproteína plaquetária Ib (GPIb), para heparina e para o colágeno; domínio A2 para a ADAMTS-13 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina); domínio A3 para o colágeno e domínio C1 para a integrina plaquetária α IIb β 3 (SADLER, 2005).

Figura 1. Diagrama esquemático da síntese do FVW. Em A, pré-pró-FVW que consiste de um peptídeo sinalizador (aa 1-22), pró-peptídeo (aa 23-763) e subunidade madura (aa 764-2813). Os sítios de ligação nos domínios da subunidade madura são indicados para FVIII (D'-D3), GPIb (A1), heparina (A1), colágeno (A1 e A3), ADAMTS-13 (A2) e $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (C1). Em B, o peptídeo sinalizador foi clivado, são formadas ligações dissulfídicas entre os domínios cisteína de cada monômero, formando os dímeros. Em C, união dos dímeros através de ligações dissulfídicas entre os domínios D3 de cada dímero, formando os multímeros. Em D, o pró-peptídeo foi proteolizado e o multímero está pronto para ser secretado para o plasma ou ser armazenado em grânulos secretórios (SADLER, 2005 – modificado).

O FVW está envolvido na hemostasia primária e no processo de coagulação, no qual é o transportador do FVIII (RUGGERI; WARE, 1993). O FVW é importante na adesão de plaquetas aos locais de dano vascular, onde é mediador inicial na progressão da formação do trombo no local da lesão endotelial por meio de interações específicas com componentes da matrix extracelular e receptores de plaquetas. Sabe-se que os multímeros de alto peso molecular se ligam às plaquetas com mais afinidade (RUGGERI; WARE, 1993). No caso de lesão endotelial, os multímeros de FVW alteram sua conformação tornando-se aptos para interagir com as plaquetas circulantes através da ligação com a integrina plaquetária $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e glicoproteína Ib α e iniciar a adesão plaquetária (FERREIRA et al., 2000).

Fisiologicamente, o padrão multimérico do FVW no plasma é determinado pela ação de uma protease específica (FURLAN et al., 1998), que promove degradação limitada dos multímeros de alto peso molecular secretados pelas células endoteliais, gerando fragmentos de 140 e 176 kDa de massa molecular. Em condições patológicas, as formas de alto peso molecular do FVW podem estar aumentadas ou diminuídas. Na deficiência desta protease, multímeros de altíssimo peso molecular passam a ser detectados no plasma, tal como são secretados (MOAKE, 1998). A presença desses assim chamados multímeros supranormais, configura uma situação de predisposição à trombose, como por exemplo, na púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (TSAI, 2000).

A PTT é uma doença incluída no grupo das síndromes das microangiopatias trombóticas (MANNUCCI et al., 2001). É caracterizada pela

destruição intravascular de eritrócitos e plaquetas, resultando em anemia hemolítica, trombocitopenia e oclusões trombóticas em arteríolas e capilares, principalmente nos rins e no sistema nervoso, resultando em falência renal e disfunção neurológica por isquemia (RUGGENENTI; REMUZZI, 1996). A síndrome urêmica hemolítica (SUH) também está incluída no grupo das síndromes das microangiopatias trombóticas, sendo as manifestações clínicas as mesmas da PTT, porém os sintomas neurológicos são menos evidentes e a falência renal é mais proeminente. A distinção entre PTT e SUH é difícil já que as características clínicas e laboratoriais das duas doenças são muito parecidas (RUGGENENTI; REMUZZI, 1996).

Em 1982, Moake observou a presença de multímeros de alto peso molecular do FVW circulantes em pacientes com PTT, o que contribui para a patogênese da doença e hipotetizou que isto poderia ocorrer devido à falta de uma “depolimerase” (MOAKE et al., 1982). E a partir de então, vários estudos foram iniciados na tentativa de buscar uma resposta para esta hipótese (LAMMLE et al., 2005).

O FVW pode estar alterado quantitativa e qualitativamente em processos patológicos. Laboratorialmente, há ensaios que permitem a avaliação quantitativa do FVW através da determinação da proteína no plasma por método imunológico. Sua atividade biológica é analisada por testes de aglutinação plaquetária, utilizando o antibiótico ristocetina que facilita a aproximação entre as plaquetas. A análise qualitativa e semi-quantitativa é estudada pela caracterização do padrão multimérico e composição das subunidades, utilizando-se a técnica de *Western*

immunoblotting (LOPES; MAEDA, 1995; KRIZEK; RICK, 2000; CASONATO et al., 2007).

Quando os multímeros de alto peso molecular do FVW são secretados através de estímulo, sofrem proteólise fisiológica devido à ação de uma protease chamada ADAMTS-13.

1.2 ADAMTS-13 (a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif)

Em 2001, a protease que quebra fisiologicamente o FVW foi identificada como ADAMTS-13, uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina, dependente de Zn^{2+}/Ca^{2+} (SOEJIMA et al., 2001). Ela é o 13º membro da família ADAMTS de metaloproteinases, a qual está amplamente relacionada com a família ADAM (uma desintegrina e metaloproteinase). As proteinases ADAM são proteínas transmembrana do tipo I que possuem um peptídeo sinalizador e um pró-peptídeo que precedem o domínio metaloproteinase, o domínio desintegrina, repetições EGF (fator de crescimento epidérmico), domínio transmembrana e domínio citoplasmático (Figura 2). Os membros da família ADAMTS possuem as estruturas dos domínios similares às da ADAM, porém não possuem repetições de EGF e nem domínio transmembrana. Por outro lado, possuem um ou mais domínios trombospondina tipo 1. A ADAMTS-13 é a única protease da família ADAMTS que, além de conter os domínios característicos desta família, possui o domínio CUB (acrônimo de três proteínas através das quais o domínio foi caracterizado: subcomponentes do

Complemento C1r/C1s, fator de crescimento epidérmico *sea urchin*, *Bone morphogenetic protein 1* - Bmp1) (LEVY et al., 2005), e é este domínio que parece dar estabilidade à molécula, tornando-a menos suscetível a degradação extracelular (ZHOU et al., 2009).

Figura 2. Diagrama esquemático da estrutura da ADAM, ADAMTS e ADAMTS-13, representado por peptídeo sinalizador (S), pró-peptídeo (PROP), domínio metaloproteinase (MT), domínio desintegrina (DES), domínio rico em cisteína (CIS), fator de crescimento de epiderme (EGF), domínio transmembrana (TM), domínio citoplasmático (CIT), trombospondina-1 (TSP), domínio espaço (ESP) e domínio CUB (CUB) (LEVY et al., 2005).

O gene da ADAMTS-13 está no braço longo do cromossomo 9, contém 29 exons, aproximadamente 37 kb e 190 kDa de massa molecular (FUJIKAWA et al., 2001). A metaloproteinase (Figura 3) consiste de um peptídeo sinalizador, um pró-peptídeo, um domínio tipo metaloproteinase, um domínio desintegrina, repetições de trombospondina, um domínio rico em cisteína, um domínio espaço e 2 domínios CUB no C-terminal (ZHENG et al., 2001).

Figura 3. Diagrama esquemático da estrutura da ADAMTS-13, representado por peptídeo sinalizador (S), pró-peptídeo (P), domínio metaloproteinase (M), domínio desintegrina (D), domínio rico em cisteína (C), repetições de trombospondina (1-8), domínio espaço (E) e domínio CUB (CUB) (SADLER, 2008 – modificado).

Vários estudos têm demonstrado a importância do domínio espaço da protease na ligação com o FVW e também a importância do domínio metaloproteinase na proteólise do FVW (Figura 4), mas o mecanismo preciso ainda não foi determinado (GROOT et al., 2009).

O domínio rico em cisteína e o domínio espaço interagem com o domínio A2 do FVW (aa 1641 – 1658) e (aa 1659 – 1668), respectivamente, contribuindo assim para o reconhecimento do FVW pela ADAMTS-13 (SOEJIMA et al., 2003, GROOT et al., 2009). Após esta primeira ligação ocorre uma segunda, porém mais fraca entre o domínio desintegrina da ADAMTS-13 com os aa 1612 - 1614 do domínio A2 do FVW, com a função de fazer o posicionamento correto da molécula para a proteólise realizada pela enzima ADAMTS-13 (GROOT et al., 2009). E então, o domínio metaloproteinase cliva a ligação entre a tirosina 1605 e a metionina 1606 do FVW, gerando fragmentos de FVW de 176 e 140 kDa de massa molecular (SADLER, 2005; GROOT et al., 2009). Esta clivagem proteolítica é essencial para reduzir o tamanho dos polímeros do FVW para que continuem sendo funcionais para estancar um sangramento, mas não tão ativos a ponto de causar trombose nas pequenas arteríolas (ZHENG; SADLER, 2008; ZHENG, 2009). O domínio CUB e as repetições de trombospondina também são

importantes para o reconhecimento e clivagem do FVW, pois em estudos onde foram feitas deleções destes domínios observou-se que não ocorria a interação entre a metaloprotease e o FVW (ZHANG et al., 2007).

Figura 4. Diagrama esquemático das proteínas FVW e ADAMTS-13, com seus respectivos domínios, a localização de ligação da ADAMTS-13 no FVW e a forma como a ADAMTS-13 efetua a clivagem fisiológica do FVW. Em A, subunidade madura do FVW e a posição dos seus domínios. Em B temos a ampliação do domínio A2 do FVW mostrando os aminoácidos envolvidos no processo de ligação e proteólise: aa 1605-1606 ligando-se ao domínio metaloproteína (M) da molécula de ADAMTS-13, ressaltando-se que este domínio é o responsável pela clivagem do FVW, aa 1612-1614 ao domínio desintegrina (D), aa 1641-1658 ao domínio rico em cisteína (C), e finalmente aa 1659-1668 ligando-se ao domínio espaço (E). Em D, mostra-se o local da clivagem do FVW pela ADAMTS-13, que dará origem aos fragmentos de 140 e 176 kDa da subunidade do FVW (SADLER, 2005 – modificado; SADLER, 2008 - modificado).

A concentração antigênica da ADAMTS-13 no plasma de indivíduos saudáveis varia de 0,5 a 1 mg/L (GERRITSEN et al., 2001; SHELAT et al., 2006) e sua meia-vida *in vivo* é de 2 a 3 dias (FURLAN, 1999).

Até 2004, sabia-se que a ADAMTS-13 era expressa predominantemente no fígado, neste mesmo ano, alguns pesquisadores descobriram que a ADAMTS-13 também está presente nas plaquetas (SUZUKI et al., 2004) e em 2006, foi descoberto que esta metaloproteinase é expressa pelas células endoteliais (TURNER et al., 2006).

A ADAMTS-13 pode estar alterada qualitativa e quantitativamente devido a mutações no gene da ADAMTS-13 ou por produção de auto-anticorpos que inibem a atividade da protease, principalmente através da inibição da região rica em cisteína e domínio espaço (KLAUS et al., 2004).

A atividade biológica da ADAMTS-13 pode ser estudada laboratorialmente através de métodos que avaliam direta ou indiretamente as propriedades de clivagem do FVW. A partir de 2006, quando se conseguiu caracterizar e produzir anticorpos policlonais e monoclonais anti-ADAMTS-13 pôde-se começar a estudar a concentração antigênica da ADAMTS-13 (RIEGER et al., 2006; FEYS et al., 2006). A análise semi-quantitativa pode ser feita por métodos funcionais que utilizam FVW purificado (derivado do plasma ou recombinante) como substrato para a determinação da atividade da ADAMTS-13 plasmática, e a detecção da proteína clivada é baseada principalmente na mensuração da ligação residual do FVW ao colágeno comparado com a proteína intacta. Os métodos funcionais mais atuais utilizam substratos sintéticos que mimetizam

a porção do FVW que contém o sítio fisiológico de clivagem da ADAMTS-13 (TRIPODI et al., 2008), um destes métodos é o FRET, que utiliza o peptídeo sintético VWF73 quimicamente modificado para revelar sua fluorescência quando clivado pela ADAMTS-13 plasmática (KREMER et al., 2006). Um outro método, GST-VWF73-HIS, também utiliza o peptídeo sintético VWF73 marcado com glutathione S-transferase (GST) e histidina (HIS), quando o peptídeo é clivado pela protease, é reconhecido por um anticorpo monoclonal marcado com peroxidase (KATO et al., 2006). Um terceiro método utiliza um peptídeo recombinante conjugado com uma peroxidase no N-terminal e uma biotina no C-terminal, HRP-VWF78-Biotina, quando clivado pode ser quantificado através da peroxidase residual (WU et al., 2006). Os métodos que utilizam peptídeos sintéticos como substrato parecem ser os mais adequados para mensurar a ADAMTS-13 em casos de baixa atividade da protease (0-5% de atividade de ADAMTS-13), porém, o método baseado na ligação do colágeno residual possui boa sensibilidade e reprodutibilidade, além do que não necessita de reagentes especiais, como os peptídeos sintéticos tornando seu custo mais baixo. Somando-se a estas características, o método de ligação ao colágeno residual nos dá a possibilidade de rastrear a presença de inibidores da protease (TRIPODI et al., 2008). Existe também a possibilidade de análise qualitativa e semi-quantitativa da ADAMTS-13, que pode ser realizada através da caracterização do padrão multimérico, analisando a presença ou não de multímeros de alto peso molecular do FVW, utilizando-se a técnica de *Western immunoblotting*. O estudo semi-qualitativo também pode ser

realizado através da visualização de cordões de multímeros de alto peso molecular de FVW no sobrenadante de cultura celular de célula endotelial, utilizando-se a microscopia eletrônica (TRIPODI et al., 2004).

Foi observado que a alta concentração do FVW está associada à diminuição da ADAMTS-13 no plasma, por exemplo, em casos como inflamação crônica ou infusão de desmopressina (MANNUCI et al., 2004). Esta relação inversa entre FVW e ADAMTS-13 pode ter implicações clínicas, pois altos níveis de FVW representam risco para doença cardiovascular e se associado à diminuição da ADAMTS-13, a contribuição para o aumento do risco pode ser ainda maior.

1.3 Disfunção endotelial e hipóxia

As células endoteliais formam a camada íntima dos vasos sanguíneos, sendo assim, estão em contato direto com o sangue. Estas células respondem a mudanças ocorridas no sangue, tais como a variação da tensão de oxigênio (O_2).

O nível de O_2 pode estar aumentado (hiperóxia) ou diminuído (hipóxia). Este nível é determinado através de quimiorreceptores celulares especializados que regulam a ventilação e a perfusão (MICHIELS, 2004).

O endotélio em sua forma normal possui características anticoagulantes, sendo dotado de superfície lisa, com propriedades antiaderentes, antiagregantes e antitrombóticas. As células endoteliais são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e mediadores

vasoativos que regulam as propriedades físicas e bioquímicas dos vasos (MICHIELS et al., 2000).

Alguns estímulos têm sido identificados como ativadores do desequilíbrio do endotélio, como a hipóxia, a inflamação e o *shear stress* (COOL et al., 2005). Estes estímulos ativam a célula endotelial e a célula endotelial ativada tem como uma de suas características induzir a exocitose de sua vesícula de estoque chamada corpúsculo de Weibel-Palade.

O corpúsculo de Weibel-Palade é somente encontrado nas células endoteliais, e é altamente organizado morfológicamente. Esta vesícula de estoque armazena algumas substâncias: endotelina-1 (ET-1), óxido nítrico (NO), serotonina, tromboxane-A₂, prostaciclina, selectina-P, trombomodulina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) e fator de von Willebrand (FVW) (BUDHIRAJA et al., 2004, BARRETO et al., 2005), que são secretadas por exocitose quando a célula é estimulada por agonistas, sendo que a maioria destes são mediadores de trombose e inflamação, como por exemplo, trombina, epinefrina e vasopressina. Estes agonistas conduzem a célula endotelial a uma via de ativação intracelular, o que leva ao aumento do cálcio citoplasmático, a vesícula então se aproxima da membrana celular fundindo-se a ela, fazendo com que a membrana da vesícula seja rompida e o seu conteúdo seja secretado (RONDAIJ et al., 2006).

Acredita-se que a liberação destes elementos culmina com a perda das propriedades antiaderentes, antiagregantes e antitrombóticas que o

endotélio possui, resultando, portanto, em desvio para um estado pró-agregante, pró-trombótico e proliferativo (COOL et al., 2005).

1.4 Cardiopatias congênitas cianogênicas

As cardiopatias congênitas são defeitos frequentes em recém-nascidos, ocorrendo em aproximadamente 0,8% das crianças (PERLOFF et al., 2001). Atualmente, com a melhora das técnicas em cirurgia cardíaca, aproximadamente 85% destas crianças alcançam a vida adulta (LOVELL, 2004).

Os portadores de cardiopatia congênita cianogênica possuem um *shunt* intra-cardíaco, de direita para esquerda, e devido a esta alteração anatômica, eles vivem em condição de hipoxemia crônica. Uma das consequências que a hipoxemia crônica pode causar além de ativar as células endoteliais é a diminuição da saturação de oxigênio nas artérias renais, induzindo a produção de eritropoetina pelas células do interstício da cortical renal (GIDDING; STOCKMAN, 1988).

A eritropoetina, um hormônio glicoproteico, estimula a medula óssea à eritropoese. Porém, a ferritina (estoque de ferro), que seria adequada em condições fisiológicas de eritropoese, torna-se insuficiente, levando à formação de microesferócitos, que não possuem a mesma elasticidade, resistência e poder de deformação que um eritrócito normal possui, o que resulta em dificuldade de passagem pelos capilares sanguíneos, além de possuírem menor concentração de hemoglobina e, portanto menor

capacidade de transportar o oxigênio (GIDDING; STOCKMAN, 1988). O aumento da massa eritrocitária nos cardiopatas cianóticos torna-os susceptíveis a distúrbios de coagulação (TEMPE; VIRMANI, 2002), pois a eritrocitose adicionada à perda de elasticidade, resistência e poder de deformação, levam ao quadro de hiperviscosidade.

A hiperviscosidade sanguínea pode levar à coagulação intravascular através da ativação e posterior agregação plaquetária, o resultado é o alto consumo dos fatores da coagulação, levando à hipocoagulabilidade e posterior sangramento. Além disso, a hipoxemia juntamente com a perfusão de sangue muito viscoso leva a uma disfunção hepática, o que acarreta em metabolismo anormal com síntese e função diminuídas dos fatores de coagulação sintetizados pelos hepatócitos. Estes fatos contribuem para o aumento de complicações hemorrágicas e/ou trombóticas no período pré e pós-operatório (AUI Y et al., 2009). Portanto, poderá haver a ocorrência de trombose e hemorragia simultaneamente. A microvasculatura pulmonar é o sítio mais comum para este fenômeno devido à grande ramificação dos capilares sanguíneos neste local (TEMPE; VIRMANI, 2002).

Todo este quadro torna o paciente cardiopata cianótico propenso a trombooses e sangramentos, o que pode dificultar a programação de tratamento cirúrgico. Além das anormalidades hemostáticas adquiridas durante o curso da doença, a própria cirurgia pode piorar este quadro já que ela pode vir ou não acompanhada de circulação extra-corpórea (CEC) (HARTMANN et al., 2006). Portanto, no período pós-operatório é fundamental que a homeostase seja mantida tanto quanto possível e para

tanto, se faz necessário estudar o que ocorre com os diversos fatores envolvidos.

A ADAMTS-13 é bastante estudada em casos de PTT e SUH, porém há escassez de dados sobre a regulação e a atividade desta protease no plasma, seja em situação fisiológica ou em outras patologias além de PTT e SUH. O estudo sobre ADAMTS-13 é relevante na condição de hipoxemia crônica, já que a associação entre hipóxia e alterações do FVW já é conhecida, pois estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que pacientes com hipoxemia crônica possuíam concentração plasmática de FVW aumentada (SOARES et al., 2005), porém não há dados na literatura que correlacionam as modificações no comportamento do FVW e sua enzima clivadora, ADAMTS-13, na condição de hipoxemia crônica. O interesse na melhor compreensão da relação entre o FVW e a ADAMTS-13 estimulou-nos a realizar o presente estudo, podendo então acrescentar dados sobre os distúrbios da hemostasia, os quais são comuns em pacientes com cardiopatia cianogênica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A hipótese geral deste estudo foi verificar se a atividade da enzima ADAMTS-13, assim como as características do FVW relacionáveis a ela, poderiam estar alteradas em presença de hipoxemia comparativamente à condição de oxigenação normal. A mesma foi ser testada em relação à hipótese de nulidade: ausência de alterações. Considerando-se que não há na literatura informações a partir das quais se possam prever alterações para mais ou para menos, foi testada simplesmente a hipótese de presença de alterações versus ausência, utilizando-se testes bicaudais em todos os procedimentos.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar, em crianças cardiopatas com insaturação de oxigênio (hipoxemia), a atividade da ADAMTS-13 e sua relação com o padrão de fragmentação da subunidade principal do FVW, bem como a presença de inibidores contra ADAMTS-13. A concentração circulante da proteína (antígeno do FVW) foi usada como um referencial, uma vez que espera-se aumento da mesma em condições de hipoxemia.
2. Verificar se as eventuais alterações anteriormente mencionadas (atividade da ADAMTS-13 versus fragmentação do FVW), se

modificam quando a mesma criança é retirada da condição de hipoxemia, isto é, após a correção cirúrgica do defeito cardíaco.

3. Verificar o comportamento das mesmas variáveis biológicas em crianças que persistem em hipoxemia, isto é, cujo defeito cardíaco, por questões anatômicas, não pode ser corrigido completamente (operações paliativas).

CASUÍSTICA

3 CASUÍSTICA

3.1 População estudada

Considerando o objetivo de se verificar o possível papel da hipóxia sobre o comportamento da ADAMTS-13, a casuística deste estudo foi constituída por pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas (N=56), com idades entre um e sete anos ($35,7 \pm 24,3$ meses; média $\pm$ D.P), candidatos ao tratamento cirúrgico, na Unidade Clínica de Cardiologia Pediátrica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor – HCFMUSP).

O limite inferior, de um ano, visou eliminar alterações da ADAMTS-13, principalmente a diminuição da concentração antigênica, esperadas fisiologicamente em lactentes menores, sobretudo abaixo dos seis meses (SCHMUGGE et al., 2003; FEYS et al., 2007). O limite superior de sete anos, nos pareceu apropriado no sentido de eliminar a interferência de complicação (por exemplo, fenômenos trombóticos) que poderia estar presente no momento do estudo e que é relativamente frequente em adultos com cardiopatias cianogênicas não tratados. Entretanto, na faixa etária entre um e sete anos, não foram excluídos pacientes com história prévia sugestiva de eventos trombóticos, uma vez que estes seriam os casos de maior interesse para investigação de mecanismos trombogênicos.

As características dos pacientes estudados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica

Nº	Nome	Idade (meses)	Sexo	Diagnóstico	Tipo Sanguíneo	Peso (kg)	Altura (cm)
1	N.S.A.	16	Feminino	T. Fallot	A+	7,6	73
2	A.R.F.R.	45	Masculino	C. univ.	A+	15,0	99
3	E.R.O.	29	Masculino	C. univ.	A+	9,3	81
5	G.V.S.S.	33	Feminino	C. univ.	O+	9,0	78
6	L.J.S.N.	40	Masculino	T. Fallot	O+	11,8	93
9	J.C.S.R.	24	Masculino	C. univ.	B+	8,5	83
10	H.F.L.	30	Feminino	C. univ.	O+	16,0	91
11	T.R.C.	35	Feminino	C. univ.	A+	11,5	91
12	M.B.S.	21	Feminino	A. Pulmonar	O+	9,4	75
13	D.G.S.	17	Masculino	C. univ.	O+	11,5	77
14	M.A.S.O.C.	15	Feminino	A. Pulmonar	O+	9,6	95
15	A.C.V.O.	91	Feminino	A. Pulmonar	O+	15,7	111
16	B.P.S.	43	Feminino	A. Pulmonar	O+	12,8	95
17	T.F.D.	67	Feminino	C. univ.	B+	13,7	102
18	G.F.N.	11	Masculino	C. univ.	O-	6,1	65
19	O.A.M.C.	25	Masculino	T. Fallot	O+	14,0	61
20	L.G.S.	84	Feminino	C. univ.	A+	16,8	116
21	V.A.F.S.	13	Masculino	T. Fallot	O+	6,0	63
22	G.B.O.C.	43	Feminino	T. Fallot	B+	13,2	96
23	L.N.P.	10	Masculino	C. univ.	O-	7,5	69
24	M.I.S.G.	37	Feminino	C. univ.	O+	12,4	92
25	J.V.O.S.	33	Masculino	C. univ.	O+	11,2	88
26	L.R.A.	17	Masculino	C. univ.	A+	11,5	83
27	D.B.S.	19	Masculino	T. Fallot	-	10,3	73
28	K.C.S.	11	Feminino	T. Fallot	AB+	8,0	72
29	V.F.P.	68	Masculino	TGA	AB+	14,7	103
30	I.L.A.	57	Feminino	A. Pulmonar	B+	16,2	110
31	M.E.A.S.	13	Feminino	C. univ.	B+	7,6	73
32	E.A.G.	24	Feminino	A. Pulmonar	O+	12,0	87
33	M.A.S.S.	21	Masculino	A. Pulmonar	O+	9,9	75
34	V.M.O.A.	30	Feminino	C. univ.	O+	9,4	86
35	M.H.V.S.	71	Masculino	A. Pulmonar	O+	16,4	106
36	J.P.G.D.	33	Masculino	C. univ.	A+	15,0	84
37	N.O.S.	18	Feminino	T. Fallot	O-	7,6	67
38	E.V.P.C.	16	Masculino	T. Fallot	O-	8,9	114
39	A.F.O.S.	28	Masculino	A. Pulmonar	O+	9,1	77,5
40	G.H.L.S.	15	Masculino	T. Fallot	-	9,8	95
41	G.B.A.	13	Masculino	C. univ.	O+	7,2	69
42	I.D.P.A.	23	Feminino	C. univ.	A-	11,0	88
43	G.P.M.F.	57	Masculino	DATVP	B+	15,8	95

Continua

Continuação

Tabela 1 – Características dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica

No	Nome	Idade (meses)	Sexo	Diagnóstico	Tipo Sanguíneo	Peso (kg)	Altura (cm)
44	G.G.S.S.	12	Masculino	T. Fallot	O+	9,0	75
45	L.R.F.	84	Feminino	A. Pulmonar	B+	16,8	106
46	C.C.S.T.	82	Feminino	A. Pulmonar	A+	21,8	120
47	R.S.M.	32	Feminino	C. univ.	A+	10,0	94
48	M.F.P.	51	Masculino	A. Pulmonar	O+	14,6	65
49	S.S.F.	44	Feminino	A. Pulmonar	O+	12,0	95,5
50	M.V.S.	59	Feminino	A. Pulmonar	A+	16,4	99
51	T.I.F.B.R.	28	Masculino	C. univ.	O+	14,7	89
52	J.A.S.	84	Feminino	C. univ.	O+	20,0	115
53	N.V.G.	40	Feminino	A. Pulmonar	O+	14,7	94
54	G.J.M.	39	Masculino	A. Pulmonar	A+	14,9	98
55	L.O.J.	14	Masculino	A. Pulmonar	O+	8,8	75
56	M.J.B.G.	66	Masculino	C. univ.	B+	17,0	108
57	S.S.S.	80	Feminino	A. Pulmonar	A+	12,6	98
58	M.L.M.	31	Masculino	TGA	A+	13,0	90
59	M.S.	37	Masculino	T. Fallot	O-	14,1	97

T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; C. cg. Compl. = Cardiopatia congênita complexa; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias.

Não fizeram parte do estudo, pacientes portadores de doença hepática ou sob uso de medicação anticoagulante por quaisquer motivos. As outras situações que costumam alterar os níveis de ADAMTS-13, a saber, a sepse, a coagulação intravascular disseminada, doenças malignas e doença do tecido conectivo, não são esperadas neste tipo de paciente. Por fim, somente foram incluídos pacientes cujos pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Grupos de pacientes

Para efeito comparativo, dois grupos foram considerados. O grupo A foi constituído de pacientes que por razões diversas, não tinham a perspectiva de correção total do defeito cardíaco, sendo submetidos à intervenção cirúrgica paliativa. Neste grupo foram incluídos os pacientes que a saturação periférica de oxigênio no momento pós 30 dias estava $< 94\%$, ou seja, pacientes com presença de hipoxemia residual. O grupo B foi constituído de pacientes submetidos à correção total da cardiopatia, na qual se esperava o completo desaparecimento da hipoxemia após o tratamento. Neste grupo foram incluídos os pacientes que no momento pós 30 dias da cirurgia, a saturação periférica de oxigênio estava $\geq 94\%$.

3.3 Desenho do estudo

O estudo possuiu característica longitudinal, onde o paciente foi seu próprio controle (condição pré, pós-operatória (pós 48 horas) e pós 30 dias da cirurgia). As determinações foram realizadas na condição basal (pré-operatória), 48 horas após a cirurgia (pós-operatório imediato), onde se espera que os indivíduos do grupo A já tenham sua saturação de oxigênio praticamente normalizada e no primeiro retorno ambulatorial após a cirurgia, previsto para 30 dias.

3.4 Aspectos éticos

O desenho do estudo foi analisado e aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 04/2007) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos – CAPPesq (protocolo de pesquisa nº 846/07). Somente foram incluídos neste estudo pacientes cujos pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta do material (sangue venoso periférico) foi realizada na maioria dos casos durante procedimentos de rotina diagnóstica, portanto sem desconforto para o paciente.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

4.1.1 Coleta com anticoagulante

O sangue foi coletado em citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), para a determinação da atividade da ADAMTS-13 e presença de inibidor, FVW plasmático e tipagem sanguínea.

O sangue foi coletado em EDTA para a realização do hemograma.

4.1.2 Coleta com anticoagulante e inibidores de protease

O sangue foi coletado em citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v), em presença dos inibidores de proteases (EDTA 5 mM, NEM 6 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 25 mM e aprotinina 20 U/mL) para análise das subunidades do FVW plasmático.

4.2 Procedimentos laboratoriais

4.2.1 Reagentes

Proteína A Sepharose®, membrana Hybond™, anticorpo secundário anti-coelho marcado com peroxidase foram adquiridos da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia). Ácido edético (EDTA), N-etilmaleimida

(NEM), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), leupeptina, aprotinina, reagente Folin-Ciocalteu, albumina bovina, membrana de diálise, orto-fenilenodiamina e o marcador de peso molecular foram adquiridos da Sigma (St Louis, MO, EUA). Anticorpo policlonal anti-FVW e anticorpo policlonal anti-FVW marcado com peroxidase foram adquiridos da Dako Corporação (Carpinteria, CA, EUA). O *kit* para determinação do FVW:Ag, foi obtido da Diagnostica Stago (Asnières, França). A microplaca de ELISA foi obtida da Corning (New York, EUA). O colágeno bovino foi obtido da Vitrogen® (Palo Alto, CA, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de altíssimo grau de pureza.

4.2.2 Determinação do antígeno do fator de von Willebrand (FVW:Ag)

A determinação do FVW:Ag, no plasma foi realizada pelo método de ELISA, utilizando o *kit* Asserachrom VWF:Ag da Diagnostica Stago, de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em U/dL (MURDOCK et al., 1997).

4.2.3 Determinação da atividade da protease ADAMTS-13

Para a determinação da atividade da protease ADAMTS-13, utilizamos o plasma do indivíduo (controle ou paciente) como fonte de enzima e substrato. Para viabilizar este ensaio, foi necessário utilizar duas alíquotas de plasma de cada indivíduo (controles e pacientes), uma para o

basal (como fonte de enzima) e outra para a diálise (como fonte de substrato).

4.2.3.1 Preparo da membrana de diálise

A membrana utilizada na diálise de amostras (controle ou paciente) necessitou de tratamento prévio com a finalidade de retirar o glicerol e os componentes sulfúricos contidos na membrana, para que os mesmos não interferissem no ensaio. A membrana foi lavada em água corrente por 3 horas. E então foi tratada com sulfito de sódio 0,3% a 80°C por 1 minuto, e posteriormente lavada com água a 60°C por 2 minutos. Em seguida, foi lavada com ácido sulfúrico 0,2% por 1 minuto, e o ácido foi então removido com água a 60°C por 2 minutos.

4.2.3.2 Preparo da amostra

A diálise das amostras dos pacientes e controles (80 µL de plasma) foi realizada em tampão (Tris 5 mM/L, pH 8,3, contendo uréia 1,5 M/L) por um período de 3 horas a 37°C com agitação suave, com a finalidade de modificar a conformação do FVW: a molécula se abre, expondo o seu domínio A2 que possui o sítio de clivagem para ADAMTS-13, que por sua vez cliva o FVW entre a tirosina 1605 e a metionina 1606. Simultaneamente à diálise, uma outra alíquota de 80 µL de plasma (paciente e controle) permaneceu por 3 horas a 37°C, sendo, portanto, a amostra basal de cada

paciente ou controle. O FVW da alíquota dialisada tem, portanto, sua capacidade de ligação com o colágeno diminuída em relação à alíquota não dialisada (basal). Após o preparo das amostras (sem diálise e dialisada) seguiu-se a determinação da atividade da ADAMTS-13 conforme descrito no próximo item.

4.2.3.3 Ensaio da atividade da protease ADAMTS-13

A determinação da atividade da protease ADAMTS-13 no plasma foi realizada por técnica de ELISA, baseada nas propriedades de ligação do FVW ao colágeno (ARONSON et al., 2001, RICK et al., 2002, TRIPODI et al., 2008).

A microplaca para ELISA de alta ligação foi sensibilizada com 200 µL/poço de colágeno, em uma concentração 3 µg/mL, diluído em tampão de sensibilização (Tris 5 mM/L e NaCl 10 mM/L, pH 7,4) e mantida a 4°C por 12 horas. A microplaca foi lavada 4 vezes alternadamente com 300 µL de água deionizada e tampão de lavagem (Tris 5 mM/L, NaCl 10 mM/L, pH 7,4, contendo Tween-20 0,1%).

Após a diálise, conforme descrito no item 3.4.3.2.2, todas as amostras foram diluídas 1/20 em tampão (Tris 0,1 M/L, NaCl 75 mM/L, pH 7,4, contendo Tween-20 0,1%), e adicionadas em triplicata na microplaca de ELISA (125 µL/poço), a incubação seguiu-se por 45 minutos com agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, a microplaca foi lavada 4 vezes com 300 µL de tampão de lavagem. Seguiu-se incubação com 200 µL de

anticorpo policlonal anti-FVW humano marcado com peroxidase em uma concentração 1,1 g/L, diluído a 1/400 em tampão (Tris 0,1 M/L, NaCl 75 mM/L, pH 7,4, contendo Tween-20 0,1%) por 45 minutos com agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, a microplaca foi lavada 4 vezes com 300 µL de tampão de lavagem, e então a revelação foi realizada adicionando 100 µL de orto-fenilenodiamina 0,5 mg/mL contendo H₂O₂ 0,5 µL/mL 30% (v/v), por 3 minutos. A reação foi interrompida adicionando 100 µL H₂SO₄ 3M. A leitura foi realizada no leitor de ELISA em 492 nm.

Os resultados da atividade da ADAMTS-13 foram expressos em porcentagem, obtidos através da subtração: atividade basal (amostra não dialisada) menos a sua atividade residual de ligação do FVW ao colágeno (amostra dialisada). O resultado dos pacientes foi comparado com o controle (*pool* composto de plasma de 12 doadores saudáveis, não tabagistas, da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo), o qual foi considerado possuir 100% de atividade de ADAMTS-13 (TRIPODI et al., 2008).

4.2.3.4 Avaliação da presença de inibidores da ADAMTS-13

Este método foi realizado para avaliar a presença de inibidores da protease ADAMTS-13 no plasma dos pacientes e controles (RICK et al., 2002).

As amostras (50 µL) de plasma de controles e pacientes foram misturadas com 50 µL de *pool* (composto de plasma de 12 doadores saudáveis, não tabagistas, da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo) e

incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, estas amostras seguiram o ensaio de determinação da atividade da ADAMTS-13, conforme item 4.2.3.3.

Os resultados da presença de inibidor foram considerados positivos se a atividade de ligação ao colágeno residual da mistura (amostra que foi compensada) fosse maior do que 50% da atividade da ADAMTS-13 da mesma amostra no ensaio comum (AUSTIN et al., 2008).

4.2.4 Análise das subunidades do FVW plasmático

Para a realização do estudo das subunidades do FVW plasmático, foi necessário concentrar o FVW, como descrito a seguir.

4.2.4.1 Imunoprecipitação do FVW plasmático

O FVW foi purificado por imunoprecipitação (LOPES; MAEDA, 1995, CASONATO et al., 2007). O esquema com as etapas da purificação do FVW é apresentado na Figura 5.

O plasma (500 µL) de pacientes e de controles foi incubado com 108 µg/mL de anticorpo policlonal anti-FVW na concentração de 5,7 g/L em tampão NET-gel (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, nonidet P-40 0,1%, EDTA 5 mM, pH 8,0, gelatina 2,5%, azida de sódio 0,02%), contendo os inibidores de proteases (NEM 50 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 0,25 mM e aprotinina 20 U/mL), por 1 hora a 4°C. Em seguida, esta mistura foi incubada com a proteína *A-Sepharose*, para associação com o FVW presente na

amostra (780 µL de resina/mg de anticorpo) por 1 hora a 4°C. Seguiu-se centrifugação a 12 000 g por 2 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e a resina foi então lavada duas vezes com 1 mL de tampão NET-gel por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 12 000 g por 2 minutos a 4°C. A resina foi então lavada com 1 mL de tampão (Tris 10 mM, pH 7,5, nonidet P-40 0,1%), contendo os inibidores de proteases (EDTA 5 mM, NEM 50 mM, leupeptina 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 U/mL) por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi removido após centrifugação a 12 000 g por 2 minutos a 4°C. A resina juntamente com o plasma foram incubados com 120 µL de tampão de amostra desnaturante (Tris 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, ditioneitol 100mM, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,02%) por 20 minutos a 60°C para que o FVW e a resina se dissociassem. A resina foi então removida por centrifugação a 12 000 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante (FVW) foi aliquoteado e estocado a -80°C até o momento da sua análise.

Figura 5 – Etapas da purificação do FVW plasmático

4.2.4.2 Determinação de proteínas do imunoprecipitado

A determinação de proteínas do imunoprecipitado (FVW purificado) foi realizada pela técnica de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Utilizamos albumina bovina sérica de alto grau de pureza na concentração de 5 mg/mL para construir a curva padrão nas concentrações

de 200 a 1000 µg/mL. As amostras foram diluídas 1:100 em água MilliQ. Foi adicionado às amostras e à curva padrão 3 mL da solução A, composta de: 96% de Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1M, 2% de CuSO₄.5H₂O 0,5% e 2% de citrato de sódio 1%, em seguida os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 300 µL de solução B (reagente fenol Folin-Ciocalteau 1/3), e os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro DU®-70 da Beckman no comprimento de onda 750 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL a partir dos dados obtidos pelo gráfico da curva padrão:

$$[\text{proteína mg/dL}] = \frac{\text{absorbância} - \text{intercepto}}{\text{slope}} \times \text{diluição}$$

4.2.4.3 Composição das subunidades do FVW plasmático – *Western immunoblotting*

Para análise das subunidades do FVW plasmático, o imunoprecipitado do FVW (7,5 µL, que corresponde a aproximadamente 230 mg/mL de proteína) foi desnaturado com tampão de amostra redutor (Tris 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,02%) contendo DTT 50 mM a 60°C por 20 minutos (CASONATO et al., 2007), e então submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% (SDS-PAGE), (LAEMMLI, 1970) com tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,3), com corrente constante de 25 mA por 4 horas a 15°C. Foram usados como marcadores de peso molecular: miosina (205 kDa); beta-

galactosidase (116 kDa); fosforilase B (97,4 kDa), frutose 6P quinase (84 kDa), albumina fetal bovina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3P desidrogenase (36 kDa). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 390 mM, SDS 0,037%, metanol 20% (v/v), pH 8,3), com corrente constante de 50 mA por 16 horas a 15°C (TOWBIN, 1979). Após a transferência, a membrana foi lavada 3 vezes com 10 mL de tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6 acrescido de Tween-20 0,05%) em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização suave. A membrana foi bloqueada com solução de albumina bovina sérica 5% diluída em TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente com homogeneização suave. A membrana foi então lavada por 3 vezes com 10 mL de TBS-T em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização suave. Em seguida, foi incubada com o anticorpo policlonal anti-FVW na concentração de 5,7 g/L diluído 1:750 em TBS-T, por 2 horas em temperatura ambiente com homogeneização suave. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes com 10 mL de TBS-T em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização suave. Após, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho ligado à peroxidase em uma diluição 1:2000, em TBS-T, por 1 hora, em temperatura ambiente com homogeneização suave. A membrana foi lavada novamente por 3 vezes com 10 mL de TBS-T em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização suave e foi então revelada utilizando luminol (Tris 1 M pH 8,5, luminol 250 mM, ácido comárico 190 mM, H₂O₂ 0,3%) e exposta ao

filme de raio X por 10 a 30 segundos. A semi-quantificação foi realizada através de densitometria a laser.

4.2.4.4 Análise densitométrica das subunidades do FVW

A protease ADAMTS-13 cliva a subunidade principal (225 kDa) do FVW gerando fragmentos de 140 e 176 kDa, estes fragmentos podem ser visualizados no filme de raio X e semi-quantificados através da densitometria.

Para a determinação do peso molecular dos fragmentos, foi construída uma curva de calibração utilizando o log da massa molecular dos seguintes marcadores de peso molecular: miosina (205 kDa); beta-galactosidase (116 kDa); fosforilase B (97,4 kDa), frutose 6P quinase (84 kDa), albumina fetal bovina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3P desidrogenase (36 kDa), versus sua mobilidade relativa na eletroforese (WEBER; OSBORN, 1969). A massa molecular dos fragmentos do FVW foi estimada através da comparação da sua mobilidade eletroforética com a curva de calibração.

Após estes fragmentos terem a sua massa molecular determinada, eles foram densitometrados utilizando o densitômetro a laser Ultrosan XL da LKB.

4.2.5 Variáveis laboratoriais gerais

O hematócrito, a concentração de hemoglobina e o número de plaquetas foram determinados por contagem eletrônica automatizada. O tipo sanguíneo dos pacientes foi determinado imunologicamente. Estas variáveis laboratoriais foram determinadas em testes utilizados na rotina do laboratório de análises clínicas do Instituto do Coração.

4.3 Análise estatística

A avaliação estatística do presente estudo se deu em duas etapas: uma inicial exploratória, a fim de conhecermos as distribuições das variáveis e uma segunda cujo objetivo era estudar as associações e correlações entre as variáveis de interesse.

O estudo exploratório consistiu em conhecer as grandezas estatísticas, levantando as medidas de tendência central (médias e medianas) e dispersão (desvio padrão e variância) e foram importantes para representação gráfica em *box plot*. Para as variáveis qualitativas calculou-se frequências absolutas e relativas.

Para a comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student, quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (ROSNER, 1986).

Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando ocorreram frequências esperadas menores do que 5) (ROSNER, 1986).

Para o estudo de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação Spearman (ROSNER, 1986).

Para averiguar o comportamento dos grupos em relação aos momentos de avaliação fez-se uso da análise de variância com medidas repetidas (TIMM, 1975), quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada foram utilizados os testes não-paramétricos de Friedman e Wilcoxon (ROSNER, 1986).

Para o estudo de fatores prognósticos foi utilizado o modelo de regressão logístico (HOSMER; LEMESHOW; 1989).

Todas as análises acima citadas foram desenvolvidas levando em consideração um intervalo de confiança (IC) de 95% e α bidirecional 5%. Os softwares utilizados para a realização das mesmas foram o SPSS 13 (Statistical Package for the Social Sciences) e Excel 2007[®] (Microsoft Office).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

No presente estudo, foram incluídos 56 pacientes, todos cianóticos, com anomalias cardíacas congênitas com orientação para tratamento cirúrgico, no período de novembro de 2007 a setembro de 2009, sendo 27 do sexo feminino e 29 do sexo masculino, com idades variando de 10 a 91 meses (média 37 meses). Trata-se de um estudo longitudinal, ou seja, realizado em três momentos: pré-operatório (basal), pós-operatório imediato (pós 48 horas de cirurgia) e pós 30 dias de cirurgia, onde utilizamos o paciente como seu próprio controle. Nestes pacientes, a saturação periférica de oxigênio no momento basal (pré-operatório) foi $78 \pm 8\%$, e o hematócrito foi $47 \pm 7\%$. Do total de 56 pacientes, 5 tiveram sua cirurgia adiada, todos os demais foram submetidos a operação cardíaca. Houve a utilização de circulação extra-corpórea em 33 pacientes. Na evolução imediata, ou seja, em menos de 48 horas após a cirurgia, 3 pacientes foram a óbito e outros 3 pacientes foram excluídos por perda de seguimento ambulatorial na coleta após 30 dias de cirurgia.

Os dados individuais dos 56 pacientes incluídos neste estudo encontram-se dispostos no anexo, Tabelas 7, 8 e 9, páginas 92 - 96 juntamente com as medidas de tendência central.

Os resultados apresentados a seguir tiveram como base o estudo realizado com os indivíduos que completaram as coletas nos três momentos, ou seja, basal, pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia, neste grupo foram incluídos 45 pacientes.

As características (sexo, idade e diagnóstico) dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas bem como a data de inclusão do paciente no estudo, ou seja, coleta pré (basal), e as variáveis: nível de saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e número de plaquetas, dos pacientes completos (N = 45) juntamente com as medidas de tendência central, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pré (basal), e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Paciente	Sexo	Idade (meses)	Data da coleta	Diagnóstico	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq (x10 ³ /mm ³)
						Pré	(Basal)		
1	N.S.A.	Fem	16	29/11/07	T. Fallot	75	44	13,6	233
2	A.R.F.R.	Masc	45	20/12/07	C. univ.	78	70	23	116
3	E.R.O.	Masc	29	08/01/08	C. univ.	84	56	19,7	285
5	G.V.S.S.	Fem	33	27/03/08	C. univ.	79	55	17	240
6	L.J.S.N.	Masc	40	31/03/08	T. Fallot	80	41	13,6	455
9	J.C.S.R.	Masc	24	23/04/08	C. univ.	84	49	16,4	387
10	H.F.L.	Fem	30	30/04/08	C. univ.	83	49	16,8	242
11	T.R.C.	Fem	37	30/04/08	C. univ.	80	54	16,1	340
12	M.B.S.	Fem	21	14/05/08	A. Pulmonar	83	41	13,2	261
14	M.S.O.C.	Fem	15	02/06/08	A. Pulmonar	63	47	15,7	231
15	A.C.V.O.	Fem	91	09/06/08	A. Pulmonar	78	52	16,8	224
17	T.F.D.	Fem	67	26/06/08	C. univ.	85	48	17,3	294
18	G.F.N.	Masc	11	04/07/08	C. univ.	79	43	13,7	410
19	O.A.M.C.	Masc	26	11/07/08	T. Fallot	73	43	15	365
20	L.G.S.	Fem	84	11/07/08	C. univ.	81	55	18,7	178
23	L.N.P.	Masc	10	18/07/08	C. univ.	80	50	16,9	727
24	M.I.S.G.	Fem	37	25/07/08	C. univ.	79	53	17,9	316
26	L.R.A.	Masc	17	12/08/08	C. univ.	82	44	16,1	342
28	K.C.S.	Fem	11	21/08/08	T. Fallot	86	34	11,7	270
30	I.L.A.	Fem	57	30/08/08	A. Pulmonar	77	53	19,7	180
31	M.E.A.S.	Fem	13	09/09/08	C. univ.	53	52	18,2	346
32	E.A.G.	Fem	25	09/09/08	A. Pulmonar	64	50	17,4	463
33	M.A.S.S.	Masc	21	18/09/08	A. Pulmonar	88	35	12,9	366
34	V.M.O.A.	Fem	30	25/09/08	C. univ.	80	42	13,9	545
35	M.H.V.S.	Masc	71	30/09/08	A. Pulmonar	65	51	17,4	322
36	J.P.G.D.	Masc	33	30/09/08	C. univ.	65	48	16	391
37	N.O.S.	Fem	18	02/10/08	T. Fallot	62	40	14	365
38	E.V.P.C.	Masc	16	15/10/08	T. Fallot	90	36	12,3	321
39	A.F.O.S.	Masc	28	30/10/08	A. Pulmonar	63	62	18,6	196
40	G.H.L.S.	Masc	15	03/11/08	T. Fallot	72	38	12,7	448
41	G.B.A.	Masc	13	13/11/08	C. univ.	84	39	13,2	443
42	I.D.P.A.	Fem	23	13/11/08	C. univ.	84	43	14,4	467
43	G.P.M.F.	Masc	57	02/12/08	DATVP	91	44	14,8	170
45	L.R.F.	Fem	84	26/01/09	A. Pulmonar	78	51	18,3	213
46	C.C.S.T.	Fem	82	28/01/09	A. Pulmonar	81	43	14,9	156
47	R.S.M.	Fem	32	12/02/09	C. univ.	72	44	11,5	308
48	M.F.P.	Masc	51	03/03/09	A. Pulmonar	79	50	16,9	339
49	S.S.F.	Fem	44	14/03/09	A. Pulmonar	80	40	13,4	328
50	M.V.S.	Fem	59	18/03/09	A. Pulmonar	80	50	16,9	321
51	T.I.B.R.	Masc	28	02/04/09	C. univ.	75	45	15,6	313
53	N.V.G.	Fem	40	12/05/09	A. Pulmonar	80	53	18,1	149
54	G.J.M.	Masc	39	12/05/09	A. Pulmonar	80	45	16,2	234
57	S.S.S.	Fem	80	23/05/09	A. Pulmonar	71	44	15,2	195
58	M.L.M.	Masc	31	02/06/09	TGA	78	45	16,2	369
59	M.S.	Masc	37	16/07/09	T. Fallot	82	45	15,9	392
Média			37			77	47	15,9	317
D.P.			23			8	7	2,4	116
Mediana			31			80	45	16,1	321
Mínimo			10			53	34	11,5	116
Máximo			91			91	70	23,0	727

Nº = número de entrada do paciente no estudo; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; Fem = feminino; Masc = masculino; T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias; D.P. = Desvio padrão.

Nas Tabelas 3 e 4, apresentamos os 45 pacientes completos do estudo com os respectivos diagnósticos, e a quantidade de dias decorridos entre a cirurgia e as coletas no período pós-operatório imediato (pós 48 horas) e pós 30 dias, respectivamente, assim como as variáveis: nível de saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e número de plaquetas, juntamente com as medidas de tendência central.

A nomenclatura do diagnóstico dos 45 pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênica utilizada nas Tabelas 3 e 4 a seguir foi a mesma também utilizada na Tabela 2 apresentada anteriormente: T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias.

Tabela 3 - Pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 48 horas de cirurgia, quantidade de dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento pós 48 horas de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	Sat O ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Pla _q (x10 ³ /mm ³)
			Pós 48h				
1	N.S.A.	T. Fallot	2	95	27	8,7	129
2	A.R.F.R.	C. univ.	2	78	51	17,1	165
3	E.R.O.	C. univ.	2	87	39	12,9	206
5	G.V.S.S.	C. univ.	2	85	40	12,5	173
6	L.J.S.N.	T. Fallot	2	100	33	10,8	154
9	J.C.S.R.	C. univ.	2	91	38	12,2	210
10	H.F.L.	C. univ.	2	97	39	12,8	115
11	T.R.C.	C. univ.	2	72	50	15,6	342
12	M.B.S.	A. Pulmonar	2	86	27	8,3	141
14	M.S.O.C.	A. Pulmonar	2	96	29	9,1	106
15	A.C.V.O.	A. Pulmonar	2	83	35	11,4	148
17	T.F.D.	C. univ.	4	90	36	12,4	90
18	G.F.N.	C. univ.	4	85	32	10,1	281
19	O.A.M.C.	T. Fallot	3	100	38	12,6	128
20	L.G.S.	C. univ.	2	88	33	10,6	770
23	L.N.P.	C. univ.	2	88	36	12,3	137
24	M.I.S.G.	C. univ.	2	79	32	10,8	239
26	L.R.A.	C. univ.	2	85	32	10,9	248
28	K.C.S.	T. Fallot	4	94	39	13,5	234
30	I.L.A.	A. Pulmonar	3	96	31	10,5	88
31	M.E.A.S.	C. univ.	2	95	33	11,2	221
32	E.A.G.	A. Pulmonar	2	83	38	12,7	250
33	M.A.S.S.	A. Pulmonar	2	90	34	11,6	296
34	V.M.O.A.	C. univ.	2	83	39	12,8	204
35	M.H.V.S.	A. Pulmonar	3	73	43	14,3	194
36	J.P.G.D.	C. univ.	2	89	39	12,6	38
37	N.O.S.	T. Fallot	2	98	32	10,8	138
38	E.V.P.C.	T. Fallot	3	93	27	8,8	16,9
39	A.F.O.S.	A. Pulmonar	2	92	40	12,4	236
40	G.H.L.S.	T. Fallot	2	97	35	11,4	109
41	G.B.A.	C. univ.	2	93	32	10,1	168
42	I.D.P.A.	C. univ.	2	95	37	12,1	154
43	G.P.M.F.	DATVP	2	95	22	6,7	93
45	L.R.F.	A. Pulmonar	2	98	46	15,5	160
46	C.C.S.T.	A. Pulmonar	2	90	28	9,3	88
47	R.S.M.	C. univ.	2	97	46	13,2	128
48	M.F.P.	A. Pulmonar	2	99	42	13,2	149
49	S.S.F.	A. Pulmonar	2	84	34	10,5	214
50	M.V.S.	A. Pulmonar	2	94	34	11	267
51	T.I.B.R.	C. univ.	3	87	31	9,9	194
53	N.V.G.	A. Pulmonar	3	80	50	16,2	132
54	G.J.M.	A. Pulmonar	2	98	28	9,1	114
57	S.S.S.	A. Pulmonar	3	71	39	13,3	128
58	M.L.M.	TGA	5	83	35	11,6	381
59	M.S.	T. Fallot	2	100	28	9,2	169
Média			2	90	36	11,7	189
D.P.			1	8	6	2,1	113
Mediana			2	90	35	11,6	165
Mínimo			2	71	22	6,7	38
Máximo			5	100	51	17,1	770

Nº= número de entrada do paciente no estudo; Dias = dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento Pós 48 horas; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 4 - Pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 30 dias de cirurgia, quantidade de dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento pós 30 dias de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Pla _q x10 ³ /mm ³
			Pós 30d				
1	N.S.A.	T. Fallot	28	92	42	13,1	374
2	A.R.F.R.	C. univ.	28	82	47	16,9	176
3	E.R.O.	C. univ.	18	79	42	13,1	531
5	G.V.S.S.	C. univ.	30	89	37	11,1	310
6	L.J.S.N.	T. Fallot	30	97	37	12,8	581
9	J.C.S.R.	C. univ.	30	98	36	11,4	587
10	H.F.L.	C. univ.	28	90	41	13	223
11	T.R.C.	C. univ.	43	72	44	13,3	549
12	M.B.S.	A. Pulmonar	29	88	46	14,3	477
14	M.S.O.C.	A. Pulmonar	25	97	32	10,2	465
15	A.C.V.O.	A. Pulmonar	18	100	34	11,2	429
17	T.F.D.	C. univ.	28	86	37	12,2	531
18	G.F.N.	C. univ.	27	83	46	14,5	525
19	O.A.M.C.	T. Fallot	18	96	37	12,3	512
20	L.G.S.	C. univ.	29	88	41	12,9	252
23	L.N.P.	C. univ.	41	83	41	14,4	588
24	M.I.S.G.	C. univ.	20	80	39	12,9	551
26	L.R.A.	C. univ.	27	78	43	14,6	367
28	K.C.S.	T. Fallot	27	96	38	13,1	544
30	I.L.A.	A. Pulmonar	62	97	31	11,2	279
31	M.E.A.S.	C. univ.	22	86	39	12,8	349
32	E.A.G.	A. Pulmonar	54	86	45	15	190
33	M.A.S.S.	A. Pulmonar	30	95	34	11,1	582
34	V.M.O.A.	C. univ.	28	80	37	11,6	469
35	M.H.V.S.	A. Pulmonar	28	67	50	17	228
36	J.P.G.D.	C. univ.	28	98	27	8,9	264
37	N.O.S.	T. Fallot	26	98	29	9,3	400
38	E.V.P.C.	T. Fallot	27	96	36	11,8	416
39	A.F.O.S.	A. Pulmonar	28	83	30	8,7	453
40	G.H.L.S.	T. Fallot	42	97	34	10,7	425
41	G.B.A.	C. univ.	23	77	33	10,8	676
42	I.D.P.A.	C. univ.	33	94	42	13,9	362
43	G.P.M.F.	DATVP	30	97	30	9,3	294
45	L.R.F.	A. Pulmonar	49	96	40	13,5	215
46	C.C.S.T.	A. Pulmonar	30	87	30	9,6	211
47	R.S.M.	C. univ.	22	95	37	10,8	338
48	M.F.P.	A. Pulmonar	28	98	35	11,4	118
49	S.S.F.	A. Pulmonar	29	81	41	13,7	337
50	M.V.S.	A. Pulmonar	26	86	43	14,7	510
51	T.I.B.R.	C. univ.	105	80	44	16,4	309
53	N.V.G.	A. Pulmonar	117	82	46	15,7	178
54	G.J.M.	A. Pulmonar	62	95	36	12,5	220
57	S.S.S.	A. Pulmonar	14	78	44	14,8	239
58	M.L.M.	TGA	41	82	41	13,8	442
59	M.S.	T. Fallot	38	98	39	13,2	373
Média			34	88	39	12,7	388
D.P.			20	8	5	2,1	141
Mediana			28	88	39	12,9	374
Mínimo			14	67	27	8,7	118
Máximo			117	100	50	17	676

Nº= número de entrada do paciente no estudo; Dias = dias decorridos entre a cirurgia e a coleta do momento Pós 30 dias; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; D.P. = Desvio padrão.

Como já foi dito anteriormente, dos 56 pacientes incluídos no estudo, 11 pacientes foram excluídos: 5 por adiamento da cirurgia, 3 por óbito e 3 por perda do seguimento ambulatorial na coleta do momento pós 30 dias, portanto, nossos resultados estão apresentados com base nos 45 pacientes completos, e para estudar a influência da hipóxia neste estudo, os pacientes foram separados em dois grupos: grupo A foi constituído de pacientes que após 30 dias de terem sido submetidos à cirurgia apresentaram saturação periférica de oxigênio (SpO_2) < 94% (N=26), sendo 10 pacientes do sexo masculino e 16 do sexo feminino, com idade variando de 67 a 92 meses (média 38 meses). No grupo B foram incluídos pacientes que após 30 dias de terem sido submetidos à cirurgia apresentaram saturação periférica de oxigênio (SpO_2) $\geq$ 94% (N=19) sendo 11 pacientes do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idade variando de 11 a 91 meses (média 36 meses).

É importante ressaltar que se trata de um estudo longitudinal, portanto o paciente é o seu próprio controle.

5.1 Variáveis laboratoriais gerais

As variáveis laboratoriais gerais dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, dos grupos A e B, analisadas foram: hematócrito, hemoglobina, número de plaquetas (Figura 6) e tipagem sanguínea (Tabela 5).

Os pacientes do grupo A, apresentaram uma diminuição significativa do hematócrito no pós-operatório imediato (média $36 \pm 6\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $41 \pm 6\%$) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média $49 \pm 7\%$). Com relação ao grupo B, também foi verificado uma diminuição significativa do hematócrito no pós-operatório imediato (média $35 \pm 6\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $35 \pm 4\%$) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média $44 \pm 6\%$).

A concentração de hemoglobina dos pacientes do grupo A apresentou-se diminuída no momento pós 48 horas (média 12 ± 2 g/dL) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (13 ± 2 g/dL) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média 16 ± 2 g/dL). Com relação ao grupo B, também foi verificado uma diminuição significativa da concentração de hemoglobina no momento pós 48 horas (média 11 ± 2 g/dL) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (11 ± 1 g/dL) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média 15 ± 2 g/dL).

O número de plaquetas dos pacientes do grupo A apresentou-se diminuído no momento pós 48 horas (222 ± 133 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média 313 ± 132 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$). O momento pós 30 dias apresentou número aumentado

de plaquetas (386 ± 147 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) em comparação ao momento pré (313 ± 132 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$) e ao momento pós 48 horas (222 ± 133 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$). Os pacientes do grupo B, apresentaram número de plaquetas diminuído no momento pós 48 horas (146 ± 57 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) em comparação ao momento pré (322 ± 94 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$), e número de plaquetas aumentado no momento pós 30 dias (372 ± 158 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) em comparação ao momento pré (322 ± 94 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$) e ao momento pós 48 horas (146 ± 57 plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$) ($p < 0,001$).

Figura 6 – Variáveis hematócrito, hemoglobina e plaquetas dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia. Em A, B e C temos o hematócrito, a hemoglobina e o número de plaquetas respectivamente. Observamos que as variáveis hematócrito, concentração de hemoglobina e número de plaquetas estão diminuídas no momento pós 48 horas em relação ao momento pré ($p < 0,001$) nos grupos A e B. O hematócrito e a concentração de hemoglobina encontram-se diminuídos no momento pós 30 dias em relação ao momento pré ($p < 0,001$) nos grupos A e B. O número de plaquetas aumentou no momento pós 30 dias em relação ao pré e ao pós 48 horas ($p < 0,001$) nos dois grupos.

Em resumo, verificamos que o hematócrito e a concentração de hemoglobina dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica dos grupos A e B apresentaram uma diminuição significativa nos momentos pós 48 horas e pós 30 dias em comparação ao momento pré, já o número de plaquetas dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica dos grupos A e B apresentou uma diminuição significativa no momento pós 48 horas e um aumento significativo no momento pós 30 dias em comparação ao momento pré.

O tipo sanguíneo dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica foi determinado imunologicamente e encontra-se representado em porcentagem na Tabela 5.

Tabela 5 – Frequência em porcentagem da tipagem sanguínea do grupo ABO dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas dos grupos A e B.

ABO	Grupo A	Grupo B	Total
A+	38,6% (N = 10)	16,7% (N = 3)	13
A-	0%	5,6% (N = 1)	1
B+	7,7% (N = 2)	22,1% (N = 4)	6
B-	0%	0%	0
AB+	0%	5,6% (N = 1)	1
AB-	0%	0%	0
O+	46% (N = 12)	33,3% (N = 6)	18
O-	7,7% (N = 2)	16,7% (N = 3)	5

Analisando a frequência da tipagem sanguínea dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas pudemos verificar que os pacientes não diferem em relação ao tipo sanguíneo.

5.2 Saturação periférica de oxigênio

A medida da saturação periférica de oxigênio (SpO₂) foi feita pela equipe de enfermagem, utilizando um oxímetro digital.

Nós observamos que os pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas apresentaram diferença estatisticamente significativa no comportamento da SpO₂ entre os grupos A e B ($p < 0,001$) ao longo das avaliações realizadas (pré, pós-operatório imediato e pós 30 dias). Os pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas do grupo A, apresentaram um aumento significativo da saturação periférica de oxigênio no pós-operatório imediato (48 horas) (média $85,8 \pm 7,1\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $82,5 \pm 5,5\%$) ($p = 0,005$) em comparação ao momento pré (média $77 \pm 7,7\%$). Com relação ao grupo B, foi verificado um aumento significativo da SpO₂ no pós-operatório imediato (média $95,2 \pm 4,4\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $96,7 \pm 1,4\%$) ($p < 0,001$) em relação ao momento pré (média $78,1 \pm 8,5\%$) (Figura 7).

Figura 7 - Encontram-se representados pelo gráfico de linha a média e o desvio padrão da saturação periférica de oxigênio (SpO₂) nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A (SpO₂ < 94%) e no grupo B (SpO₂ ≥ 94%) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia. Observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B ao longo das avaliações ($p < 0,001$). No grupo A, houve diferença estatisticamente significativa no momento pós 48 horas ($p < 0,001$) e pós 30 dias ($p = 0,005$) em relação ao momento pré. Em relação ao grupo B, pudemos observar uma diferença significativa do momento pós 48 horas ($p < 0,001$) e pós 30 dias ($p < 0,001$) em relação ao momento pré.

5.3 Análise quantitativa do fator de von Willebrand

A determinação do antígeno do FVW foi realizado por Elisa. Os pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas do grupo A, apresentaram um aumento significativo da concentração antigênica do FVW no pós-operatório imediato (48 horas) (média $201,7 \pm 79,3$ U/dL) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $104,9 \pm 52,6$ U/dL) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média $81,4 \pm 26,7$ U/dL). Mas no grupo A também foi verificada uma diminuição significativa do FVW:Ag no pós 30 dias (média $104,9 \pm 52,6$ U/dL) em relação ao pós 48 horas (média $201,7 \pm 79,3$ U/dL) ($p < 0,001$). No grupo B, nós verificamos um aumento significativo do FVW:Ag no pós-operatório imediato (média $219,2 \pm 61,9$ U/dL) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $98,9 \pm 52$ U/dL) ($p < 0,001$) em relação ao momento pré (média $76,5 \pm 14,7$ U/dL). Assim como no grupo A, no grupo B também foi verificada uma diminuição significativa do FVW:Ag no pós 30 dias (média $98,9 \pm 52$ U/dL) em relação ao pós 48 horas (média $219,2 \pm 61,9$ U/dL) ($p < 0,001$). A concentração antigênica do FVW não apresentou diferença de comportamento entre os grupos A e B ao longo das avaliações realizadas (pré, pós-operatório imediato e pós 30 dias) (Figura 8).

Figura 8 - Encontram-se representados pelo gráfico de linha a média e o desvio padrão da concentração antigênica do FVW (FVW:Ag) nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia. Em ambos os grupos, há um aumento estatisticamente significativo do FVW:Ag no momento pós 48 horas e pós 30 dias ($p < 0,001$) em relação ao momento pré. A diminuição do FVW:Ag apresentada no momento pós 30 dias em relação ao pós 48 horas também foi significativa ($p < 0,001$) para os grupos A e B.

5.4 Análise funcional da protease ADAMTS-13

A determinação da atividade da protease ADAMTS-13 foi verificada considerando-se a mesma como sendo inversamente proporcional à capacidade de ligação residual do FVW ao colágeno, após sua exposição à enzima (ADAMTS-13).

Os pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas do grupo A, apresentaram um aumento significativo da atividade da ADAMTS-13 no pós-operatório imediato (48 horas) (média $130,4 \pm 52,4\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $84,4 \pm 36,9\%$) ($p < 0,001$) em comparação ao momento pré (média $64,9 \pm 28,1\%$). Também no grupo A foi verificada uma diminuição significativa da atividade da ADAMTS-13 no pós 30 dias (média $84,4 \pm 36,9\%$) em relação ao pós 48 horas (média $130,4 \pm 52,4\%$) ($p < 0,001$). No grupo B, foi verificado um aumento significativo da atividade da ADAMTS-13 no pós-operatório imediato (média $159,9 \pm 64\%$) ($p < 0,001$) e no pós 30 dias (média $94,7 \pm 59,4\%$) ($p < 0,001$) em relação ao momento pré (média $63,3 \pm 19,5\%$). Também no grupo B, como no grupo A, foi verificada uma diminuição significativa da atividade da ADAMTS-13 no pós 30 dias (média $94,7 \pm 59,4\%$) em relação ao pós 48 horas (média $159,9 \pm 64\%$) ($p < 0,001$). O comportamento da variável atividade da ADAMTS-13 apresentou um perfil parecido para o grupo A e grupo B, portanto a atividade da ADAMTS-13 não apresentou diferença de comportamento entre os grupos A e B ao longo das avaliações realizadas (pré, pós-operatório imediato e pós 30 dias) (Figura 9).

Figura 9 - Encontram-se representados pelo gráfico de linha a média e o desvio padrão da atividade da ADAMTS-13 nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia. Em ambos os grupos, houve aumento estatisticamente significativo da atividade da ADAMTS-13 no momento pós 48 horas e pós 30 dias ($p < 0,001$) em relação ao momento pré. A diminuição da atividade da ADAMTS-13 apresentada no pós 30 dias em relação ao pós 48 horas também foi significativa ($p < 0,001$) para os grupos A e B.

5.5 Análise da presença de inibidores da protease ADAMTS-13

Foi feita uma análise da amostra dos pacientes para avaliar a presença de inibidores da protease ADAMTS-13, trata-se de um método de triagem, portanto o resultado será apresentado como presença ou ausência do anticorpo anti-ADAMTS-13 e está didaticamente demonstrado na Tabela 5. No grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$), 4% dos pacientes apresentaram inibidores da protease ADAMTS-13 nos três momentos; 31% no momento pré (basal); em 8% dos pacientes a presença de inibidores foi detectada apenas no momento pós 30 dias; 4% deles apresentaram inibidores nos momentos pré (basal) e pós 48 horas e outros 4% apresentaram inibidores nos momentos pré (basal) e pós 30 dias. No grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) 16% dos pacientes apresentaram inibidores nos três momentos; em 26% dos pacientes deste grupo a presença de inibidores foi detectada no momento pré (basal); 5% dos pacientes deste grupo apresentaram inibidores no momento pós 30 dias e 10% deles apresentaram inibidores nos momentos pré (basal) e pós 30 dias.

Tabela 6 - Frequência em porcentagem da presença de inibidores de ADAMTS-13 nos momentos Pré, Pós 48 horas e Pós 30 dias nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas dos grupos A e B.

Momentos de coleta	Grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) (N = 26)	Grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) (N = 19)
Pré	31% (N = 8)	26% (N = 5)
Pré e Pós 48h	4% (N = 1)	0%
Pré e Pós 30d	4% (N = 1)	10% (N = 2)
Pós 30d	8% (N = 2)	5% (N = 1)
Pré, Pós 48h e Pós 30d	8% (N = 2)	16% (N = 3)

5.6 Análise da composição das subunidades do FVW plasmático

A composição da subunidade do FVW no plasma foi analisada por *Western immunoblotting*, e na Figura 10 encontram-se os resultados representativos do grupo A e do grupo B. Para realizar esta análise, o FVW foi previamente purificado por imunoprecipitação e separado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 5%.

Figura 10 – *Western immunoblotting* representativo da composição das subunidades do FVW plasmático em controles (*pool*) e dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($SpO_2 < 94\%$) e no grupo B ($SpO_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias. O padrão de fragmentação do FVW plasmático está representado por: subunidade principal do FVW com 225 kDa e os demais fragmentos com 205, 189, 176 e 140 kDa. PM = peso molecular (miosina = 205 kDa, beta-galactosidade = 116 kDa, fosforilase B = 97 kDa). Ctle = controle (*pool* composto de plasma de 12 doadores saudáveis, não tabagistas, da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo).

Todos os fragmentos da composição da subunidade do FVW plasmático foram submetidos à densitometria e as suas densidades normalizadas encontram-se apresentados no Anexo, Tabelas 18, 19 e 20; páginas 84 a 86.

Após a densitometria, foi feita uma relação entre a densidade do fragmento do paciente com a densidade do fragmento correspondente do controle (*pool* composto de plasma de 12 doadores saudáveis, não tabagistas, da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo). Essa correção foi feita para a normalização do ensaio.

A subunidade principal (intacta) do FVW é representada pela fração com migração de 225 kDa; esta fração é sabidamente clivada pela ADAMTS-13 gerando fragmentos de 176 e 140 kDa, fragmentos de principal interesse neste estudo.

A análise da densidade normalizada da proteólise da subunidade principal do FVW (225 kDa) do grupo A apresentou uma tendência ao aumento nos momentos pós 48 horas (mediana 0,910, limites 0,227 e 2,832) e pós 30 dias (mediana 0,811, limites 0,416 e 1,385) em comparação ao momento pré (mediana 0,786, limites 0,374 e 1,275) ($p=0,354$). No grupo B, assim como no grupo A, a análise da densidade normalizada da subunidade principal do FVW (225 kDa) também apresentou uma tendência ao aumento nos momentos pós 48 horas (mediana 1,142, limites 0,330 e 1,581) e pós 30 dias (mediana 0,921, limites 0,207 e 2,641) em comparação ao momento pré (mediana 0,825, limites 0,300 e 1,413) com $p=0,05$ (Figura 11).

Figura 11 – Densidade normalizada da subunidade principal do FVW (225 kDa) em pacientes portadores de cardiopatias congênicas cianogênicas no grupo A ($SpO_2 < 94\%$) e no grupo B ($SpO_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos do fragmento estudado.

A análise da densidade normalizada do fragmento de 176 kDa do grupo A apresentou uma tendência ao aumento nos momentos pós 48 horas (mediana 0,864, limites 0,015 e 3,902) e pós 30 dias (mediana 0,803, limites 0,080 e 2,258) em comparação ao momento pré (mediana 0,630, limites 0,262 e 2,359), no entanto este aumento não foi significativo ($p = 0,076$). No grupo B, também foi verificado uma tendência ao aumento da densidade do fragmento de 176 kDa no pós 48 horas (mediana 1,380, limites 0,029 e 6,139) e pós 30 dias (mediana 0,815, limites 0,086 e 7,102) em comparação ao momento pré (mediana 0,657, limites 0,086 e 3,069), porém este aumento não foi significativo ($p = 0,076$) (Figura 12).

Figura 12 - Densidade normalizada do fragmento de 176 kDa do FVW em pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos do fragmento estudado.

A análise da densidade normalizada do fragmento de 140 kDa do grupo A apresentou uma tendência ao aumento no momento pós 48 horas (mediana 0,576, limites 0,019 e 2,843) em comparação ao momento pré (mediana 0,451, limites 0,075 e 14,732), e apresentou tendência a diminuição no pós 30 dias (mediana 0,384, limites 0,008 e 10,413) em comparação ao momento pré, no entanto estas alterações não foram significantes ($p = 0,241$). No grupo B, também foi verificado uma tendência ao aumento da densidade do fragmento de 140 kDa no pós 48 horas (mediana 0,515, limites 0,011 e 21,800) em comparação ao momento pré (mediana 0,455, limites 0,022 e 5,552), e tendência a diminuição no pós 30 dias (0,448, limites 0,022 e 12,650) em comparação ao momento pré, porém estas alterações não foram significantes ($p = 0,378$) (Figura 13).

Figura 13 – Densidade normalizada do fragmento de 140 kDa do FVW em pacientes portadores de cardiopatias congênicas cianogênicas no grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) nos momentos pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos do fragmento estudado.

Observamos que nos dois grupos a densidade normalizada da subunidade de 225 kDa apresentou-se aumentada no momento pós 48 horas, no entanto, a magnitude do aumento observado no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$) foi quase o dobro do verificado no grupo A. Consequentemente, a densidade normalizada do fragmento 176 kDa apresentou-se mais elevada no grupo B, no momento pós 48 horas, do que a observada no grupo A; confirmando uma relação entre a subunidade principal 225 kDa e os fragmentos (176 e 140 kDa). No momento pós 30 dias, a densidade normalizada da subunidade principal 225 kDa apresentou-se ligeiramente aumentada em relação ao momento pré (basal), mas os dois grupos apresentaram uma redução na densidade normalizada do fragmento principal no momento pós 30 dias em relação ao momento pós 48 horas (Figuras 11 a 13). Sugerindo que no grupo de pacientes com correção da hipóxia ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$), o aumento da subunidade principal, decorrente do aumento do FVW:Ag plasmático, no momento pós operatório imediato (48 horas), tem uma resposta imediata da ADAMTS-13 pelo aumento da densidade do fragmento 176 kDa e no momento pós 30 dias observa-se uma diminuição nesta relação. Este fato pode ser reforçado pela observação da razão entre a atividade da enzima ADAMTS-13 e a proteína FVW:Ag, que no grupo B, no momento basal, era de 0,85 e cai para 0,81 no momento pós 48 horas, provavelmente devido ao aumento do FVW neste momento. E com o quadro mais estável do paciente após 30 dias de cirurgia, a razão enzima/proteína mostrou-se 1/1.

Em resumo, a concentração plasmática do FVW nos dois grupos, no momento pré, encontra-se abaixo do que esperávamos para pacientes com hipóxia (SOARES et al., 2005) (grupo A média $81,4 \pm 26,7$ U/dL; e no grupo B média $76,5 \pm 14,7$ U/dL). No entanto, no momento pós operatório imediato (48 horas) houve um aumento de aproximadamente duas vezes e meia a concentração antigênica do FVW no grupo A ($SpO_2 < 94\%$), média $201,7 \pm 79,3$ U/dL, e de três vezes no grupo B ($SpO_2 \geq 94\%$), média $219,2 \pm 61,9$ U/dL, provavelmente em decorrência da lesão endotelial ocasionada pela cirurgia; pois no momento pós 30 dias a concentração antigênica do FVW no grupo A (média $104,9 \pm 52,6$ U/dL) diminuiu em duas vezes em relação ao momento pós 48 horas e no grupo B (média $98,9 \pm 52$ U/dL) diminuiu aproximadamente duas vezes e meia.

A atividade da ADAMTS-13 nos dois grupos, no momento pré, também apresentou-se abaixo dos valores normais (média $84 \pm 16\%$) descritos para indivíduos nesta faixa etária (FEYS et al., 2009) (grupo A média $65 \pm 28\%$ e grupo B média $63 \pm 19\%$). No momento pós operatório imediato (48 horas) observamos que no grupo A, a atividade da ADAMTS-13 dobra (média $130 \pm 52\%$) e no grupo B, a atividade aumenta duas vezes e meia (média $160 \pm 64\%$), no entanto este aumento não acompanha o aumento observado no FVW:Ag. Porém a análise da composição das subunidades do FVW plasmático, nos indica que a ADAMTS-13 presente é suficiente para clivar a subunidade principal do FVW (fragmento de 225 kDa), pois não observamos um aumento da mesma magnitude que o aumento do FVW:Ag na densidade normalizada do fragmento de 225 kDa.

5.7 Análise das possíveis correlações entre a saturação periférica de oxigênio, atividade da ADAMTS-13 e FVW

Ainda explorando as variáveis SpO_2 , FVW:Ag, ADAMTS-13 e composição da subunidade do FVW com enfoque nos fragmentos 176 e 140 kDa, sabidamente clivados pela ADAMTS-13 foi feito um estudo de correlação entre estas variáveis, que estão apresentados nas Figuras 14 a 17; onde nos gráficos, a reta azul representa o grupo A ($SpO_2 < 94\%$) e a reta rosa representa o grupo B ($SpO_2 \geq 94\%$).

A análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da saturação periférica de oxigênio nos dois grupos, nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias) encontra-se na Figura 14. Os gráficos em A, B e C nos mostram que a ADAMTS-13 tem uma correlação bem fraca com a SpO_2 no grupo A nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias) com coeficientes de correlação ($r = 0,182$; $p = 0,373$); ($r = 0,126$; $p = 0,539$) e ($r = 0,092$; $p = 0,655$), respectivamente, e no grupo B, a correlação apresentou-se fraca nos momentos pré ($r = -0,016$; $p = 0,949$) e pós 48 horas ($r = 0,199$; $p = 0,414$). No entanto, no momento pós 30 dias de cirurgia, pudemos verificar uma correlação positiva entre a ADAMTS-13 e a SpO_2 ($r = 0,536$; $p = 0,018$).

Figura 14 - Análise individual da atividade da ADAMTS-13 (%) em função da saturação periférica de oxigênio SpO₂ (%) nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, considerando os grupos A e B. Em A, B e C estão representados os momentos: basal (pré); pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia, respectivamente.

A análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da concentração do FVW:Ag nos dois grupos, nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias) encontra-se na Figura 15.

Analisando os gráficos pudemos verificar que o grupo A apresentou uma correlação positiva entre a atividade da ADAMTS-13 e a concentração do FVW:Ag no momento pré ($r = 0,640$; $p < 0,001$) e pós 30 dias ($r = 0,500$; $p = 0,009$), e uma correlação fraca no momento pós 48 horas ($r = 0,391$; $p = 0,048$). O grupo B apresentou correlação fraca entre a atividade da ADAMTS-13 e a concentração do FVW:Ag nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias), com coeficientes de correlação ($r = 0,244$; $p = 0,314$); ($r = 0,149$; $p = 0,542$) e ($r = 0,207$; $p = 0,395$), respectivamente.

Figura 15 - Análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da concentração do FVW:Ag, nos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, considerando os grupos A e B. Em A, B e C estão representados os momentos: basal (pré); pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia, respectivamente.

A análise individual da densidade normalizada do fragmento de 176 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13 no grupos A e B, nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias) encontra-se na Figura 16. O grupo A, apresenta uma correlação positiva moderada da densidade normalizada do fragmento de 176 kDa com a atividade da ADAMTS-13 com coeficiente de correlação ($r = 0,435$; $p = 0,027$) no momento pré; e apresenta correlação bem fraca no momento pós 48 horas ($r = -0,095$; $p = 0,645$) e uma correlação positiva moderada no pós 30 dias ($r = 0,444$; $p = 0,023$). O grupo B, apresenta correlação positiva fraca da densidade normalizada do fragmento de 176 kDa com a atividade da ADAMTS-13 nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias) com coeficientes de correlação ($r = 0,347$; $p = 0,145$); ($r = 0,337$; $p = 0,158$) e ($r = 0,200$; $p = 0,413$), respectivamente.

Figura 16 - Análise individual da densidade normalizada do fragmento 176 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13, considerando os grupos A e B. Em A, momento basal (pré); em B, momento pós 48 horas de cirurgia; em C, momento pós 30 dias de cirurgia.

A Figura 17 nos mostra a análise individual da densidade normalizada do fragmento de 140 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13 no grupos A e B, nos três momentos (pré, pós 48 horas e pós 30 dias). O grupo A, apresenta uma correlação fraca da densidade normalizada do fragmento de 140 kDa com a atividade da ADAMTS-13 com coeficiente de correlação ($r = 0,279$; $p = 0,168$) no momento pré e no pós 30 dias ($r = 0,216$; $p = 0,290$); e não apresenta correlação no momento pós 48 horas ($r = 0,084$; $p = 0,682$). O grupo B, apresenta correlação moderada da densidade normalizada do fragmento de 140 kDa com a atividade da ADAMTS-13 no momento pré, com coeficiente de correlação ($r = 0,442$; $p = 0,058$); porém nos momentos pós 48 horas e pós 30 dias a correlação apresentou-se fraca com coeficientes de correlação ($r = 0,351$; $p = 0,141$) e ($r = 0,135$; $p = 0,581$), respectivamente.

Figura 17 - Análise individual da densidade normalizada do fragmento 140 kDa da subunidade principal do FVW em função da atividade da ADAMTS-13, considerando os grupos A e B. Em A, momento basal (pré); em B, momento pós 48 horas de cirurgia; em C, momento pós 30 dias de cirurgia.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A manutenção da homeostase de oxigênio é essencial para a sobrevivência de todas as espécies de vertebrados. A hipóxia tem sido demonstrada como capaz de alterar muitos mecanismos bioquímicos nas células endoteliais (MICHIELS et al., 2000; BYDLOWSKI et al., 1998a). Tais alterações podem ser observadas na mudança do estado anticoagulante para pró-trombótico. Observou-se também que a hipóxia induz a expressão endotelial de moléculas de adesão, como por exemplo, o fator de von Willebrand (FVW) e a selectina P, além de quimiocinas, promovendo o recrutamento de elementos celulares circulantes, (GINIS et al., 1993; KARAKURUM et al., 1994). Assim, acredita-se que a hipóxia leva o endotélio ao fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico. O endotélio possui características particulares, sendo dotado de superfície lisa, com propriedades anti-aderentes, anti-agregantes e anti-trombóticas. Em situações de injúria, há perda dessas propriedades, com desvio da condição basal de equilíbrio para um estado pró-agregante e pró-trombótico (GROSS; AIR; 2000; BYDLOWSKI et al., 1998b). Outra consequência da hipóxia já descrita na literatura, é o estímulo para o aumento da produção de eritropoetina, um hormônio essencial para a eritropoese, através do *hypoxia – inducible factor 1* (VARELA et al., 2010), funcionando como um mecanismo de compensação à oxigenação diminuída; a consequência a

este mecanismo é a hiperviscosidade, a qual pode funcionar como um fator de injúria endotelial.

Partindo-se do pressuposto que a hipóxia e a hiperviscosidade sanguínea são dois fatores de injúria endotelial, e estão presentes tanto na circulação pulmonar como na circulação sistêmica dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica, sugere-se que a disfunção endotelial também ocorra em ambos os territórios. Assim, as alterações sistêmicas descritas nesses pacientes podem ser, em parte, reflexo do quadro de disfunção endotelial (CARLINI et al., 1993).

Em pacientes com cardiopatias congênitas cianogênicas alguns estudos têm demonstrado alta incidência de trombose (DeFILLIPIS et al., 2007). Sabe-se que adultos com este tipo de cardiopatia frequentemente desenvolvem eritrocitose secundária; porém, a relação entre hiperviscosidade e trombose não está bem demonstrada nestes pacientes, esta relação é somente vista em pacientes com policitemia vera (eritrocitose primária), os quais apresentam trombose se manifestando geralmente como acidente vascular cerebral (AVC) e infarto do miocárdio (ROSE et al., 2007). Não há estudos que definam o hematócrito ótimo para pacientes com cardiopatia congênita cianogênica. Entretanto, a trombocitopenia é um dos maiores complicadores nestes pacientes com cardiopatia congênita cianogênica, por que causa sangramento excessivo no momento da cirurgia e no pós-cirúrgico, e em algumas situações pode causar resistência ao tratamento (OLGAR et al., 2008). Esses trabalhos não fornecem informações sobre possíveis fatores que estariam associados a esta complicação, sejam

eles clínicos ou bioquímicos. Somando-se a isso, o conhecimento destes fatores poderia ser útil na identificação de pacientes com alto risco para trombose, permitindo o estabelecimento precoce de medidas preventivas. Por outro lado, também existem estudos nestes pacientes que demonstram alta incidência de hemorragia, e a explicação para este fato é a diminuição de síntese ou de atividade de alguns dos fatores envolvidos na coagulação, devido à disfunção hepática causada pela hipoxemia e também pela hiperviscosidade do sangue (TEMPE; VIRMANI; 2002; AUI Y et al., 2009).

Com base nesta relação hipóxia, lesão endotelial, presença de FVW e estado pró-trombótico formam-se uma série de questões a serem respondidas, uma delas, tem como base o fato de existir uma associação entre hipóxia e alterações do FVW, como o aumento da sua concentração antigênica (SOARES et al., 2005), foi motivo de verificar se a atividade da enzima ADAMTS-13, principal reguladora da proteólise fisiológica do FVW, poderia estar alterada em presença de hipoxemia comparativamente à condição de oxigenação normal, e se alguma destas variáveis poderiam servir como indicadores de um melhor prognóstico para estes pacientes após a cirurgia. Assim, as cardiopatias congênitas cianogênicas (hipoxemia presente) que não cursam com microvasculopatia pulmonar extensa, constituem uma condição em humanos, menos complexa, para se verificar os efeitos da hipóxia sobre o funcionamento do conjunto FVW/ADAMTS-13. Para isto o estudo foi feito de forma longitudinal, para compararmos o momento basal (pré) com os momentos pós 48 horas, já com correção da

hipoxemia, porém com o efeito agudo do procedimento cirúrgico, e finalmente com o momento pós 30 dias de intervenção cirúrgica.

Estudamos o FVW antigênico quantitativamente, a composição da sua subunidade por métodos semi-quantitativos, a atividade da sua enzima clivadora, a ADAMTS-13, e a presença de inibidores contra a ADAMTS-13 por Elisa *in house*, em pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas que foram submetidos à cirurgia cardíaca. Estes pacientes também foram analisados quanto à saturação periférica de oxigênio após 30 dias de cirurgia, quando os pacientes que apresentaram $\text{SpO}_2 < 94\%$, ou seja, com hipóxia residual, foram incluídos no grupo A e os pacientes que apresentaram $\text{SpO}_2 \geq 94\%$, ou seja, em situação de normóxia após 30 dias de cirurgia, foram incluídos no grupo B.

Com relação aos métodos utilizados para fazer as determinações das variáveis estudadas, eles apresentam algumas limitações e é o que discutiremos a seguir. O método ideal para a determinação do FVW não está padronizado na literatura, mas os diferentes ensaios que têm sido utilizados pelos grandes estudos epidemiológicos têm produzido resultados comparáveis e reprodutíveis (MAGLIANO et al., 2003). O ensaio tradicional é baseado na agregação (RiCof), e é considerado um ensaio de alto custo e alta complexidade. Este fato tem sido parcialmente resolvido com a implantação do Elisa para FVW:Ag (MURDOCK et al., 1997). No nosso estudo avaliamos o FVW quantitativamente através do Elisa, um método de alta sensibilidade e especificidade, e a avaliação estrutural do FVW foi feita através da análise da composição da subunidade do FVW, trata-se de um

método semi-quantitativo, porém o único descrito para examinar a proteólise do FVW.

Existem 14 métodos disponíveis para avaliar a atividade biológica da ADAMTS-13 (PEYVANDI et al., 2010), alguns se baseiam nas propriedades de clivagem do FVW. Os métodos podem utilizar FVW purificado (derivado do plasma ou recombinante) como substrato para a determinação da atividade da ADAMTS-13 plasmática ou substratos sintéticos que mimetizam a porção do FVW que contém o sítio fisiológico de clivagem da ADAMTS-13 (TRIPODI, et al., 2008).

De acordo com o estudo mais recente sobre os métodos existentes para avaliar a ADAMTS-13 (PEYVANDI et al., 2010), algumas variáveis nos ensaios podem interferir nos resultados. A principal variável é que todos os ensaios foram desenvolvidos para determinar a atividade da ADAMTS-13 em condições estáticas, o que não reflete a condição fisiológica do fluxo sanguíneo, necessária para as mudanças conformacionais no FVW, o que possibilita a atividade enzimática da ADAMTS-13, e por isso a maioria destes métodos utilizam agentes desnaturantes, como por exemplo, a uréia, que no ensaio faz o papel do fluxo sanguíneo, alterando a conformação do FVW, ou seja alongando a molécula. O problema é que estes agentes desnaturantes podem também alterar a atividade enzimática da ADAMTS-13 e inibir a interação entre os anticorpos e a ADAMTS-13, o que pode, portanto, apresentar um resultado falsamente diminuído da atividade enzimática (PEYVANDI et al., 2010). O método baseado na ligação do colágeno residual (RICK et al., 2002) possui boa sensibilidade e

reprodutibilidade, e fornece a possibilidade de se fazer um rastreamento da presença de inibidores da protease (TRIPODI et al., 2008), por isto foi o escolhido para este estudo.

Nos pacientes com cardiopatias congênitas cianogênicas considerados como um grupo único, observamos que a saturação periférica de oxigênio (SpO_2) após 30 dias de submissão a cirurgia teve um aumento de 16% comparado ao basal; com relação ao hematócrito e hemoglobina, observamos uma diminuição de 17% e 20% respectivamente, comparado ao basal. Os pacientes deste estudo apresentaram uma pequena elevação do hematócrito no momento pré cirúrgico (basal), no entanto, os valores encontrados são próximos aos valores de normalidade descritos para esta faixa etária e, portanto, não configura uma situação de hiperviscosidade. O número de plaquetas teve um aumento de 22% no pós 30 dias comparado ao basal. O aumento do número de plaquetas após a cirurgia pode estar associado, entre outros fatores, à maior oferta de oxigênio à medula óssea (VONGPATANASIN et al., 1998).

Também os pacientes como um todo, apresentaram um comportamento muito parecido no momento pré (basal), tanto na concentração antigênica do FVW (FVW:Ag) quanto na atividade da ADAMTS-13, apresentando valores abaixo dos fisiologicamente descritos na literatura (FEYS et al., 2009), e a nossa expectativa era encontrar concentrações elevadas do FVW:Ag, devido ao efeito da hipóxia sobre o endotélio; já que estudos anteriores realizados em nosso laboratório indicaram uma forte associação entre hipóxia, trombocitopenia e

concentração elevada de FVW:Ag (SOARES et al., 2005). A análise da composição da subunidade do FVW sugeriu um aumento da concentração da subunidade principal (225 kDa) no momento pós 48 horas e pós 30 dias em relação ao pré (basal). Como já foi dito anteriormente, a subunidade principal do FVW é clivada fisiologicamente pela ADAMTS-13 na posição aa 1605 - aa 1606 do FVW, dando origem aos fragmentos de 176 e 140 kDa. A densidade normalizada do fragmento de 176 kDa apresentou o mesmo comportamento verificado na subunidade principal, ou seja tendência ao aumento, sugerindo um aumento na proteólise do FVW. Porém com relação ao fragmento 140 kDa, no momento pós 30 dias de cirurgia a densidade normalizada não mostrou tendência ao aumento com relação ao momento pré (basal); este fato pode ter ocorrido por dois motivos: primeiramente a mediana pode estar sendo influenciada pelos valores extremos encontrados, e também porque trata-se de um método de análise semi-quantitativo.

Os pacientes com cardiopatias congênitas cianogênicas do grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) apresentaram uma melhora da saturação periférica de oxigênio de 16% entre o momento pré e o pós 30 dias; já no grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$), o aumento na média da saturação periférica de oxigênio foi de 24%. Foi observado também, em ambos os grupos, uma diminuição do hematócrito e da hemoglobina no momento pós 30 dias de cirurgia em relação ao momento pré, mas como já foi dito anteriormente, apesar destas diferenças serem significantes não há diferença estatística entre os grupos A e B com relação a estas variáveis. Em relação ao número de plaquetas no

sangue periférico, observamos um aumento no momento pós 30 dias de cirurgia em relação ao momento pré, de 23% para o grupo A ($\text{SpO}_2 < 94\%$) e de 15% para o grupo B ($\text{SpO}_2 \geq 94\%$), podemos especular então que só o fato de aumentar a oferta de oxigênio para os pacientes do grupo B não foi o suficiente para aumentar o número de plaquetas, talvez esteja envolvido o fato de que neste grupo B o número de pacientes com cirurgias realizadas com circulação extra-corpórea (CEC) foi de 89%. Sabe-se que a realização de CEC leva o paciente a desencadear um processo inflamatório (DRAAISMA et al., 2006), que, por sua vez leva ao aumento do consumo de plaquetas, assunto este amplamente descrito na literatura (DANESE et al., 2004; WEYRICH et al., 2007).

Nestes pacientes, seja grupo A ou B, a concentração antigênica do FVW e a atividade da ADAMTS-13 apresentaram-se diminuídos no momento pré (basal) em relação aos dados da literatura (FEYS et al., 2009). No entanto, após 48 horas de cirurgia o FVW:Ag e a atividade da ADAMTS-13 apresentaram um aumento significativo, provavelmente devido a grande lesão endotelial que ocorre no processo cirúrgico, estes valores estão próximos aos encontrados no estudo realizado na Bélgica com pacientes submetidos a cirurgia cardíaca (FEYS et al., 2009). A razão entre enzima (ADAMTS-13) e substrato (FVW:Ag) encontrou-se diminuída em ambos os grupos no momento pós 48 horas, o que sugere uma diminuição da enzima proteolítica.

No momento pós 30 dias de cirurgia, no grupo B, a concentração antigênica do FVW aproxima-se dos valores de referência, somando-se a

isto temos o fato de que a razão entre a atividade de ADAMTS-13 e FVW:Ag observada neste grupo foi exatamente 1:1. A concentração antigênica do FVW apresenta-se ligeiramente elevada no grupo A, que também mostrou uma razão (atividade de ADAMTS-13 /FVW:Ag) < 1.

Lattuada e colaboradores relataram que o nível do antígeno do FVW plasmático e a atividade biológica desta molécula estavam aumentados em um grupo de grávidas, mas os multímeros de alto peso molecular não estavam presentes no plasma. Os autores formulam a hipótese de que o alto nível do FVW:Ag seja responsável pela diminuição da atividade da ADAMTS-13 no plasma, como resultado do consumo da protease quando ocorre um aumento do substrato (FVW:Ag) (LATTUADA et al., 2003). Em 2006, outro grupo de pesquisadores observou um aumento significativo do FVW:Ag com correspondente atividade da proteína (FVW) e uma moderada, porém significativa, diminuição da atividade enzimática da ADAMTS-13 no plasma de pacientes com pré-eclâmpsia com síndrome HELLP (hemólise, enzimas elevadas do fígado e baixo número de plaquetas), quando comparado com grávidas saudáveis voluntárias (HULSTEIN et al., 2006). E em 2009, Molvarec e colaboradores descreveram que em muitas condições associadas com o aumento da concentração do FVW:Ag no plasma a atividade da ADAMTS-13 encontra-se diminuída (MOLVAREC et al., 2009).

Um outro problema também já descrito é que a atividade da ADAMTS-13 pode ser influenciada por altos níveis de FVW endógeno, hiperlipemia, níveis plasmáticos elevados de hemoglobina (pode agir como inibidor de ADAMTS-13) (STUDT et al., 2005) ou bilirrubina (pode interferir

na fluorescência dos ensaios) (MEYER et al., 2007), além da presença de outras proteases plasmáticas que podem interferir na clivagem do FVW, como a plasmina por exemplo, ou podem degradar a própria ADAMTS-13 (LAM et al., 2007).

A análise da subunidade do FVW sugeriu que parte das alterações observadas nestes pacientes se devia à alta degradação proteolítica desta proteína pela ADAMTS-13, esta afirmação foi baseada na diminuição da densidade da subunidade principal (225 kDa), e na tendência ao aumento da densidade de um ou mais fragmentos proteolíticos.

No presente estudo, a oportunidade de ter analisado variáveis não só clínicas como também laboratoriais ao longo do estudo trouxe novas informações sobre o comportamento evolutivo de pacientes com cardiopatia congênita cianogênica.

Os nossos dados indicam que parece existir uma relação linear entre FVW:Ag e atividade da ADAMTS-13 dentro dos valores fisiológicos e/ou abaixo do fisiológicos de FVW:Ag e uma inversão de proporção quando ocorre o aumento do FVW:Ag; que provavelmente ocorre por consumo da enzima, esta hipótese ganha força quando observamos a composição das subunidades do FVW plasmático, pois mesmo tendo um aumento de três vezes a concentração antigênica do FVW no momento pós operatório imediato (48 horas) o aumento da subunidade principal do FVW (225 kDa) não ocorre na mesma magnitude, sugerindo que o consumo da enzima ADAMTS-13 esteja ocorrendo nesta ação de proteólise do fragmento 225 kDa. Sendo assim, parece que a enzima ADAMTS-13 pode funcionar como

mais um mecanismo de proteção a estes pacientes com tendência a trombose. Somando-se a esta relação do FVW:Ag/ADAMTS-13, tem o fato curioso de 29% dos pacientes apresentarem presença de inibidores da ADAMTS-13 no momento pré (basal). Entretanto, o significado biológico dessas observações permanece incerto, pois os mecanismos que regulam a atividade da ADAMTS-13, a formação de auto-anticorpos contra ela, assim como a proporção entre as moléculas (ADAMTS-13 e FVW) não estão completamente entendidos até o presente. Este estudo trouxe informações importantes sobre a relação hipóxia, FVW e a sua enzima proteolítica ADAMTS-13. Por outro lado, reforça a necessidade de estudar um método para avaliar a meia-vida da ADAMTS-13.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Após a análise dos dados deste estudo, podemos fazer as seguintes conclusões.

1 – A maioria dos pacientes com cardiopatia congênita cianogênica estudados, de ambos os grupos, apresentaram melhora significativa da saturação periférica de oxigênio após a realização da cirurgia.

2 - Na condição de hipoxemia, ou seja, no momento basal, os pacientes dos dois grupos apresentaram diminuição da concentração antigênica do FVW e da atividade da sua enzima proteolítica ADAMTS-13, e da densidade dos fragmentos da composição da subunidade do FVW, sugerindo duas possibilidades: que o grau de hipoxemia destes pacientes não foi suficiente para levar a uma disfunção endotelial com consequente aumento da secreção do FVW; e que existe uma proporção fisiológica entre a ADAMTS-13 e o FVW, existindo, portanto, uma simbiose entre eles.

3 - Os resultados observados no momento basal se alteram após a realização da cirurgia em ambos os grupos. A concentração antigênica do FVW e a atividade da ADAMTS-13 se apresentam significativamente aumentados nos momentos pós-operatório imediato (pós 48 horas) e pós 30 dias de cirurgia em comparação ao momento basal. Os fragmentos do FVW estudados (176 e 140 kDa) bem como a subunidade principal do FVW (225 kDa) apresentam uma tendência ao aumento nos momentos pós 48 horas e pós 30 dias quando comparado ao basal. Sugerindo que a cirurgia ocasionou um quadro de lesão endotelial, com desequilíbrio entre a

proporção da ADAMTS-13 com o FVW, ou provavelmente tenha ocorrido consumo da enzima ADAMTS-13, uma vez que a subunidade principal do FVW (225 kDa) bem como todos os demais fragmentos se encontram com tendência ao aumento; no momento pós 48 horas. No momento pós 30 dias, a proteólise da subunidade principal (225 kDa) mostrou-se diminuída em ambos os grupos, sugerindo uma diminuição da lesão endotelial e equilíbrio entre o FVW e a ADAMTS-13.

4 – O estudo de triagem da presença de inibidores contra ADAMTS-13 acusou a presença de inibidores em 29% dos pacientes no basal, este fato nos leva a pensar que estes pacientes podem desenvolver um mecanismo alternativo para produção de inibidores para ADAMTS-13.

ANEXOS

8 ANEXOS

As Tabelas 7, 8 e 9 são referentes às variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas) juntamente com as medidas de tendência central dos 56 pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas incluídos neste estudo. As Tabelas 10 a 16 são referentes às variáveis bioquímicas e correspondem aos dados individuais dos 45 pacientes que completaram as coletas nos três momentos de estudo, ou seja, pré (basal), pós 48 horas e pós 30 dias de cirurgia, juntamente com as medidas de tendência central.

Tabela 7 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pré (basal), e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Paciente	Sexo	Idade (meses)	Diagnóstico	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
					Pré	(Basal)		
1	N.S.A.	Fem	16	T. Fallot	75	44	13,6	233
2	A.R.F.R.	Masc	45	C. univ.	78	70	23	116
3	E.R.O.	Masc	29	C. univ.	84	56	19,7	285
5	G.V.S.S.	Fem	33	C. univ.	79	55	17	240
6	L.J.S.N.	Masc	40	T. Fallot	80	41	13,6	455
9	J.C.S.R.	Masc	24	C. univ.	84	49	16,4	387
10	H.F.L.	Fem	30	C. univ.	83	49	16,8	242
11	T.R.C.	Fem	37	C. univ.	80	54	16,1	340
12	M.B.S.	Fem	21	A. Pulmonar	83	41	13,2	261
13	D.G.S.	Masc	17	C. univ.	73	47	16	218
14	M.A.S.O.C.	Fem	15	A. Pulmonar	63	47	15,7	231
15	A.C.V.O.	Fem	91	A. Pulmonar	78	52	16,8	224
16	B.P.S.	Fem	43	A. Pulmonar	76	46	15,9	331
17	T.F.D.	Fem	67	C. univ.	85	48	17,3	294
18	G.F.N.	Masc	11	C. univ.	79	43	13,7	410
19	O.A.M.C.	Masc	26	T. Fallot	73	43	15	365
20	L.G.S.	Fem	84	C. univ.	81	55	18,7	178
21	V.A.F.S.	Masc	13	T. Fallot	80	46	16,6	315
22	G.B.O.C.	Fem	43	T. Fallot	84	38	12,9	351
23	L.N.P.	Masc	10	C. univ.	80	50	16,9	727
24	M.I.S.G.	Fem	37	C. univ.	79	53	17,9	316
25	J.V.O.S.	Masc	33	C. univ.	87	48	16,4	241
26	L.R.A.	Masc	17	C. univ.	82	44	16,1	342
27	D.B.S.	Masc	19	T. Fallot	72	42	14,5	345
28	K.C.S.	Fem	11	T. Fallot	86	34	11,7	270
29	V.F.P.	Masc	68	TGA	85	47	15,4	201
30	I.L.A.	Fem	57	A. Pulmonar	77	53	19,7	180
31	M.E.A.S.	Fem	13	C. univ.	53	52	18,2	346
32	E.A.G.	Fem	25	A. Pulmonar	64	50	17,4	463
33	M.A.S.S.	Masc	21	A. Pulmonar	88	35	12,9	366
34	V.M.O.A.	Fem	30	C. univ.	80	42	13,9	545
35	M.H.V.S.	Masc	71	A. Pulmonar	65	51	17,4	322
36	J.P.G.D.	Masc	33	C. univ.	65	48	16	391
37	N.O.S.	Fem	18	T. Fallot	62	40	14	365
38	E.V.P.C.	Masc	16	T. Fallot	90	36	12,3	321
39	A.F.O.S.	Masc	28	A. Pulmonar	63	62	18,6	196
40	G.H.L.S.	Masc	15	T. Fallot	72	38	12,7	448
41	G.B.A.	Masc	13	C. univ.	84	39	13,2	443
42	I.D.P.A.	Fem	23	C. univ.	84	43	14,4	467
43	G.P.M.F.	Masc	57	DATVP	91	44	14,8	170
44	G.G.S.S.	Masc	12	T. Fallot	91	41	13,4	410
45	L.R.F.	Fem	84	A. Pulmonar	78	51	18,3	213

Continua

Continuação

Tabela 7 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pré (basal), e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Paciente	Sexo	Idade (meses)	Diagnóstico	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
					Pré	(Basal)		
46	C.C.S.T.	Fem	82	A. Pulmonar	81	43	14,9	156
47	R.S.M.	Fem	32	C. univ.	72	44	11,5	308
48	M.F.P.	Masc	51	A. Pulmonar	79	50	16,9	339
49	S.S.F.	Fem	44	A. Pulmonar	80	40	13,4	328
50	M.V.S.	Fem	59	A. Pulmonar	80	50	16,9	321
51	T.I.F.B.R.	Masc	28	C. univ.	75	45	15,6	313
52	J.A.S.	Fem	84	C. univ.	79	51	18	219
53	N.V.G.	Fem	40	A. Pulmonar	80	53	18,1	149
54	G.J.M.	Masc	39	A. Pulmonar	80	45	16,2	234
55	L.O.J.	Masc	14	A. Pulmonar	78	42	15	208
56	M.J.B.G.	Masc	66	C. univ.	88	49	17,2	234
57	S.S.S.	Fem	80	A. Pulmonar	71	44	15,2	195
58	M.L.M.	Masc	31	TGA	78	45	16,2	369
59	M.S.	Masc	37	T. Fallot	82	45	15,9	392
Média					78	47	15,8	309
D.P.					8	7	2,2	110
Mediana					80	46	16,0	316
Mínimo					53	34	11,5	116
Máximo					91	70	23,0	727

Nº= número de entrada do paciente no estudo; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; Fem = feminino; Masc = masculino; T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias. D.P. = Desvio padrão.

Tabela 8 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 48 horas de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	Sat O ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
Pós 48h							
1	N.S.A.	T. Fallot	2	95	27	8,7	129
2	A.R.F.R.	C. univ.	2	78	51	17,1	165
3	E.R.O.	C. univ.	2	87	39	12,9	206
5	G.V.S.S.	C. univ.	2	85	40	12,5	173
6	L.J.S.N.	T. Fallot	2	100	33	10,8	154
9	J.C.S.R.	C. univ.	2	91	38	12,2	210
10	H.F.L.	C. univ.	2	97	39	12,8	115
11	T.R.C.	C. univ.	2	72	50	15,6	342
12	M.B.S.	A. Pulmonar	2	86	27	8,3	141
13	D.G.S.	C. univ.	2	81	35	12	163
14	M.S.O.C.	A. Pulmonar	2	96	29	9,1	106
15	A.C.V.O.	A. Pulmonar	2	83	35	11,4	148
16	B.P.S.	A. Pulmonar	SC	SC	SC	SC	SC
17	T.F.D.	C. univ.	4	90	36	12,4	90
18	G.F.N.	C. univ.	4	85	32	10,1	281
19	O.A.M.C.	T. Fallot	3	100	38	12,6	128
20	L.G.S.	C. univ.	2	88	33	10,6	770
21	V.A.F.S.	T. Fallot	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
22	G.B.O.C.	T. Fallot	SC	SC	SC	SC	SC
23	L.N.P.	C. univ.	2	88	36	12,3	137
24	M.I.S.G.	C. univ.	2	79	32	10,8	239
25	J.V.O.S.	C. univ.	SC	SC	SC	SC	SC
26	L.R.A.	C. univ.	2	85	32	10,9	248
27	D.B.S.	T. Fallot	SC	SC	SC	SC	SC
28	K.C.S.	T. Fallot	4	94	39	13,5	234
29	V.F.P.	TGA	SC	SC	SC	SC	SC
30	I.L.A.	A. Pulmonar	3	96	31	10,5	88
31	M.E.A.S.	C. univ.	2	95	33	11,2	221
32	E.A.G.	A. Pulmonar	2	83	38	12,7	250
33	M.A.S.S.	A. Pulmonar	2	90	34	11,6	296
34	V.M.O.A.	C. univ.	2	83	39	12,8	204
35	M.H.V.S.	A. Pulmonar	3	73	43	14,3	194
36	J.P.G.D.	C. univ.	2	89	39	12,6	38
37	N.O.S.	T. Fallot	2	98	32	10,8	138
38	E.V.P.C.	T. Fallot	3	93	27	8,8	16,9
39	A.F.O.S.	A. Pulmonar	2	92	40	12,4	236
40	G.H.L.S.	T. Fallot	2	97	35	11,4	109
41	G.B.A.	C. univ.	2	93	32	10,1	168
42	I.D.P.A.	C. univ.	2	95	37	12,1	154
43	G.P.M.F.	DATVP	2	95	22	6,7	93

Continua

Continuação

Tabela 8 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 48 horas de cirurgia, e suas variáveis (saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	Sat O ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
Pós 48h							
44	G.G.S.S.	T. Fallot	3	97	32	10	231
45	L.R.F.	A. Pulmonar	2	98	46	15,5	160
46	C.C.S.T.	A. Pulmonar	2	90	28	9,3	88
47	R.S.M.	C. univ.	2	97	46	13,2	128
48	M.F.P.	A. Pulmonar	2	99	42	13,2	149
49	S.S.F.	A. Pulmonar	2	84	34	10,5	214
50	M.V.S.	A. Pulmonar	2	94	34	11	267
51	T.I.B.R.	C. univ.	3	87	31	9,9	194
52	J.A.S.	C. univ.	2	90	38	12,8	134
53	N.V.G.	A. Pulmonar	3	80	50	16,2	132
54	G.J.M.	A. Pulmonar	2	98	28	9,1	114
55	L.O.J.	A. Pulmonar	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
56	M.J.B.G.	C. univ.	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
57	S.S.S.	A. Pulmonar	3	71	39	13,3	128
58	M.L.M.	TGA	5	83	35	11,6	381
59	M.S.	T. Fallot	2	100	28	9,2	169
Média			2	90	36	11,7	185
D.P.			1	8	6	2,1	113
Mediana			2	90	35	11,6	162
Mínimo			2	71	22	6,7	17
Máximo			5	100	51	17,1	770

Nº= número de entrada do paciente no estudo; Dias = dias decorridos entre a cirurgia e a coleta; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias. SC = sem cirurgia; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 9 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 30 dias de cirurgia, e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
Pós 30d							
1	N.S.A.	T. Fallot	28	92	42	13,1	374
2	A.R.F.R.	C. univ.	28	82	47	16,9	176
3	E.R.O.	C. univ.	18	79	42	13,1	531
5	G.V.S.S.	C. univ.	30	89	37	11,1	310
6	L.J.S.N.	T. Fallot	30	97	37	12,8	581
9	J.C.S.R.	C. univ.	30	98	36	11,4	587
10	H.F.L.	C. univ.	28	90	41	13	223
11	T.R.C.	C. univ.	43	72	44	13,3	549
12	M.B.S.	A. Pulmonar	29	88	46	14,3	477
13	D.G.S.	C. univ.	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
14	M.S.O.C.	A. Pulmonar	25	97	32	10,2	465
15	A.C.V.O.	A. Pulmonar	18	100	34	11,2	429
16	B.P.S.	A. Pulmonar	SC	SC	SC	SC	SC
17	T.F.D.	C. univ.	28	86	37	12,2	531
18	G.F.N.	C. univ.	27	83	46	14,5	525
19	O.A.M.C.	T. Fallot	18	96	37	12,3	512
20	L.G.S.	C. univ.	29	88	41	12,9	252
21	V.A.F.S.	T. Fallot	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
22	G.B.O.C.	T. Fallot	SC	SC	SC	SC	SC
23	L.N.P.	C. univ.	41	83	41	14,4	588
24	M.I.S.G.	C. univ.	20	80	39	12,9	551
25	J.V.O.S.	C. univ.	SC	SC	SC	SC	SC
26	L.R.A.	C. univ.	27	78	43	14,6	367
27	D.B.S.	T. Fallot	SC	SC	SC	SC	SC
28	K.C.S.	T. Fallot	27	96	38	13,1	544
29	V.F.P.	TGA	SC	SC	SC	SC	SC
30	I.L.A.	A. Pulmonar	62	97	31	11,2	279
31	M.E.A.S.	C. univ.	22	86	39	12,8	349
32	E.A.G.	A. Pulmonar	54	86	45	15	190
33	M.A.S.S.	A. Pulmonar	30	95	34	11,1	582
34	V.M.O.A.	C. univ.	28	80	37	11,6	469
35	M.H.V.S.	A. Pulmonar	28	67	50	17	228
36	J.P.G.D.	C. univ.	28	98	27	8,9	264
37	N.O.S.	T. Fallot	26	98	29	9,3	400
38	E.V.P.C.	T. Fallot	27	96	36	11,8	416
39	A.F.O.S.	A. Pulmonar	28	83	30	8,7	453
40	G.H.L.S.	T. Fallot	42	97	34	10,7	425
41	G.B.A.	C. univ.	23	77	33	10,8	676
42	I.D.P.A.	C. univ.	33	94	42	13,9	362
43	G.P.M.F.	DATVP	30	97	30	9,3	294

Continua

Continuação

Tabela 9 - Características dos pacientes portadores de cardiopatias congênitas cianogênicas, no momento pós 30 dias de cirurgia, e suas variáveis (Saturação periférica de oxigênio, hematócrito, hemoglobina e plaquetas)

Nº	Nome	Diagnóstico	Dias	SpO ₂ (%)	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plaq x10 ³ /mm ³
Pós 30d							
44	G.G.S.S.	T. Fallot	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
45	L.R.F.	A. Pulmonar	49	96	40	13,5	215
46	C.C.S.T.	A. Pulmonar	30	87	30	9,6	211
47	R.S.M.	C. univ.	22	95	37	10,8	338
48	M.F.P.	A. Pulmonar	28	98	35	11,4	118
49	S.S.F.	A. Pulmonar	29	81	41	13,7	337
50	M.V.S.	A. Pulmonar	26	86	43	14,7	510
51	T.I.B.R.	C. univ.	105	80	44	16,4	309
52	J.A.S.	C. univ.	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
53	N.V.G.	A. Pulmonar	117	82	46	15,7	178
54	G.J.M.	A. Pulmonar	62	95	36	12,5	220
55	L.O.J.	A. Pulmonar	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
56	M.J.B.G.	C. univ.	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
57	S.S.S.	A. Pulmonar	14	78	44	14,8	239
58	M.L.M.	TGA	41	82	41	13,8	442
59	M.S.	T. Fallot	38	98	39	13,2	373
Média			34	88	39	12,7	388
D.P.			20	8	5	2,1	141
Mediana			28	88	39	12,9	374
Mínimo			14	67	27	8,7	118
Máximo			117	100	50	17,0	676

Nº= número de entrada do paciente no estudo; Dias = dias decorridos entre a cirurgia e a coleta; SpO₂ = Saturação periférica de oxigênio; Ht = hematócrito; Hb = hemoglobina; Plaq = número de plaquetas; T. Fallot = Tetralogia de Fallot; C. univ. = Coração com fisiologia univentricular; A. Pulmonar = Atresia pulmonar; DATVP = Drenagem anômala total de veias pulmonares; TGA = Transposição das grandes artérias. SC = sem cirurgia; Aus = Ausente; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 10 - Determinação do antígeno do FVW (FVW:Ag)

FVW:Ag (U/dL)				
Nº	Paciente	Pré	Pós 48h	Pós 30d
1	N.S.A.	79	181	149
2	A.R.F.R.	130	239	86
3	E.R.O.	88	206	185
5	G.V.S.S.	89	298	94
6	L.J.S.N.	84	101	89
9	J.C.S.R.	98	252	75
10	H.F.L.	94	324	95
11	T.R.C.	101	318	95
12	M.B.S.	63	99	87
14	M.S.O.C.	51	89	58
15	A.C.V.O.	70	240	68
17	T.F.D.	94	319	110
18	G.F.N.	54	198	78
19	O.A.M.C.	67	262	87
20	L.G.S.	51	91	76
23	L.N.P.	73	230	82
24	M.I.S.G.	82	253	84
26	L.R.A.	62	96	78
28	K.C.S.	85	192	209
30	I.L.A.	71	208	77
31	M.E.A.S.	143	212	203
32	E.A.G.	51	59	49
33	M.A.S.S.	77	255	73
34	V.M.O.A.	159	324	297
35	M.H.V.S.	63	81	80
36	J.P.G.D.	82	300	267
37	N.O.S.	67	250	71
38	E.V.P.C.	51	188	65
39	A.F.O.S.	71	243	142
40	G.H.L.S.	67	204	73
41	G.B.A.	79	250	89
42	I.D.P.A.	94	262	104
43	G.P.M.F.	101	236	107
45	L.R.F.	93	327	113
46	C.C.S.T.	69	211	96
47	R.S.M.	85	168	91
48	M.F.P.	78	246	97
49	S.S.F.	68	134	84
50	M.V.S.	69	129	79
51	T.I.B.R.	71	221	83
53	N.V.G.	64	185	59
54	G.J.M.	57	244	76
57	S.S.S.	77	177	86
58	M.L.M.	72	167	82
59	M.S.	75	141	79
Média		79	209	102
D.P.		22	72	52
Mediana		75	212	86
Mínimo		51	59	49
Máximo		159	327	297

Tabela 11 - Determinação da atividade da ADAMTS-13

ADAMTS-13 (%)				
Nº	Paciente	Pré	Pós 48h	Pós 30d
01	N.S.A.	90	166	97
02	A.R.F.R.	89	122	69
03	E.R.O.	78	154	88
05	G.V.S.S.	62	113	70
06	L.J.S.N.	86	199	94
09	J.C.S.R.	83	157	164
10	H.F.L.	118	205	144
11	T.R.C.	140	303	211
12	M.B.S.	64	137	101
14	M.S.O.C.	41	165	101
15	A.C.V.O.	63	167	69
17	T.F.D.	92	182	88
18	G.F.N.	37	103	93
19	O.A.M.C.	57	152	67
20	L.G.S.	28	96	63
23	L.N.P.	34	70	24
24	M.I.S.G.	57	184	124
26	L.R.A.	13	148	69
28	K.C.S.	57	68	36
30	I.L.A.	64	148	88
31	M.E.A.S.	69	116	97
32	E.A.G.	42	55	42
33	M.A.S.S.	75	137	67
34	V.M.O.A.	73	139	94
35	M.H.V.S.	55	93	82
36	J.P.G.D.	97	178	281
37	N.O.S.	56	273	160
38	E.V.P.C.	45	178	137
39	A.F.O.S.	44	65	58
40	G.H.L.S.	39	114	49
41	G.B.A.	46	96	47
42	I.D.P.A.	33	79	35
43	G.P.M.F.	47	46	31
45	L.R.F.	99	271	91
46	C.C.S.T.	64	148	109
47	R.S.M.	50	155	73
48	M.F.P.	79	277	119
49	S.S.F.	102	172	101
50	M.V.S.	56	135	60
51	T.I.B.R.	61	113	85
53	N.V.G.	69	98	56
54	G.J.M.	77	158	61
57	S.S.S.	58	94	69
58	M.L.M.	47	84	53
59	M.S.	56	117	77
Média		64	143	89
D.P.		25	59	47
Mediana		61	139	82
Mínimo		13	46	24
Máximo		140	303	281

Tabela 12 - Avaliação da presença de Inibidores de ADAMTS-13**Atividade da ADAMTS-13 – Avaliação da presença de inibidor (%)**

Nº	Paciente	Basal	Cálculo	P/A	Pós 48h	Cálculo	P/A	Pós 30d	Cálculo	P/A
1	N.S.A.	84	135	A	89	249	A	134	145	A
2	A.R.F.R.	131	133	A	113	183	A	133	103	P
3	E.R.O.	104	117	A	167	231	A	92	132	A
5	G.V.S.S.	72	93	A	74	169	A	73	106	A
6	L.J.S.N.	66	130	A	140	299	A	88	140	A
9	J.C.S.R.	99	125	A	113	235	A	133	246	A
10	H.F.L.	101	176	A	141	308	A	129	215	A
11	T.R.C.	105	209	A	193	454	A	123	317	A
12	M.B.S.	75	96	A	116	206	A	114	151	A
14	M.S.O.C.	114	62	P	150	248	A	90	151	A
15	A.C.V.O.	107	95	P	124	251	A	94	104	A
17	T.F.D.	96	138	A	121	273	A	105	132	A
18	G.F.N.	79	55	P	90	154	A	93	139	A
19	O.A.M.C.	95	86	P	108	228	A	89	101	A
20	L.G.S.	66	42	P	102	144	A	107	95	P
23	L.N.P.	91	51	P	113	105	P	87	37	P
24	M.I.S.G.	92	86	P	148	276	A	119	186	A
26	L.R.A.	66	19	P	112	221	A	62	103	A
28	K.C.S.	102	86	P	102	101	P	134	54	P
30	I.L.A.	72	96	A	92	223	A	80	131	A
31	M.E.A.S.	118	104	P	146	174	A	103	145	A
32	E.A.G.	42	63	A	42	83	A	55	64	A
33	M.A.S.S.	87	113	A	126	205	A	118	100	P
34	V.M.O.A.	104	109	A	139	209	A	112	140	A
35	M.H.V.S.	85	82	P	102	140	A	108	122	A
36	J.P.G.D.	83	146	A	121	267	A	160	421	A
37	N.O.S.	97	83	P	158	410	A	138	240	A
38	E.V.P.C.	84	67	P	119	267	A	138	206	A
39	A.F.O.S.	75	66	P	104	98	P	82	87	A
40	G.H.L.S.	61	59	P	141	171	A	96	74	P
41	G.B.A.	83	69	P	130	144	A	63	71	A
42	I.D.P.A.	129	49	P	226	118	P	124	53	P
43	G.P.M.F.	139	70	P	147	70	P	123	47	P
45	L.R.F.	108	149	A	192	407	A	107	137	A
46	C.C.S.T.	79	96	A	116	222	A	115	164	A
47	R.S.M.	119	75	P	172	233	A	116	110	P
48	M.F.P.	71	119	A	129	416	A	84	179	A
49	S.S.F.	71	153	A	127	258	A	68	152	A
50	M.V.S.	58	84	A	76	203	A	57	90	A
51	T.I.B.R.	98	92	P	109	170	A	75	127	A
53	N.V.G.	87	104	A	87	147	A	86	84	P
54	G.J.M.	77	116	A	110	238	A	91	92	A
57	S.S.S.	73	87	A	84	140	A	77	103	A
58	M.L.M.	77	70	P	86	126	A	75	79	A
59	M.S.	68	84	A	91	176	A	101	116	A
Média		89	96		122	214		101	133	
D.P.		21	37		34	88		25	71	
Mediana		85	92		116	209		101	122	
Mínimo		42	19		42	70		55	37	
Máximo		139	209		226	454		160	421	

P = presença de inibidor; A = ausência de inibidor; D.P. = Desvio padrão

Tabela 13 - Determinação de proteínas do imunoprecipitado do FVW**Proteínas do imunoprecipitado do FVW (mg/mL)**

Nº	Paciente	Basal	Pós 48h	Pós 30d
1	N.S.A.	25,76	23,88	26,17
2	A.R.F.R.	25,13	26,96	24,41
3	E.R.O.	28,78	30,06	30,51
5	G.V.S.S.	31,76	29,03	32,34
6	L.J.S.N.	34,44	37,45	35,16
9	J.C.S.R.	28,19	26,29	29,00
10	H.F.L.	35,64	31,61	31,53
11	T.R.C.	29,75	28,52	32,01
12	M.B.S.	32,53	28,20	32,00
14	M.S.O.C.	28,72	31,88	32,92
15	A.C.V.O.	32,81	39,66	34,54
17	T.F.D.	40,52	33,64	34,85
18	G.F.N.	36,20	35,68	33,34
19	O.A.M.C.	31,49	27,39	34,51
20	L.G.S.	37,79	34,66	35,99
23	L.N.P.	38,05	31,74	34,63
24	M.I.S.G.	53,11	21,30	27,88
26	L.R.A.	32,41	29,78	32,99
28	K.C.S.	34,13	36,25	33,61
30	I.L.A.	28,71	28,34	25,84
31	M.E.A.S.	31,28	33,63	38,17
32	E.A.G.	37,44	40,40	32,63
33	M.A.S.S.	22,43	24,36	28,51
34	V.M.O.A.	28,04	28,91	32,94
35	M.H.V.S.	30,45	32,36	36,53
36	J.P.G.D.	54,64	32,16	28,31
37	N.O.S.	31,83	29,20	32,89
38	E.V.P.C.	38,03	35,46	44,57
39	A.F.O.S.	30,99	27,42	29,12
40	G.H.L.S.	26,14	20,61	24,29
41	G.B.A.	28,89	23,33	29,50
42	I.D.P.A.	30,28	27,60	25,34
43	G.P.M.F.	23,36	26,52	30,84
45	L.R.F.	26,33	28,66	24,35
46	C.C.S.T.	24,62	25,64	23,28
47	R.S.M.	20,91	20,21	27,31
48	M.F.P.	32,26	24,22	22,89
49	S.S.F.	30,06	26,18	34,64
50	M.V.S.	25,47	27,59	25,33
51	T.I.B.R.	28,29	33,71	31,11
53	N.V.G.	32,28	33,59	25,64
54	G.J.M.	29,54	31,84	37,84
57	S.S.S.	25,48	25,48	23,80
58	M.L.M.	29,98	29,03	34,16
59	M.S.	36,15	37,03	37,90
Média		31,58	29,72	31,02
D.P.		6,59	4,85	4,80
Mediana		30,45	29,03	32,00
Mínimo		20,91	20,21	22,89
Máximo		54,64	40,40	44,57

Tabela 14 – Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pré (basal)

Padrão de fragmentação do FVW (densidade)						
Nº	Paciente	Basal 140 kDa	Basal 176 kDa	Basal 189 kDa	Basal 205 kDa	Basal 225 kDa
1	N.S.A.	0,868	1,490	1,967	2,106	1,275
2	A.R.F.R.	0,075	0,350	1,118	1,044	0,747
3	E.R.O.	5,169	0,999	0,956	1,124	0,960
5	G.V.S.S.	0,226	0,560	0,678	0,518	0,705
6	L.J.S.N.	0,702	0,999	0,656	0,602	0,915
9	J.C.S.R.	2,250	2,546	2,058	1,694	1,204
10	H.F.L.	0,290	0,312	0,326	0,380	0,718
11	T.R.C.	14,732	2,359	2,430	2,546	0,538
12	M.B.S.	1,902	0,629	0,518	0,838	0,685
14	M.S.O.C.	0,117	0,109	0,097	0,177	0,322
15	A.C.V.O.	0,315	0,284	0,192	0,136	0,974
17	T.F.D.	8,788	0,637	0,842	0,879	0,826
18	G.F.N.	0,378	0,610	0,604	0,630	0,795
19	O.A.M.C.	0,186	0,220	0,205	0,110	0,327
20	L.G.S.	0,407	0,262	0,421	0,417	0,716
23	L.N.P.	0,811	0,499	0,316	0,564	0,826
24	M.I.S.G.	0,247	0,516	0,511	0,519	0,859
26	L.R.A.	1,497	0,779	0,661	0,785	0,845
28	K.C.S.	3,277	0,885	1,046	1,008	1,266
30	I.L.A.	1,375	3,069	2,358	2,433	1,374
31	M.E.A.S.	0,308	2,243	1,972	1,436	0,757
32	E.A.G.	0,129	0,311	0,478	0,375	0,584
33	M.A.S.S.	0,322	0,683	0,567	0,804	0,803
34	V.M.O.A.	1,170	1,936	1,293	1,175	1,203
35	M.H.V.S.	0,333	1,245	1,323	0,924	0,777
36	J.P.G.D.	0,148	1,281	1,258	1,247	1,212
37	N.O.S.	0,184	0,680	0,677	0,613	0,536
38	E.V.P.C.	0,022	0,164	0,252	0,240	0,532
39	A.F.O.S.	0,195	0,287	0,353	0,359	0,434
40	G.H.L.S.	0,082	0,389	0,710	0,559	0,720
41	G.B.A.	0,245	0,631	0,630	0,626	0,677
42	I.D.P.A.	1,688	0,756	0,723	0,690	0,825
43	G.P.M.F.	0,677	1,548	1,865	1,631	1,413
45	L.R.F.	2,082	0,619	0,595	0,763	0,711
46	C.C.S.T.	0,383	0,697	0,747	0,556	0,905
47	R.S.M.	0,455	0,657	0,613	0,709	0,694
48	M.F.P.	5,552	0,612	0,501	0,756	1,022
49	S.S.F.	1,411	0,814	0,719	1,044	0,805
50	M.V.S.	0,841	0,339	0,705	0,325	0,374
51	T.I.B.R.	0,842	0,950	0,336	0,947	1,104
53	N.V.G.	0,255	0,481	0,426	0,786	0,715
54	G.J.M.	0,479	0,494	0,528	0,596	0,994
57	S.S.S.	0,495	0,666	0,718	0,879	1,023
58	M.L.M.	4,793	0,469	0,717	0,681	0,847
59	M.S.	0,090	0,086	0,072	0,130	0,300
Média		1,484	0,826	0,816	0,830	0,819
D.P.		2,678	0,673	0,591	0,553	0,274
Mediana		0,455	0,631	0,661	0,709	0,803
Mínimo		0,022	0,086	0,072	0,110	0,300
Máximo		14,732	3,069	2,430	2,546	1,413

Tabela 15 – Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pós 48 horas de cirurgia

Padrão de fragmentação do FVW (densidade)						
Nº	Paciente	Pós 48h 140 kDa	Pós 48h 176 kDa	Pós 48h 189 kDa	Pós 48h 205 kDa	Pós 48h 225 kDa
1	N.S.A.	1,868	0,898	2,106	1,837	0,956
2	A.R.F.R.	0,660	2,736	1,387	1,448	1,087
3	E.R.O.	0,472	0,916	0,959	1,515	1,020
5	G.V.S.S.	0,687	0,965	0,858	0,846	0,863
6	L.J.S.N.	0,515	1,006	1,121	0,736	1,166
9	J.C.S.R.	21,800	6,139	3,635	2,813	1,581
10	H.F.L.	0,562	0,609	0,431	0,448	0,845
11	T.R.C.	0,625	0,360	0,522	0,715	0,820
12	M.B.S.	2,843	1,156	0,937	1,342	0,684
14	M.S.O.C.	0,911	0,688	0,975	1,391	0,991
15	A.C.V.O.	1,562	2,328	1,457	1,097	1,172
17	T.F.D.	0,591	0,015	0,143	0,141	0,326
18	G.F.N.	0,019	0,044	0,071	0,084	0,303
19	O.A.M.C.	0,042	0,178	0,178	0,174	0,429
20	L.G.S.	0,213	0,708	0,777	0,913	1,099
23	L.N.P.	0,888	0,709	0,493	0,807	0,941
24	M.I.S.G.	0,489	0,617	0,574	0,756	0,839
26	L.R.A.	0,667	1,703	0,871	1,387	1,103
28	K.C.S.	0,197	0,454	0,581	0,950	1,117
30	I.L.A.	0,591	1,467	1,407	1,425	1,094
31	M.E.A.S.	0,339	2,563	2,118	1,596	1,127
32	E.A.G.	0,201	0,397	0,450	0,461	0,572
33	M.A.S.S.	0,263	1,721	1,381	1,335	0,738
34	V.M.O.A.	0,133	0,734	0,612	0,520	0,883
35	M.H.V.S.	0,077	1,703	0,827	0,444	0,227
36	J.P.G.D.	1,036	2,659	1,323	0,962	1,314
37	N.O.S.	0,233	2,653	1,458	1,591	1,142
38	E.V.P.C.	0,011	0,029	0,038	0,069	0,330
39	A.F.O.S.	0,997	1,595	0,884	1,007	0,936
40	G.H.L.S.	0,459	1,276	1,230	1,744	1,382
41	G.B.A.	0,340	0,830	0,712	1,111	0,783
42	I.D.P.A.	0,795	1,056	0,838	0,837	0,873
43	G.P.M.F.	0,457	1,394	1,554	1,366	1,364
45	L.R.F.	17,852	1,380	1,093	1,399	1,147
46	C.C.S.T.	0,125	1,859	1,652	1,026	1,060
47	R.S.M.	0,313	0,548	0,969	1,322	1,064
48	M.F.P.	5,931	1,847	0,963	2,368	1,570
49	S.S.F.	2,133	1,242	1,451	1,281	1,111
50	M.V.S.	0,189	0,473	0,968	0,390	0,588
51	T.I.B.R.	1,292	3,902	1,885	1,742	2,832
53	N.V.G.	0,429	0,774	0,954	1,398	1,159
54	G.J.M.	2,618	1,694	1,823	1,743	1,371
57	S.S.S.	1,437	1,501	1,590	1,265	1,013
58	M.L.M.	0,837	0,164	0,282	0,347	0,588
59	M.S.	0,433	0,565	0,379	0,645	0,754
Média		1,670	1,295	1,043	1,084	0,986
D.P.		4,109	1,118	0,659	0,590	0,426
Mediana		0,562	1,006	0,959	1,097	1,013
Mínimo		0,011	0,015	0,038	0,069	0,227
Máximo		21,800	6,139	3,635	2,813	2,832

Tabela 16 – Densidade normalizada do padrão de fragmentação do FVW dos pacientes no momento pós 30 dias.

Padrão de fragmentação do FVW (densidade)						
Nº	Paciente	Pós 30d 140 kDa	Pós 30d 176 kDa	Pós 30d 189 kDa	Pós 30d 205 kDa	Pós 30d 225 kDa
1	N.S.A.	2,026	2,258	3,017	2,353	1,385
2	A.R.F.R.	0,190	0,488	0,794	0,725	0,671
3	E.R.O.	0,698	0,580	0,651	0,767	0,856
5	G.V.S.S.	0,218	1,561	1,027	0,637	1,112
6	L.J.S.N.	0,467	1,211	0,863	0,800	1,158
9	J.C.S.R.	12,650	7,102	3,199	3,731	1,705
10	H.F.L.	0,783	0,843	0,809	1,021	1,170
11	T.R.C.	1,696	2,029	2,148	2,355	1,307
12	M.B.S.	0,392	0,322	0,305	0,422	0,483
14	M.S.O.C.	0,086	0,180	0,167	0,195	0,454
15	A.C.V.O.	0,417	0,355	0,269	0,186	0,688
17	T.F.D.	0,417	1,245	0,804	0,828	0,875
18	G.F.N.	0,008	0,080	0,068	0,086	0,416
19	O.A.M.C.	0,028	0,086	0,055	0,047	0,207
20	L.G.S.	0,080	0,180	0,267	0,332	0,695
23	L.N.P.	0,362	0,170	0,106	0,197	0,538
24	M.I.S.G.	0,065	0,455	0,458	0,627	0,746
26	L.R.A.	0,913	0,980	0,779	0,878	0,937
28	K.C.S.	0,448	0,815	0,568	0,908	0,980
30	I.L.A.	0,511	1,295	1,133	1,266	1,061
31	M.E.A.S.	0,375	1,364	1,016	1,683	1,104
32	E.A.G.	0,133	0,302	0,345	0,347	0,617
33	M.A.S.S.	0,344	0,738	0,882	0,910	0,906
34	V.M.O.A.	0,400	0,903	0,751	0,655	0,965
35	M.H.V.S.	0,068	1,389	0,913	0,412	0,419
36	J.P.G.D.	0,055	1,523	1,379	1,825	1,144
37	N.O.S.	0,699	0,708	0,539	0,731	0,585
38	E.V.P.C.	0,022	0,106	0,125	0,232	0,852
39	A.F.O.S.	0,180	1,043	0,640	0,709	0,720
40	G.H.L.S.	0,146	0,184	0,656	0,556	0,906
41	G.B.A.	0,118	0,195	0,229	0,299	0,450
42	I.D.P.A.	1,465	0,828	1,042	1,214	1,352
43	G.P.M.F.	0,050	1,788	1,847	1,839	1,003
45	L.R.F.	6,016	1,158	1,197	1,039	0,805
46	C.C.S.T.	0,268	2,090	1,549	0,965	0,823
47	R.S.M.	0,084	0,668	0,526	0,838	1,042
48	M.F.P.	0,741	1,777	2,030	1,487	2,641
49	S.S.F.	1,175	0,985	0,933	0,885	0,966
50	M.V.S.	0,297	0,496	0,749	0,440	0,420
51	T.I.B.R.	0,727	0,347	0,417	0,702	0,641
53	N.V.G.	0,944	0,579	0,583	0,946	0,804
54	G.J.M.	0,502	0,647	0,285	0,467	0,746
57	S.S.S.	0,618	0,916	0,743	0,895	0,818
58	M.L.M.	10,413	0,762	0,855	0,954	0,865
59	M.S.	1,464	1,063	0,731	0,953	0,921
Média		1,106	0,995	0,854	0,896	0,888
D.P.		2,474	1,095	0,690	0,689	0,399
Mediana		0,400	0,815	0,749	0,800	0,856
Mínimo		0,008	0,080	0,055	0,047	0,207
Máximo		12,650	7,102	3,199	3,731	2,641

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Aronson DL, Krizek DM, Rick ME. A rapid assay for the vWF protease. *Thromb Haemost* 2001;85:184-185.
- 2- Aui Y, Hei F, Long A, Feng Z, Zhao J, Yan F, Wang Y, Liu J. Perioperative monitoring of Thromboelastograph on hemostasis and therapy for cyanotic infants undergoing complex cardiac surgery. *Artif organs* 2009;33(11):909-914.
- 3- Austin SK, Starke RD, Lawrie AS, Cohen H, Machin SJ, Mackie IJ. The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome: ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction. *British Journal of Haematology* 2008;141:536-544.
- 4- Barreto AC, Franchi SM, Pereira AC, Lopes AA. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85 (2):147-154.
- 5- Bonthron DT, Handin RI, Kaufman RJ, Wasley LC, Orr EC, Mitsock LM, Ewenstein B, Loscalzo J, Ginsburg D, Orkin SH. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 1986;324:270-273.
- 6- Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;109:159-165.
- 7- Bydlowski SP, Magnanelli AC, Chamone DdeA. Hyperhomocysteinemia and vaso occlusive diseases. *Arq Bras Cardiol* 1998;71(1):69-76.
- 8- Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP, Lopes AA. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet derived growth factor. *Chest* 1998;114(1):236-240.
- 9- Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin (RHUEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 1993;43(5):1010-1014.

- 10-Casonato A, De Marco L, Gallinaro L, Sztukowska M, Mazzuccato M, Battiston M, Pagnan A, Ruggeri ZM. Altered von Willebrand factor subunit proteolysis and multimer processing associated with the Cys2362Phe mutation in the B2 domain. *Thromb Haemost* 2007;97:527-533.
- 11-Cool CD, Groshong SD, Oakey J, Voelkel NF. Pulmonary hypertension cellular and molecular mechanisms. *Chest* 2005;128:565-571S.
- 12-Danese S, Scaldaferri F, Papa A, Pola R, Sans M, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:193-198.
- 13-DeFilippis AP, Law K, Curtin S. Blood is thicker than water the management of hyperviscosity in adults with cyanotic heart disease. *Cardiol Rev* 2007;15(1):31-34.
- 14-Draaisma AM, Hazekamp MG, Anes N, Schoof PH, Hack CE, Sturk A, Dion RA. Phosphorylcholine coating of bypass systems used for young infants does not attenuate the inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 2006;81(4):1455-1459.
- 15-Ferreira MS, Lopes AAB, Coelho V, Guilherme L, Kalil J. Two novel anti von Willebrand factor monoclonal antibodies. *Thromb Res* 2000;97:3-13.
- 16-Feys HB, Liu F, Dong N, Parein I, Vauterin S, Vandeputte N, Noppe W, Ruan C, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. *J Thromb Haemost* 2006;4:955-962.
- 17-Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 2007;138(4):534-540.
- 18-Feys HB, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematol* 2009;121(2-3):183-185.

- 19-Fujikawa k, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 2001;98:1662-1666.
- 20-Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998;339:1578–1580.
- 21-Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lammle B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1999;81:8-13.
- 22-Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001;98:1654-1661.
- 23-Gidding SS, Stockman JA III, Goldwassser E: Erythropoietin in cyanotic heart disease. *Am Heart J* 1988;116:128-132.
- 24-Ginis I, Mentzer SJ, Faller DV. Oxygen tension regulates neutrophil adhesion to human endothelial cells via an LFA-1 dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1993; 157:659-578.
- 25-Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GAP, Latt SA, Orkin SH. Human von Willebrand factor (VWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985;228;1401-1406.
- 26-Groot E, Fijnheer R, Sebastian SA, Groot PG, Lenting PJ. The active conformation of von Willebrand factor in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura in remission. *J Thromb Haemost* 2009;7(6):962-969.
- 27-Gross PL, Air WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2001; 26: 463-478.
- 28-Hartmann M, Sucker C, Boehm O, Koch A, Loer S, Zacharowski K. Effects of Cardiac Surgery on Hemostasis. *Transfusion Medicine Reviews* 2006;20(3):230-241.

- 29-Hosmer, D.W. e Lemeshow S. Applied Logistic Regression – John Wiley & Sons, Inc. – 1989, 307pp.
- 30-Hulstein JJ, van Runnard Heimel PJ, Franx A, Lenting PJ, Bruinse HW, Silence K, Groot GPH, Fijnheer R. Acute activation of the endothelium results in increased levels of active von Willebrand factor in hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4:2569-2575.
- 31-Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93:1564-1570.
- 32-Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS-13 activity. *Transfusion* 2006;46:1444-1452.
- 33-Klaus C, Plaimauer B, Studt J-D, Domer F, Lammle B, Mannucci PM, Scheiflinger F. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:4514-4519.
- 34-Kremer Hovinga JA, Mottini M, Lammle B. Measurement of ADAMTS-13 activity in plasma by the FRETs-VWF73 assay: comparison with other methods. *J Thromb Haemost* 2006;4:1146-1148.
- 35-Krizek DR, Rick ME. A rapid method to visualize von Willebrand factor multimers by using agarose gel electrophoresis, immunolocalization and luminographic detection. *Thromb Res* 2000;97(6):457-62.
- 36-Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 37-Lam JK, Chion CK, Zanardelli S, Lane DA, Crawley JT. Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1010-1018.
- 38-Lammle B, Kremer Hovinga JA, Alberio L. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2005;3:1663-1675.
- 39-Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci MP. Mild to moderate reduction of a von Willebrand cleaving protease (ADAMTS-

- 13) in pregnant woman with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica* 2003; 88: 1029-1034.
- 40-Levy GG, Motto DG, Gingsburg D. ADAMTS 13 turns 3. *Blood* 2005;106:11-17.
- 41-Lopes AAB, Maeda NY. Abnormal degradation of von Willebrand factor main subunit in pulmonary hypertension. *Eur Resp J* 1995;8:530-536.
- 42-Lovell AT. Anaesthetic implications of grown-up congenital heart disease. *Br J Anaesth* 2004;93:129-139.
- 43-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 44-Magliano DJ, Liew D, Ashton EL, Sundararajan V, McNeil JJ. Novel biomedical risk markers for cardiovascular disease. *J Cardiovasc Risk* 2003;10(1):41-55.
- 45-Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989; 264(33):19514-19527.
- 46-Mannucci M, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001;98:2730-2735.
- 47-Mannucci PM, Capoferri C, Canciani MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Brit J Hematol* 2004;126:213-218.
- 48-Meyer SC, Sulzer I, Lämmle B, Kremer Hovinga JA. Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRET-S-VWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 866-867.
- 49-Michiels C, Arnould T, Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta* 2000;1497:1-10.

- 50-Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 2004;164:1875-1882.
- 51-Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982;307:1432-1435.
- 52-Moake JL. von Willebrand factor in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Lab Sci* 1998;11:362-366.
- 53-Molvarec A, Rigo J, Boze T, Derzsy Z, Cervenak L, Mako V, Gombos T, Udvardy LM, Harsfalvi J, Prohaszka Z. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost* 2009; 101:305-311.
- 54-Murdock PJ, Woodhams BJ, Matthews KB, Pasi KJ, Goodall AH. Von Willebrand factor activity detected in a monoclonal antibody-based ELISA: an alternative to the ristocetin cofactor platelet agglutination assay for diagnostic use. *Thromb Haemost* 1997;78(4):1272-1277.
- 55-Olgar S, Ertugrul T, Nisli K, Devecioglu O, Turkan E. Shunt operations improved thrombocytopenia in a patient with congenital cyanotic heart disease. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2008;14(5):329-332.
- 56-Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010 jan 21 epub ahead of print.
- 57-Perloff JK, Warnes CA. Challenges posed by adults with repaired congenital heart disease. *Circulation* 2001;103:2637-2643.
- 58-Rick ME, Moll S, Taylor MA, Krizek DM, White GC, Aronson DL. Clinical use of a rapid collagen binding assay for von Willebrand factor cleaving protease in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2002;88:598-604.
- 59-Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, Weber A, Remuzzi G, Dockal M, Plaimauer B, Scheiflinger F. Relation between ADAMTS-13 activity and ADAMTS-13 antigen levels in healthy donors and 18 patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost* 2006;95:212-220.

- 60-Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1002-1007.
- 61-Rose SS, Shad AA, Hoover DR, Saidi P. Cyanotic congenital heart disease (CCHD) with symptomatic erythrocytosis. *J Gen Intern Med* 2007;22(12):1775-1777.
- 62-Rosner B. Fundamentals of Biostatistics - Boston, PWS Publishers, Second edition, 1986, 584pp.
- 63-Ruggenenti P, Remuzzi G. The pathophysiology and management of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 1996;56:191-207.
- 64-Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J* 1993;7:308-316.
- 65-Sadler JE. von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost* 2005;3:1702-1709.
- 66-Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008;112:11-18.
- 67-Schmugge M, Rand ML, Bang KW, Mody M, Dunn MS, Amankwah KS, Blanchette VS, Freedman J. The relationship of von Willebrand factor binding to activated platelets from healthy neonates and adults. *Pediatr Res* 2003;54(4):474-479.
- 68-Shelat SG, Smith AG, Ai J, Zheng XL. Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost* 2006;4:1707-1717.
- 69-Soares RPS, Lopes AA, Maeda NY, Bydlowski SP. Endothelial dysfunction markers and severity of hypoxemia in the Eisenmenger syndrome. A comparative analysis of tissue-type plasminogen activator, thrombomodulin and von Willebrand factor. *Cardiol Young* 2005;15:504-513.
- 70-Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem* 2001;130:475-480.

- 71-Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003;102:3232-3237.
- 72-Studt JD, Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, Lämmle B. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* 2005; 105: 542-544.
- 73-Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Ashida S, Shibano T Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:212-216.
- 74-Tempe DK, Virmani S: Coagulation abnormalities in patients with cyanotic heart disease: Review article. *J Cardioth Vasc Anesth* 2002;16:752-765.
- 75-Timm NH Multivariate Analysis with Applications in Educations and Psychology - Monterrey, CA Brooks/Cole, 1975, 687pp.
- 76-Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
- 77-Tripodi A, Chantarangkul V, Bohm M, Budde U, Dong JF, Friedman KD, Galbusera M, Girma JP, Moake J, Rick ME, Studt JD, Turecek PL, Mannucci PM. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J Thromb Haemost* 2004;2:1601-1609.
- 78-Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, Palla R, Afrasiabi A, Canciani MT, Chung DW, Ferrari S, Fujimura Y, Karimi M, Kokame K, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, de Meyer SF, Plaimauer B, Vanhoorelbeke K, Varadi K, Mannucci PM. Second international collaborative study evaluating performance characteristics of methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J Thromb Haemost* 2008;9:1534-1541.
- 79-Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Seaton AC, Sussman II. The high molecular weight form of endothelial cell von Willebrand factor is released by the regulated pathway. *Br J Haematol* 1991;79:239-245.

- 80-Tsai MH. High titers of inhibitors of von Willebrand factor-cleaving metalloproteinase in a fatal case of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Haematol* 2000;65:251-255.
- 81-Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006;4:1396-1404.
- 82-Varela LML, Soto FME, Munguía CR, Mendonza TBM, Cabrera GG, Huerta CV, Sahagún OD, Zárate CB. Expression of HIF-1 alpha, VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hypoxia. *Clin Biochem* 2010;43(3):234-239.
- 83-Vongpatanasin W, Brickner ME, Hillis LD, Lange RA. The Eisenmenger Syndrome in Adults. *Ann Intern Med* 1998;128(9):745-755.
- 84-Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:217-246.
- 85-Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969;244(16):4406-4412.
- 86-Weyrich A, Cipollone F, Mezzetti A, Zimmerman G. Platelets in Atherothrombosis: New and Evolving Roles. *Current Pharmaceutical Design* 2007;13:1685-1691.
- 87-Wu J-J, Fujikawa K, Lian EC, McMullen BA, Kulman JD, Chung DW. A rapid enzyme-linked assay for ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006;4:129-136.
- 88-Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood* 2007;110(6):1887-1894.
- 89-Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276:41059-41063.

- 90-Zheng X, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Path Mech Dis* 2008;3:249-277.
- 91-Zheng X. A team player: the disintegrin domain of ADAMTS13. *Blood* 2009;113(22):5373-5374.
- 92-Zhou Z, Jing H, Tao Z, Choi H, Aboulfatova K, Moake J, Li R, Dong JF. Effects of naturally occurring mutations in CUB-1 domain on synthesis, stability, and activity of ADAMTS-13. *Thromb Res* 2009;124(3):323-327.