NATÁLIA MASTANTUONO NASCIMENTO DE VITA

O fator de von Willebrand, ligação com fator VIII e estudo
da atividade da ADAMTS-13 em pacientes com síndrome
antifosfolípide primária

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

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

Orientador: Prof^o. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

Coorientador: Prof^o. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vita, Natália Mastantuono Nascimento de

O fator de von Willebrand, ligação com fator VIII e estudo da atividade da ADAMTS-13 em pacientes com síndrome antifosfolípide primária / Natália Mastantuono Nascimento de Vita. -- São Paulo, 2014.

**Tese(doutorado)--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.

Coorientador: Eduardo Ferreira Borba Neto.

Descritores: 1.Fator de von Willebrand 2.ADAMT-13 proteína humana
3.Fator VIII 4.Trombose 5.Endotélio 6.Síndrome antifosfolípica 7.Anticorpos
antifosfolípeos 8.Estudos transversais

USP/FM/DBD-349/14

À Deus,

Por iluminar os meus
caminhos

Dedico esta tese aos meus amores, minha família!

À aquele que escolhi passar os dias ao lado, meu marido **Paulo Vita**, por me mostrar novos caminhos, por cuidar de mim e me proporcionar felicidade, amor e carinho.

Ao meu filho de pelos, **Lilo**, cuja presença me traz imensa felicidade, pelo seu olhar de carinho e seu amor incondicional, por estar sempre ao meu lado, por me chamar para brincar ou simplesmente para ficar no meu colo todas as vezes que eu me sentava em frente ao computador. Pelo simples fato de existir e fazer de mim uma pessoa melhor.

Aos meus pais, **Renê** e **Elisabete**, pelo incentivo, dedicação, ensinamentos, pelas palavras de encorajamento e principalmente por seu amor, minha eterna gratidão. Aos meus irmãos, **Fábio** e **Bruno** pelo carinho ao longo da nossa jornada. Aos meus avós, **Giuseppe** e **Lucrezia** pela eterna preocupação com minha felicidade e bem estar.

“Eu sei que vou te amar, por toda a minha vida eu vou te amar....”

Vinícius de Moraes

À queridíssima amiga **Rô, Dra. Rosangela de Paula Silva Soares**, por seu apoio e confiança desde a iniciação científica, depois passando pelo mestrado e agora finalizando este doutorado. Obrigada por me ensinar tudo o que sabe; e este tudo não se limita ao âmbito laboratorial. Você me ensina o que sabe sobre a vida, me passa suas experiências tornando as minhas mais fáceis de enfrentar. Obrigada por ter sempre uma palavra amiga e de carinho para minhas angústias. Obrigada por estar disposta a ensinar quantas vezes forem necessárias e por estar ao meu lado neste período! Você é um exemplo de profissionalismo e dedicação na busca dos ideais! Obrigada por tudo querida amiga!

- O que quer dizer cativar?

- ...Significa criar laços.

Antoine Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski**, pela orientação, por todo o apoio e sugestões a este estudo. Por suas ideias e encorajamentos. Obrigada pela confiança em mim depositada e pelo carinho!

Ao **Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba**, pela coorientação, pelo apoio e sugestões dadas, pelos ensinamentos na escrita do artigo científico e desta tese. Obrigada pela confiança e carinho!

À querida amiga **Lú, Dra. Luciana Parente Costa Seguro**, por me auxiliar na seleção dos pacientes, me ensinar sobre a parte clínica da doença, por estar sempre calma e disposta a me ajudar. Obrigada pelo carinho!

À querida amiga **Naná, Dra. Nair Yukie Maeda**, por todas as suas sugestões e pela preocupação com o meu crescimento profissional. Obrigada pelo apoio, pelos cafés, almoços, comemorações sem fim regadas de boas risadas. Mas acima de tudo, obrigada pelo seu carinho e por nossa amizade!

Ao **Prof. Dr. Antônio Augusto Lopes**, por ser um exemplo de professor e minha inspiração didática, e principalmente por nossa amizade.

Aos membros da banca de qualificação, **Dra. Paula Ribeiro Villaça, Dra. Vânia Maris Morelli e Dra. Danielli Castro Oliveira de Andrade**, por todas as sugestões feitas a esta tese.

À querida **Cris, Cristina Maria Nazareth**, secretária do ambulatório da Reumatologia, por me conceder semanalmente as listas de agendamento dos pacientes, por imprimir todas as etiquetas, por me auxiliar em tudo o que podia e por seu carinho.

Às queridas e sempre prestativas **Sandra, Dalva, Dagmar e Ana** por me auxiliar nas coletas de sangue dos pacientes.

Às queridas amigas **Natália, Bruna e Mari**, pelos momentos de descontração, pelas risadas, conversas sobre banalidades, pelo carinho e por nossa amizade.

Aos amigos do laboratório: **Adriana, Andréia, Bruno, Cleide, Débora, Denise, Giovanna, Joel, Jorge, Linah, Livia, Luciana, Paula, Rita, Suelen e Zenaide**, pelo carinho.

Ao **CNPq e FAPESP**, financiadores deste projeto de pesquisa, processos nº479161-2012-7 e 2013/02785-5, e à **CAPES** pelo fornecimento da bolsa de estudos.

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

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente deste estudo.

**“Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós. Deixam um pouco de
si, levam um pouco de nós.....”**

Antoine Saint-Exupéry

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

Joanna de Ângelis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O endotélio	1
1.1.1 Ativação e resposta da célula endotelial	3
1.2 O fator de von Willebrand (FVW)	4
1.2.1 O FVW na hemostasia primária	6
1.2.2 O FVW no processo de coagulação	8
1.2.3 O FVW e a sua enzima proteolítica, a ADAMTS-13	10
1.3 A Síndrome Antifosfolípide (SAF)	14
1.3.1A SAF e a anticoagulação oral	17
1.3.2A SAF e a hemostasia	18
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MÉTODOS	28
3.1 Casuística	28
3.1.1 População estudada	28
3.1.2 Tamanho da amostra	29
3.1.3 Aspectos éticos	30
3.2 Coleta de amostras	30
3.3 Procedimentos laboratoriais	31
3.3.1 Reagentes	31
3.3.2 Antígeno e atividade do fator de von Willebrand	32
3.3.3 Antígeno e atividade da ADAMTS-13	32
3.3.4 Antígeno e atividade do FVIII	33
3.3.5 Ligação do FVW ao FVIII	33
3.3.6 Fator 4 plaquetário (PF4)	33
3.3.7 Anticardiolipina	34

3.3.8 Anti- β 2glicoproteína I	34
3.3.9 Anticoagulante lúpico	34
3.3.10 Análise das subunidades do FVW plasmático	35
3.3.10.1 Imunoprecipitação do FVW plasmático.....	35
3.3.10.2 Composição das subunidades do FVW plasmático – <i>Western immunoblotting</i>	36
3.3.11 Variáveis laboratoriais gerais	37
3.4 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS	40
4.1 Análise comparativa entre pacientes e controles	41
4.1.1 Variáveis laboratoriais gerais.....	41
4.1.2 Variáveis bioquímicas específicas.....	42
4.1.2.1 A proteína fator de von Willebrand (FVW)	42
4.1.2.2 A proteína ADAMTS-13	45
4.1.2.3 A proteína fator VIII (FVIII).....	49
4.1.2.4 A ligação do FVW ao FVIII.....	52
4.1.2.5 A proteína fator 4 plaquetário (PF4).....	53
4.1.2.6 Análise da composição da subunidade do FVW plasmático	54
4.2 Análise entre pacientes SAFP agrupados de acordo com o tipo de evento trombótico	56
4.2.1 Variáveis laboratoriais gerais.....	57
4.2.2 Variáveis laboratoriais específicas.....	57
4.3 Análise entre pacientes SAFP agrupados de acordo com o tipo de anticorpo antifosfolípide presente no momento da coleta	60
4.3.1 Variáveis laboratoriais gerais.....	61
4.3.2 Variáveis laboratoriais específicas.....	62
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	74
7 ANEXOS	77
8 REFERÊNCIAS	..89

LISTA DE ABREVIATURAS

<	Menor que
>	Maior que
α IIb β 3	Integrina plaquetária α IIb β 3
a- β 2GPI	Anti- β 2 glicoproteína
Anti- β 2GPI	Anti- β 2 glicoproteína
aa	Aminoácidos
ACL	Anticardiolipina
ADAMTS	Uma desintegrina e metaloproteinase com domínios Trombospondina
ADAMTS-13	Uma desintegrina e metaloproteinase com domínios Trombospondina - 13
ADAMTS-13:Ag	Antígeno da ADAMTS-13
ADAMTS-13:Atv	Atividade da ADAMTS-13
AFL	Antifosfolípide
AL	Anticoagulante lúpico
CTLE	Controle
CUB	Complemento C1r/C1s, <i>urchin</i> , <i>Bone morphogenetic protein 1</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido edético
ELISA	Imunoensaio enzimático
FVIII	Fator anti-hemofílico; Fator VIII da coagulação
FVIII:Ag	Antígeno do Fator VIII da coagulação
FVW:FVIII B	Ligação do fator de von Willebrand ao fator VIII

FVIII:C	Atividade do Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII ativado
FVW	Fator de von Willebrand
FVW:Ag	Antígeno do fator de von Willebrand
FVW:CB	Atividade do fator de von Willebrand
GPIb	Glicoproteína plaquetária Ib
GPL	Unidades de IgG por mililitro
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	kilobase
kDa	kilodaltons
MPL	Unidades de IgM por mililitro
NEM	N-etilmaleimida
PCR	Proteína C reativa
PF4	Fator 4 plaquetário
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
RNI	Razão normalizada internacional
SAF	Síndrome antifosfolípide
SAFP	Síndrome antifosfolípide primária
SDS	Sulfato de dodecil sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TBS-T	Tampão Tris salina com Tween-20
TP	Tempo de protrombina
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático da síntese do FVW	5
Figura 2.	Diagrama esquemático da estrutura da ADAMTS-13	11
Figura 3.	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	13
Figura 4.	Possíveis mecanismos de formação de trombos mediados pelos anticorpos antifosfolípides	20
Figura 5.	Prováveis mecanismos de ação dos anticorpos antifosfolípides	22
Figura 6.	Concentração antigênica do FVW (FVW:Ag) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	42
Figura 7.	Atividade do FVW (FVW:CB) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles.....	43
Figura 8.	Análise individual da atividade do FVW em função da concentração antigênica do FVW nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles.....	44
Figura 9.	Concentração antigênica da ADAMTS:13 (ADAMTS-13:Ag) em mediana, os percentis 25% e	

75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	45
Figura 10. Atividade da ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Atv) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	46
Figura 11. Razão entre atividade e antígeno da ADAMTS-13 em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	47
Figura 12. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da concentração antigênica da ADAMTS-13 nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	48
Figura 13. Concentração antigênica do FVIII (FVIII:Ag) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	49
Figura 14. Atividade do FVIII (FVIII:C) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	50
Figura 15. Análise individual da atividade do FVIII em função da concentração antigênica do FVIII nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	51
Figura 16. A ligação do FVW ao FVIII (FVW:FVIII B) em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores	

extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	52
Figura 17. Concentração do PF4 em mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	53
Figura 18. <i>Western immunoblotting</i> representativo da composição das subunidades do FVW plasmático em pacientes com síndrome antifosfolípide primária e em controles.....	54
Figura 19. Análise individual da atividade do FVW em função da concentração antigênica do FVW nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária do grupo arterial e do grupo venoso.....	58
Figura 20. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 em função da concentração antigênica da ADAMTS-13 nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária do grupo arterial e do grupo venoso	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caracterização dos grupos de pacientes com síndrome antifosfolípide primária separados pelo tipo de evento trombótico	56
Tabela 2.	Positividade dos anticorpos antifosfolípides nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária	60
Tabela 3.	Caracterização dos grupos de pacientes com síndrome antifosfolípide primária em relação ao tipo de anticorpo antifosfolípide	61
Tabela 4.	Características dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária	77
Tabela 5.	Características gerais dos controles	78
Tabela 6.	Características clínicas dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária	79
Tabela 7.	Dados laboratoriais gerais dos pacientes com síndrome antifosfolípide primária	80
Tabela 8.	Determinação do antígeno e atividade do FVW nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	81
Tabela 9.	Determinação do antígeno e atividade da ADAMTS-13 nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	82
Tabela 10.	Determinação do antígeno e atividade do FVIII nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	83

Tabela 11. Determinação da ligação do FVW ao FVIII nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	84
Tabela 12. Determinação PF4 nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	85
Tabela 13. Determinação da densidade relativa da subunidade principal e fragmentos do FVW nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária e nos controles	86
Tabela 14. Presença e título dos anticorpos antifosfolípidos nos pacientes com síndrome antifosfolípide primária	87

RESUMO

Vita NMN. Atividade do fator de von Willebrand, ligação com fator VIII e estudo da atividade da ADAMTS-13 em pacientes com síndrome antifosfolípide primária [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A Síndrome Antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune na qual há presença de anticorpos antifosfolípides [anticoagulante lúpico (AL), anticardiolipina (ACL), anti- β 2glicoproteína I (a- β 2GPI)]. É caracterizada por eventos trombóticos e/ou perdas gestacionais de repetição. Existe um ambiente pró-coagulante na SAF, pois os antifosfolípides (AFL) são capazes de induzir disfunção endotelial aumentando a expressão de moléculas de adesão como o fator de von Willebrand (FVW). Entre os inúmeros elementos envolvidos neste processo, o FVW e a relação com: sua principal enzima proteolítica, a ADAMTS-13, e com o FVIII são relativamente menos conhecidos. Os objetivos deste estudo foram: 1-verificar alterações no endotélio de pacientes com SAF primária (SAFP), através do marcador de lesão endotelial, o FVW, da ADAMTS-13 e do FVIII, avaliando a concentração antigênica, a atividade e a correlação entre estas proteínas; 2- Verificar se alguma destas variáveis é capaz de diferenciar os tipos de eventos trombóticos ocorridos nestes pacientes e se a presença dos AFL influenciam estas proteínas. O estudo, do tipo transversal, envolveu 39 pacientes com SAF primária, com idade mediana de 43 anos, em tratamento no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas, e 39 controles sadios doadores da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pareados por sexo e idade com os pacientes. Os títulos de ACL e a- β 2GPI, as determinações antigênicas e de atividade das proteínas FVW, ADAMTS-13, FVIII e PF4 foram realizados por ELISA, e a atividade do FVIII foi determinada pelo método cromogênico. A análise das subunidades do FVW foi realizada por Western immunoblotting. AL foi detectado utilizando ensaios

de coagulação de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia. Os resultados foram apresentados em: 1- pacientes SAFP e controles, e 2- pacientes SAFP agrupados em relação ao tipo de evento e ao tipo de AFL presente. Os pacientes apresentaram aumento da concentração antigênica do FVW (74 ± 6 x 69 ± 11 UI/dL; $p=0,016$), ADAMTS-13 ($1,3 \pm 0,34$ x $0,82 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$; $p<0,0001$), FVIII (106 ± 19 x 91 ± 15 UI/dL; $p=0,0003$), da ligação FVW:FVIII (144 ± 17 x $134 \pm 20\%$; $p=0,082$) e da atividade do FVIII (117 ± 38 x $98 \pm 30\%$; $p=0,0021$) comparado aos controles. O PF4 apresentou-se diminuído nos pacientes em relação aos controles (96 ± 12 x 101 ± 8 UI/mL; $p=0,014$). Os pacientes com trombose arterial apresentaram correlação positiva e significativa entre a atividade e o antígeno do FVW ($r=0,468$; $p=0,028$) e da ADAMTS-13 ($r=0,635$; $p=0,001$); os pacientes com trombose venosa apresentaram esta correlação positiva e significativa na ADAMTS-13 ($r=0,635$; $p=0,001$). Quando os pacientes foram analisados pelo tipo de antifosfolípide, não se observou diferenças nas variáveis estudadas. Os pacientes com SAFP parecem apresentar disfunção endotelial. No entanto, aparentemente existe um mecanismo de equilíbrio para evitar a formação de um novo trombo. O papel do FVW e a sua relação com a ADAMTS-13, em diferentes doenças, ainda é relativamente pouco conhecido, mas está sendo apontado como importante na patogênese de estados pró-trombóticos como os presentes em pacientes com SAF.

Descritores: 1. Fator de von Willebrand; 2. ADAMTS-13 proteína humana; 3. Fator VIII; 4. Trombose; 5. Endotélio; 6. Síndrome antifosfolipídica; 7. Anticorpos antifosfolipídeos; 8. Estudos transversais

ABSTRACT

Vita NMN. Study of von Willebrand factor activity, binding with factor VIII and ADAMTS-13 activity in patients with primary antiphospholipid syndrome [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease, characterized by vascular thrombosis and /or pregnancy morbidity, in association with antiphospholipid antibodies (aPL) (lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin (ACL), anti- β 2glycoprotein I (a- β 2GPI). Antiphospholipid (APL) seems to induce endothelial dysfunction by increasing the expression of adhesion molecules such as von Willebrand factor (VWF). This results in a prothrombotic state in APS. Among the several elements involved in this process, some are relatively less known, such as VWF and its relationship with ADAMTS-13, its main proteolytic enzyme. The aim of this study was to evaluate endothelial dysfunctions in patients with primary APS (PAPS), by examining correlation among the soluble endothelial marker, VWF, the enzyme ADAMTS-13, and FVIII protein. The relationship of these proteins and the presence of arterial and/or venous thrombosis, and presence of APL was also evaluated. This cross-sectional study involved 39 PAPS patients, with a median age of 43 years, who have been treated in the Outpatient Clinics, Department of Rheumatology, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and 39 healthy subjects blood donors from the Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, matched for sex and age with patients. Levels of APL (ACL and a- β 2GPI), concentration and activities of VWF, ADAMTS-13, FVIII and PF4 proteins were measured with ELISA. LA was detected with coagulation assays according to updated guidelines from the International Society on Thrombosis and Haemostasis, and FVIII activity was measured by

chromogenic method. Analysis of VWF subunits was performed by Western immunoblotting. The results were evaluated according to: 1- PAPS patients and controls, and 2- PAPS patients grouped in relation to type of event and the type of APL. Patients showed higher VWF antigen concentration ($74 \pm 6 \times 69 \pm 11$ IU/dL, $p=0.016$), ADAMTS-13 ($1.3 \pm 0.34 \times 0.82 \pm 0.12$ $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$), FVIII ($106 \pm 19 \times 91 \pm 15$ IU/dL, $p=0.0003$), VWF binding to FVIII ($144 \pm 17 \times 134 \pm 20\%$, $p=0.082$) and activity of FVIII ($117 \pm 38 \times 98 \pm 30\%$, $p=0.0021$) than controls. The PF4 was decreased in patients compared to controls (96 ± 12 vs. 101 ± 8 IU/mL, $p=0.014$). VWF antigen and activity correlated well (Pearson's $r = 0.468$; $p=0.028$) as well as ADAMTS-13 (Pearson's $r = 0.635$; $p=0.001$) in patients with arterial thrombosis. However, in patients with venous thrombosis only ADAMTS-13 had a good correlation (Pearson's $r = 0.492$; $p=0.045$). When patients were analyzed by the type of aPL, no differences in the studied variables were observed. Patients with PAPS seem to present endothelial dysfunction. However, apparently there is an attempt to balance mechanism to prevent a new thrombus formation. The role of VWF and its relation with ADAMTS-13 in different diseases is still relatively unknown. However it has been considered as important in the pathogenesis of prothrombotic states such as those present in patients with APS.

Descriptors: 1. von Willebrand factor; 2. ADAMTS-13 human protein; 3. Factor VIII; 4. Thrombosis; 5. Endothelium; 6. Antiphospholipid syndrome; 7. Antiphospholipid antibody; 8. Cross-sectional studies

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O endotélio

A manutenção da fluidez sanguínea é controlada por um revestimento interno do sistema circulatório, chamado endotélio (VAN HINSBERGH; 2012).

O endotélio é uma fina monocamada de células endoteliais que formam a camada íntima dos diferentes tipos de vasos sanguíneos (veias, artérias, vênulas, arteríolas e capilares), separando estrategicamente a parede vascular da circulação sanguínea e dos componentes do sangue. O endotélio é uma barreira permeável e altamente seletiva que controla funções importantes, tais como a regulação do tônus vascular, fluidificação, coagulação, manutenção da circulação sanguínea e respostas inflamatórias (VAN HINSBERGH; 2012). Dessa forma, o endotélio representa uma interface entre os elementos da circulação e os vários sistemas do organismo (MEHTA, MALIK; 2006).

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).

As células endoteliais apresentam diversas funções que variam de acordo com o tipo de vaso sanguíneo, já que a força que o fluxo sanguíneo exerce sobre a parede do vaso (*shear stress*) varia de acordo com o tamanho deste vaso. Dentre as várias funções que o endotélio possui, a principal delas é a manutenção da fluidez sanguínea e a prevenção da

formação de trombos; isso se dá devido a sua superfície lisa e suas propriedades antiaderentes, antiagregantes e antitrombóticas (MICHIELS et al., 2000).

Outra função importante do endotélio juntamente com a célula muscular lisa da parede do vaso sanguíneo é o controle da perfusão e da tensão sanguínea por vasoregulação com a vasoconstrição ou a vasodilatação, isto se dá devido às células endoteliais serem responsivas a agentes vasoativos como óxido nítrico e prostaciclina, importantes vasodilatadores, e endotelina-1 que atua como vasoconstritor (MEHTA, MALIK; 2006).

As células endoteliais também estão envolvidas no recrutamento de leucócitos em áreas necessitadas, isto ocorre pela capacidade das células endoteliais expressarem proteínas específicas e moléculas de adesão celular (POBER, SESSA; 2007). Estas células também possuem papel importante após a inflamação, através do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e angiopoetina, o que é essencial para a reparação do tecido envolvido e recanalização de vasos obstruídos (FRAISL et al., 2009).

Assim, já está estabelecido através de vários estudos de diferentes grupos que as células endoteliais podem ser ativadas, e de acordo com a natureza do estímulo responderão e adaptarão seu fenótipo.

1.1.1 Ativação e resposta da célula endotelial

As células endoteliais podem ser ativadas por agentes vasoativos, trombina, citocinas inflamatórias, resposta imune inata ou adquirida, hipóxia e *shear stress* (COOL et al., 2005; POBER, SESSA; 2007). A ativação da célula endotelial leva a sinalização para o interior da célula com a indução da transcrição de alguns genes, os quais permitem que a célula endotelial execute outras atividades e exponha outros receptores, este processo é acompanhado por influxo de cálcio e indução de várias vias de fosforilação que resultam na ativação de enzimas que geram óxido nítrico (NO), prostaciclina e prostaglandina, e na secreção do conteúdo da sua vesícula de estoque chamada corpúsculo de Weibel-Palade (VAN HINSBERGH; 2012).

O corpúsculo de Weibel Palade é encontrado somente nas células endoteliais e 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). Acredita-se que a liberação destes elementos culmina com a perda das propriedades antiaderentes, antiagregantes e antitrombóticas que o endotélio possui, resultando, portanto, em alteração do controle da coagulação e da formação do trombo em uma direção mais pró-agregante, pró-trombótica e

proliferativa(COOL et al., 2005). A perda da propriedade antitrombótica pode causar complicações trombóticas gravíssimas, como visto em algumas doenças como a aterosclerose, hipoxemia grave, púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome antifosfolípide.

1.2 O 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; primeiramente é formado o pré-pró-FVW, polipeptídeo precursor com 2.813 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 2.050 aa e aproximadamente 250 kDa de massa molecular(BONTHRON et al., 1986) (**Figura 1**). Após a formação da molécula, o peptídeo sinalizador e o pró-peptídeo são proteolizados, ocorre então glicosilação da molécula, formação de dímeros (união entre duas subunidades maduras através de ligação dissulfídica) e multimerização

(união entre vários dímeros). Em seguida, os multímeros são secretados para o plasma ou estocados em grânulos secretórios denominados corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais, e grânulos α nas plaquetas (WAGNER, 1990).

A subunidade madura do FVW possui sítios de ligação específicos localizados em seus domínios: no domínio D' para o FVIII circulante; no A1 para a glicoproteína plaquetária Ib (GPIb); no A2 para a ADAMTS-13 (uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina); no A3 para o colágeno e no domínio C1 para a integrina plaquetária α IIb β III (CRAWLEY, 2011) (**Figura 1**).

Figura 1. Diagrama esquemático do FVW. N = região N terminal; C = região carboxi terminal. O pré-pró-FVW, que consiste de um pró-peptídeo (D1 e D2) e subunidade madura (D'-CK). Os sítios de ligação nos domínios da subunidade madura são indicados para FVIII (D'), GPIb (A1), colágeno (A1, A3), ADAMTS-13 (A2) e α IIb β III (C1) (CRAWLEY, 2011 – modificado).

Quando o FVW é secretado ele possui uma conformação globular (SIEDLECKI et al., 1996), o que significa que alguns sítios de ligação estão inacessíveis aos seus ligantes específicos, de forma a incapacitar o FVW a se ligar desnecessariamente a plaquetas ou proteínas plasmáticas ainda

com o vaso intacto. Esta conformação é modificada quando ocorre o dano vascular, resultando em exposição da matriz rica em colágeno localizada sob a camada de células endoteliais, o FVW globular reconhece o colágeno exposto e liga-se a ele, o fluxo sanguíneo por sua vez exerce a função de alterar a conformação do FVW aderido. A molécula do FVW adquire uma conformação alongada e ativa, expondo sítios de ligação a plaquetas anteriormente internalizados (TSAI, 1994).

Numerosos fatores influenciam a concentração plasmática do antígeno do fator de von Willebrand (FVW:Ag), e dentre eles o grupo sanguíneo ABO é considerado um dos fatores de maior importância. Vários autores demonstraram que indivíduos do grupo sanguíneo O possuem a concentração do FVW:Ag mais baixa e a atividade do fator VIII coagulante (FVIII:C) reduzida quando comparados com os outros grupos (A,B e AB). A literatura não apresenta relatos sobre a atividade funcional do FVW nos subgrupos do sistema ABO (SOUSA et al., 2007; MORELLI et al., 2007).

O FVW está envolvido na hemostasia primária mediando a adesão e agregação plaquetária em resposta a ativação endotelial, e no processo de coagulação, no qual o FVW é transportador do FVIII.

1.2.1 O FVW na hemostasia primária

O FVW é uma proteína multiadesiva que pode interagir com a superfície celular, matriz extracelular e com ligantes de proteínas plasmáticas, através de seus sítios de ligação de domínios específicos. O

FVW funciona como um sensor do dano à parede vascular, iniciando a hemostasia primária através da adesão de plaquetas ao local de dano vascular, onde é mediador inicial na progressão da formação do trombo por meio de interações específicas com componentes da matriz extracelular e receptores de plaquetas (MOAKE et al., 1986). Este processo é altamente dependente do tamanho dos multímeros, sabe-se que os multímeros de alto peso molecular são hemostaticamente mais ativos por possuírem mais sítios de ligação específicos, e apresentarem uma conformação responsiva à força que o fluxo sanguíneo exerce na parede do vaso (SADLER, 1998), ligando-se às plaquetas com mais afinidade (RUGGERI; WARE, 1993).

Este aspecto da molécula mostra a importância da estrutura do FVW na hemostasia, pois interessante este mesmo processo que ativa o FVW em uma proteína funcional hemostática também representa um importante determinante para a clivagem proteolítica fisiológica que controlará a função do FVW (CRAWLEY et al., 2011). Esta clivagem fisiológica é essencial para reduzir o tamanho dos polímeros do FVW de modo a serem funcionais para estancar um sangramento, mas não tão ativos a ponto de causar trombose nas pequenas arteríolas (ZHENG, SADLER, 2008; ZHENG, 2009).

O padrão multimérico da molécula de FVW é determinado fisiologicamente pela ação de uma protease específica chamada ADAMTS-13 (FURLAN et al., 1998), que promove degradação limitada dos multímeros de alto peso molecular secretados pelas células endoteliais e plaquetas. A importância clínica da regulação do tamanho dos multímeros pode ser

exemplificada nas doenças em que 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, tais 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). Também existem sugestões que o desbalanço hemostático causado pela redução desta protease possa contribuir para trombose associada com doenças cardiovasculares (CRAWLEY et al., 2008).

1.2.2 O FVW no processo de coagulação

O FVW é o transportador do FVIII da coagulação em virtude de sua capacidade de ligação específica, exercendo a função de proteger o FVIII de um *clearance* prematuro e da degradação proteolítica (LENTING et al., 1998).

O fator VIII humano é um pró-cofator não enzimático com 330 kDa de massa molecular, cujo gene encontra-se localizado na banda distal (Xq28) do braço longo do cromossomo X (GITSCHIER et al., 1984); o fígado é a fonte primária de sua produção. O FVIII é sintetizado como polipeptídeo de cadeia única com 2.332 aminoácidos, e circula como um heterodímero e seus domínios podem ser representados como A1-A2-B (cadeia pesada) e A3-C1-C2 (cadeia leve) (FAY, SMUDZIN., 1992; OTA et al., 2011).

Imediatamente após a liberação do FVIII na circulação, ocorre uma interação com sua proteína carregadora, o fator de von Willebrand (FVW) formando um complexo não covalente (VEHAR, DAVIER., 1992), desta forma o FVIII circula como um heterodímero inativo. Cada monômero de FVW é capaz de se ligar a uma molécula do FVIII. Entretanto, *in vivo*, esta estequiometria é limitada pelo número de moléculas de FVIII presentes, resultando em uma razão aproximada de 1 molécula de FVIII para 50 de FVW (VEHAR, DAVIER., 1992), possivelmente altas concentrações de FVW correspondam também a elevados níveis de FVIII:C (RUGGERI, WARE 1993).

O FVIII é ativado, sendo convertido para sua forma ativa o FVIIIa, e neste momento o FVIII se dissocia do FVW através da clivagem da Arg 1.689, viabilizando a associação do FVIIIa à membrana fosfolipídica (REGAN, FAY., 1995).

A função do FVIIIa é funcionar como um pró-cofator na ativação do fator X na via intrínseca da coagulação. Para que isto ocorra, ele se liga com o fator IXa, formando o complexo tenase cuja função é catalisar a clivagem para ativação do fator X para fator Xa em presença de fosfolípidos e cálcio na via intrínseca da coagulação (ZIMMERMAN., 1987; WOLBERG et al., 2012). A molécula de FVIIIa é inativada pela trombina e fator Xa em presença de fosfolípidos, através da dissociação do domínio A2 e clivagem pela proteína C ativada (OTA et al., 2011).

Alguns estudos têm investigado os efeitos dos níveis do FVIII na ocorrência e na recorrência de trombose venosa, estes estudos indicam que

os pacientes com altos níveis de FVIII (acima de 150 UI/dL) possuem alto risco de recorrência comparado com aqueles com níveis de FVIII abaixo de 150 UI/dL (LEGNANI et al., 2004; OTA et al., 2011).

1.2.3 O FVW e a sua enzima proteolítica, a ADAMTS-13

Em 2001, a protease que quebra fisiologicamente o FVW foi identificada como ADAMTS-13, uma desintegrina e metaloprotease com domínios trombospondina, dependente de Zn^{2+}/Ca^{2+} (SOEJIMA et al., 2001).

Ela é o 13º membro da família ADAMTS de metaloproteases, sua particularidade está na presença de um domínio chamado 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).

O gene da ADAMTS-13 está no braço longo do cromossomo 9, contém 29 exons, aproximadamente 37 kb e codifica uma metaloprotease de aproximadamente 180 kDa de massa molecular (FUJIKAWA et al., 2001). A metaloprotease consiste de um peptídeo sinalizador, um pró-peptídeo, um domínio tipo metaloprotease, 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 2**).

Figura 2. Diagrama esquemático da estrutura da ADAMTS-13, representado do N terminal para o C terminal por: peptídeo sinalizador (S), pró-peptídeo (P), domínio metaloprotease (MP), domínio desintegrina (DES), domínio rico em cisteína (CIS), repetições de trombospondina (1-8), domínio espaço (ESPAÇO) e domínios CUB 1 e 2 (CRAWLEY, 2011 – modificado).

A ADAMTS-13 é expressa no fígado, megacariócitos (SUZUKI et al., 2004) e células endoteliais (TURNER et al., 2006). 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).

Vários estudos têm demonstrado a importância do domínio CUB e as repetições de trombospondina para o reconhecimento e clivagem do FVW, já que com a deleção destes domínios, a interação entre a metaloprotease e o FVW não ocorre (ZHANG et al., 2007). O domínio espaço é importante para a ligação com o FVW, e o domínio metaloprotease para proteólise do FVW (GROOT et al., 2009).

Em condições fisiológicas o FVW circula no plasma sob sua conformação globular na qual o seu domínio A2 está internalizado (**Figura 3 A**). No entanto, estudos realizados por Feys e por Zanardelli mostraram uma ligação específica, ou seja, uma interação da ADAMTS-13 ao FVW globular (FEYS et al., 2009; ZANARDELLI et al., 2009). Isto se dá através do domínio D4 do FVW constitutivamente exposto, mesmo na forma globular, com uma pequena proporção da enzima ADAMTS-13, através dos domínios

trombospondinas 5-8 e CUB, formando um complexo (FEYS et al., 2009; ZANARDELLI et al., 2009). No entanto, na ausência de *shear stress*, para induzir o desdobramento do FVW, esta interação não é produtiva em termos de proteólise do FVW, e é reversível (CRAWLEY et al., 2011) **(Figura 3 B)**. Feys também demonstrou que existe uma porcentagem circulante do complexo (FVW globular e ADAMTS-13). A estequiometria deste complexo é baixa, aproximadamente uma molécula de ADAMTS-13 para 250 moléculas de FVW (FEYS et al., 2009). Quando a força do fluxo sanguíneo começa a induzir a modificação de conformação do FVW para uma estrutura alongada, o domínio A2 é exposto possibilitando a sua ligação com o domínio espaço da enzima ADAMTS-13, contribuindo para o reconhecimento do FVW pela ADAMTS-13 (SOEJIMA et al., 2003, GROOT et al., 2009) **(Figura 3 C)**. Em seguida ocorre uma segunda ligação, mais fraca entre o domínio desintegrina da ADAMTS-13 com o domínio A2 do FVW, com a função de aproximar e posicionar corretamente a molécula para a proteólise (GROOT et al., 2009, CRAWLEY et al., 2011) **(Figura 3 D)**, e então o domínio metaloprotease da ADAMTS-13 cliva a ligação entre a tirosina 1.605 e a metionina 1.606 do FVW, gerando fragmentos de FVW de 176 e 140 kDa de massa molecular (SADLER, 2005; GROOT et al., 2009, CRAWLEY et al., 2011) **(Figura 3 E)**. Após a proteólise, ocorre redução na afinidade entre as moléculas, possibilitando que a protease seja reciclada (CRAWLEY et al., 2011).

Figura 3. 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, conformação globular do FVW e ampliação de uma subunidade mostrando seus domínios. Em B, temos a ligação reversível entre as moléculas através da interação entre os domínios trombospondina (5-8) da ADAMTS-13 com o domínio D4 do FVW e do domínio CUB da ADAMTS-13 com os domínios C1, C2 do FVW. Em C, temos o alongamento da estrutura do FVW. Em D, temos a ligação dos domínios espaço, desintegrina (Des) e metaloprotease (MP) da ADAMTS-13 com o domínio A2 do FVW. Em E, 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 (CRAWLEY et al., 2011 - modificado).

Foi observado que a alta concentração de FVW está associada à diminuição da ADAMTS-13 no plasma em várias situações como, por exemplo, em casos de 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 trombose e doença cardiovascular e se associado à diminuição da ADAMTS-13, a contribuição para o aumento do risco pode ser mais efetiva.

1.3 A Síndrome Antifosfolípide (SAF)

A SAF é uma doença auto-imune, caracterizada por eventos trombóticos de repetição, perdas gestacionais e trombocitopenia associada a anticorpos antifosfolípidos [anticardiolipina (ACL), anticoagulante lúpico (AL) e anti β 2-glicoproteína I (α - β 2GPI)] (MIYAKIS et al., 2006, PETRI., 2007). A SAF primária é definida como a presença de antifosfolípidos em pacientes com trombose idiopática, mas sem nenhuma evidência de outra doença auto-imune ou outros fatores desencadeantes como infecção, malignidade, hemodiálise ou antifosfolípidos induzidos por drogas (PIETTE et al., 1993, MIYAKIS et al., 2006).

Em indivíduos aparentemente saudáveis, a prevalência de anticorpos antifosfolípidos varia de 1 a 5%, aumentando com a idade (MCHRANI, PETRI; 2009). Em indivíduos com doenças crônicas, tais como vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana (HIV), citomegalovírus,

varicela zoster, vírus do Epstein-barr, adenovírus, parvovírus, lepra e sífilis, esta prevalência pode subir para até 49% (nos casos de HIV) (SÈNE et al., 2008). A idade média de início das manifestações clínicas da doença ocorre aos 31 anos (CERVERA et al., 2002).

A associação entre os antifosfolípides e a trombose venosa ou arterial é amplamente aceita e a formação do coágulo é o evento que trará manifestações vasculares com achados clínicos tais como: as manifestações clínicas trombóticas, alterações em sistema nervoso central, alterações hematológicas, alterações cardíacas, alterações pulmonares, alterações cutâneas e alterações renais (MIYAKIS et al., 2006). No estudo realizado por Cervera e colaboradores (CERVERA et al., 2002) foi observado que as manifestações clínicas mais comuns são: trombose venosa profunda (31,7%), trombocitopenia (21,9%), acidente vascular cerebral (13,1%), tromboflebite superficial (9,1%), embolia pulmonar (9,0%), perda fetal (8,3%), ataque isquêmico transitório (7,0%) e anemia hemolítica (6,6%).

Sabe-se que os antifosfolípides estão associados com várias manifestações cardiovasculares, incluindo aterosclerose acelerada, doença cardíaca valvular, trombo intracardíaco e doença vascular periférica (KAPLAN et al., 1992; PUISIEUX et al., 2000; SHOENFELD et al., 2005). Embora os fatores de riscos cardiovasculares tradicionais (idade, gênero, fumo, hipertensão e dislipidemia) tenham sido implicados na fisiopatogenia da aterosclerose, cada um destes fatores não parece explicar completamente o risco cardiovascular aumentado nessa população de pacientes com SAF (CHUNG et al., 2005; KIANI et al., 2008).

O diagnóstico acurado da SAF é baseado principalmente nos critérios de classificação clínicos e laboratoriais propostos em um consenso internacional, denominados critérios de Sidney (MIYAKIS et al., 2006) **(Quadro1)**.

Quadro 1. Critérios clínicos e laboratoriais para classificação da Síndrome Antifosfolípide

Critérios Clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Trombose arterial e/ou venosa e/ou de capilares em qualquer tecido ou órgão, confirmada por imagem ou histopatologia. • 1 ou + óbitos fetais com feto morfologicamente normal, documentado por ultrassom ou exame diretamente no feto, próximo a 10^a semana de gestação. • 3 ou + abortos espontâneos consecutivos antes da 10^a semana de gestação. • 1 ou + partos prematuros (< 34 semanas) devido a eclâmpsia, pré-eclâmpsia ou insuficiência placentária. <p>Excluir alterações hormonais, anatômicas e cromossômicas</p>
Critérios laboratoriais	<ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulante lúpico • Anticardiolipina IgG ou IgM em título médio (40 - 80 GPL* ou MPL**) ou alto (> 80 GPL ou MPL) • Anti β2-glicoproteína I IgG ou IgM <p>Obrigatoriamente, devem-se ter duas dosagens positivas do anticorpo, separadas por intervalo mínimo de 12 semanas</p> <p>*GPL = unidades de IgG por mililitro; **MPL = unidades de IgM por mililitro</p>

Pelo diagnóstico diferencial ser amplo e pelas muitas características clínicas inespecíficas, o tratamento do episódio agudo de trombose em

pacientes com SAF não difere daquele estabelecido nos demais pacientes com trombose. Utiliza-se a infusão de heparina intravenosa contínua, com controle do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) até se obter aumento do tempo de coagulação entre 1,5 a 2 vezes. Após o episódio agudo, o tratamento em longo prazo com anticoagulante oral é a terapia de eleição (TRIPODI et al., 2011).

1.3.1 A SAF e a anticoagulação oral

Os anticoagulantes orais (varfarina, acenocumarol, fluindiona, tiocloamarol, fenindiona) são antagonistas da vitamina K, inibem a síntese dos fatores II, VII, IX e X da coagulação e das proteínas anticoagulantes C e S (WELLS et al., 1994). Inibindo a reação de gamacarboxilação dependente da vitamina K, ou seja os antagonistas da vitamina K e do 2,3-epóxido da vitamina K atuam através da inibição da enzima vitamina K epóxido redutase e da vitamina K redutase. A inibição destas enzimas conduz à depleção de vitamina KH₂ (forma reduzida da vitamina K). Sem a vitamina K estes fatores tem o seu efeito prejudicado pela falta da terceira carboxila nos resíduos de ácido glutâmico. Este radical é fundamental para a interação com o fosfolípido plaquetário e com o cálcio ionizado.

Dentre os anticoagulantes orais existentes no mercado, o de uso mais comum é a varfarina (composto 4-hidroxycumarina), é o método mais prático e mais barato de garantir anticoagulação plena a longo prazo.

A monitoração da dose de varfarina é realizada pela medida do tempo de protrombina (TP) expresso pelo RNI (níveis da razão normalizada internacional) demonstrando a eficácia do tratamento anticoagulante. O objetivo desta monitoração medicamentosa é estabelecer uma faixa terapêutica adequada do RNI que compreende entre 2 e 3, na grande maioria dos estudos clínicos, minimizando o risco de hemorragias, sem elevar os riscos trombóticos (BLANN et al., 2002). Para os episódios de trombose venosa em pacientes com SAF deve-se manter o RNI do tempo de protrombina entre 2 e 3, e entre 3 e 4, com algumas controvérsias, para os fenômenos arteriais (LIM et al., 2006).

Os antagonistas de vitamina K são administrados, às vezes, por mais de 60 anos, como profilaxia e para tratamento de fenômenos tromboembólicos. E apesar do controle da ação da varfarina estar baseado no RNI, existem as complicações do tratamento que podem ocorrer mesmo com um acompanhamento adequado. O maior problema são as hemorragias, com sangramento maior em 1 a 5% dos pacientes tratados (SCHENK et al., 1999; LANDEFELD et al., 1993). Este valor aumenta para 8%, quando todos os tipos de sangramento/hemorragias são incluídos (GALLUS, 2000).

1.3.2 A SAF e a hemostasia

O mecanismo preciso pelo qual o anticorpo antifosfolípide causa trombose não está bem estabelecido (DEVREESE, 2012). Vários estudos

demonstraram que os fenômenos trombóticos são na maioria das vezes venosos, isto é, trombose venosa profunda (CERVERA, 2002). Sabe-se também que, níveis elevados da concentração plasmática do FVIII estão envolvidos na trombose venosa profunda e em indivíduos com tromboembolismo venoso recorrente (MARTINELLI, 2005; JENKINS et al., 2012). Um estudo realizado na década passada mostrou que o aumento nos níveis plasmáticos de FVIII está correlacionado com a duração do tempo de terapia com varfarina, sugerindo a possibilidade de uma via compensatória para corrigir a diminuição dos fatores vitamina-K dependente (BRUMMEL et al., 2001).

O mecanismo pró-coagulante mediado pelos antifosfolípides está relacionado à sua capacidade de interagir com proteínas ligantes de fosfolípides expressas nas membranas celulares de diferentes tipos de células (MERONI et al., 2011). O complexo formado entre antígeno e anticorpo leva à ativação da via sinalizatória para o núcleo, e então, dependendo de sua função biológica, as células ativadas produzirão diferentes respostas, as quais podem contribuir para a variedade de manifestações clínicas vistas na SAF (MERONI, 2008).

Existe um ambiente pró-trombótico na SAF, pois todas as etapas do sistema de coagulação estão conjuntamente ativadas para que se produza a trombose, a qual parece ser o resultado de diferentes vias, envolvendo formação do coágulo, inibição do mecanismo de anticoagulação natural e a inibição do sistema fibrinolítico (**Figura 4**). Desse modo, as células endoteliais são ativadas pelos antifosfolípides, principalmente através da

ligação da $\beta 2$ GPI na superfície celular, induzindo um fenótipo pró-coagulante e pró-inflamatório (PIERANGELI et al., 1999; GHARAVI et al., 1999; MERONI et al., 2011).

Figura 4. Possíveis mecanismos de formação de trombos mediados pelos anticorpos antifosfolípides. Em 1, ampliação da membrana da célula endotelial mostrando a interação entre a célula e o antifosfolípide através da $\beta 2$ GPI. Em 2, os antifosfolípides ativam a célula endotelial, fazendo com que haja secreção de moléculas de adesão, como o FVW, e aumento da expressão de fator tecidual nestas células e nos monócitos, promovendo adesão entre o leucócito e o endotélio, secreção de citocinas e produção de prostaglandina. Em 3, antifosfolípides reconhecem proteínas ligantes de fosfolípides na membrana da plaqueta, potencializando a agregação plaquetária induzida por um agonista. Em 4, os antifosfolípides atuam nos componentes plasmáticos da cascata de coagulação, inibindo a atividade anticoagulante, alterando a fibrinólise e competindo pela ligação de um anticoagulante natural, a anexina V. MERONI et al., 2011 – modificado.

As células endoteliais ativadas passam a expressar um maior número de moléculas de adesão, como o fator de von Willebrand (FVW), aumentando também a expressão de fator tecidual nas células endoteliais e nos monócitos (LÓPEZ-PEDRERA et al., 2006), o que resulta em adesão dos leucócitos ao endotélio, secreção de citocinas e síntese de prostaglandina E₂; o tônus vascular encontra-se aumentado, com uma maior quantidade de vasoconstritores circulantes (endotelina-1); os antifosfolípides também reconhecem as proteínas ligantes de fosfolípides expressas nas plaquetas e esta ligação faz com que as plaquetas agreguem-se, aumentando a adesão ao endotélio vascular; alguns fatores de coagulação como a protrombina estão ativados e favorecem a formação da trombina e, conseqüentemente, a quebra do fibrinogênio em fibrina. Por sua vez, o sistema anticoagulante natural, representado pelas proteínas C e S, está reduzido, pois podem existir anticorpos contra essas proteínas, diminuindo sua concentração plasmática, além de competirem os sítios de estruturas aniônicas da membrana plasmática com a anexina V, um anticoagulante natural (LAAT et al., 2007); e, de forma interessante, completando a atividade pró-trombótica, existe a inibição do sistema fibrinolítico através do aumento do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) (KRONE et al., 2010). No entanto, o mecanismo preciso pelo qual antifosfolípides alteram a hemostasia induzindo um estado de hipercoagulabilidade ainda não foi descoberto (HOPPENSTEADT et al., 2008, MERONI et al., 2011).

Em resumo, os antifosfolípides atuam ativando a célula endotelial, monócitos e plaquetas, inibem proteínas regulatórias da coagulação e da fibrinólise culminando com a formação de trombos (**Figura 5**).

Figura 5. Prováveis mecanismos de ação dos anticorpos antifosfolípides. IRASTORZA et al., 2010 – modificado.

Durante a última década, muitos parâmetros indiretos para investigar a lesão nas células endoteliais vêm sendo estudados em pacientes com SAF (CUGNO et al., 2010); entre eles, o FVW e, mais especificamente, a sua relação com a ADAMTS-13 e os anticorpos contra esta protease (AUSTIN et al., 2008).

O papel da patogênese da ADAMTS-13 no estado pró-trombótico da síndrome antifosfolípide permanece desconhecido, mas as observações dos estudos anteriores sugerem que os desarranjos na ADAMTS-13 possam ocorrer nos pacientes com SAF, contribuindo para o frequente distúrbio no balanço hemostático destes indivíduos (AUSTIN et al., 2008).

O FVW é uma glicoproteína que já vem sendo estudada há um século, estando bem estabelecido na literatura o seu papel na hemostasia. Os estudos iniciais com a ADAMTS-13 ocorreram na década de 90 com enfoque na PTT. No entanto hoje, já sabemos que a ADAMTS-13 e seu substrato, o FVW estão alterados em várias outras condições trombóticas adquiridas.

Assim, o estudo do comportamento das moléculas FVW, ADAMTS-13 e o FVIII, na SAF podem originar informações importantes nas causas dos distúrbios da coagulação que são característicos nos pacientes com SAF.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A hipótese geral deste estudo é que em pacientes com síndrome antifosfolípide primária a função endotelial está alterada e passível de ser comprovada através do marcador de lesão endotelial, o fator de von Willebrand, e das alterações da enzima ADAMTS-13e da proteína FVIII, as quais são diretamente relacionadas a ele.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar, em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, a concentração antigênica, a atividade e a correlação entre as proteínas plasmáticas FVW, FVIII e ADAMTS-13. Analisar a ligação do FVW ao FVIII e avaliar a ativação plaquetária através do PF4.
2. Verificar o padrão de fragmentação da subunidade principal do FVW.
3. Verificar entre as variáveis gerais ou específicas estudadas se alguma delas é capaz de diferenciar os tipos de eventos trombóticos ocorridos (arterial e venoso) nestes pacientes com SAF primária.

4. Verificar se a presença dos anticorpos antifosfolípides (anticoagulante lúpico, anticardiolipina, e anti- β 2glicoproteína I) influenciam as proteínas FVW, FVIII e ADAMTS-13.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 População estudada

A casuística deste estudo foi constituída por pacientes (N= 39) com síndrome antifosfolípide primária definida de acordo com os critérios de Sidney (MIYAKIS et al., 2006) com trombose comprovada por exames de imagens, provenientes do ambulatório de Síndrome Antifosfolípide da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As idades dos pacientes estavam entre 19 e 69 anos (mediana 43 anos). Os participantes foram avaliados através de entrevista clínica, exame físico, incluindo medidas antropométricas, e testes laboratoriais. Foram anotados os tipos de eventos trombóticos e se houve recorrência.

Não fizeram parte do estudo pacientes durante o evento trombótico, com hemorragia, com SAF secundária a outra conectivopatia, com infecção aguda, portadores de doença hepática, com sepse, com doenças malignas e durante a gravidez e a lactação.

O grupo controle foi composto de indivíduos saudáveis doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo; eles foram pareados para a idade e sexo com o grupo com SAFP.

Somente foram incluídos os pacientes e controles que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

As características antropométricas dos pacientes estudados encontram-se na Tabela 4 em Anexos. As características gerais dos controles encontram-se na Tabela 5 em Anexos. O tipo de evento trombótico, número de eventos, tempo de doença e a medicação anticoagulante usada estão na tabela 6 em Anexos.

Os pacientes foram incluídos no estudo de forma seqüencial e foram identificados com números ímpares de entrada e os controles com números pares.

3.1.2 Tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi feito com base em uma das variáveis que foram estudadas, sendo esta variável já conhecida em nosso laboratório.

Considerando uma diferença a ser demonstrada na maioria dos testes, da ordem de 0,5 desvio-padrão ou superior, com nível de significância de 0,05 e poder de 0,8, estimamos que a amostra devesse corresponder a 30 indivíduos em cada grupo, ou seja, 30 pacientes e o mesmo número de controles pareados. Esta estimativa previu a realização de testes bicaudais em todos os procedimentos.

Considerando que esta estimativa foi feita para a variável mais conhecida e que as demais poderiam ser mais problemáticas do ponto de

vista estatístico, decidimos trabalhar com 39 indivíduos em cada grupo, considerando-se a possibilidade de perda ou não aproveitamento em torno de 20%.

3.1.3 Aspectos éticos

O desenho do estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos - CAPPesq (protocolo de pesquisa nº 0614/10). Somente foram incluídos neste estudo os pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Coleta de amostras

Todos os pacientes com SAFP tiveram amostras de sangue coletadas no momento de sua inclusão no estudo. O sangue foi coletado em:

- Citrato de sódio 3,2% (1:10 v/v), para a determinação do antígeno do FVW plasmático, atividade biológica do FVW, antígeno da ADAMTS-13, atividade da ADAMTS-13, antígeno do FVIII, atividade do FVIII, ligação do FVW no FVIII, Fator 4 plaquetário (PF4), tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e anticoagulante lúpico (AL).
- EDTA para a realização do hemograma e tipagem sanguínea.

- Citrato de sódio 3,2% (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.
- Tubo seco (sem anticoagulante) para detecção dos anticorpos antifosfolípides do tipo anticardiolipina (ACL) e anti β 2-glicoproteína I (a- β 2GPI).

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Reagentes

Proteína A Sepharose®, membrana Hybond™, anticorpo secundário anti-coelho marcado com peroxidase e o marcador de peso molecular foram adquiridos da GE healthcare (Uppsala, Suécia). Ácido edético (EDTA), N-etilmaleimida (NEM), aprotinina, leupeptina e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) foram adquiridos da Sigma (St Louis, MO, EUA). Anticorpo policlonal anti-FVW foi adquirido da Dako Corporação (Carpinteria, CA, EUA). Os *kits* para determinação do antígeno e atividade do FVW, capacidade de ligação do FVW ao FVIII, fator 4 plaquetário foram obtidos da Diagnostica Stago (Asnières, França). Os *kits* para determinação do antígeno e atividade da ADAMTS-13 foram adquiridos da Technoclone (Vienna, Áustria). Os *kits* para determinação do antígeno do FVIII foram obtidos da Affinity Biologicals (Ancaster, Canadá). Os *kits* para

determinação da atividade do FVIII foram obtidos da Chromogenix (Massachusetts, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de altíssimo grau de pureza.

3.3.2 Antígeno e atividade do fator de von Willebrand

A determinação do antígeno do FVW (FVW:Ag) foi realizada pelo método de ELISA, utilizando o *okit* Asserachrom® VWF:Ag (Diagnostica Stago), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em UI/dL (MURDOCK et al., 1997).

A determinação da atividade biológica do FVW (FVW:CB) foi realizada pelo método de ELISA utilizando o *kit* Asserachrom® VWF:CB (Diagnostica Stago), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em %.

3.3.3 Antígeno e atividade da ADAMTS-13

A determinação do antígeno da ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Ag), no plasma, foi realizada pelo método de ELISA, com utilização do *Kit* Technozym® ADAMTS-13 Antígeno (Technoclone), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em µg/mL.

A determinação da atividade da ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Atv), no plasma, foi realizada pelo método de ELISA, com utilização do *Kit* Technozym® ADAMTS-13 Atividade (Technoclone), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em %.

3.3.4 Antígeno e atividade do fator VIII

A determinação do antígeno do FVIII (FVIII:Ag) foi realizada pelo método de ELISA utilizando o *kit* VisuLize™ FVIII Antigen Kit (Affinity Biologicals), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em UI/dL.

A determinação fotométrica da atividade do FVIII (FVIII:C) foi realizada pelo método cromogênico utilizando o *kit* Coamatic® Factor VIII (Chromogenix), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em %.

3.3.5 Ligação do fator de von Willebrand ao fator VIII (FVW:FVIII:B)

A determinação da ligação do FVW ao FVIII foi realizada pelo método de ELISA utilizando o *kit* Asserachrom® VWF:FVIII:B (Diagnostica Stago), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em %.

3.3.6 Fator 4 plaquetário (PF4)

A determinação do PF4 foi realizada pelo método de ELISA utilizando o *kit* Asserachrom® PF4 (Diagnostica Stago), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em UI/mL.

3.3.7 Anticardiolipina

A anticardiolipina (ACL) foi avaliada por teste imunométrico enzimático destinado a determinação quantitativa dos autoanticorpos da classe IgM e IgG com utilização dos kits QUANTA Lite ACL IgM III e IgG III (INOVA diagnostics, Inc, San Diego, CA USA) de acordo com as especificações do fabricante, na rotina do laboratório de imunologia da reumatologia. Os resultados foram expressos em GPL para IgG, MPL para IgM.

3.3.8 Anti- β 2glicoproteína I

A presença de anti-beta2glicoproteína I (α - β 2GPI) foi avaliada por teste de Elisa, com utilização dos kits QUANTA Lite β 2GPI IgM e IgG (INOVA Diagnostics, Inc, San Diego, CA USA), de acordo com as especificações do fabricante, na rotina do laboratório de imunologia da reumatologia. Os resultados foram expressos em GPL para IgG, MPL para IgM.

3.3.9 Anticoagulante lúpico

A determinação da presença do anticoagulante lúpico foi realizada através dos kits LAC Screen e LAC Confirm (Instrumentation laboratory, Lexington, MA USA), de acordo com as especificações do fabricante com as

recomendações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia. Os testes foram realizados na rotina do laboratório de hematologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas.

3.3.10 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.

3.3.10.1 Imunoprecipitação do FVW plasmático

O FVW foi purificado por imunoprecipitação (LOPES; MAEDA, 1995, CASONATO et al., 2007).

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 de incubação (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3). Em seguida, esta mistura foi incubada com a proteína A-Sepharose (780 µL de resina/mg de anticorpo). Seguiu-se lavagem da resina duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem 1 (LiCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM, NEM 5 mM e aprotinina 20 U/ mL) e uma vez com 1 mL de tampão de lavagem 2 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 20 mM, pH 8,0), acrescido de aprotinina 1 U/mL. O sobrenadante foi removido e o FVW foi eluído com 120 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 100 mM, SDS 2%, pH 8,0). A resina foi removida e o sobrenadante contendo o FVW plasmático foi aliquoteado e estocado a -80°C até o momento da sua análise.

3.3.10.2 Composição das subunidades do FVW plasmático – *Western blotting*

Para análise das subunidades do FVW plasmático, o imunoprecipitado do FVW (10 µL) 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 15 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). O marcador de peso molecular utilizado foi o *Rainbow molecular weight marker full range* (GE healthcare) com pesos moleculares entre 225 kDa e 12 kDa. As proteínas separadas na eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (GE healthcare) utilizando-se tampão (Tris 48 mM, glicina 390 mM, SDS 0,37%, metanol 20% (v/v), pH 8,3) (TOWBIN, 1979). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de albumina bovina sérica 5% diluída em TBS-T. Em seguida, foi incubada com o anticorpo policlonal anti-FVWna concentração de 5,7 g/L diluído 1:750 em TBS-T e após com anticorpo secundário anti-coelho ligado à peroxidase em uma diluição 1:2000, em TBS-T. Entre todas as etapas, a membrana foi lavada com tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6 acrescido de Tween-20 0,05%). A imunodeteção dos fragmentos do FVW imobilizados na membrana foi realizada por reação de quimioluminescência utilizando-se uma solução de luminol (Tris 1 M pH 8,5, luminol 250 mM, ácido comárico 190 mM, H₂O₂ 0,3%) e um sistema de imagem digital LAS 4000 (GE healthcare). A análise

para quantificação dos fragmentos foi realizada através do software ImageQuantTMCapture software(GE healthcare).

3.3.11 Variáveis laboratoriais gerais

O hematócrito, a concentração de hemoglobina e o número de plaquetas foram determinados por contagem eletrônica automatizada, utilizando o princípio da impedância, utilizando o equipamento Coulter STKS (Beckman Couter, CA – EUA). O tipo sanguíneo foi determinado imunologicamente. O TP, TT e TTPA foram determinados através do tempo de formação do coágulo. Estas variáveis laboratoriais foram determinadas em testes utilizados na rotina do laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas.

3.4 Análise estatística

As variáveis envolvidas no estudo foram testadas com relação à sua aderência à distribuição normal, quando a aderência foi satisfatória, os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, ou mediana e limites quando a aderência não foi satisfatória. Para os procedimentos não paramétricos, as comparações entre dois grupos foram feitas com uso do teste de Mann-Whitney e para comparação de três grupos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis. As comparações envolvendo mais de uma condição experimental no mesmo indivíduo foram feitas com uso de análise de

variância para dois fatores, e as variáveis analisadas com transformação logarítmica, as comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Este estudo é do tipo transversal e foram incluídos 39 pacientes portadores de síndrome antifosfolípide primária (SAFP), no período de maio de 2011 a dezembro de 2012. Foram incluídos 39 controles sadios, doadores voluntários da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pareados com os pacientes por sexo e idade,

Os resultados estão apresentados em duas partes:

- Na primeira parte estão apresentados os dados entre os pacientes e os controles sadios pareados

- Na segunda parte está apresentada uma análise entre os pacientes com SAFP classificados em grupos: pacientes separados de acordo com o tipo de evento trombótico (arterial e venoso) e pacientes separados de acordo com a presença de anticorpo antifosfolípide no momento da coleta (AL, triplo positivo e ausência de antifosfolípide).

4.1 Análise comparativa entre pacientes e controles

Foram incluídos 39 pacientes com SAFP sendo 29 pacientes do sexo feminino e 10 pacientes do sexo masculino, com idades variando de 19 a 69 anos (mediana 43 anos). Os controles incluídos foram pareados aos pacientes por sexo e idade, portanto são 29 controles do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com idade mediana de 43 anos.

As características clínicas dos pacientes incluindo tempo de doença, presença de hipertensão arterial sistêmica, presença de diabetes, uso de anticoagulante e tipo de evento trombótico encontram-se nos Anexos, tabela 6.

4.1.1 Variáveis laboratoriais gerais

As variáveis laboratoriais gerais analisadas nos pacientes com SAFP primária foram: hematócrito, hemoglobina, número de plaquetas, número de leucócitos, tempo de protrombina (TP), razão normalizada internacional (RNI), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), tipagem sanguínea sistema ABO e proteína C reativa (PCR). Os valores individuais juntamente com as medidas de tendência central encontram-se dispostos na tabela 7 em Anexos.

4.1.2 Variáveis laboratoriais bioquímicas específicas

4.1.2.1 A proteína fator de von Willebrand (FVW)

Concentração antigênica e atividade do FVW

A concentração antigênica do FVW apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes com SAFP (74 ± 6 UI/dL) comparado com os controles (69 ± 11 UI/dL), $p = 0,016$; Figura 6. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 8.

Figura 6. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação do antígeno do FVW nos pacientes com SAFP e nos controles.

A atividade biológica do FVW plasmático não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com SAFP ($75 \pm 16\%$) e os controles ($73 \pm 14\%$), $p = 0,4966$; Figura 7. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 8.

Figura 7. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação da atividade do FVW nos pacientes com SAFP e nos controles.

Razão e correlação entre a atividade e o antígeno do FVW

A razão entre a atividade e o antígeno do FVW não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com SAFP ($1,01 \pm 0,19$) e os controles ($1,06 \pm 0,15$), $p = 0,0732$. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 8.

A análise individual da correlação da atividade do FVW em função da concentração antigênica do FVW nos pacientes com SAFP e nos controles encontra-se na Figura 8.

Foi observada uma correlação positiva e significativa nos dois grupos, pacientes SAFP: $r=0,4543$; $p=0,0037$ e controles: $r = 0,6326$; $p < 0,0001$.

Figura 8. Análise individual da atividade do FVW:CB (%) em função da concentração antigênica do FVW:Ag (UI/dL). Em A: pacientes com SAFP; em B: controles.

4.1.2.2 A proteína ADAMTS-13:

Concentração antigênica e atividade enzimática da ADAMTS-13

A concentração antigênica da ADAMTS-13 apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes com SAFP ($1,3 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$) comparado com os controles ($0,82 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$), $p < 0,0001$; Figura 9. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 9.

Figura 9. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação do antígeno da ADAMTS-13 nos pacientes com SAFP e nos controles.

A atividade da ADAMTS-13 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes SAFP ($90 \pm 20\%$) e os controles ($92 \pm 17\%$), $p = 0,79$; Figura 10. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 9.

Figura 10. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação da atividade da ADAMTS-13 nos pacientes com SAFP e nos controles.

Razão e correlação entre atividade e o antígeno da ADAMTS-13

A razão entre a atividade e o antígeno da ADAMTS-13 estava significativamente diminuída nos pacientes com SAFP ($0,69 \pm 0,18$) comparado com os controles ($1,12 \pm 0,19$), $p < 0,0001$; Figura 11. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 9.

Figura 11. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação da atividade da ADAMTS-13 nos pacientes com SAFP e nos controles.

A análise individual da correlação da atividade da ADAMTS-13 em função da sua concentração antigênica nos pacientes com SAFP e nos controles encontra-se na Figura 12. Foi observada uma correlação positiva e significativa nos dois grupos: pacientes SAFP: $r = 0,5908$; $p < 0,0001$ e controles: $r = 0,6777$; $p < 0,0001$.

Figura 12. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 (%) em função da concentração antigênica da ADAMTS-13 (µg/mL). Em A: pacientes com SAFP; em B: controles.

4.1.2.3 A proteína fator VIII (FVIII):

Concentração antigênica e atividade do FVIII

A concentração antigênica do FVIII apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes com SAFP (106 ± 19 UI/dL) comparado com os controles (91 ± 15 UI/dL), $p = 0,0003$; Figura 13. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 10.

Figura 13. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação do antígeno do FVIII nos pacientes com SAFP e nos controles.

A atividade do FVIII apresentou-se estatisticamente aumentada nos pacientes com SAFP ($117 \pm 38\%$) comparado com os controles ($98 \pm 30\%$), $p = 0,0021$; Figura 14. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 10.

Figura 14. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação da atividade do FVIII nos pacientes com SAFP e nos controles.

Razão e correlação entre o antígeno e a atividade do FVIII

A razão entre a atividade e o antígeno do FVIII não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com SAFP ($1,13 \pm 0,39$) e os controles ($1,08 \pm 0,32$), $p = 0,0461$. Os valores e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 10.

A análise individual da correlação da atividade do FVIII em função da sua concentração antigênica nos pacientes com SAFP e nos controles encontra-se na figura 15. Foi observada uma correlação positiva nos dois grupos, sendo esta correlação significativa apenas no grupo dos controles: pacientes SAFP: $r = 0,0017$; $p = 0,9917$ e controles: $r = 0,3823$; $p = 0,0163$.

Figura 15. Análise individual da atividade do FVIII:C (%) em função da concentração antigênica do FVIII (UI/mL). Em A: pacientes com SAFP; em B: controles.

4.1.2.4 A ligação do FVW ao FVIII

A FVW:FVIII B apresentou-se estatisticamente aumentada nos pacientes com SAFP ($144 \pm 17\%$) comparado com os controles ($134 \pm 20\%$), $p = 0,0082$; Figura 16. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 11.

Figura 16. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação da ligação do FVW no FVIII nos pacientes com SAFP e nos controles.

4.1.2.5 A proteína fator 4 plaquetário (PF4):

A concentração da PF4 estava significativamente diminuída nos pacientes com SAFP (96 ± 12 UI/mL) comparado com os controles (101 ± 8 UI/mL), $p = 0,014$; Figura 17. Os valores individuais e as medidas de tendência central encontram-se nos Anexos, tabela 12.

Figura 17. Encontram-se representados pelos *box plots* a mediana, os percentis 25% e 75% e os valores extremos da determinação do PF4 nos pacientes com SAFP e nos controles.

4.1.2.6 Análise da composição das subunidades do FVW plasmático

A composição da subunidade do FVW no plasma foi analisada por *Western blotting*, e na Figura 18 encontra-se uma imagem de um gel representativo.

Figura 18. *Western immunoblotting* representativo da composição das subunidades do FVW plasmático de paciente com SAFP e de controle pareado. 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 – *Rainbow*; P = amostra em duplicata de um paciente com SAFP; CTLE = amostra em duplicata do controle pareado.

A subunidade principal do FVW é representada pela fração com migração de 225 kDa; que é clivada pela ADAMTS-13 gerando fragmentos de 176 e 140 kDa. Podemos observar 4 fragmentos abaixo da subunidade principal do FVW plasmático, os 4 fragmentos e a subunidade principal foram submetidos à densitometria. Foi calculada a porcentagem relativa dos

fragmentos de interesse da seguinte maneira: as densidades da subunidade principal e dos 4 fragmentos foram somadas e a este resultado atribuímos o valor de 100%, após foi calculado a porcentagem relativa dos fragmentos de interesse (225, 176 e 140 kDa). As porcentagens relativas e as medidas de tendência central dos fragmentos do FVW plasmático de cada paciente e dos controles encontram-se apresentadas nos Anexos, tabela 13. A porcentagem relativa da densidade da subunidade principal (225 kDa) do FVW não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com SAFP (mediana 71, limites 40 e 87) e os controles (mediana 70, limites 38 e 89), $p = 0,956$.

Considerando-se a subunidade principal como 100% nos pacientes e nos controles, o fragmento de 176 kDa representa 11% deste total nos pacientes e 10% nos controles; e o fragmento de 140 kDa representa 15% nos pacientes e 19% nos controles.

4.2 Análise entre pacientes SAFP agrupados de acordo com o tipo de evento trombótico

Os pacientes com SAFP foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de evento trombótico apresentado durante o curso da doença (tabela 1):

- O primeiro grupo foi constituído de pacientes que apresentaram eventos arteriais (N = 22);
- O segundo grupo foi constituído de pacientes que apresentaram eventos venosos (N = 17);

Tabela 1. Caracterização dos grupos de pacientes com SAFP separados pelo tipo de evento trombótico.

	Tipo de evento trombótico	
	Arterial (N = 22)*	Venoso (N = 17)
Idade (anos)	46	41
Sexo (F / M)	15 / 7	14 / 3

F = feminino, M = masculino. Idade em mediana.

*36% destes pacientes tiveram pelo menos um evento venoso no curso da doença.

4.2.1 Variáveis laboratoriais gerais

Os pacientes com SAFP separados por eventos trombóticos apresentaram um aumento significativo do TP no grupo arterial (27 ± 7 segundos) comparado ao venoso (22 ± 6 segundos), $p = 0,018$; assim como a razão normalizada internacional (RNI) apresentou-se aumentada no grupo arterial ($2,5 \pm 0,8$) comparado ao venoso ($2 \pm 0,6$), $p = 0,02$.

O número de leucócitos apresentou-se aumentado no grupo arterial ($7485 \pm 1553 \text{ mm}^3$) comparado ao venoso ($5704 \pm 2503 \text{ mm}^3$), $p = 0,02$.

4.2.2 Variáveis laboratoriais específicas

A análise do antígeno do FVW nos pacientes com SAFP agrupados pelo tipo de evento, não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes dos grupos arterial ($75 \pm 5 \text{ UI/dL}$) e venoso ($73 \pm 7 \text{ UI/dL}$); $p = 0,387$, assim como sua atividade no grupo arterial ($78 \pm 15\%$) comparado com o venoso ($72 \pm 16\%$); $p = 0,372$. A correlação entre atividade e antígeno do FVW mostrou-se positiva nos dois grupos (arterial $r = 0,4681$ e venoso $r = 0,3775$), porém significativa no grupo arterial ($p = 0,028$), Figura 19.

Figura 19. Análise individual da atividade do FVW:CB (%) em função da concentração antigênica do FVW:Ag (UI/dL). Em A: pacientes do grupo arterial; em B: pacientes do grupo venoso.

A concentração antigênica da ADAMTS-13 não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes do grupo arterial ($1,3 \pm 0,3\mu\text{g/mL}$) e do venoso ($1,4 \pm 0,4\mu\text{g/mL}$); $p = 1,00$, assim como sua atividade no grupo arterial ($91 \pm 20\%$) e no venoso ($90 \pm 19\%$); $p = 0,419$. A correlação entre a atividade e o antígeno da ADAMTS-13 mostrou-se positiva e significativa nos pacientes do grupo arterial: $r = 0,6352$; $p = 0,001$ e do grupo venoso: $r = 0,4902$; $p = 0,045$. Figura 20.

Figura 20. Análise individual da atividade da ADAMTS-13 (%) em função da concentração antigênica da ADAMTS-13 (µg/mL). Em A: pacientes do grupo arterial; em B: pacientes do grupo venoso.

O antígeno do FVIII não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes do grupo arterial (108 ± 20 UI/dL) e do venoso (104 ± 17 UI/dL); $p = 0,357$, assim como a sua atividade no grupo arterial ($115 \pm 43\%$) e no venoso ($120 \pm 34\%$); $p = 0,766$. A correlação entre a atividade e o antígeno do FVIII mostrou-se negativa e não significante nos pacientes do grupo arterial: $r = -0,193$; $p = 0,387$; e positiva, porém não significante nos pacientes do grupo venoso: $r = 0,183$; $p = 0,480$.

A ligação do FVW ao FVIII não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes do grupo arterial ($147 \pm 16\%$) e do venoso ($139 \pm 19\%$); $p = 0,112$.

O PF4 não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes do grupo arterial (98 ± 7 UI/mL) e do venoso ($94 \pm 17\%$ UI/mL); $p = 0,853$.

4.3 Análise entre pacientes SAFP agrupados de acordo com o tipo de anticorpo antifosfolípide presente no momento da coleta

A frequência dos anticorpos antifosfolípides: anticoagulante lúpico (AL), anticardiolipina (ACL) IgG e IgM, e anti- β 2 glicoproteína I (a- β 2GPI) IgG e IgM nos pacientes com SAFP deste estudo podem ser vistos na tabela 2. A presença de AL e os títulos para ACL e anti- β 2GPI individuais encontram-se nos Anexos, tabela 14.

Tabela 2. Positividade dos anticorpos antifosfolípides nos pacientes com SAFP.

	N total = 39
	N (%)
AL	29 (74)
ACL IgG/IgM	12 (31)
IgG	11 (28)
IgM	1 (2)
a-β2GPI IgG/IgM	16 (41)
IgG	11 (28)
IgM	5 (13)

AL = anticoagulante lúpico; ACL = anticardiolipina; a- β 2GPI = anti- β 2 glicoproteína I.

Na análise consideramos três grupos (tabela 3):

- Grupo AL: constituído por pacientes com positividade apenas para o AL (anticoagulante lúpico) (N = 16);
- Grupo triplo positivo: constituído por pacientes com positividade para os três antifosfolípidos: AL (anticoagulante lúpico) + ACL (anticardiolipina) + anti-β2GPI (anti-β2glicoproteína I) (N = 6);
- Grupo ausência de AFL: constituído por pacientes com ausência de antifosfolípide positivo no momento da coleta (N=5).

Tabela 3. Caracterização dos grupos de pacientes com SAF primária em relação ao tipo de anticorpo antifosfolípide.

	Grupos		
	AL (N = 16)	Triplo positivo (N = 6)	Ausência de AFL (N = 5)
Idade (anos)	47	48	38
Sexo (F / M)	13 / 3	2 / 4	4 / 1

F = feminino; M = masculino; AL = anticoagulante lúpico; AFL = antifosfolípide.
Idade em mediana.

4.3.1 Variáveis laboratoriais gerais

Na análise das variáveis laboratoriais gerais, os pacientes com SAFP separados de acordo com o tipo de AFL não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as variáveis laboratoriais gerais.

4.3.2 Variáveis laboratoriais específicas

Na análise do FVW, a concentração antigênica não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes dos grupos AL (75 ± 7 UI/dL), triplo positivo (77 ± 2 UI/dL) e ausência de AFL (74 ± 5 UI/dL); $p = 0,711$, assim como a atividade: AL ($77 \pm 22\%$), triplo positivo ($80 \pm 18\%$) e ausência de AFL ($79 \pm 6\%$); $p = 0,881$.

O antígeno da ADAMTS-13 não apresentou diferenças entre os pacientes dos grupos AL ($1,3 \pm 0,3$ µg/mL), triplo positivo ($1,4 \pm 0,3$ µg/mL) e ausência de AFL ($1,5 \pm 0,3$ µg/mL); $p = 0,273$, assim como sua atividade: AL ($83 \pm 22\%$), triplo positivo ($98 \pm 14\%$) e ausência de AFL ($102 \pm 10\%$); $p = 0,139$.

O FVIII:Ag não apresentou diferenças entre os pacientes dos grupos AL (112 ± 16 UI/dL), triplo positivo (107 ± 11 UI/dL) e ausência de AFL (112 ± 18 UI/dL); $p = 0,244$, assim como a atividade: AL ($118 \pm 41\%$), triplo positivo ($107 \pm 49\%$) e ausência de AFL ($117 \pm 32\%$); $p = 0,927$.

A ligação do FVW ao FVIII não apresentou diferenças entre os pacientes dos grupos AL ($144 \pm 17\%$), triplo positivo ($148 \pm 12\%$) e ausência de AFL ($151 \pm 21\%$); $p = 0,823$.

O PF4 não apresentou diferenças entre os pacientes dos grupos AL ($95 \pm 18\%$ UI/mL), triplo positivo ($97 \pm 8\%$ UI/mL) e ausência de AFL ($97 \pm 10\%$ UI/mL); $p = 0,914$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A manutenção da fluidez sanguínea possui grande importância para a prevenção da formação de trombos, e o tecido responsável por esta função é o endotelial (VAN HINSBERGH; 2012). A célula endotelial pode ser ativada alterando seu fenótipo para um estado pró-agregante e pró-trombótico. Uma das consequências da ativação da célula endotelial é a secreção do FVW em forma de multímeros de alto peso molecular, que são hemostaticamente mais ativos. Fisiologicamente estes multímeros são proteolizados pela enzima ADAMTS-13, diminuindo o tamanho dos polímeros de FVW tornando-os menos ativos para a formação de trombos (CRAWLEY et al., 2011).

Vários estudos, em pacientes com síndrome antifosfolípide, já demonstraram a ativação da célula endotelial pelos anticorpos antifosfolípides, aumentando a produção, expressão e secreção de moléculas de adesão, tais como o FVW (PIERANGELI, HARRIS; 2003; LEVY et al., 2005; DER et al., 2007; CUGNO et al., 2010).

Para avaliarmos se os pacientes com SAFP definida apresentavam ativação endotelial, nós estudamos o FVW, descrito como um marcador clássico de lesão endotelial, e as proteínas ADAMTS-13 e FVIII, que estão diretamente relacionadas a ele. Por estes pacientes estarem na fase crônica da doença, nós estudamos o comportamento destas proteínas nos pacientes e comparamos com os controles sadios pareados para sexo e idade.

Este estudo incluiu 39 pacientes com SAF primária definida, sendo 29 mulheres e 10 homens (frequência 3:1), com idade mediana de 43 anos. A faixa etária dos pacientes e a alta frequência do sexo feminino no nosso estudo também foram observadas em outros estudos descritos na literatura, como em um estudo multicêntrico (20 centros em 13 países) de SAF realizado, trata-se de um estudo que envolveu 1000 pacientes com SAF, sendo 820 mulheres e 180 homens, no qual 53% dos pacientes tinham SAF primária, sendo que a frequência mulher/homem para a SAF primária era 3,5:1, e a idade em mediana era 40 anos, variando de 0 a 82 anos (CERVERA et al., 2002). No entanto, o motivo de a frequência desta síndrome de SAF ser maior em mulheres ainda não foi esclarecido. O que se sabe é que a prevalência desta síndrome na população é baixa, variando de 1 a 4,5%, e que ela aumenta conforme o aumento da idade (CASTRO-MARRERO et al., 2012).

Em nosso estudo, os pacientes com SAFP apresentaram aumento das concentrações antigênicas de FVW e FVIII em relação aos controles. Este resultado nos leva a especular que mesmo estando em uma fase crônica da doença, estes pacientes apresentam ativação endotelial constante, liberando FVW na circulação. Este fato poderia induzir estes pacientes ao risco de apresentar novo evento trombótico. No entanto, os pacientes apresentaram aumento do antígeno da ADAMTS-13. Esta enzima, como já está bem descrito na literatura, tem papel fisiológico na clivagem do FVW, tornando-o menos adesivo e prevenindo a hipercoagulabilidade (SADLER, 2005). Este é um importante mecanismo

de equilíbrio da função hemostática do FVW, já que ele em sua forma de alto peso molecular contribui diretamente para a formação do trombo (RIOS et al., 2012).

Ainda em relação ao FVW e a ADAMTS-13, não foi observado um aumento de suas atividades biológicas nos pacientes em relação aos controles. O fato de a atividade do FVW não estar aumentada pode ter ocorrido em decorrência da clivagem do FVW pela enzima ADAMTS-13, tornando-o menos adesivo e, portanto, com atividade reduzida. Em relação à atividade da ADAMTS-13, tendo como base fisiológica que a enzima ADAMTS-13 precisa estar ativa para clivar o FVW, ainda não se sabe qual a meia-vida da protease ativada (ZHENG, 2013). Como a ADAMTS-13 é a protease responsável por clivar a subunidade principal do FVW (CASONATO, 2007), nós verificamos a proteólise da subunidade principal do FVW, analisando os fragmentos gerados por *Western blotting*. Observamos que a subunidade principal (225 kDa) e os fragmentos de 176 e 140 kDa não apresentaram diferenças de densidade entre pacientes e controles.

Em nosso estudo, o antígeno e a atividade do FVIII estavam aumentados nos pacientes com SAFP comparado aos controles, diferentemente do FVW, que apresentou apenas a concentração antigênica aumentada. Analisando a correlação entre atividade e antígeno do FVIII, observamos que ela se perde nos pacientes. Sabe-se que o FVIII circula formando um complexo com o FVW e este complexo é importante para a manutenção do FVIII na circulação (VLOT et al., 1998).

O FVW o protege da degradação proteolítica pela proteína C ativada e pelo fator X ativado, estabiliza sua estrutura e impede que ele se ligue à plaqueta ativada (SAENKO, SCANDELLA; 1995; KOEDAN et al., 1988). Portanto, o FVIII livre tem meia-vida mais curta do que quando complexado com o FVW, já que estará mais suscetível a degradação (OTA et al., 2011), sugerindo que a meia-vida do FVIII plasmático é principalmente determinada pelo *clearance* do FVW (LENTING et al., 2010). Nossos resultados sugerem que existe um mecanismo pró-trombótico nestes pacientes.

A quantidade de FVIII que está complexada ao FVW é determinada pela constante afinidade entre as duas moléculas e pelas suas concentrações individuais (LENTING et al., 2010). Por este motivo nós avaliamos a ligação do FVW ao FVIII. Os nossos pacientes apresentaram aumento da ligação do FVW ao FVIII comparativamente aos controles. Este ensaio de ligação foi desenvolvido para o diagnóstico diferencial entre o tipo 2N da doença de von Willebrand e a hemofilia A (CARON et al., 2002). No tipo 2N ocorre deficiência no FVIII devido à diminuição da afinidade do FVW pelo FVIII (SADLER, 1995), enquanto que na hemofilia A ocorre deficiência de FVIII ligada ao cromossomo X (CARON et al., 2002). Nossos resultados sugerem que a ligação do FVW ao FVIII é efetiva e provavelmente está aumentada devido ao aumento do FVW disponível.

Sabe-se que pacientes com SAF possuem aumento da ativação plaquetária, principalmente pacientes com histórico clínico de eventos

trombóticos (LEVINE et al., 2002, JY et al., 2007). Ainda não se sabe ao certo como os AFL ativam as plaquetas (TODOROVA, BALEVA; 2007). Devido a isto, analisamos o fator 4 plaquetário (PF4), que é secretado por plaquetas ativadas e possui efeitos pró-trombóticos, tais como a inibição da inativação da trombina pela anti-trombina, potencialização da agregação plaquetária e aceleração da clivagem da proteína C ativada (HARPER et al., 2011). Nossos pacientes apresentaram diminuição da concentração de PF4 comparado com os controles. Alguns estudos citam o PF4 como um possível alvo dos AFLs na SAF, pois ele parece se ligar a anti- β 2GPI e juntos ligam-se aos receptores de membrana plaquetários, ativando-os (URBANUS et al., 2008; SIKARA et al., 2010). Também já foram descritos anticorpos anti-PF4 em pacientes com SAF (ALPERT et al., 2008, MARTIN-TOUTAIN et al., 2007; SATOH et al., 2012), esses anticorpos são comumente a causa da trombocitopenia induzida por heparina (HARPER et al., 2011). No entanto, ainda não se sabe qual a importância do PF4 na fisiopatologia da SAF.

Segundo Devreese existem muitos estudos sobre o risco de complicações clínicas em pacientes com SAF, mas faltam estudos de um marcador prognóstico sorológico para a predição de trombose nestes pacientes (DEVREESE, 2012). O estudo da presença de anticorpos antifosfolípides parece não ser suficiente para predizer o risco trombótico. Deve-se, portanto, associar outros marcadores pró-coagulantes (DEVREESE et al., 2010). Em nosso estudo, avaliamos os marcadores pró-coagulantes FVW e o FVIII. Ainda existem dúvidas em relação ao

papel patogênico dos antifosfolípides nas manifestações clínicas da SAF. Embora seja amplamente aceito que os AFLs possuem um papel patogênico, parece que apenas o fato de eles estarem presentes não é suficiente para desencadear um evento trombótico, sendo necessária a presença de um “*second hit*” (termo utilizado que expressa que uma outra condição trombofílica deve existir), que podem ser desde elementos ambientais até suscetibilidade genética (CASTRO-MARRERO et al., 2012; MERONI, 2011).

Com base nestes argumentos e para testarmos a hipótese de que o endotélio poderia se comportar de maneira diferente entre pacientes com trombose arterial ou venosa, e na presença ou não de AFL, nós realizamos uma análise comparativa categorizando os nossos pacientes com SAFP de acordo com o tipo de evento trombótico, e de acordo com a presença de AFL.

Em relação ao tipo de evento trombótico, os pacientes com SAFP foram agrupados em pacientes com trombose arterial e pacientes com trombose venosa. O grupo com trombose arterial representou 56% da população estudada; esses pacientes apresentaram eventos arteriais e/ou eventos arteriais e venosos. Os pacientes com trombose arterial e venosa (N=8) foram incluídos neste grupo, pois o são em termos de tratamento clínico. Os pacientes com trombose venosa representaram 44% da população estudada. A manifestação clínica mais comum foi a trombose venosa profunda (TVP) em 56% dos pacientes, seguido por acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) em 38%, e tromboembolismo

pulmonar (TEP) em 18% dos pacientes. Houve recorrência em 15% a 18% dos casos. Em relação a complicações gestacionais, 31% das pacientes apresentaram abortos.

Quando categorizamos os pacientes de acordo com o tipo de evento trombótico, não observamos diferenças estatísticas quanto à concentração das proteínas FVW, ADAMTS-13, FVIII e PF4.

A dose de varfarina que os pacientes do grupo arterial e os do grupo venoso tomam são distintas, tanto é que a diferença do TP entre os grupos é estatisticamente significativa, mas mesmo assim a varfarina parece não afetar a relação entre o FVW e a ADAMTS-13. Esta hipótese é reforçada quando fazemos o estudo da correlação FVW:CB/Ag e ADAMTS-13:Atv/Ag e verificamos que a correlação entre antígeno e atividade destas moléculas em ambos os grupos arterial e venoso é positiva e significativa. Existem poucos estudos mostrando a influência da varfarina sobre o FVW ou FVIII, mas eles mostram que a varfarina parece não alterar os níveis destas proteínas (KIM et al., 2001; OTA et al., 2011).

Parece que independentemente do tipo de evento trombótico que tenha ocorrido no paciente durante todo o curso da doença, o comportamento dessas moléculas na situação crônica é o mesmo.

No estudo dos pacientes com SAFP categorizados de acordo com a positividade dos AFLs no momento da coleta observamos várias situações, desde pacientes sem a presença de anticorpos antifosfolípides positivos (13%) ou presença de um único tipo de antifosfolípide (49%), até outros com mais do que um tipo (38%).

Na literatura já está descrito que, em pacientes com SAF, o tipo de anticorpo antifosfolípide presente pode estar relacionado a um maior potencial trombogênico. Considerando-se a positividade para apenas um único anticorpo antifosfolípide, o anticoagulante lúpico é reconhecido como o de maior fator de risco para eventos tromboembólicos (GALLI, 2010). A ACL e anti- β 2GPI também possuem seu grau de trombogenicidade, sendo que o isotipo IgG das duas possui maior significância clínica do que o IgM. Entretanto, os pacientes que possuem positividade para os três anticorpos antifosfolípides em questão são os que exibem o maior risco trombótico, comparado aos que apresentam um ou dois antifosfolípides (GALLI, 2010).

Por esses motivos, a análise dos pacientes categorizados de acordo com o tipo de anticorpo antifosfolípide presente no momento da coleta foi feita com enfoque em três grupos: anticoagulante lúpico positivo (AL), triplo positivo (AL + ACL + β 2GPI) e ausência de AFL. 41% dos nossos pacientes eram positivos apenas para o anticoagulante lúpico, 15% eram positivos para os três tipos de antifosfolípides, enquanto que 13% apresentaram ausência de AFL positivo.

Nestes pacientes categorizados de acordo com o tipo de AFL não observamos diferenças estatísticas nas proteínas FVW, ADAMTS-13, FVIII e PF4.

O mecanismo trombogênico da SAF parece incluir as duas vias de ativação da coagulação: a hemostasia primária e a secundária.

Observamos nos pacientes com SAFP, através do estudo das proteínas FVW e FVIII, que estas duas vias estão alteradas.

Embora tenham-se feito muitos esforços no estudo da trombogenicidade da SAF nos últimos 25 anos, ainda não é sabido como os anticorpos antifosfolípides aumentam o risco de trombose na SAF. Muitas teorias já foram propostas, mas infelizmente nenhuma delas foi comprovada de modo convincente (CASTRO-MARRERO et al., 2012). Em relação à presença dos anticorpos antifosfolípides, existem tentativas de comprovação de que o risco trombótico é maior quando se tem altos títulos de AFL, persistência ou presença de triplo positivo. No entanto, a quantificação deste risco é inexistente (BERTOLACCINI et al., 2014).

A idéia de se ter um “*second hit*” é crescente; neste sentido, a presença do AFL configura um estado trombofílico, mas a formação do trombo se dá apenas na presença de mais outra condição trombofílica (MERONI et al., 2011).

Com base em nossos resultados, podemos sugerir que mesmo os pacientes com SAFP estando em uma condição crônica da doença, a disfunção endotelial mostrou-se presente, através do marcador clássico FVW, e também sinalizou que a análise da proteína FVIII pode servir como um marcador hemostático.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

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

1- Os pacientes com síndrome antifosfolípide primária apresentaram aumento da concentração antigênica da proteína FVW, de sua enzima clivadora ADAMTS-13, em relação aos controles sadios pareados para idade e sexo. As atividades do FVW e da ADAMTS-13 não se alteraram comparativamente aos controles e a atividade do FVIII apresentou-se aumentada. Isto sugere a possibilidade de que, mesmo os pacientes estando no estado crônico da doença, o endotélio parece se alterar comprovado pelo aumento de seu marcador clássico, o FVW. No entanto, este aumento é controlado através da ação da ADAMTS-13, havendo equilíbrio da função hemostática, e por isso não houve alteração das atividades destas proteínas e no padrão de fragmentação da subunidade principal do FVW. O antígeno do FVIII e sua atividade apresentaram-se aumentados em relação aos controles, sugerindo um mecanismo pró-trombótico.

2- Os pacientes com SAFP apresentaram aumento da ligação do FVW ao FVIII, sugerindo que o FVW está apto para carregar o FVIII, formando um complexo que o estabiliza e o protege da degradação. Os pacientes apresentaram diminuição do PF4 em relação aos controles, que pode ter ocorrido devido a um mecanismo de inibição por anticorpos.

3- A manutenção da correlação entre atividade e antígeno do FVW e da ADAMTS-13, nos pacientes que apresentaram eventos arteriais ou venosos mostra que a correlação entre estas proteínas são independentes do tipo de evento ocorrido.

4- O tipo de anticorpo antifosfolípide não exerceu influência nos níveis séricos e atividades das proteínas FVW, ADAMTS-13 e FVIII.

ANEXOS

7 ANEXOS

Tabela 4. Características dos pacientes com SAF primária

Nº	Nome	Idade	Sexo	ABO	IMC
1	A.S.C.	36	F	O+	30
3	P.L.B.	27	M	O+	28
5	S.R.S.	25	M	O+	24
7	L.C.S.R.	19	F	O+	27
9	M.J.D.	34	M	A+	30
11	P.F.S.	33	F	O+	32
13	L.C.V.	37	F	AB+	23
15	J.F.S.	25	F	A+	23
17	M.E.N.	41	F	A+	26
19	P.S.M.	23	F	B-	24
21	D.O.S.V.	53	F	B+	18
23	T.R.G.M.	55	F	B+	38
25	E.A.C.B.	31	F	A+	30
27	D.A.V.	69	F	B-	35
29	J.S.F.	38	F	A+	29
31	E.N.H.S.	34	F	A+	39
33	S.C.T.S	43	F	O+	59
35	A.F.M.	50	F	A+	28
37	N.A.F.M.	56	F	AB+	30
39	D.R.S.	41	M	AB+	29
41	J.A.S.	61	M	O+	24
43	V.N.P.	44	F	B+	19
45	D.G.S.	55	M	O+	28
47	F.A.P.S.	39	F	B+	37
49	J.R.M.M.	64	M	A+	23
51	M.H.C.Z.	50	F	A-	36
53	W.M.S.	57	F	O+	28
55	R.A.R.	42	M	A+	27
57	R.M.N.P.	53	F	O+	26
59	V.V.	46	F	O+	23
61	L.H.N.L.	48	F	O+	23
63	L.C.M.	64	M	O+	29
65	L.C.B.P.	59	F	A+	22
67	M.V.	44	F	O+	48
69	C.M.C.M.	43	F	A+	25
71	S.C.S	48	F	A+	33
73	M.L.Q.	34	F	A+	33
75	B.B.O.	29	F	A+	22
77	O.J.S.	54	M	AB+	31
Média		44	*	*	29
D.P.		12	*	*	8
Mediana		43	*	*	28
Mínimo		19	*	*	18
Máximo		69	*	*	59

Nº = número de entrada do paciente (números ímpares) no estudo; ABO = tipo sanguíneo; IMC = índice de massa corpórea; F = feminino; M = masculino; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 5. Características gerais dos controles.

Nº	Nome	Idade	Sexo	ABO
2	R.V.V	36	F	A+
4	F.F.S	27	M	O+
6	E.M.S.J	25	M	A+
8	B.C.O	19	F	A+
10	A.R.B.O	34	M	O+
12	A.C.A.S	33	F	O+
14	F.S.S	37	F	O+
16	C.F.T	25	F	O+
18	S.C	41	F	A-
20	T.S.P	23	F	O+
22	A.M.S.R.O	53	F	O+
24	S.M	55	F	A+
26	F.T.C	31	F	A+
28	L.G.V	69	F	O+
30	E.S.R	38	F	O+
32	S.A.A	32	F	O+
34	E.R.C.S	43	F	B+
36	R.B	50	F	B+
38	A.A.B	56	F	A-
40	G.O	41	M	O+
42	J.L	61	M	O+
44	C.M.A.S	44	F	O+
46	G.B.C.N	55	M	A+
48	I.N.S	39	F	O+
50	V.F	64	M	AB+
52	I.S	50	F	O-
54	L.H.K	57	F	A+
56	C.A.A	42	M	O+
58	S.R.B	53	F	A+
60	S.F.C	46	F	O-
62	S.A.S.D	48	F	AB+
64	H.S	64	M	O+
66	A.F.S	59	F	A+
68	L.F.M	44	F	O+
70	F.A.M.D	49	F	B+
72	R.A	48	F	A+
74	C.C	34	F	A-
76	A.L.P.C.O	29	F	O+
78	A.R.L.R	54	M	A+
Média		44	*	*
D.P.		12	*	*
Mediana		44	*	*
Mínimo		19	*	*
Máximo		69	*	*

Nº = número de entrada seqüencial par para controle no estudo (par); F = feminino; M = masculino.

Tabela 6. Características clínicas dos pacientes com SAFP.

Nº	Tempo (anos)	HAS	Diabetes	Anticoagulantes			Tipo de evento	
				AAS	Varfarina	Enoxaparina	Arterial (nºvezes)	Venoso (nº vezes)
1	10	não	sim	não	sim	não	1	1
3	4	sim	não	não	sim	não	0	1
5	0,5	não	não	não	sim	não	1	0
7	3	sim	não	sim	sim	não	1	1
9	4	não	não	não	sim	não	1	5
11	5	não	não	não	sim	não	0	1
13	2	sim	não	sim	não	não	1	0
15	1	não	não	sim	não	sim	1	0
17	4	não	não	não	sim	não	0	1
19	4	não	não	não	sim	não	0	1
21	14	sim	não	não	sim	sim	1	1
23	11	sim	não	não	sim	sim	1	1
25	7	não	não	não	sim	não	0	1
27	6	sim	não	não	sim	sim	0	1
29	15	não	não	não	sim	não	0	3
31	4	sim	não	sim	sim	não	0	5
33	11	sim	não	não	sim	não	3	2
35	6	não	não	não	sim	não	0	1
37	8	sim	não	não	sim	não	1	1
39	11	não	não	não	sim	não	0	1
41	3	sim	não	sim	não	não	2	0
43	11	sim	não	não	sim	não	2	0
45	9	sim	não	não	sim	não	1	0
47	15	sim	não	não	sim	não	0	1
49	2	sim	não	não	sim	não	1	0
51	17	não	sim	não	sim	não	0	3
53	7	sim	não	não	sim	sim	0	1
55	20	não	não	não	sim	não	3	0
57	15	não	não	não	sim	não	1	0
59	11	não	não	não	sim	não	0	2
61	2	não	não	não	sim	não	1	0
63	4	sim	não	não	sim	não	4	0
65	5	sim	não	sim	sim	não	0	0
67	11	não	não	não	sim	não	1	0
69	2	sim	não	não	sim	não	1	0
71	22	sim	não	sim	não	não	0	1
73	8	sim	não	não	sim	não	4	1
75	2	não	não	não	sim	não	0	1
77	15	não	não	não	sim	não	0	2
Média	8	*	*	*	*	*	1	1
D.P.	6	*	*	*	*	*	1	1

Nº = número de entrada sequencial ímpar para paciente no estudo; Tempo = tempo de doença; HAS = hipertensão arterial sistêmica; AAS = ácido acetil salicílico; nº vezes = número de vezes que o paciente apresentou o evento; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 7. Dados laboratoriais gerais dos pacientes com SAFP.

Nº	HB	HT	PLAQ	LEUC	TP	RNI	TT	TTPA	PCR
	(g/dL)	(%)	(x10 ³ /mm ³)	(mm ³)	(s)		(s)	(s)	(mg/L)
1	12	39	242	7800	23,2	2,04	28,2	58,9	9,2
3	15	45	87	4520	21,6	1,88	18,9	80,9	2,5
5	15	45	248	6120	36,2	3,52	20,4	54,1	1,1
7	13	41	203	8780	33,5	3,29	16,0	53,3	0,8
9	15	47	160	5440	29,0	2,73	18,2	71,3	34,2
11	14	41	243	6400	24,7	2,21	19,5	67,0	2,9
13	13	38	334	6070	13,2	0,99	23,0	69,9	2,8
15	13	42	242	8170	12,8	0,95	22,5	33,8	0,9
17	12	38	262	9080	15,6	1,22	17,5	31,8	6,6
19	14	40	212	6150	30,1	2,86	17,6	56,1	1,0
21	13	41	279	9210	26,1	2,38	24,6	61,1	0,8
23	12	38	365	7610	26,1	2,38	19,8	62,0	11,7
25	15	44	203	4320	22,9	2,01	16,0	51,0	0,9
27	12	38	160	4990	23,4	2,06	51,0	91,3	2,0
29	15	45	280	6370	13,1	0,97	17,9	47,7	1,3
31	12	38	1249	9380	27,8	2,58	16,0	50,6	4,8
33	14	47	304	8220	33,4	3,28	18,1	53,2	10,5
35	13	40	243	6860	22,4	1,95	17,7	59,3	16,3
37	13	38	315	7310	33,9	3,34	18,2	52,5	9,9
39	16	46	159	4240	25,1	2,28	16,2	60,2	2,0
41	13	37	139	4350	12,9	1,01	17,3	124,0	3,0
43	14	39	188	7680	17,2	1,46	18,7	34,0	1,5
45	13	39	147	5500	28,7	2,85	19,4	51,9	2,8
47	12	39	323	9540	27,0	2,49	16,1	65,2	12,8
49	15	44	303	7740	31,9	3,09	19,7	56,9	0,9
51	12	40	333	6200	28,4	2,66	18,6	72,7	5,2
53	14	42	238	6450	18,8	1,55	20,2	39,3	5,4
55	14	41	208	5740	30,0	2,85	20,0	82,3	2,0
57	13	41	197	8940	25,8	2,34	20,4	70,0	2,8
59	14	40	126	4210	32,9	3,12	17,2	44,7	0,8
61	16	48	280	8740	30,0	3,09	18,8	2,12	5,2
63	11	39	298	7910	31,4	3,28	18,2	138,6	1,5
65	14	43	567	9270	30,4	2,82	16,8	45,8	3,8
67	12	38	261	5650	26,4	2,61	17,4	52,0	12,2
69	13	42	218	10530	35,4	3,52	20,5	51,9	2,7
71	13	38,8	292	7520	12,7	0,95	17,8	38,5	5,3
73	13	39	187	7880	26,3	2,35	17,4	55,7	8,9
75	14	45	192	4730	15,1	1,24	19,2	35,0	0,6
77	18	50	121	2150	16,2	2,58	21,1	49,8	3,2
Média	14	41	267	6866	24,9	2,33	19,8	58,0	5,2
D.P.	1	3	180	1865	7,0	0,78	5,6	23,2	6,2
Mediana	13	41	242	6860	26,1	2,38	18,6	54,0	2,8
Mínimo	11	37	87	2150	12,7	0,95	16,0	2,12	0,6
Máximo	18	50	1249	10530	36,2	3,52	51,0	138,6	34,2

Nº = número de entrada do paciente no estudo; HB = hemoglobina; HT = hematócrito; PLAQ = plaquetas; LEUC = leucócitos; TP = tempo de protrombina; RNI = razão normalizada internacional; TT = tempo de trombina; TTPA = tempo de tromboplastina parcial ativada; PCR = proteína C reativa; g/dL = gramas por decilitro; mg/dL = miligrama por decilitro; mm³ = milímetros cúbicos, s = segundos; D.P. = desvio padrão.

Tabela 8. Determinação do antígeno e atividade do FVW nos pacientes com SAFP e nos controles.

Paciente SAF				Controle			
Nº	FVW:Ag (UI/dL)	FVW:CB (%)	FVW CB/Ag	Nº	FVW:Ag (UI/dL)	FVW:CB (%)	FVW CB/Ag
1	79	100	1,27	2	79	91	1,14
3	78	95	1,22	4	75	83	1,11
5	57	58	1,01	6	72	85	1,19
7	70	87	1,25	8	65	75	1,16
9	77	95	1,23	10	49	57	1,16
11	53	66	1,24	12	70	83	1,18
13	77	97	1,26	14	71	73	1,03
15	74	97	1,32	16	60	81	1,37
17	78	94	1,21	18	66	90	1,36
19	70	93	1,33	20	73	67	0,92
21	75	90	1,20	22	64	82	1,27
23	80	96	1,21	24	77	92	1,19
25	71	73	1,02	26	82	77	0,93
27	80	97	1,22	28	61	78	1,28
29	67	70	1,04	30	62	84	1,36
31	77	80	1,03	32	55	56	1,01
33	74	76	1,03	34	58	59	1,01
35	79	90	1,14	36	78	87	1,11
37	79	93	1,17	38	86	99	1,15
39	74	68	0,92	40	52	41	0,78
41	74	61	0,83	42	64	62	0,96
43	77	79	1,02	44	54	61	1,13
45	76	79	1,04	46	83	87	1,05
47	71	61	0,87	48	73	70	0,96
49	79	80	1,02	50	50	47	0,93
51	75	62	0,83	52	55	49	0,90
53	77	69	0,90	54	80	86	1,07
55	77	78	1,01	56	74	71	0,97
57	75	56	0,75	58	82	88	1,08
59	67	47	0,71	60	68	79	1,15
61	76	66	0,87	62	73	83	1,14
63	71	56	0,78	64	61	58	0,95
65	76	63	0,82	66	76	76	0,99
67	76	64	0,85	68	47	46	0,98
69	78	68	0,87	70	84	82	0,97
71	75	56	0,75	72	75	65	0,86
73	79	67	0,85	74	88	84	0,96
75	75	46	0,61	76	82	59	0,72
77	80	62	0,77	78	84	68	0,81
Média	74	75	1,01	40	69	73	1,06
D.P.	6	15	0,19	23	11	14	0,15
Mediana	76	73	1,02	40	72	77	1,05
Mínimo	53	46	0,61	2	47	41	0,72
Máximo	80	100	1,33	78	88	99	1,37

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo; FVW:Ag = antígeno do FVW; FVW:CB = atividade do FVW; FVW CB/Ag = razão entre atividade e antígeno do FVW; UI/dL = unidades internacionais por decilitro; % = porcentagem; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 9. Determinação do antígeno e atividade da ADAMTS-13 nos pacientes com SAF e nos controles.

Paciente SAF				Controle			
Nº	ADA:Ag	ADA:Atv	ADA:Atv/Ag	Nº	ADA:Ag	ADA:Atv	ADA:Atv/Ag
	(µg/mL)	(%)			(µg/mL)	(%)	
1	1,47	72	0,49	2	1,00	103	1,03
3	1,93	125	0,65	4	0,70	87	1,26
5	1,55	107	0,69	6	0,82	65	0,80
7	1,88	116	0,61	8	0,81	114	1,40
9	1,49	90	0,60	10	0,78	106	1,36
11	1,48	95	0,64	12	0,99	100	1,01
13	0,90	81	0,90	14	0,84	88	1,05
15	1,60	117	0,73	16	0,78	90	1,15
17	1,12	77	0,69	18	0,69	94	1,36
19	1,63	89	0,54	20	0,71	87	1,23
21	1,09	102	0,94	22	0,62	79	1,26
23	1,31	100	0,76	24	0,69	93	1,34
25	1,17	77	0,66	26	0,92	109	1,18
27	1,17	57	0,49	28	0,94	96	1,02
29	1,77	108	0,61	30	1,06	96	0,90
31	1,12	98	0,88	32	0,82	86	1,05
33	1,71	104	0,61	34	0,68	89	1,31
35	1,67	87	0,52	36	0,74	86	1,16
37	1,44	112	0,78	38	0,93	98	1,05
39	1,30	66	0,51	40	0,85	103	1,20
41	1,67	94	0,56	42	0,71	79	1,11
43	1,20	89	0,75	44	0,89	97	1,08
45	1,37	99	0,73	46	0,81	89	1,10
47	1,08	92	0,85	48	0,89	94	1,06
49	1,52	99	0,65	50	0,72	85	1,18
51	2,11	129	0,61	52	0,75	80	1,06
53	1,49	105	0,71	54	0,78	23	0,30
55	1,30	91	0,70	56	1,16	109	0,94
57	1,02	88	0,86	58	0,81	87	1,08
59	0,61	79	1,29	60	0,69	84	1,21
61	1,21	79	0,66	62	0,70	68	0,97
63	1,13	71	0,63	64	0,89	104	1,17
65	1,12	86	0,77	66	0,94	108	1,15
67	0,53	18	0,35	68	0,56	73	1,32
69	1,38	94	0,68	70	0,92	116	1,27
71	1,49	80	0,54	72	0,87	117	1,34
73	1,57	91	0,58	74	0,92	109	1,19
75	0,75	93	1,23	76	0,82	87	1,06
77	1,09	70	0,64	78	0,89	98	1,11
Média	1,34	90	0,69		0,82	92	1,12
D.P.	0,34	19	0,18		0,12	17	0,19
Mediana	1,37	91	0,66		0,82	93	1,15
Mínimo	0,53	18	0,35		0,56	23	0,30
Máximo	2,11	129	1,29		1,16	117	1,40

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo; ADA:Ag = antígeno da ADAMTS-13; ADA:Atv = atividade enzimática da ADAMTS-13; ADA Atv/Ag = razão entre atividade e antígeno da ADAMTS-13; µg/mL = micrograma por mililitro; % = porcentagem; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 10. Determinação do antígeno e atividade do FVIII nos pacientes com SAFP e nos controles.

Paciente SAF				Controle			
Nº	FVIII:Ag (UI/dL)	FVIII:C (%)	FVIII:C/FVIII:Ag	Nº	FVIII:Ag (UI/dL)	FVIII:C (%)	FVIII:C/FVIII:Ag
1	114	94	0,83	2	90	66	0,73
3	105	96	0,91	4	99	66	0,67
5	36	57	1,59	6	100	76	0,76
7	102	87	0,85	8	77	62	0,80
9	118	117	0,99	10	73	53	0,74
11	60	60	1,00	12	95	61	0,64
13	111	104	0,95	14	82	62	0,76
15	112	64	0,57	16	98	75	0,76
17	117	104	0,89	18	94	79	0,85
19	110	102	0,92	20	81	68	0,85
21	115	43	0,38	22	84	45	0,53
23	117	23	0,20	24	94	140	1,49
25	97	91	0,94	26	89	97	1,09
27	119	90	0,76	28	72	97	1,34
29	106	112	1,06	30	87	111	1,28
31	100	99	1,00	32	82	66	0,80
33	119	94	0,79	34	88	99	1,14
35	115	98	0,86	36	103	94	0,91
37	119	97	0,81	38	117	97	0,83
39	94	100	1,07	40	86	98	1,13
41	107	99	0,93	42	93	120	1,29
43	143	118	0,82	44	116	107	0,93
45	107	159	1,49	46	94	151	1,60
47	120	151	1,26	48	117	124	1,07
49	108	171	1,59	50	66	134	2,02
51	114	171	1,50	52	113	80	0,70
53	72	162	2,24	54	119	139	1,17
55	103	168	1,63	56	109	134	1,23
57	89	137	1,55	58	107	121	1,13
59	98	132	1,34	60	84	111	1,32
61	106	137	1,30	62	80	97	1,21
63	113	152	1,34	64	93	109	1,17
65	108	132	1,22	66	55	69	1,26
67	138	150	1,09	68	103	169	1,64
69	109	183	1,69	70	69	93	1,34
71	126	161	1,27	72	106	133	1,26
73	98	136	1,39	74	81	103	1,26
75	114	144	1,26	76	89	126	1,41
77	98	171	1,75	78	81	77	0,95
Média	106	117	1,13		91	98	1,08
D.P.	19	38	0,39		15	30	0,32
Mediana	109	112	1,06		90	97	1,13
Mínimo	36	23	0,20		55	45	0,53
Máximo	143	183	2,24		119	169	2,02

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo; FVIII:Ag = antígeno do FVIII; FVIII:C = atividade do FVIII; FVIII:C/FVIII:Ag = razão entre atividade e antígeno do FVIII; UI/dL = unidades internacionais por decilitro; % = porcentagem; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 11. Determinação da ligação FVW:FVIII B nos pacientes com SAF e nos controles.

Paciente SAF		Controle	
Nº	FVW:FVIII B (%)	Nº	FVW:FVIII B (%)
1	157	2	115
3	142	4	132
5	110	6	149
7	154	8	152
9	172	10	114
11	133	12	125
13	147	14	108
15	138	16	142
17	144	18	149
19	150	20	112
21	143	22	131
23	146	24	142
25	127	26	90
27	143	28	126
29	126	30	121
31	133	32	104
33	127	34	137
35	176	36	157
37	168	38	175
39	166	40	160
41	144	42	126
43	164	44	156
45	156	46	121
47	153	48	141
49	177	50	175
51	129	52	119
53	172	54	155
55	140	56	151
57	144	58	147
59	122	60	148
61	147	62	147
63	132	64	128
65	122	66	101
67	143	68	119
69	149	70	154
71	120	72	101
73	157	74	138
75	117	76	121
77	113	78	154
Média		144	
D.P.		17	
Mediana		144	
Mínimo		110	
Máximo		177	

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo;
 FVW:FVIII B = capacidade de ligação do FVW ao FVIII; % =
 porcentagem; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 12. Determinação do PF4 nos pacientes com SAFP e nos controles.

Paciente SAF		Controle	
Nº	PF4	Nº	PF4
	(UI/mL)		(UI/mL)
1	107	2	108
3	84	4	102
5	106	6	107
7	85	8	79
9	105	10	107
11	36	12	109
13	82	14	92
15	105	16	107
17	103	18	109
19	77	20	107
21	110	22	107
23	105	24	106
25	99	26	106
27	107	28	104
29	105	30	110
31	109	32	110
33	105	34	109
35	110	36	108
37	88	38	110
39	97	40	111
41	97	42	98
43	97	44	99
45	98	46	97
47	98	48	97
49	88	50	98
51	98	52	97
53	94	54	97
55	97	56	98
57	95	58	98
59	95	60	97
61	97	62	97
63	93	64	96
65	97	66	99
67	97	68	68
69	96	70	97
71	95	72	95
73	97	74	97
75	97	76	96
77	93	78	97
Média		101	
D.P.		8	
Mediana		99	
Mínimo		68	
Máximo		111	

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo; PF4 = fator 4 plaquetário; UI/mL = unidades internacionais por mililitro; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 13. Determinação da densidade relativa da subunidade principal e fragmentos do FVW nos pacientes com SAFP e nos controles.

Paciente SAF				Controle			
Nº	225	176	140	Nº	225	176	140
	(% relativa)	(% relativa)	(% relativa)		(% relativa)	(% relativa)	(% relativa)
1	56	9	11	2	54	9	15
3	67	9	7	4	47	6	36
5	74	6	9	6	76	6	8
7	46	13	19	8	61	9	14
9	64	9	8	10	77	6	6
11	56	14	4	12	67	8	6
13	76	8	7	14	81	5	10
15	83	7	5	16	79	6	10
17	83	5	4	18	84	5	4
19	46	11	16	20	48	11	16
21	40	15	25	22	38	14	26
23	57	13	10	24	69	10	8
25	76	5	14	26	85	4	7
27	78	8	6	28	68	6	10
29	80	6	5	30	74	5	15
31	60	11	14	32	69	6	14
33	69	7	11	34	48	7	16
35	80	6	8	36	76	7	13
37	71	7	14	38	83	4	9
39	80	5	9	40	85	5	6
41	86	6	2	42	66	6	25
43	87	4	4	44	89	4	4
45	71	8	7	46	63	10	13
47	73	8	13	48	79	8	8
49	68	17	6	50	69	15	8
51	72	8	12	52	67	9	11
53	68	7	21	54	62	8	25
55	76	8	11	56	64	8	26
57	74	9	10	58	73	7	15
59	81	7	6	60	57	9	28
61	75	7	14	62	80	5	11
63	64	8	22	64	74	7	14
65	83	5	6	66	67	9	19
67	63	5	4	68	81	5	10
69	72	8	16	70	75	7	14
71	62	7	12	72	70	9	10
73	68	8	18	74	73	6	17
75	58	9	14	76	69	8	15
77	71	10	12	78	71	8	16
Média	70	8	11		70	7	14
D.P.	11	3	5		11	2	7
Mediana	71	8	10		70	7	13
Mínimo	40	4	2		38	4	4
Máximo	87	17	25		89	15	36

Nº= número de entrada do paciente/controle no estudo; D.P. = Desvio padrão.

Tabela 14. Presença e título dos anticorpos antifosfolípides nos pacientes com SAFP.

Nº	AL (Presença)	ACL IgG (GPL)	ACL IgM (MPL)	a-β2GPI IgG (GPL)	a-β2GPI IgM (MPL)
1	sim	0	0	0	0
3	sim	164	0	150	0
5	não	63	0	50	0
7	não	0	0	0	0
9	sim	43	0	212	0
11	sim	0	0	0	0
13	sim	0	0	150	0
15	sim	0	0	0	115
17	sim	0	0	0	0
19	sim	0	0	0	0
21	sim	0	0	0	0
23	sim	66	0	34,5	0
25	sim	0	0	26,7	0
27	sim	0	0	0	0
29	não	0	0	0	0
31	não	0	0	0	0
33	sim	0	0	0	0
35	sim	0	0	0	0
37	sim	0	0	0	0
39	sim	0	0	117	0
41	sim	109	0	102	0
43	não	0	0	0	0
45	sim	0	0	0	0
47	sim	0	0	0	0
49	não	0	0	0	0
51	sim	120	67	0	0
53	sim	0	0	0	36
55	sim	84	0	38,5	0
57	sim	72	0	72	32
59	não	53	0	51	0
61	sim	100	0	0	0
63	sim	0	0	0	0
65	não	0	0	0	116
67	sim	0	0	0	0
69	sim	0	0	0	0
71	não	0	0	0	110
73	não	41	0	0	0
75	sim	0	0	0	0
77	sim	0	0	0	0

Nº = número de entrada do paciente no estudo; AL = anticoagulante lúpico; ACL = anticardiolipina; aβ2GPI = antiβ2-GPI; GPL = unidades de IgG por mililitro; MPL = unidades de IgM por mililitro.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- 1- Austin KS, Starke RD, Lawrie SA, Cohen H, Machin J, Mackie JL. The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome: ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction. *Brit J Hematol* 2008;141:536-544.
- 2- 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.
- 3- Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, de Groot P, Lakos G, Lambert M, Meroni P, Ortel TL, Petri M, Rahman A, Roubey R, Sciascia S, Snyder M, Tebo AE, Tincani A, Willis R. 14th International Congress on antiphospholipid antibodies task force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmun Rev* 2014;14:120-7. Epub ahead of print.
- 4- Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmunity reviews* 2010;9:A299-A304.
- 5- Blann AD, Landray MJ, Lip GY. ABC of antithrombotic therapy: An overview of antithrombotic therapy. *BMJ* 2002;325:762-5.
- 6- Bobrow RS. Excess factor VIII: A common cause of hypercoagulability. *J Am Board Fam Pract* 2005;18:147-149.
- 7- Bonthron DT, Handin RI, Kaufman RJ, Wasley LC, Orr EC, Mitsch 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.
- 8- Brummel KE, Paradis SG, Branda RF, Mann KG. Oral anticoagulation thresholds. *Circulation* 2001;104:2311-2317.
- 9- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;109:159-165.

- 10- Caron C, Mazurier C, Goudemand. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *J. Brit J Haematol* 2002;117:716-718.
- 11- 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.
- 12- Castro-Marrero J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarrés M. *Genetics of Antiphospholipid syndrome, Antiphospholipid syndrome*. Croácia: Intech; 2012
- 13- Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019-27.
- 14- Chung CP, Oeser A, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani AK, et al. Increased coronary artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum* 2005;52:3045-53.
- 15- Cool CD, Groshong SD, Oakey J, Voelkel NF. Pulmonary hypertension cellular and molecular mechanisms. *Chest* 2005;128:565-571S.
- 16- Crawley JT, Lane DA, Woodward M, Rumley A, Lowe GD. Evidence that high von Willebrand factor and low ADAMTS-13 levels independently increase the risk of a non-fatal heart attack. *J Thromb Haemost* 2008;6:583-588.
- 17- Crawley JTB, Groot R, Xiang Y, Luken BM. Unraveling the scissible bond: how ADAMTS-13 recognizes and cleaves von Willebrand factor *Blood* 2011;118:3212-3221.
- 18- Cugno M, Borghi OM, Lonati ML, Ghidoni L, Gerosa M, Grossi C, De Angelis V, Magnaghi G, Tincani A, Mari D, Riboldi P, Meroni PL. Patients with antiphospholipid syndrome display endothelial perturbation. *J Autoimmun* 2010;34:105-110.

- 19- Der H, Kerekes G, Veres K, Szodoray P, Toth J, Lakos G, Szegedi G, Soltesz P. Impaired endothelial function and increased carotid intima-media thickness in association with elevated von Willebrand antigen level in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2007;16:497-503.
- 20- Devreese K, Peerlinck K, Hoylaerts MF. Thrombotic risk assessment in the antiphospholipid syndrome requires more than the quantification of lupus anticoagulants. *Blood* 2010;115:870-8.
- 21- Devreese KMJ. Antiphospholipid antibodies: evaluation of the thrombotic risk. *Thrombosis Research* 2012;130:S37-S40.
- 22- Fay PJ, Smudzin TM. Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/a3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. *J Biol Chem* 1992;267:13246-13249.
- 23- Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2009;7(12):2088-2095.
- 24- Feys HB, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematol* 2009;121(2-3):183-185.
- 25- Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell* 2009;16:167-179.
- 26- 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.
- 27- Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:1578–1580.
- 28- 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.
- 29- Galli M. The antiphospholipid triangle. *J thromb haemost* 2010;8(2):234-236.

-
- 30- Gallus AS. Preventing venous thromboembolism in general medical inpatients and after an ischaemic stroke. *Haemostasis* 2000;30 suppl 2:64-71.
 - 31- Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001;98:1654-1661.
 - 32- Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu XW, Espinola RG, Harris EN. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 1999;163:2922-7.
 - 33- 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.
 - 34- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar G, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326-330.
 - 35- 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):962-9.
 - 36- Harper EB, Wills R, Pierangeli SS. Pathophysiological mechanisms in antiphospholipid syndrome. *Int J Clin Rheumatol* 2011;6:157-171.
 - 37- Hoppensteadt DA, Fabbrini N, Bick RL, Messmore HL, Adiguzel C, Fareed J. Laboratory evaluation of the antiphospholipid syndrome. *Hematol Oncol Clin N Am* 2008;22:19-32.
 - 38- Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, O'Donnell JSO. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *British Journal of Haematology* 2012;157:653-663.
 - 39- Jy W, Tiede M, Bidot C. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2007;121:319-325.
 - 40- Kaplan SD, Chatash EK, Pizzarello RA, et al. Cardiac manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Am Heart J* 1992;124(5):1331-8.

- 41- Kiani AN, Magder L, Petri M. Coronary calcium in systemic lupus erythematosus is associated with traditional cardiovascular risk factors, but not with disease activity. *J Rheumatol* 2008;35:1300-6.
- 42- Kim SB, Lee SK, Park JS, Chi HS, Hong CD, Yang WS. Effects of fixed low-dose warfarin on hemostatic factors in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Kid Dis* 2011;37:343-347.
- 43- Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1988;82:1236-43.
- 44- Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12:53-7.
- 45- Laat B, Wu XX, van Lummel M, Derksen RH, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood* 2007;109:1490-4.
- 46- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 47- Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology prediction, and prevention. *Am J Med* 1993;95:315-71.
- 48- Legnani C, Cosmi B, Cini M, Frascaro M, Guazzaloca G, Palareti G. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2004; 124: 504 – 510.
- 49- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998;92:3983-96.
- 50- Levine J, Branch W, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;346:752-763.
- 51- Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS 13 turns 3. *Blood* 2005;106:11-17.
- 52- Levy Y, Shenkman B, Tamarin I, Pauzner R, Shoenfeld Y, Langevitz P, Savion N, Varon D. Increased platelet deposition on extracellular

- matrix under flow conditions in patients with antiphospholipid syndrome who experience thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2005;52:4011-4017.
- 53- Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006;295:1050-7.
- 54- Lopes AAB, Maeda NY. Abnormal degradation of von Willebrand factor main subunit in pulmonary hypertension. *Eur Resp J* 1995;8:530-536.
- 55- López-Pedrería C, Buendía P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, Montiel-Duarte C, Torres A, Khamashta M, Velasco F. Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006;54:301-11.
- 56- 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):19514-27.
- 57- 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.
- 58- Martinelli I. von Willebrand factor and factor VIII as risk factors for arterial and venous thrombosis. *Semin Hematol* 2005;42:49-55.
- 59- Mchrani T, Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, editor. *Handbook of systemic autoimmune diseases*, vol 10 Amsterdam. Elsevier 2009;13-34.
- 60- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279-367.
- 61- Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:330-9.

-
- 62- Meroni PL. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: an additional example of the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun* 2008;30:99-103.
- 63- 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.
- 64- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4(2):295-306.
- 65- Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of large plasma von Willebrand factor (VWF) multimers and unusually large VWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 1986;78:1456-1461.
- 66- Moake JL. von Willebrand factor in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Lab Sci* 1998;11:362-366.
- 67- Morelli VM, de Visser MC, van Tilburg NH, Vos HL, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Bertina RM. ABO blood group genotypes, plasma von Willebrand factor levels and loading of von Willebrand factor with A and B antigens. *Thromb Haemost* 2007;97(4):534-41.
- 68- 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):1272-7.
- 69- Ota S, Yamada N, Ogihara Y, Tsuji A, Ishikura K, Nakamura M, Wada H, Ito M. High plasma level of factor VIII: an important risk factor for venous thromboembolism. *Circ J* 2011;75:1472-5.
- 70- Ota S, Yamada N, Ogihara Y, Tsuji A, Ishikura K, Nakamura M, Wada H, Ito M. High plasma level of factor VIII. *Circ J* 2011;75:1472-1475.

-
- 71- Petri M: The antiphospholipid antibody syndrome. In Current Rheumatology Diagnosis & Treatment, 2.a ed, United States of America, Lange Medical Books/McGrawHill, 2007.
 - 72- Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999;99:1997-2002.
 - 73- Pierangeli SS, Harris EN. Probing antiphospholipid-mediated thrombosis: the interplay between anticardiolipin antibodies and endothelial cells. *Lupus* 2003;12:539-45.
 - 74- Piette JC, Wechsler B, Frances C, et al. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993;20:1802-4.
 - 75- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:803-815.
 - 76- Puisieux F, de Groote P, Masy E, et al. Association between anticardiolipin antibodies and mortality in patients with peripheral arterial disease. *Am J Med* 2000;109(8):635-41.
 - 77- Regan LM, Fay PJ. Cleavage of factor VIII light chain is required for maximal generation of factor VIIIa activity. *J Biol Chem* 1995;270:8546-52.
 - 78- Rios DRA, Fernandes AP, Figueiredo RC, Guimarães CNF, Silva ACS, Carvalho MG, Gomes KB, Dusse LMSA. Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS-13 and factor VIII in patients undergoing hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis* 2012;33:416-421.
 - 79- Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J* 1993;7:308-316.
 - 80- Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1995;71:520-525.
 - 81- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998;67:395-424.
 - 82- Sadler JE. von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost* 2005;3:1702-1709.

-
- 83- Saenko EL, Scandella D. A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1995;270:13826-33.
- 84- Satoh T, Tanaka Y, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, Kuwana M. Heparin-dependent and -independent anti-platelet factor 4 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheum* 2012;51:1721-8.
- 85- Schenk JF, Morsdorf S, Pindur G, Munter KH, Thrum F, Tiaden JD, Wenzel E. Analysis and occurrence of adverse events with oral anticoagulant therapy. *Semin Thromb Hemost* 1999;25:65-71.
- 86- Sène D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infection. *Autoimmun Rev* 2008;7:272-7.
- 87- 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.
- 88- Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation* 2005;112(21):3337-47.
- 89- Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Sheardependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996;88:2393-2950.
- 90- Sikara M, Routsias J, Samiotaki M, Panyotou G, Moutsopoulos H, Vlachoyiannopoulos P. β 2 glycoprotein I (β 2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;115:713-723.
- 91- Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fugimura Y, Nakagaki T. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003;102(9):3232-7.
- 92- 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.

-
- 93- Sousa NC, Anicchino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro ML. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. *Haematologica* 2007;92:236-9.
 - 94- 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.
 - 95- 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.
 - 96- Tripodi A, de Groot PG, Pengo V. Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. *J intern med* 2011;270:110-122.
 - 97- Tsai HM, Sussman II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994;83:2171-2179.
 - 98- Tsai HM. 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.
 - 99- 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.
 - 100-Urbanus R, Pennings M, Derksen R, de Groot P. Platelet activation by dimeric β 2-glycoprotein I requires signaling via both glycoprotein Iba and apolipoprotein E receptor 2'. *J Thromb Haemost* 2008;6:1405-1412
 - 101-van Hinsbergh VWM. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2012;34:96-106.
 - 102-Vehar G, Davier E. Preparation and properties of bovine FVIII (anti hemophilic factor). *Biochemistry* 1992;31:2805-2812.
 - 103-Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1998;79:456-465

-
- 104-Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:217-246.
- 105-Wells PS, Holbrook AM, Crowther NR, Hirsh J. Interactions of Warfarin with drugs and food. *Ann Intern Med* 1994;121(9):676-83.
- 106-Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg* 2012;114:275-85.
- 107-Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, Mckinnon TA, Laffan MA, Tseng M, Lane DA. A novel site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood* 2009;114(13):2819-2828.
- 108-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):1887-94.
- 109-Zheng LX. Structure-function and regulation of ADAMTS13 protease. *J Thromb Haemost* 2013;11:11-23.
- 110-Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fugikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276:41059-41063.
- 111-Zheng X, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Path Mech Dis* 2008;3:249-277.
- 112-Zheng X. A team player: the disintegrin domain of ADAMTS13. *Blood* 2009;113(22):5373-5374.
- 113-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):323-7.
- 114-Zimmerman TS. Factor VIII/von Willebrand factor. Structure and function. *Ann NY Acad Sci* 1987;509:53-59.