

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM
DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 3**

ANA PAULA MACIEL ORNAGHI

Orientadores: Dr^aUrsula Matte
Dr. Francisco Mauro Salzano *in memoriam*
Co-orientadora: Dr^aEliane Bandinelli

Porto Alegre, abril de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTAÇÕES EM PACIENTES COM
DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 3**

ANA PAULA MACIEL ORNAGHI

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
para obtenção do grau de Doutor

Orientadores: Dr^aUrsula Matte

Dr. Francisco Mauro Salzano *in memoriam*

Co-orientadora: Dr^aEliane Bandinelli

Porto Alegre, abril de 2019

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hemostasia do departamento de genética da UFRGS e na Unidade de pesquisa laboratorial/CPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Dedico essa TESE ao queridíssimo e eterno professor Francisco Mauro Salzano no qual tive a honra de ser orientada por quase 4 anos. Um exemplo de dedicação e com conhecimento gigantesco acumulado ao longo de sua trajetória na pesquisa. Me guiou de forma exemplar, me auxiliando nas dúvidas, ouvindo minhas sugestões e me incentivando a seguir em frente. Adepto das reuniões, que chamava de entrevista, mensais, onde dividíamos o andamento da TESE e também podíamos dividir um pouco da vida pessoal. Eu chegava nas reuniões sempre com frio na barriga, e saía com alegria no rosto e ouvindo as palavras “Parabéns e vamos seguir em frente” ao final. Acolheu sem julgamentos minha primeira gestação e compreendeu limites que a TESE podia chegar pela redução de verba que sofremos atualmente na pesquisa e por eu não ter dedicação exclusiva, precisando trabalhar junto com os anos de doutorado.

Ainda sinto falta dos seus passos pelo corredor, ainda me sinto um pouco órfã, mesmo que a querida prof^a Ursula tenha assumido a minha orientação nessa etapa final do doutorado e me acolhido com todo coração.

Lembrarei sempre dos seus conselhos e ensinamentos e levarei para minha vida profissional, obrigada professor por tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por seu meu guia em todos os percursos da minha vida.

À minha família por todo apoio, carinho, amor e suporte imprescindíveis para a conquista dos meus objetivos. Em especial aos meus pais: Jandira e Paulo; aos meus filhinhos de 4 patas: Mosi, Barthô e Tom, que tornaram meus dias mais alegres.

Ao meu marido Denis Kroeff por todo seu amor, amizade, paciência, companheirismo, sem ele ao meu lado seria muito mais difícil seguir em frente.

Ao meu filho Théo, que veio como planejado no meio da TESE e que ocupou meu coração, minha mente, meu tempo e deu muito mais sentido a minha vida. Me tornou uma pessoa mais tranquila e que aproveita o tempo ao máximo.

E ao meu filho Miguel, que teve que esperar um pouco para ser fabricado, para dar tempo da mamãe concluir a TESE com ele ainda na barriga. Ele foi um grande estímulo pra não desistir e tentar concluir antes dele nascer.

Ao prof. Francisco Mauro Salzano e a Prof^a Eliane Bandinelli pela orientação durante o doutorado.

À prof. Ursula Matte que aceitou a missão de me orientar no final da TESE e me forneceu ajudas e estímulos essenciais para a conclusão do doutorado.

Às minhas colegas de laboratório e amigas Mariana Meireles, Lara Stelmach e Mariana Botton pelas ajudas e pelos conhecimentos compartilhados.

Às minhas amigas do quinteto, que mesmo distante, foram essenciais para momentos de desabafos, conselhos e distrações.

À UFRGS por me proporcionar e estimular esse aperfeiçoamento sendo funcionária da universidade.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	07
Lista de Figuras.....	08
Lista de Tabelas.....	09
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Capítulo 1 – Introdução	14
1.A hemostasia.....	16
1.1.Hemostasia Primária.....	16
1.2.Hemostasia Secundária.....	19
1.2.1.Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea.....	19
1.2.2.Modelo Celular da Coagulação Sanguínea.....	22
2.O Fator de vonWillebrand.....	25
3.As Doenças de Von Willebrand.....	28
3.1.Doença de Von Willebrand tipo 3.....	32
4.Estudos Anteriores sobre a Doença de vonWillebrand no Rio Grande do Sul.....	34
Capítulo 2 –Objetivos.....	35
Capítulo 3 – Artigo Científico.....	37
Capítulo 4 – Discussão.....	52
Capítulo 5 –Conclusão.....	61
Referências.....	64
ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado ao CEP.....	76
ANEXO 2– Termo de consentimento.....	79
ANEXO 3 - Ficha de cadastro dos pacientes.....	81
ANEXO 4 – Primers utilizados no seqüenciamento de Sanger.....	82
ANEXO 5 – Amplicons utilizados no NGS.....	84

LISTA DE ABREVIACÕES

ADP= difosfato de adenosina

AMP= adenosina monofosfato

DDAVP= vasopressina 1-desamino-8-D-arginina

DvW= Doença de vonWillebrand. A abreviação em português do termo von Willebrand é escrito com vW (v minúsculo e W maiúsculo, já em inglês o mais usado é VW (V e W maiúsculos)

DvW3= Doença de von Willebrand tipo 3

FI, FII, FIII, FIV, FV, FVI, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII= Fator I, II, III, IV (...) e assim por diante, respectivamente

FIIa, FIIIa...= o sufixo “a” indica a ativação do fator (FVIIa= fator VII ativado)

FvW= Fator von Willebrand

GPI= glicoproteína I

GPO= glicina-prolina-hidroxiprolina

HMWK= *high molecular weight kininogen* –cininogênio de alto peso molecular

HA= hemofilia A

HB= hemofilia B

kDA= kilodaltons

PCR= *Polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

SAP= *Shrimp alkaline phosphatase* – fosfatase alcalina do camarão

TF= fator tissular

TFPI= inibidor da via do fator tecidual

TTPA= tempo de tromboplastina parcial ativado

TT= tempo de trombina

TxA₂= Tromboxano

µg= micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da Hemostasia Primária.....	18
Figura 2. Modelo da Cascata de Coagulação Clássica.....	21
Figura 3. Modelo Celular da Coagulação Sanguínea.....	23
Figura 4. Estrutura Primária do Fator von Willebrand.....	26
Figura 5. Representação esquemática do FvW e suas principais interações com as plaquetas e com o FVIII.....	30
Figura 6. Localização das mutações que resultam na DvW tipo 2.....	32
Figura 7. Segregação familiar da mutação p.Pro2063Ser.....	56
Figura 8. Mutações e domínios.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência das coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos por diagnóstico no Brasil, 2016.....	15
Tabela 2. Prevalência da doença de von Willebrand por tipo e subtipo, por unidade federativa, por região e Brasil, 2016.....	33
Table 1. Clinical data and pathogenic mutations of patients analyzed in this study.....	48
Table 2. Prediction of all missense variants found in this study.....	49
Table 3. New variants found in this study.....	49
Supplementary Table1: All variants found in patients analyzed this study with their consequence and minimum allele frequency (MAF).....	50
Tabela S2. Sequências de primers senso e anti-senso utilizados para amplificar os 52 éxons do gene de <i>VWF</i>	82
Tabela S3. Amplicons utilizados no NGS.....	84

RESUMO

Introdução

O Fator von Willebrand (FvW) humano é uma glicoproteína plasmática, sintetizada nos megacariócitos e células endoteliais, que circula no plasma sob a forma de multímeros. O gene codificante do FvW está localizado no braço curto do cromossomo 12 e contém 178 kb distribuídos em 52 éxons. O FvW participa tanto da hemostasia primária, ligando-se ao tecido lesionado e recrutando plaquetas, quanto na hemostasia secundária estabilizando a molécula de FVIII, impedindo que esta seja degradada. O gene do *VWF* é transcrito em um mRNA de 9kb e é traduzido em um pré-pro-poli-peptídeo contendo 2813 aminoácidos, sendo composto por uma pré-sequência, um pro-peptídeo e um monômero. Os processos pós traducionais do FvW incluem dimerização, glicosilação, sulfatação, clivagem do pró-peptídeo e multimerização; seguido de estocagem ou secreção. Os níveis plasmáticos normais de FvW, na população em geral, variam de 35 a 200 UI/dL. A doença de von Willebrand (DvW) é causada por anormalidades quantitativas ou qualitativas no FvW. Defeitos quantitativos causam a DvW tipo 1 e tipo 3. Por outro lado, anormalidades qualitativas causam a DvW tipo 2, que pode ser subdividida em tipos 2A, 2B, 2M e 2N. A DvW tipo 3 é uma deficiência quantitativa grave do FvW e é herdada de maneira autossômica recessiva. Os indivíduos com DvW tipo 3, apresentam níveis indetectáveis de FvW:Ag e também níveis muito baixos de FVIII. Pessoas com DvW tipo 3 podem apresentar sintomas clínicos como sangramentos mucocutâneos graves ou moderados, hematomas musculares e hemartroses. O grande tamanho, a sequência altamente polimórfica e a presença de um pseudogene complicam o rastreamento de variantes patogênicas no *VWF*. O presente estudo visa a caracterização molecular de mutações em pacientes com DvW3 no Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

O gene *VWF* foi sequenciado em 26 casos diagnosticados com DvW3 por sequenciamento de nova geração usando IonTorrent. O impacto das mutações de sentido trocado encontradas foi analisado utilizando 5 algoritmos: *Mutationtaster*, PROVEAN, SIFT, Polyphen-2 e HOPE. O sequenciamento por Sanger foi realizado para confirmar algumas mutações encontradas pelo método de NGS. O gene do *VWF* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando 52 pares de primers. As sequências foram

alinhas com a sua referência (NM_000552.4) usando o software CodonCodeAligner implementado no MEGA 5.04.

Resultados

Foram identificadas 72 variantes diferentes: 31 intrônicas, 17 sinônimas, 16 sentido trocado, 6 deleção-inserção, 2 sem sentido. As mutações foram distribuídas em todo o gene, tendo maior prevalência no exon 28 (11%). Cinco novas mutações foram encontradas: c.6976 + 5G> T; c.6885_6886insC; c.3378C> T; c.3346_3347insCCA; c.2503G> T. Vinte e quatro pacientes tiveram mais de uma mutação patogênica que poderia explicar o fenótipo da doença. Dentre elas, 17 pacientes apresentaram as variantes (p.Pro2063Ser e p.Arg324*), a p.Pro2063Ser possui divergências entre ser uma mutação patogênica ou um polimorfismo neutro, então provavelmente a causa da doença nesses pacientes seja a p.Arg324*, que gera um stop códon prematuro. Como 60% dos pacientes apresentaram essa mutação e eles se localizam em regiões próximas do estado do Rio Grande do Sul, podemos sugerir que possa ter havido um efeito fundador, e um haplótipo com outras 13 variantes comuns pra esses 17 pacientes reforça essa hipótese.

Conclusão

Usando um painel de sequenciamento de nova geração para o *VWF*, dentre os 26 pacientes, conseguimos detectar 50 dos 52 alelos em um grupo de pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de DvW3. Apesar de todos os pacientes apresentarem sangramento grave, a variação na intensidade do sangramento, tipos de sangramento e necessidade de tratamento não puderam ser correlacionados com os tipos ou posição de suas mutações. No entanto, a análise molecular do *VWF* pode ser útil para fins de diagnóstico e aconselhamento.

ABSTRACT

Introduction

Von Willebrand Factor (VWF) is a plasma glycoprotein, synthesized in megakaryocytes and endothelial cells, and circulates in plasma as multimers. The VWF coding gene is located on the short arm of chromosome 12 and contains 178 kb distributed in 52 exons. VWF participates in both primary hemostasis, binding to injured tissue and recruiting platelets, and secondary hemostasis by stabilizing the FVIII molecule, preventing it from being degraded. The *VWF* gene is transcribed into a 9kb mRNA and is translated into a pre-pro-polypeptide containing 2813 amino acids, consisting of a pre-sequence, a propeptide and a monomer. Post-translational processes of VWF include dimerization, glycosylation, sulfation, cleavage of the propeptide and multimerization; followed by storage or secretion. Normal VWF levels in the general population range from 35 to 200 IU/dL. Von Willebrand Disease (VWD) is caused by quantitative or qualitative abnormalities in VWF. Quantitative defects cause VWD type 1 and type 3. On the other hand, qualitative abnormalities cause VWD type 2, which can be subdivided into types 2A, 2B, 2M and 2N. VWD type 3 (VWD3) is a serious quantitative deficiency of VWF and is inherited in an autosomal recessive manner. Individuals with VWD3 have undetectable levels of VWF:Ag and also very low levels of FVIII. People with VWD3 may exhibit clinical symptoms such as severe or moderate mucocutaneous bleeding, muscle hematomas, and hemarthroses. Large size, highly polymorphic sequence and presence of a pseudogene complicate the screening of pathogenic variants in *VWF*. The present study aims at the molecular characterization of mutations in patients with VWD3 in Rio Grande do Sul.

Materials and Methods

The *VWF* gene was sequenced in 26 cases diagnosed with VWD3 by new generation sequencing using Ion Torrent. The impact of the exchanged sense mutations was analyzed using 5 algorithms: Mutation taster, PROVEAN, SIFT, Polyphen-2 and HOPE. Sanger sequencing was used to confirm a number of mutations found in the NGS method. The *VWF* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 52 primer pairs. The strings were aligned with their reference (NM_000552.4) using the CodonCodeAligner software implemented in MEGA 5.04.

Results

We identified 72 different variants: 31 intronic, 17 synonymous, 16 missense, 6 deletion/insertion, and 2 nonsense. The mutations were distributed along the whole gene, having a higher prevalence in exon 28 (11%). Five novel mutations were found: c.6976+5G>T, c.6885_6886insC, c.3378C>T, c.3346_3347insCCA, and c.2503G> T. Twenty-four patients had more than one pathogenic mutation that could explain the disease phenotype. Among them, 17 patients presented the variants p.Pro2063Ser and p.Arg324*. The p.Pro2063Ser has controversies regarding the functional status of the variation. Both pathogenic and neutral results were found by the predictors, so probably the cause of the disease in these patients is p.Arg324* which generates a premature stop codon. As 60% of the patients presented this mutation and they live in neighboring regions in the state of Rio Grande do Sul, we can suggest that there may have been a founding effect. A haplotype with 13 other common variants found in these 17 patients reinforces this hypothesis.

Conclusion

Using a next generation sequencing panel for *VWF* we were able to detect 50 out of 52 alleles in a set of 26 Brazilian patients clinically diagnosed with VWD3. However, despite all patients presented severe bleeding, the variation in their bleeding intensity, bleeding types and need of treatment could not be correlated with the types or position of their mutations. Nevertheless, the molecular analysis of *VWF* can be useful for both diagnostic and counselling purposes.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

As doenças hemorrágicas abrangem diversas condições clínicas, sendo caracterizadas por hemorragias de gravidade variável em diferentes locais do corpo, podendo ser hereditárias ou adquiridas. Deficiências hereditárias nas proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação sanguínea geralmente levam a problemas sanguíneos ao longo da vida, cuja gravidade é proporcional ao grau da deficiência de determinado fator (Peyvandi *et al.*, 2006). Dentre as coagulopatias hereditárias, a doença de von Willebrand e as hemofilias A e B (deficiência nos fatores VIII e IX, respectivamente), juntas, afetam de 95-97% dos indivíduos com alguma deficiência na hemostasia. Os outros 3-5% dos indivíduos são acometidos pelas chamadas desordens sanguíneas raras, compreendendo deficiência em algum dos seguintes fatores de coagulação: I (Fibrinogênio), II (Protrombina), V, combinação de V+VIII, VII, X, XI, XII ou XIII (estabilizador da fibrina) (James *et al.*, 2014). No Brasil o Ministério da Saúde possui um Programa de atenção às pessoas com hemofilia e outras doenças hemorrágicas hereditárias. Nesse programa, através do Sistema Hemovida Web Coagulopatias, é realizado um levantamento das pessoas acometidas por algum problema na coagulação sanguínea e os dados são disponibilizados através da publicação de um livro, a última edição foi em 2016 (Saúde, 2018). Na tabela 1 pode-se observar a prevalência das coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos por diagnóstico no Brasil em 2016.

Tabela 1: Prevalência das coagulopatias hereditárias e demais transtornos hemorrágicos por diagnóstico no Brasil, 2016.

Diagnóstico	2016	
	Nº	%
Hemofilia A	10.123	41,78
Hemofilia B	1.996	8,24
Doença de von Willebrand	7.811	32,24
Coagulopatias raras	1.828	7,54
Outras Coagulopatias Hereditárias e demais transtornos hemorrágicos	2.470	10,19
Total	24.228	100

Fonte: Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados Web – Coagulopatias.

1. A hemostasia

O sistema hemostático compreende a agregação plaquetária (hemostasia primária), coagulação (hemostasia secundária) e fibrinólise (hemostasia terciária) (Stassen *et al.*, 2004). O processo de hemostasia envolve um mecanismo complexo, dinâmico, finamente regulado e, sobretudo, vital na defesa contra a perda de sangue e início do reparo tecidual. Quando ocorre uma lesão vascular, as plaquetas são aderidas a macromoléculas presentes em tecidos subendoteliais e então se agregam para formar um tampão, caracterizando a hemostasia primária. As plaquetas estimulam a ativação local de fatores de coagulação no plasma, que leva à geração de um coágulo de fibrina que reforça a agregação plaquetária, cuja função é estancar o fluxo de sangue nesse local. A fibrinólise, na qual a agregação plaquetária e o tampão de fibrina são quebrados e removidos para restabelecer a fluidez sanguínea interrompida pelo coágulo de sangue formado em um vaso sanguíneo danificado, acontece logo após (Riddel *et al.*, 2007). Alterações em qualquer desses processos podem acarretar em danos como trombos ou perda anormal de sangue. A coagulação sanguínea também tem um importante papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro.

1.1. Hemostasia Primária

O primeiro processo que ocorre para estancar o sangramento de um vaso sanguíneo danificado é a vasoconstrição no local da injúria, o que faz com que o fluxo sanguíneo nesse local seja reduzido e conseqüentemente a perda de sangue seja diminuída. A segunda etapa é a formação do trombo ou tampão plaquetário através das plaquetas, que são produzidas na medula óssea por fragmentação citoplasmática dos megacariócitos (Bryckaert *et al.*, 2015).

Ocorrendo um dano em um vaso sanguíneo, o Fator von Willebrand (FvW) se liga imediatamente ao colágeno subendotelial e também às células endoteliais danificadas. Essas ligações causam uma mudança na conformação da molécula de FvW que estava enovelada e agora se desenovela, expondo os seus domínios A1. Esses domínios subsequentemente capturam e ligam-se às plaquetas através de uma glicoproteína específica, GPIb. A ligação A1-GPIb ativa outro receptor das plaquetas, a integrina

GPIIb/IIIa que se liga ao domínio C1 do FvW, sendo que o complexo plaquetário Iib/IIIa também se liga ao fibrinogênio circulante. O principal receptor de sinalização envolvido parece ser o GPVI, que se liga ao colágeno em sítios específicos de GPO (Glicina-Prolina-Hidroxiprolina) (Clemetson, 2012). As plaquetas ativadas conduzem à secreção de agonistas adicionais como ADP, tromboxano (TxA₂) e serotonina. Essa secreção leva ao recrutamento de outras plaquetas que se agregam sobre a primeira camada de plaquetas, formando um tampão hemostático. As plaquetas mudam de conformação, de um disco para uma esfera com pseudópodos (Marcus e Safier, 1993).

Em pequenos vasos, a agregação plaquetária por si só, é capaz de parar um sangramento (Figura 1), mas em lesões maiores é necessária a formação de uma rede de fibrina, formada então pelo mecanismo de coagulação na chamada hemostasia secundária.

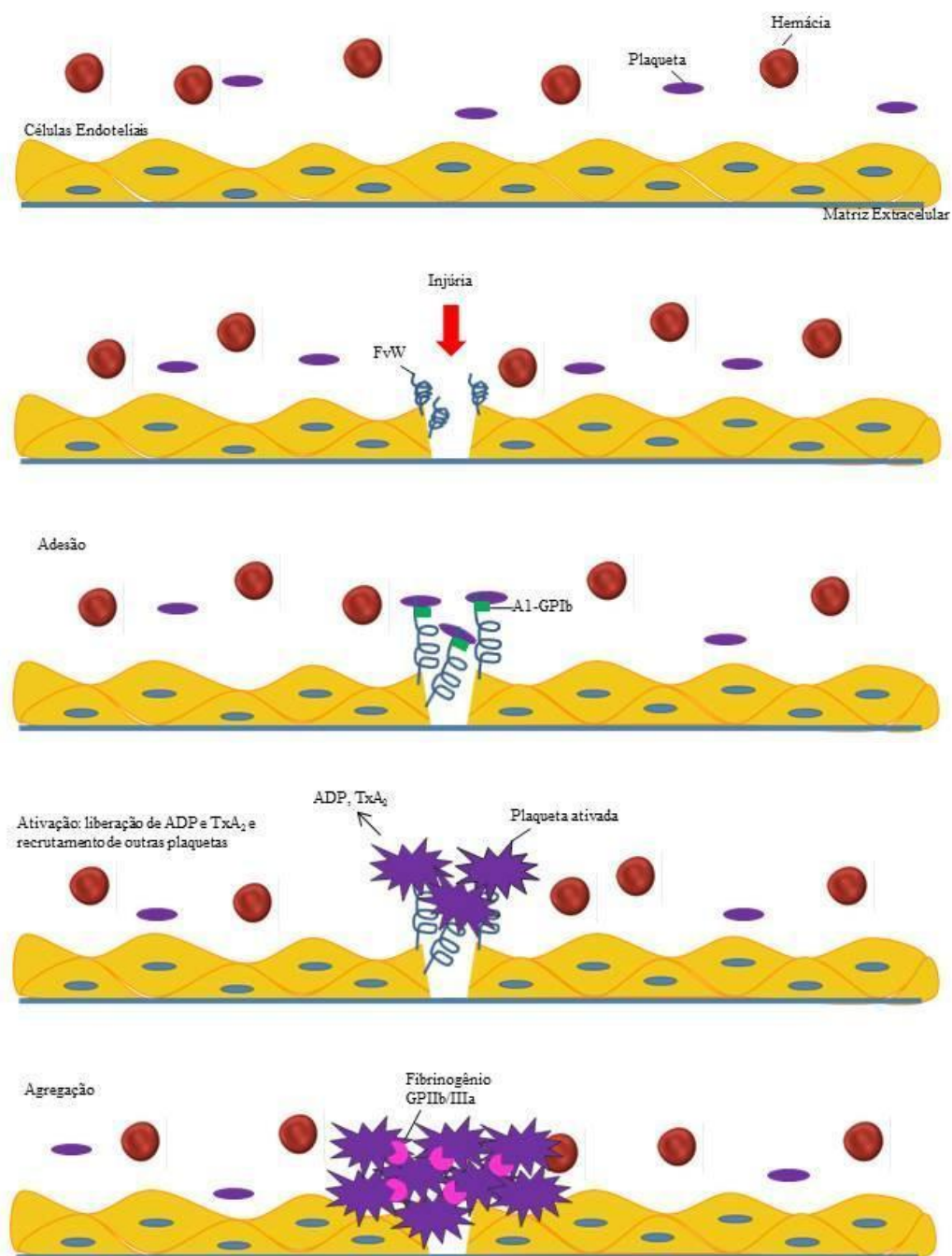


Figura 1: Etapas da Hemostasia primária após injúria vascular: adesão, ativação e agregação. (adaptado de: <http://www.eclinpath.com/>)

1.2.Hemostasia Secundária

A hemostasia secundária é caracterizada pela coagulação sanguínea desencadeada por uma cascata de reações envolvendo componentes presentes no plasma, que culmina na formação de uma rede de fibrina. Essas proteínas envolvidas na coagulação e seus respectivos cofatores interagem de modo sequencial, na superfície de plaquetas ou células endoteliais danificadas, e esta interação resulta na formação de fibrina que reforça e estabiliza o tampão plaquetário formado anteriormente (Lippi *et al.*, 2009).

Por volta de 1960, dois grupos distintos de pesquisadores, coordenados por Macfarlane e Davie & Ratnoff, introduziram o modelo de coagulação caracterizado por uma série de passos em que a ativação de cada fator de coagulação leva à ativação de um próximo fator, culminando na geração de uma grande quantidade de trombina (revisado por Riddel *et al.*, 2007). Esse modelo sugeria que a cascata de coagulação fosse dividida em duas rotas: a) intrínseca, composta por componentes presentes no sangue; e b) extrínseca, que necessita o fator tissular além dos componentes circulantes no sangue (Luchtman-Jones e Broze, 1995).

1.2.1. Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea

A via intrínseca, ou via de contato, é mediada por uma superfície negativa, podendo ser desencadeada, por exemplo, pela membrana de plaquetas ativadas, e é dependente de uma proteína plasmática circulante, o Fator XII (FXII). Uma molécula chamada quininogênio de alto peso molecular (HMWK), produto das plaquetas que fica ligado à membrana plaquetária, auxilia na ancoragem do FXII, servindo assim como um cofator, convertendo o FXII em FXIIa (ativado). O FXIIa acumulado converte a pré-caliceína em caliceína. Por sua vez as novas caliceínas produzidas aceleram a conversão de FXII em FXIIa (via de retroalimentação positiva). Além disso, o FXIIa juntamente com o HMWK cliva o Fator XI (FXI) tornando-o ativado. O FXIa cliva o Fator IX (FIX) gerando então FIXa. O FIXa, junto com Fator X ativado (FXa) e a trombina clivam o Fator VIII (FVIII) gerando FVIIIa, um cofator da próxima reação. Esse FVIIIa junto com FIXa e na presença de Ca^{2+} , participa do complexo tenase ativando o Fator X (FX) (Norris, 2003).

A via extrínseca é iniciada pela formação de um complexo entre o fator tissular (TF), presente na superfície das células, e o Fator VII (FVII), que é localizado fora do sistema vascular, tornando-o ativado. A ligação do FVIIa com o TF forma um complexo enzimático que ativa o FX, tendo uma função similar à do complexo tenase (Hoffman *et al.*, 1996).

A via comum inicia então com a ativação do FX, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca ou por ambas. O FXa ativa o Fator V (FV), possibilitando, na presença de cálcio e outros fosfolipídios, a formação do complexo protrombinase (FXa-Va). O complexo protrombinase converte protrombina (Fator II) em trombina (Fator IIa) (Hoffman e Monroe, 2005). A trombina catalisa a proteólise do fibrinogênio formando monômeros de fibrina, que se polimerizam. A trombina também ativa o Fator XIII (FXIII), que auxilia na estabilização dos polímeros de fibrina formados.

Esse conceito clássico da coagulação sanguínea (Figura 2) serviu para o entendimento geral de toda cascata e hoje em dia os termos intrínseco e extrínseco ainda são utilizados nos testes clínicos. Entretanto, observações clínicas e experimentais demonstraram que essa via clássica não refletia por completo os eventos que ocorriam *in vivo* na hemostasia (Hoffman e Monroe, 2001). Por exemplo, deficiências de FXII, precalicreína ou cininogênio de alto peso molecular prolongam o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), mas não causam sangramento (Malý *et al.*, 2007). Esse modelo de cascata também não explica porque a ativação do FX pela via extrínseca não é capaz de compensar o comprometimento da via intrínseca pela falta de FVIII ou FIX (Vine, 2009). Por isso, o modelo celular representa melhor o que ocorre *in vivo* durante o reparo de uma lesão endotelial.

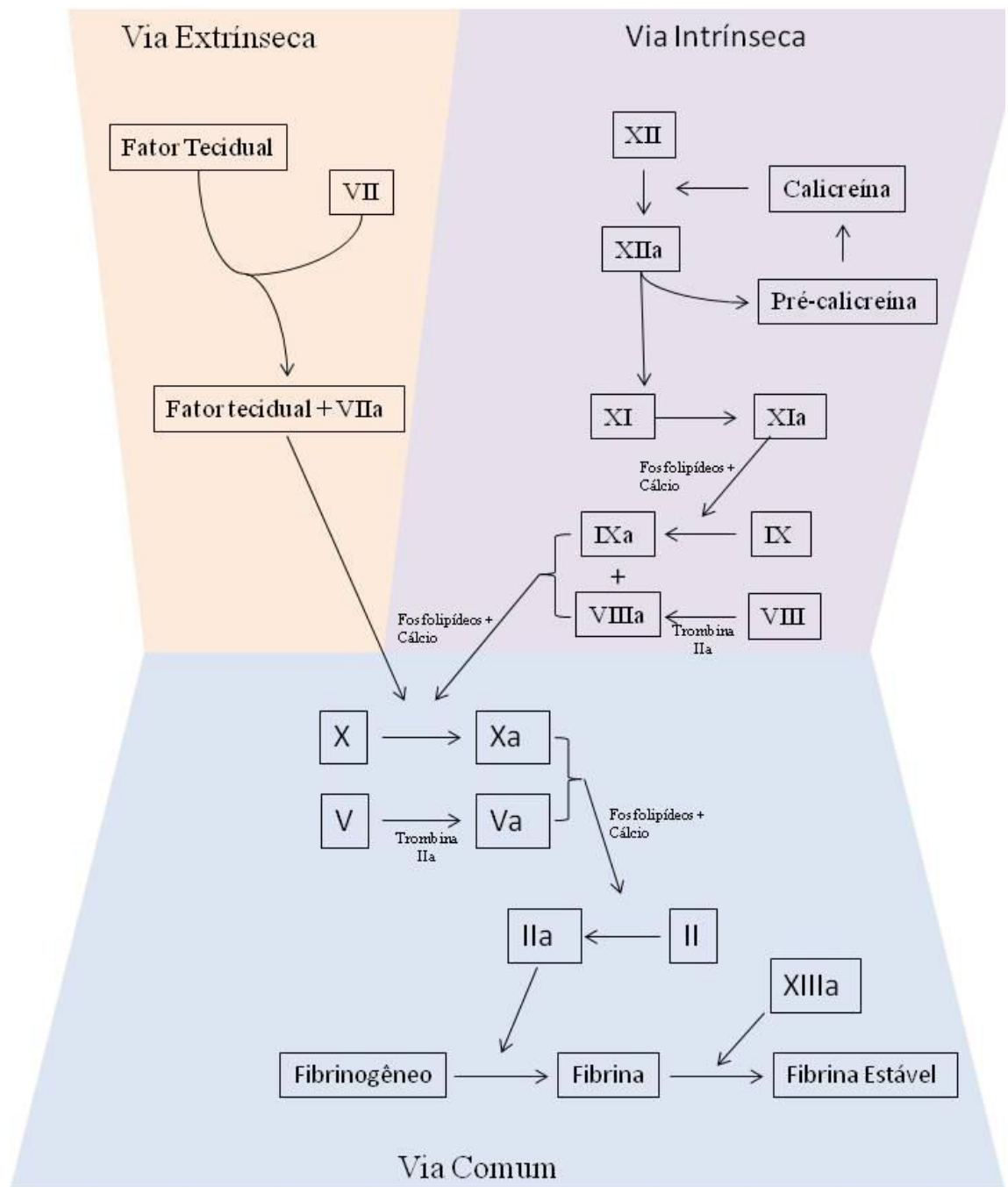


Figura 2: Modelo da cascata de coagulação clássica. Via intrínseca, via extrínseca e via comum. (adaptado de: Riddel *et al.*, 2007).

1.2.2. Modelo Celular da Coagulação Sanguínea

Um novo modelo de coagulação sanguínea foi proposto em 2001, representando melhor o que ocorre *in vivo* durante a coagulação em um tecido lesado (Hoffman e Monroe, 2001). Esse modelo estabelece uma visão fisiológica, integrada e funcional dos eventos bioquímicos complexos que ocorrem na superfície das células durante a coagulação, ao invés do modelo antigo em que a coagulação parecia ocorrer através de cascatas distintas e relativamente independentes (Becker, 2005). Os processos de coagulação podem ser compreendidos de uma forma mais clara quando colocados como uma série de fases, a iniciação, a amplificação, a propagação, e a terminação (Riddel *et al.*, 2007), como pode ser visto na Figura 3.

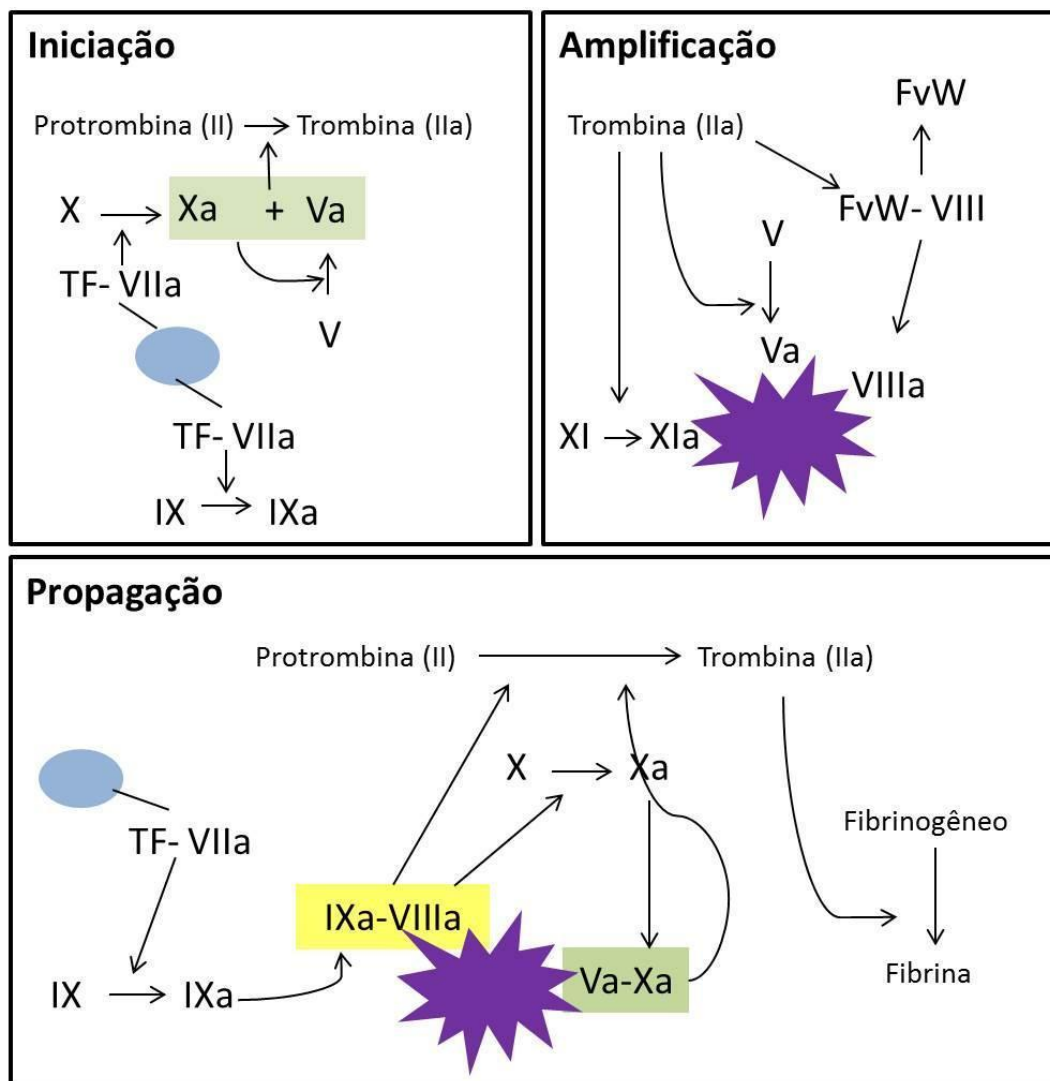


Figura 3: Modelo celular da coagulação sanguínea. Etapas de iniciação, amplificação e propagação até a formação da rede de fibrina.

A fase de iniciação acontece nas células que expressam o TF, esse fator é encontrado normalmente fora do sistema vascular, em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular e células de músculo liso das camadas mais profundas dos vasos sanguíneos. Na presença de lesão endotelial e/ou de estímulos específicos, as células endoteliais e monócitos também podem expressar o TF (Wilcox *et al.*, 1989). O TF, uma vez ligado ao FVII presente no sangue, rapidamente ativa-o formando o complexo FVIIa/TF, que é responsável pela ativação de uma pequena quantidade de FIX e de FX. O FXa, associado com seu cofator, ativa pequenas quantidades de FV e juntos formam o complexo protrombinase na superfície da célula que expressa o TF. Esse complexo

transforma pequenas quantidades de protrombina em trombina, as quais são suficientes para promover a formação de fibrina (Hoffman, 2003b).

As reações responsáveis pela iniciação da coagulação podem estar ocorrendo de forma constante fora do espaço vascular em indivíduos saudáveis gerando pequenas quantidades de fatores ativados no estado basal e produzindo continuamente pequenas quantidades de trombina (Monroe e Hoffman, 2009). Foi observado que alguns fatores da coagulação, incluindo FVII, FX e protrombina, são capazes de percorrer espaços entre os tecidos, tendo estes fatores sido detectados na linfa (Hoffman, 2003a). O processo da coagulação segue para a fase de amplificação somente quando há dano vascular (Hoffman, 2003b).

A etapa de amplificação acontece basicamente na superfície das plaquetas. Quando um vaso é lesado, plaquetas escapam de dentro dos vasos, ligam-se ao colágeno e a outros componentes da matriz extracelular no sítio da lesão, onde são parcialmente ativadas, resultando em um tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária (Boucher e Traub, 2009). A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação proporcionando ativação de mais plaquetas, aumentando a adesão dessas plaquetas e ativando os fatores V, VIII e XI. Plaquetas ativadas liberam FV na sua forma parcialmente ativada, que é então completamente ativada pela trombina ou FXa. A ligação FvW/FVIII é clivada pela trombina para liberar o FVIII e torná-lo ativado. As plaquetas ativadas passam a apresentar em sua superfície os fatores Va, VIIIa e IXa, e então inicia-se rapidamente a fase de propagação (Hoffman, 2003b).

A propagação ocorre depois que um grande número de plaquetas foi recrutado para o local de lesão e estão ativadas (Vine, 2009). Primeiro, o FIX ativado durante a fase de iniciação se liga ao FVIIIa que está na superfície das plaquetas, formando o complexo tenase. O FXIa, ligado às plaquetas, pode produzir uma quantidade adicional de FIXa. O FXa não pode efetivamente se deslocar para as plaquetas ativadas, então uma grande quantidade de FXa é produzida pelo complexo FIXa/FVIIIa na superfície das plaquetas (Hoffman, 2003b). Finalmente, o FXa se associa com o FVa ligado às plaquetas durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. A partir desse ponto ocorre a clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina. A trombina também ativa o FXIII em FXIIIa, o

qual catalisa a modificação covalente entre monômeros de fibrina, formando uma rede estável (Riddel *et al.*, 2007).

A fase de terminação ocorre para limitar o processo de coagulação ao local de lesão, evitando assim uma oclusão trombótica em áreas vasculares normais (Hoffman, 2003b). O sistema de coagulação é contido e inibido por anticoagulantes específicos que incluem o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C, proteína S e antitrombina III. A antitrombina III é ativada quando moléculas como a heparina ligam-se a células endoteliais e assim inibem a atividade da trombina e de outras proteases de serina, tais como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (Vine, 2009). As proteínas C e S são caracterizadas pela capacidade de inativar o FVa e FVIIIa. A proteína S funciona como um cofator da proteína C, aumentando sua capacidade de inativar o FVa e o FVIIIa (Riddel *et al.*, 2007). Por fim, a TFPI, uma proteína secretada pelo endotélio, atua impedindo a formação de trombina através da inibição do complexo TF/FVIIa (Malý *et al.*, 2007).

2. O Fator von Willebrand

O Fator von Willebrand (FvW) humano é uma glicoproteína plasmática, sintetizada nos megacariócitos e células endoteliais, e circula no plasma sob a forma de multímeros com peso molecular variando de 500 a 20.000 kDa (Mancuso *et al.*, 1991). O gene codificante do FvW (VWF) está localizado no braço curto do cromossomo 12 e contém 178 kb distribuídos em 52 éxons. O precursor do FvW é formado por 4 tipos de domínios repetidos (de 2 a 5 cópias cada) na seguinte ordem: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (Bonthron *et al.*, 1986). Complicações nas análises genéticas do VWF ocorrem pelo fato do cromossomo 22 carregar um pseudogene que replica a sequência parcial do cromossomo 12 entre os éxons 23 e 34, com uma variação de 3% (Mancuso *et al.*, 1991).

A repetição A do FvW parece ser homóloga a segmentos de diversas proteínas como os componentes plasmáticos, fator B e C2, do sistema complemento; à proteína de matriz da cartilagem; todas as 3 cadeias alfas de colágeno tipo VI; à α -subunidade dos receptores de adesão de leucócitos Mac-1 entre outras (Mancuso *et al.*, 1991).

A síntese do FvW é um processo complexo com muitos passos. O gene do VWF é transcrito em um mRNA de 9 kb e é traduzido em um pré-pro-polípeptídeo contendo 2813

aminoácidos, sendo composto por uma pré-sequência, um pro-peptídeo e um monômero de FvW (Figura 4). A pré-sequência de 22 aminoácidos capacita a entrada do FvW no retículo endoplasmático, e o pro-peptídeo com 741 resíduos de aminoácidos medeia o alinhamento de dímeros de FvW em formas multiméricas N-ligadas (Sadler, 1998). Os processos pós traducionais do FvW incluem dimerização, glicosilação, sulfatação, clivagem do pró-peptídeo e multimerização; seguido de estocagem ou secreção.

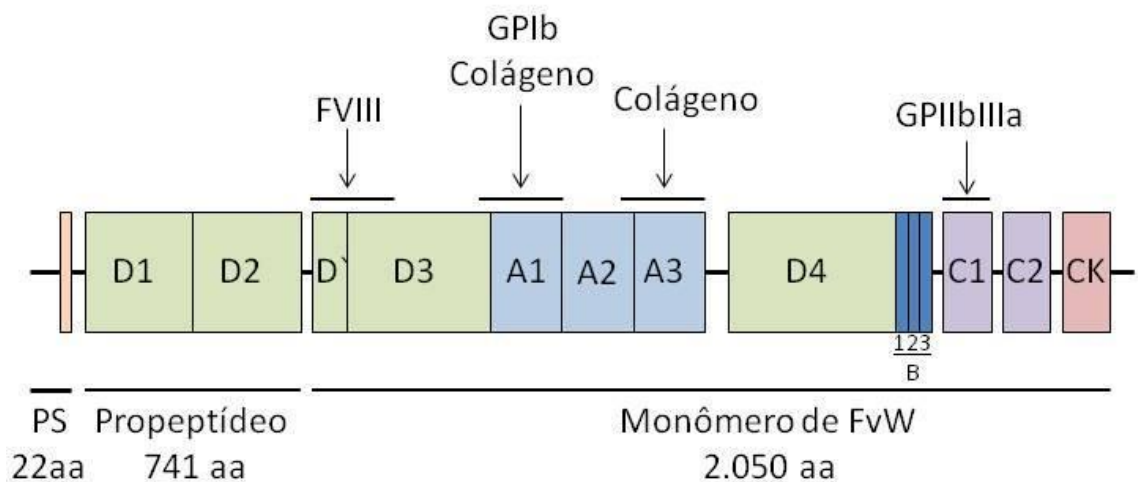


Figura 4: Estrutura primária do Fator von Willebrand. A figura mostra uma pré-sequência, o propeptídeo, o FvW maduro e seus domínios de ligação. (adaptado de: James e Lillicrap, 2013).

No retículo o FvW sofre glicosilação N-ligada e dimerização que ocorrem através de pontes de dissulfeto na região C-terminal do FvW (Voorberg *et al.*, 1991). Depois de montados corretamente, dímeros de pro-peptídeo de FvW são transportados para o aparelho de Golgi, onde ocorre a sulfatação e glicosilação O-ligada, bem como o processamento de oligossacarídeos com teor elevado de manose (Wagner, 1990). Simultaneamente à polimerização dos dímeros de FvW ocorre o deslocamento através dos compartimentos do Golgi, um passo que requer resíduos cisteína nos domínios D1, D2, D' e D3 (Voorberg *et al.*, 1990). Além disso, também ocorre multimerização e clivagem proteolítica na posição 763, liberando dímeros de pró-peptídeo dos multímeros de FvW maduros que excedem o tamanho de 20 milhões de daltons (Denis, 2002).

A função biológica do propeptídeo de FvW na circulação ainda é desconhecida. A subunidade de FvW maduro com 2050 resíduos possui domínios de ligação para o FVIII (domínios D¹-D3), para glicoproteínas de plaquetas 1b (domínio A1), colágeno (domínio A1 e A3), e para glicoproteínas de plaquetas IIb/IIIa (domínio C1) (Mohri *et al.*, 1988) (Figura 4). Essas múltiplas ligações funcionam capacitando o FvW a mediar a adesão e agregação plaquetária, e a proteger o FVIII de proteólises prematuras pela proteína C ativada (Koppelman *et al.*, 1996).

A secreção ocorre a partir das células de síntese: células endoteliais que produzem em torno de 85% do FvW do plasma, ou de megacariócitos (Wagner e Marder, 1983). O FvW sofre uma digestão proteolítica limitada por metaloproteases ADAMTS13 através da clivagem entre Tyr1605 e Met1606 no seu domínio A2 (Tsai, 1996), e essa quebra é crucial para a atividade fisiológica normal da molécula. O acesso ao local de clivagem requer desdobramento parcial do domínio A2, uma alteração mediada por um estresse danoso na circulação (Zhang *et al.*, 2009).

O FvW derivado de megacariócitos é estocado em α -grânulos das plaquetas. Em células endoteliais, a maioria do FvW é secretado constitutivamente, enquanto o restante, multímeros de alto peso molecular, são estocados em grânulos endoteliais específicos, os corpos de Weibel-Palade (Wagner, 1993). Esses corpos também armazenam outras proteínas, como a molécula de adesão celular P-selectina, a sialoglicoproteínalisossomal CD63, a endotelina, a interleucina-8, a α 1,3-fucosiltransferase VI, e possivelmente, o ativador de plasminogênio (Rosnoble *et al.*, 1999).

A secreção dos corpos de Weibel-Palade ocorre a partir da translocação dos seus grânulos do citoplasma para a superfície celular e a fusão desses grânulos com a membrana plasmática. A regulação dessa secreção ocorre na presença de Ca^{2+} e AMP-cíclico (Vischer *et al.*, 2000).

Os níveis de FvW no plasma sanguíneo são aumentados por diversos fatores como: estresse adrenérgico, geração de trombina, ou tratamento com vasopressina (DDAVP, vasopressina 1-desamino-8-D-arginina), uma droga usada para elevar níveis de FvW e FVIII em pacientes com Doença de von Willebrand (DvW) ou hemofilia A leve. O DDAVP pode induzir a secreção de FvW pela ligação ao receptor de vasopressina V2 e ativação da sinalização mediada por AMP-cíclico, mas somente em células endoteliais que expressam o receptor V2 (Kaufmann *et al.*, 2000).

Os níveis normais de FvW, na população em geral, variam de 35 a 200 UI/dL. Inúmeros fatores genéticos e ambientais contribuem para essa variação, dentre eles 4 polimorfismos de um único nucleotídeo foram identificados no promotor do gene do FvW (-1793 C/G, -1234 T/C, -1185 G/A, -1051 A/G) (Keightley *et al.*, 1999) (Harvey *et al.*, 2000) (Costa *et al.*, 2001). O grupo sanguíneo ABO é um dos fatores que tem grande influência nos níveis de FvW, com indivíduos do grupo O apresentando níveis mais baixos de antígenos de FvW no sangue. Esses níveis podem ainda ser alterados por diversos outros fatores como uso de medicamentos (por exemplo, pílula anticoncepcional), idade, exercício físico e situação de estresse (Gill *et al.*, 1987).

O envelhecimento está associado com mudanças nas quantidades de proteínas de coagulação e durante esse processo é observado um aumento de níveis plasmáticos de alguns fatores de coagulação, entre eles o FvW e o FVIII. Os níveis de FvW:Ag e de FvW:CO aumentam cerca de 0.15 e 0.17 UI/ml por década, respectivamente, em pessoas sem a DvW (Hager *et al.*, 1989). Um estudo com pacientes com DvW tipo I mostrou que os níveis plasmáticos do FvW desses pacientes também têm um aumento com o passar dos anos, mas é necessário mais estudos e com um maior número de pessoas para corroborar essa informação e para quantificar esse aumento (Rydz *et al.*, 2015). Em pacientes com DvW tipo 3 a quantidade de FvW não é modificada, pois esses pacientes não produzem o FvW, não tendo portanto como alterar sua quantidade (Rydz *et al.*, 2015).

A molécula de FvW madura possui uma meia vida de 12 a 18 horas, enquanto que o seu propeptídeo tem uma meia vida curta em torno de 3 horas (Van Mourik e Romani De Wit, 2001). A função do FvW pode ser regulada através de variações de níveis de antígeno e também através do controle do seu tamanho. A função homeostática do FvW é dependente do tamanho do seu multímero, sendo multímeros de alto peso molecular mais ativos biologicamente. Um acúmulo patológico de grande número de multímeros pode resultar em agregação espontânea de plaquetas (Denis, 2002).

3. As Doenças de Von Willebrand

A doença de von Willebrand (DvW) é uma das mais comum entre as patologias sanguíneas hereditárias. Essa doença foi descrita pela primeira vez em 1926 pelo Dr. Erick

Von Willebrand, em um artigo sobre o que ele denominou de “pseudohemofilias hereditárias”, tendo focado o estudo em famílias das ilhas Åland, principalmente a família “S”, que morava na fazenda de Norrgårds na Ilha de Föglö, na Finlândia (Becker, 2005; Blombäck *et al.*, 2012).

O casal investigado, Augusta e Oscar “S”, ambos com história de sangramento nasal principalmente quando jovens, teve 13 filhos. Destes, 4 filhas morreram por complicações hemorrágicas ainda crianças, sendo duas por sangramentos gastrointestinais aos 2 anos de idade e uma delas aos 4 anos depois de morder a língua. Outra filha apresentou sangramento aos 5 anos, tendo que ficar de cama por 10 semanas após um corte nos lábios, tendo também um sangramento importante no tornozelo. Ela apresentou, na época, um tempo Duke de sangria prolongado, enquanto os tempos de coagulação e retração do tampão plaquetário eram normais. Também apresentou um teste de fragilidade capilar e outro de número de plaquetas dentro dos limites normais. A menina sangrou até a morte em seu 4º período menstrual, quando tinha 14 anos de idade (Blombäck *et al.*, 2012).

Anos mais tarde, em 1957, a família “S” voltou a ser estudada juntamente com outros indivíduos que o Dr. Von Willebrand também tinha investigado. Todos os pacientes com casos de sangramento grave haviam morrido, enquanto nos pacientes que apresentavam sintomas de sangramento moderado foi constatado um nível baixo de FVIII (Blombäck, 1999). Em 1977 foram realizados, em pacientes com sangramento moderado, testes confiáveis de função plaquetária e ensaio imunológico do antígeno relacionado com o FVIII (atual FvW). Os sobreviventes com sintomas moderados ou leves de sangramento da família “S” apresentaram características da DvW tipo 1, com níveis diminuídos do antígeno do FvW (FvW:Ag) e da atividade do cofator de ristocetina, bem como níveis normais ou baixos de FVIII (Nyman *et al.*, 1981).

A DvW é causada por anormalidades quantitativas ou qualitativas no FvW. Defeitos quantitativos causam a DvW tipo 1 e tipo 3, sendo considerados como do tipo 1 pacientes com 1 a 35% de FvW e tipo 3 pacientes com níveis indetectáveis de FvW. Por outro lado, anormalidades qualitativas causam a DvW tipo 2, que pode ser subdividida em tipos 2A, 2B, 2M e 2N. Na Figura 5 pode ser observada a interação do FvW com as plaquetas e com o FVIII nos diferentes subtipos da DvW tipo 2.

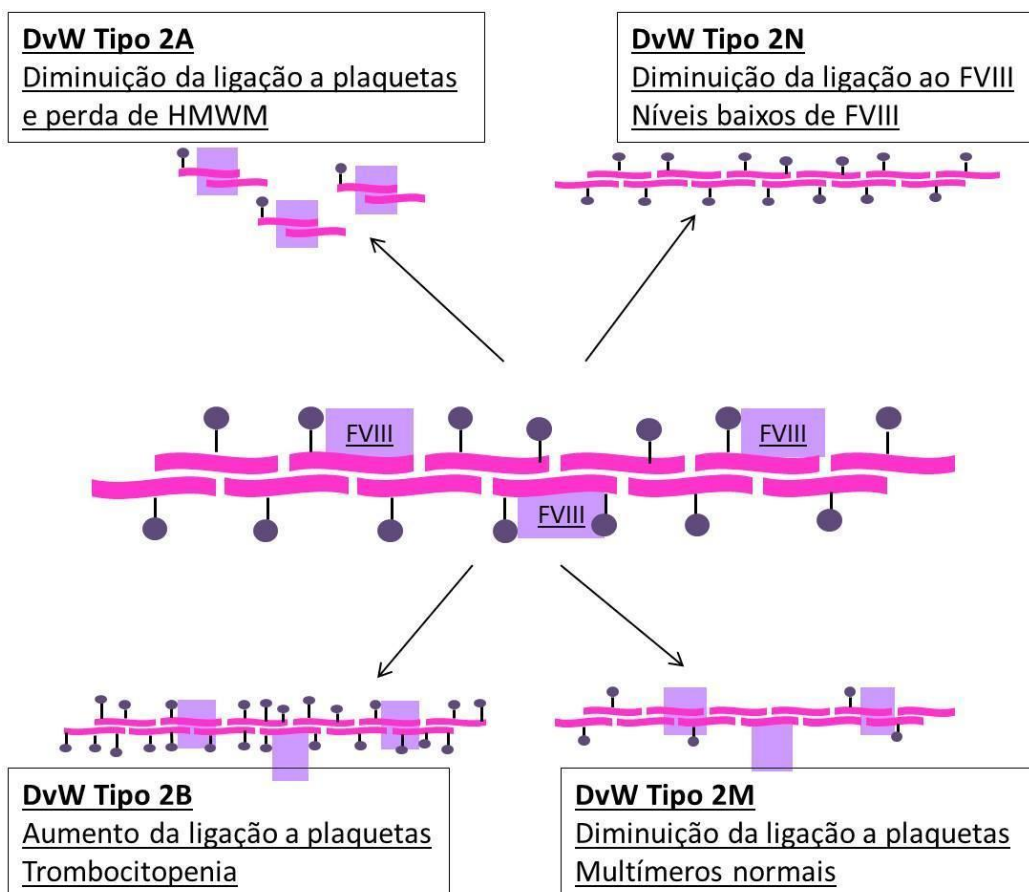


Figura 5: Representação esquemática do FvW e suas principais interações com as plaquetas e com o FVIII, e como essas interações quando afetadas causam defeitos funcionais e subsequente sangramento clínico.

Na maioria das populações, o tipo 1, representa a forma mais prevalente da doença, representando 70-80% dos casos (James e Lillicrap, 2013). Nesses pacientes o fenótipo de sangramento é leve a moderado, é associado com a redução dos níveis do FvW no plasma (Sadler, 2003). Mutações de sentido trocado são as mais relatadas associadas com a DvW tipo 1. Além disso, diversos mecanismos têm mostrado causar níveis baixos de FvW no plasma principalmente relacionados com a diminuição da secreção celular do FvW incluindo as mutações que afetam a expressão do gene (Keightley *et al.*, 1999), o tráfego de proteínas (Eikenboom *et al.*, 1996), ou o leve aumento na remoção do FvW (Sadler *et al.*, 2006).

Nos 4 tipos da DvW tipo 2, o FvW produzido tem funcionamento anormal; 3 dos subtipos da DvW tipo 2 têm padrão de herança autossômica dominante (2A, 2B e 2M) com penetrância completa do fenótipo em heterozigotos; em contraste o tipo 2N é transmitido de forma autossômica recessiva (Meyer *et al.*, 1997).

No tipo 2A ocorre uma perda de multímeros de médio e alto peso molecular, os quais são essenciais para auxiliar na adesão plaquetária na matriz subendotelial exposta (James e Lillicrap, 2013). A perda ocorre pela incapacidade de sintetizar ou secretar esses multímeros ou por um aumento na proteólise do FvW mediado por ADAMTS13 (Lyons *et al.*, 1992). O padrão de herança é dominante, e existem mais de 70 mutações originando esse fenótipo; dentre elas há mutações de sentido trocado nos domínios D2, A1 e A2 e na extremidade C-terminal da proteína, sendo mais comuns mutações no domínio A2 (Figura 6). Além disso, mais de 80% das mutações estão localizadas no éxon 28. O tipo 2A apresenta baixo FvW:Rco em relação ao FvW:Ag, com razão 0,6, e aglutinação de plaquetas induzidas por ristocetina (RIPA) normal (James e Lillicrap, 2013).

O tipo 2B é caracterizado por um fenótipo de ganho de função da ligação do domínio A1 do FvW mutante ao receptor de glicoproteína 1b α das plaquetas, formando agregados que são rapidamente eliminados pelo organismo e levando à trombocitopenia (Ruggeri *et al.*, 1980). Existem mais de 20 diferentes substituições de um único nucleotídeo que resultam no tipo 2B, todas elas no éxon 28. Há uma boa correlação entre genótipo e fenótipo em relação às mutações encontradas e à severidade da trombocitopenia (Huizinga *et al.*, 2002). O tipo 2B apresenta taxa reduzida de FvW:Rco/FvW:Ag, perda de multímeros de alto peso molecular e aumento da aglutinação de plaquetas induzida por ristocetina (RIPA) (Federici *et al.*, 2009).

No tipo 2M é encontrada uma perda de função semelhante ao tipo 2B, no entanto mutações no domínio A1 podem levar a uma diminuição na ligação ao receptor 1b α das plaquetas (Huizinga *et al.*, 2002), e em alguns estudos foram observadas mutações no domínio A3 causando uma redução da ligação ao colágeno (Ribba *et al.*, 2001). Já foram descritas mais de 25 diferentes mutações causando esse fenótipo, sendo o tipo 2M o que tem apresentado sangramentos mais leves entre os tipos da DvW (Castaman *et al.*, 2012). O tipo 2M diferencia-se do tipo 2A por apresentar uma distribuição normal de multímeros de alto peso molecular. No tipo 2M verifica-se uma razão tanto de FvW:Rco/FvW:Ag quanto de FvW:CB (atividade de ligação ao colágeno)/FvW:Ag <0,6 (James *et al.*, 2007).

O tipo 2N é um defeito raro que resulta da incapacidade do FvW de se ligar ao FVIII, o que leva à degradação rápida do FVIII não ligado ao FvW e com isso níveis baixos de FVIII no plasma sanguíneo. Indivíduos afetados são homocigotos recessivos ou heterocigotos compostos para mutações no FvW nas regiões de ligação ao FVIII (domínios

D' e/ou D3). Além disso, foram descritas formas raras na extremidade C-terminal da sequência do pro-peptídeo do FvW, que interferem com a clivagem e a liberação da subunidade madura de FvW (Mazurier *et al.*, 2001). O fenótipo pode ser semelhante ao encontrado em hemofílicos leves; no entanto, deve-se prestar maior atenção quando forem encontradas mulheres afetadas na família, ou quando o paciente não responde à infusão de FVIII, pois nesses casos o paciente pode apresentar a DvW tipo 2N e não hemofilia (Ng *et al.*, 2015).

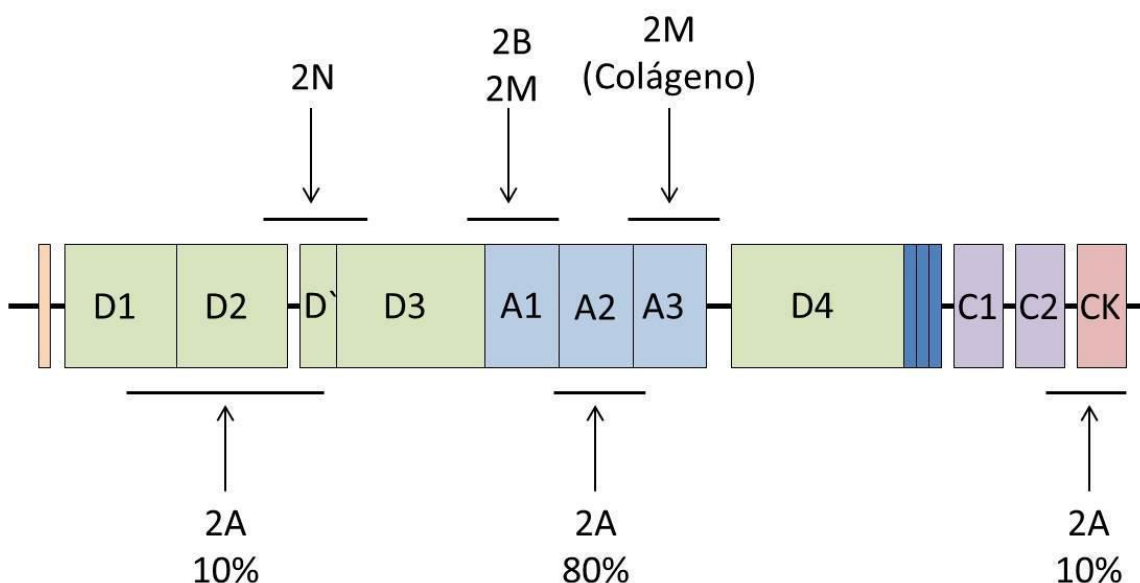


Figura 6: Localização das mutações que resultam na DvW tipo 2 . Praticamente todas as mutações são de sentido trocado. (adaptado de: James e Lillicrap, 2013).

3.1. Doença de von Willebrand tipo 3

A DvW tipo 3 é uma deficiência severa do FvW, devido à herança autossômica recessiva, seja em homozigose ou heterozigose composta para alelos nulos. Os indivíduos com DvW tipo 3 apresentam níveis indetectáveis de FvW:Ag e níveis muito baixos de FVIII no plasma. A prevalência dessa doença varia entre os países, sendo de 0,1 a 5,3 por milhão de pessoas, com aumento da prevalência em regiões com maior frequência de casamentos consanguíneos (Eikenboom, 2001). Pessoas com DvW tipo 3 podem apresentar alguns sintomas clínicos como sangramentos mucocutâneos severos ou moderados, hematomas musculares e hemartroses. Na tabela 2 pode-se observar a prevalência da doença de von Willebrand por tipo e subtipo, por unidade federativa, região

e Brasil, segundo os dados do ministério da saúde em 2016. De todas as regiões, a região sul é onde mais se verifica a DvW3 e o Rio Grande do Sul é o estado com o maior número de casos cadastrados.

Tabela 2: Prevalência da doença de von Willebrand por tipo e subtipo, por unidade federativa, por região e Brasil, 2016.

Região	UF	Doença de von Willebrand										Total
		Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2N	Tipo 2M	Tipo 3	Plaquetário (pseudoDvW)	Não esclarecido	Não testado/ Não informado		
Centro Oeste	DF	72	5	4	4	1	4	0	13	58	161	
	GO	3	0	0	0	0	0	0	8	81	92	
	MS	0	0	0	0	0	0	0	3	32	35	
	MT	1	0	0	1	0	0	0	7	85	94	
	Total	76	5	4	5	1	4	0	31	256	382	
Nordeste	AL	5	0	0	0	0	2	0	3	21	31	
	BA	0	0	0	0	0	1	0	1	229	231	
	CE	3	0	0	0	0	1	0	0	256	260	
	MA	0	0	0	0	0	0	0	1	84	85	
	PB	20	8	1	0	0	1	0	0	85	115	
	PE	17	4	3	0	0	1	0	25	213	263	
	PI	0	0	1	1	0	0	0	10	59	71	
	RN	4	0	1	1	0	0	0	5	76	87	
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80	
Total	49	12	6	2	0	6	0	45	1.103	1.223		
Norte	AC	0	1	0	0	0	0	0	0	2	3	
	AM	16	1	0	0	0	0	0	0	15	32	
	AP	0	1	0	0	0	0	0	0	51	52	
	PA	13	6	22	1	0	6	0	248	87	383	
	RO	1	0	0	0	0	0	0	1	14	16	
	RR	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	
	TO	5	0	0	0	0	0	0	5	8	18	
	Total	35	9	22	1	0	6	0	254	186	513	
Sudeste	ES	85	9	2	2	0	7	0	22	24	151	
	MG	9	0	0	0	0	3	0	32	795	839	
	RJ	37	6	0	0	0	31	0	88	1060	1.222	
	SP	253	39	30	6	4	36	2	62	1087	1.519	
	Total	384	54	32	8	4	77	2	204	2.966	3.731	
Sul	PR	57	32	0	3	1	35	0	50	473	651	
	RS	588	31	7	14	4	61	3	234	120	1.062	
	SC	32	16	0	5	2	8	0	42	144	249	
	Total	677	79	7	22	7	104	3	326	737	1.962	
Total Geral	1.221	159	71	38	12	197	5	860	5.248	7.811		

Fonte: Ministério da Saúde, Coordenação-geral de Sangue e Hemoderivados: Hemovida Web Coagulopatias.

As mutações encontradas na DvW tipo 3 são pequenas deleções e inserções, mutações de sentido trocado, mutações sem sentido ou outras mutações, localizadas ao longo do gene do *VWF* que interferem com a síntese e secreção do FvW. Existem atualmente pouco mais de 700 diferentes mutações relatadas na DvW, de acordo com a *International Society on Thrombosis and Haemostasis – Scientific and Standardization*

Committee (ISTH-SSC) (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>, acessado em 06 de janeiro de 2019).

4. Estudos anteriores sobre a Doença de von Willebrand no Rio Grande do Sul

Estudos prévios sobre essa doença ou sobre o FvW já foram realizados por nosso grupo, tendo sido concluídas duas Teses de Doutorado em 1995 e 2001. As publicações relacionadas a essas e outras pesquisas podem ser enumeradas como segue: (a) prevalência da DvW em nosso meio (Fischer *et al.*, 1989); (b) polimorfismos associados (Simon *et al.*, 2000); (c) influência do polimorfismo -1185A/G sobre os níveis de FvW no plasma (Simon *et al.*, 2002); (d) variabilidade na região promotora do gene (Simon, *et al.*, 2003); (e) mutações no tipo 2N da doença (Simon e Roisenberg, 2004); (f) envolvimento do FvW na deficiência combinada dos Fatores V e VIII (Fischer *et al.*, 1988); (g) FvW e doença maligna (Schwartzmann *et al.*, 2001); (h) níveis antigênicos de FvW no plasma de portadoras de câncer de mama (Röhsig *et al.*, 2001); (i) FvW e câncer colorretal (Damin *et al.*, 2002); e (j) associação entre o polimorfismo -1185A/G e a doença de artérias coronárias (Simon, *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

5. Objetivo Geral

O estudo visa a caracterização molecular das mutações em pacientes com DvW3 do estado do Rio Grande do Sul e análise do efeito dessas mutações na determinação da doença.

5.1. Objetivos Específicos

- Avaliar dados clínicos dos pacientes com a DvW3;
- Investigar mutações pontuais, pequenas deleções e inserções no gene *VWF*;
- Analisar o papel das mutações encontradas nos defeitos causados na proteína, que impedem sua síntese, secreção e/ou estocagem.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo aceito para publicação pela Haemophilia

**Variants p.Pro2063Ser and p.Arg324* co-segregate in type 3
von Willebrand Disease Patients from Southern Brazil**

Ana Paula Ornaghi¹/ Mariana Rost Meireles¹ / Mariana Rodrigues Botton¹/Francisco Mauro Salzano*¹ / Eliane Bandinelli¹ / Ursula Matte¹

¹Departamento de Genética e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

* *In Memoriam*

Keywords: von Willebrand factor, type 3 von Willebrand Disease, gene mutations, blood coagulation, co-segregation.

Running Title: p.Pro2063Ser and p.Arg324* in type 3 VWD

Correspondence: Eliane Bandinelli, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308-6736 Fax:

E-mail: eliane.bandinelli@ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric plasma glycoprotein that plays an important role in hemostasis. Von Willebrand disease (VWD) is an inherited heterogeneous bleeding disorder caused by either a quantitative or qualitative defect of VWF. Type 3 VWD, the most severe form of the disease, leads to complete quantitative VWF deficiency.

Aim

The present study aims to investigate the molecular pathogenesis of type 3 VWD patients from Southern Brazil.

Methods

The *VWF* gene was sequenced in 26 cases clinically diagnosed with type 3 VWD by next-generation sequencing using Ion Torrent PGM.

Results

In 25 patients, we were able to identify both disease-causing variants. We identified 72 different variants: 31 intronic and 41 exonic. Five novel variants were found: c.6976+5G>T; c.6885_6886insC; c.3378C>T (p.Cys1126); c.3346_3347insCCA; c.2503G>T (p.Glu835*). Variants p.Pro2063Ser and p.Arg324* co-segregated in 17 patients, 15 of them in homozygosity.

Conclusion

Our results may contribute to the discussion on whether the variant p.Pro2063Ser is pathogenic or not. Finally, the presence of a common haplotype in patients bearing these two variants suggests a founder effect for this variant in our region.

1. INTRODUCTION

The von Willebrand Factor (VWF) is a glycoprotein synthesized in megakaryocytes and endothelial cells that circulates in plasma in multimers weighing 500 to 20,000 kDa ¹. It is mostly known for its contribution to the hemostatic process as a mediator of platelet adhesion and aggregation at sites of vascular injury and carrier of coagulation factor VIII (FVIII) in the circulation, stabilizing the FVIII molecule and preventing it from being degraded ².

Von Willebrand Disease (VWD) is one of the most common hereditary blood disorders. Type 3 VWD is a severe deficiency of VWF caused by autosomal recessive inheritance of loss of function variants. The prevalence of type 3 VWD varies among countries, from 0.1 to 5.3 per million people, with an increase in prevalence in regions with a higher frequency of consanguineous marriages ³. Severe bleeding in type 3 VWD is caused not only by the absence of VWF, which affects primary hemostasis but also by the significant decrease in FVIII that requires VWF for its stability. FVIII is essential for blood coagulation serving as a cofactor for FIXa in the conversion of FX to FXa ⁴.

The *VWF* gene is located at the short arm of chromosome 12 and spans 178 kb distributed along 52 exons. There are currently over 700 different variants reported for VWD, according to the *International Society on Thrombosis and Haemostasis – Scientific and Standardization Committee* (ISTH-SSC) (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>). Variants found in type 3 VWD are nonsense, small deletions, small insertions, and missense variants scattered throughout the entire *VWF* gene. Splice-site variants and rare large gene deletions or large insertions have also been reported ^{5,6,7}. The presence of a pseudogene on

chromosome 22, which bears 97% resemblance to the region spanning exons 23 to 34¹, complicates the genetic analysis of *VWF*.

Here we describe the molecular analysis of type 3 VWD patients from the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul, showing co-segregation of variants p.Pro2063Ser and p.Arg324*.

2. MATERIALS AND METHODS

This work is related to a long-term project developed in the Rio Grande do Sul, Brazil, for blood coagulation disorders (recent studies reported in⁸⁻¹⁰). A total of 26 families agreed to participate in this study and donated genetic material. Clinical data were reviewed from patient's charts. The institutional review board approved the study, and all patients or legal representatives signed written informed consent. The patients included in this study were tested for clotting factors and all of them had undetectable VWF:Ag levels and FVIII coagulant activity (FVIII:C) <5%.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using non-enzymatic methods¹¹. The DNA concentration was determined by fluorometry using the Qubit Fluorometer (ThermoFischer Scientific, CA, USA). Variants in *VWF* (NM_000552.4) were screened using a Next-Generation Sequencing (NGS) panel on Ion Torrent PGM (Life Technologies, CA, USA). A total of 70 amplicons were designed using the AmpliSeq Designer software (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), covering 100% of the coding sequence of *VWF*. Amplicon library was prepared using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) and NGS performed using 20 ng of genomic DNA and Ion 316 sequencing chip (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), with

500 flows. Data from the Ion Torrent runs were analyzed using the platform-specific pipeline software Torrent Suite v3.2.1 for base calling, trimming of adapter and primer sequences, and filtering out poor quality reads. The sequences were aligned to the hg19 human reference genome, and, for variant calling, they were imported to the Ion Reporter Software v5.0. All variants identified by NGS were sought in the following databases: von Willebrand factor Variant Database (<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/>), 1000 Genomes project (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Leiden Open Variation Database (LOVD, <http://www.lovd.nl/>), and Genome Aggregation Database (gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org/>).

The impact of the missense variants found on protein structure was analyzed using five algorithms: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, <http://provean.jcvi.org/>), SIFT (Sorting Intolerant to Tolerant, <http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>). Variants potentially affecting splice were analyzed by Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>). Data on global allele frequency was obtained from GnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>). ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) was also used to classify the clinical impact of variants.

Grantham's distance algorithm was applied to predict variant effects based on the physicochemical similarity between amino acids, it produces a score from 0 to 215, with lower scores for a more similar substitution, reflecting less evolutionary distances. And the UniProt Alignment tool was used to conservation amino acid analysis between the human VWF (UniProt reviewed with high annotated score entry: P04275) and other eight mammalian species (*Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*, *Papio anubis*, *Callithrix jacchus*, *Felis catus*, *Canis lupus familiaris*, *Mus musculus*, and *Sus scrofa*).

Sanger sequencing was used to confirm variants found in the NGS method. The *VWF* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 52 primer pairs (primer sequences are available upon request). The amplicons were purified using the Exo-Sap kit (Amersham Biosciences, Les Ulis, France) and sent to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), where Sanger sequencing was performed. Sequences were aligned to their reference (NM_000552.4) using CodonCode Aligner and MEGA 5.04 software.

3. RESULTS

A total of 26 unrelated patients with type 3 VWD were included in this study, 14 females and 12 males. At the time of the study, their mean age was 36.15 years old (ranging from 15 to 62 years old). The individuals' ethnicity, assumed by self-declaration, was 87.5% Euro-descendants and 12.5% Afro-descendants. Parental consanguineous marriage was referred by 50% of the patients. Hematomas were the most frequent symptom (appearing in 100% of the patients), and 47% of the patients had the first symptoms of bleeding before one year of age.

Molecular analysis of the *VWF* gene showed 72 different variants (Table S1). Out of these, 17 were deemed to be associated with the disease, either by previous reports¹²⁻¹⁴ or by *in silico* prediction. Disease-associated genotypes were determined in 25 out of 26 (96%) patients (Table 1). Variants occur in homozygosity in 19 patients and in compound heterozygosity in six patients. In one patient, only one mutated allele was found in heterozygous form, requiring further analysis to explain his phenotype. This large number of variants in homozygosity can be explained by the number of consanguineous marriages among patients' parents (10/20 for whom information was available).

Five variants not yet described in any database appeared in four different patients, and four were considered disease-causing (Table 2). The nonsense variant in heterozygosity, p.Glu835* was observed in patient 3. This patient is also heterozygous for the previously described frameshift variant, p.Pro812fs. A splice site variant c.6976+5G>T was observed in homozygosity in patient 7. The Human Splicing Finder (umd.be/HSF3) was used to analyze this variant and showed that it alters the donor site, most probably affecting splicing. Some studies have shown that variants at splice site may lead to the formation of an mRNA without the affected exon, also leading to the elimination of this defective mRNA ¹⁵. This patient also bears the novel synonymous variant, p.Cys1126 in homozygosity, which is probably not disease-related. Patient 11 has an insertion in the exon 25, p.Gly1115_Lys1116insThr, at the site of VWF multimerization. The parents are also consanguineous, and this novel variant was found in homozygosity. Finally, p.Cys2296fs was present on patient 25. It is located at exon 39, which encodes part of the D4 domain, causes a frameshift and a premature stop codon after a sequence of 12 altered amino acids. This patient also has the previously described variant, p.Arg273Trp.

Variants p.Pro2063Ser and p.Arg324* were found co-segregating in 17 out of our 26 (65%) patients. Two of them are compound heterozygous for both changes; therefore phase cannot be ascertained. All others are homozygous for both changes, thus indicating the presence of a common haplotype in our population. Variant p.Pro2063Ser was not found isolated in any patient, whereas p.Arg324* alone was found in two individuals, one homozygous and the other in heterozygosity. Both variants were found in patients with other changes (Supp Table 1); however, given the frequency of those other changes in the general population and other patients from our sample, it is debatable whether they constitute a common haplotype.

Out of the 55 variants considered non-disease causing, eight are in splice sites, 11 are missense, and three are small deletions/insertions. Also, 16 are deep intronic, whereas 17 are synonymous. As found in the *VWF* database (www.vwf.group.shef.ac.uk/), the exon 28 reported the largest number of variants (11; 26.8%), followed by exon 18 (three; 7.3%), and exons 8, 11, 22, 25, 26 and 39 with two variants each (4.9%).

We also evaluated all 16 missense variants found in our patients using five different predictors (Table 3). Minor allele frequency (MAF) refers to the frequency at which the second most common allele occurs in a given population. It is striking to notice that predictors' interpretation varies significantly, including when compared to ClinVar – variants p.Pro2063Ser and p.Pro1162Leu were considered disease-causing by all predictors, whereas they are classified as likely benign by ClinVar. Each program uses different algorithms, which can cause different results for a same variant. ClinVar, on the other hand, is a database based on literature-provided information. Therefore it is not a prediction tool and may reflect the current knowledge about a given variant, including its contradictory interpretations. For variants p.Pro2063Ser and p.Pro1162Leu, for which divergent outcomes were predicted, there is no evidence in ClinVar.

4. DISCUSSION

Using next-generation sequencing, we were able to determine the genotype of 25 out of 26 (96%) patients with type 3 VWD from Southern Brazil. Overall, 72 variants were found by NGS, confirming the highly polymorphic character of *VWF*¹⁶. Our patients have variants distributed along the entire gene, with exon 28 bearing 15% of variants.

Among the variants found in this exon, three missense variants were found in heterozygosity in the same patient (#18): p.Val1279Ile (c.3835G>A)¹⁷, p.Asn1231Thr (c.3692A>C) and p.Val1229Gly (c.3686T>G). They are all located in the region of platelet binding. Despite being rare, they all have been described before on the VWF database, however only p.Val1279Ile was predicted to be damaging according to the *in silico* tools used in our study. These three variants are similar to the pseudogene sequence, which leads us to believe that a gene conversion event occurred in this patient. Gene conversion between the *VWF* gene and the pseudogene, located on chromosome 22, has previously been reported as a rare event in different VWD phenotypes¹⁸⁻²¹ and occurs between the D3 and A1 domains of VWF. Such gene conversion events are probably facilitated by the high homology between the gene and the pseudogene and also by the presence of two consensus chi sequences in the *VWF* gene. These regions are known to promote non-homologous recombination between genes, even on different chromosomes²². It is noteworthy that our panel does not amplify the pseudogene, thus ruling out the possibility of a false positive in this case.

In the propeptide, we found the missense variant p.Arg273Trp (c.817C>T), in patient 25, already described in other studies as related to VWD^{23,24} and predicted to be damaging by all *in silico* tools. In the D' domain, site of binding to FVIII, we found the p.Pro812fs variant (c.2435delC) in heterozygosity in two patients (#3 and #20). This change generates a premature stop codon after an alteration of 30 amino acids. In one of these patients (#20), two other variants were also found in heterozygosity, c.5842+1G>A and c.5170+10C>T, both at splice sites and already described^{25,26}. We were not able to determine whether these variants were in *cis* or *trans*.

However, the most striking finding from our study was the co-segregation of two previously described variants in the *VWF* gene: p.Pro2063Ser (c.6187C>T) and p.Arg324* (c.970C>T) found in 17 (65%) patients, 15 of whom were homozygous for these changes. This number of homozygous patients is probably due to the high rate of consanguineous marriage observed in our sample.

Variant p.Arg324* is the likely cause of type 3 VWD in these patients. This variant is placed in the D1 domain, which is part of the propeptide and causes a premature stop codon. It was first described in a study conducted in Germany by Schneppenheim ⁶, who analyzed one patient with type 3 VWD and his relatives, and verified that he had p.Arg324* in heterozygosity, without reporting the other allele. However, the other relatives that presented this alteration in heterozygosity were healthy. This variant appeared in patients with type 3 VWD in other studies in India, in 1 patient in compound heterozygosity ²⁷ and in 3 patients in homozygosity ²⁸. It was also described in England, in homozygosity in three non-related patients ¹⁵.

On the other hand, p.Pro2063Ser, located in the D4 domain, has already been described in the *VWF* database. However, there are controversies whether this is a pathogenic variant or a neutral variant. Some groups have reported its presence in healthy individuals, without stating if in homozygosity or heterozygosity ^{29,30}. Kasatkar *et al.*, studying Indian patients with type 3 VWD, showed a high frequency of this variant (observed in 11 unrelated patients) in homozygosity, without any other disease-causing variant. They also analyzed a group of healthy individuals and detected this variant in 6 subjects, all of them in heterozygosity. Thus, they suggest this variant causes type 3 VWD when in homozygosity, whereas, in heterozygosity, it would not affect the dosage of VWF:Ag ³¹. Hampshire has rebutted Kasatkar's claims arguing that the method they used to detect

variants may not have found the causal variant for type 3 VWD and concluded they believe p.Pro2063Ser is a common neutral polymorphism in *VWF*³². *In silico* analyses using predictors have shown that p.Pro2063Ser may be the likely cause of this disease. However, *in vitro* studies indicate that the variant does not affect the gene expression, which could suggest that the variant is neutral³³. In our study, all patients bearing p.Pro2063Ser also had the p.Arg324* variant in homozygosity, thus suggesting that in our population p.Pro2063Ser is not the disease causing variant.

Although a high population frequency has been described for p.Pro2063Ser^{7,31,34}, p.Arg324* is not common in the general population. Besides, these 17 patients share a common haplotype with other 13 variants (Table S1). Therefore, we hypothesized a possible founder effect in our patients. We then analyzed the city where the patients and their ancestors were born and are living. No clear relationship was found among these families, although they are all from the central and the northern portion of the state, in an area of approximately 50.000km². At times, different families shared the same or nearby cities, but no evidence was found of a kin relationship among them, even though we cannot rule out a common ancestor. It would be interesting to see if this haplotype is also present in patients from other South American regions.

In summary, using an NGS gene panel, we were able to determine the genotype of 25 out of 26 (96%) Brazilian patients with type 3 VWD. Our data may contribute to the discussion on the pathogenic or non-pathogenic effect of the variant p.Pro2063Ser, which was found co-segregating with p.Arg324*. Finally, the presence of a common haplotype in patients bearing these two variants suggests a founder effect for this variant in our region.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients and staff of HEMOCENTRO-RS for agreeing to participate in the study and for logistical support. Funding was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/HCPA). The authors would also like to thank Prof. Mara Hutz for her support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to report.

REFERENCES

1. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry*. 1991;30(1):253-269.
2. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:217-246.
3. Eikenboom JC. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14(2):365-379.
4. Tuddenham EG. Factor VIII and haemophilia A. *Baillieres Clin Haematol*. 1989;2(4):849-877.
5. Zhang ZP, Falk G, Blombäck M, Egberg N, Anvret M. Identification of a new nonsense mutation in the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III. *Hum Mol Genet*. 1992;1(1):61-62.
6. Schneppenheim R, Krey S, Bergmann F, et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *Hum Genet*. 1994;94(6):640-652.
7. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30(3):264-270.
8. Gorziza RP, Vieira IA, Kappel DB, et al. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013;24(2):164-169.

9. Rosset C, Vieira IA, Sinigaglia M, Gorziza RP, Salzano FM, Bandinelli E. Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate haemophilia A patients from southern Brazil. *Haemophilia*. 2013;19(5):773-781.
10. Meireles MR, Pantoja AG, Ornaghi APM, Vieira GF, Salzano FM, Bandinelli E. Molecular characterization of haemophilia B patients in southern Brazil. *Haemophilia*. 2017;23(5):e457-e461.
11. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
12. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, et al. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*. 2012;119(9):2135-2140.
13. Cumming A, Grundy P, Keeney S, et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2006;96(5):630-641.
14. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2007;109(1):112-121.
15. Sutherland MS, Keeney S, Bolton-Maggs PH, Hay CR, Will A, Cumming AM. The mutation spectrum associated with type 3 von Willebrand disease in a cohort of patients from the north west of England. *Haemophilia*. 2009;15(5):1048-1057.
16. Elayaperumal S, Fouzia NA, Biswas A, et al. Type-3 von Willebrand disease in India-Clinical spectrum and molecular profile. *Haemophilia*. 2018;24(6):930-940.
17. Eikenboom JC, Reitsma PH, Peerlinck KM, Briët E. Recessive inheritance of von Willebrand's disease type I. *Lancet*. 1993;341(8851):982-986.
18. Holmberg L, Dent JA, Schneppenheim R, Budde U, Ware J, Ruggeri ZM. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. *J Clin Invest*. 1993;91(5):2169-2177.
19. Eikenboom JC, Vink T, Briët E, Sixma JJ, Reitsma PH. Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(6):2221-2224.
20. Kanaji T, Okamura T, Kuroiwa M, Murakawa M, Kamura T, Niho Y. A sequence analysis of von Willebrand factor mRNA, gene, and pseudogene in two patients with von Willebrand disease type 2B, and an investigation of gene conversion in its gene. *Int J Hematol*. 1996;64(1):53-59.
21. Surdhar GK, Enayat MS, Lawson S, Williams MD, Hill FG. Homozygous gene conversion in von Willebrand factor gene as a cause of type 3 von Willebrand disease and predisposition to inhibitor development. *Blood*. 2001;98(1):248-250.
22. Kenter AL, Birshtein BK. Chi, a promoter of generalized recombination in lambda phage, is present in immunoglobulin genes. *Nature*. 1981;293(5831):402-404.
23. Allen S, Abuzenadah AM, Hinks J, et al. A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. *Blood*. 2000;96(2):560-568.
24. Bowman M, Tuttle A, Notley C, et al. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *J Thromb Haemost*. 2013;11(3):512-520.
25. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2000;84(4):536-540.

26. Gupta PK, Adamtziki E, Budde U, et al. Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease. *Br J Haematol*. 2005;130(5):752-758.
27. Gupta PK, Saxena R, Adamtziki E, et al. Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;41(2):219-222.
28. Kasatkar P, Shetty S, Ghosh K. Genetic heterogeneity in a large cohort of Indian type 3 von Willebrand disease patients. *PLoS One*. 2014;9(3):e92575.
29. Sadler JE, Ginsburg D. A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1993;69(2):185-191.
30. James PD, Notley C, Hegadorn C, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*. 2007;109(1):145-154.
31. Kasatkar P, Ghosh K, Shetty S. A common founder mutation p.P2063S in exon 36 of VWF in 11 unrelated Indian von Willebrand disease (VWD) families. *Ann Hematol*. 2013;92(8):1147-1148.
32. Hampshire DJ, Goodeve AC. p.P2063S: a neutral VWF variant masquerading as a mutation. *Ann Hematol*. 2014;93(3):505-506.
33. Eikenboom J, Hilbert L, Ribba AS, et al. Expression of 14 von Willebrand factor mutations identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study. *J Thromb Haemost*. 2009;7(8):1304-1312.
34. Johansson AM, Halldén C, Säll T, Lethagen S. Variation in the VWF gene in Swedish patients with type 1 von Willebrand Disease. *Ann Hum Genet*. 2011;75(4):447-455.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO

A doença de von Willebrand como mencionado anteriormente é uma das coagulopatias hereditárias mais frequentes no mundo. Primeiro será apresentado o diagnóstico fenotípico realizado atualmente e as falhas que possuem, dificultando e atrasando o resultado dos pacientes, em seguida exploraremos melhor o uso de ferramentas moleculares e como a caracterização da nossa população foi importante para uma possível implementação dessa nova ferramenta na detecção dessa doença.

O diagnóstico normalmente é feito por testes laboratoriais utilizando o plasma do paciente. Estes testes devem ser feitos da forma mais correta e precisa possível, seguindo protocolos, respeitando tempo de vida dos fatores, utilizando controles normais e patológicos a fim de validar cada teste realizado. Os testes de coagulação necessitam de uma série de cuidados nas diferentes etapas da sua execução para que os resultados sejam corretos. A maioria dos erros nos resultados ocorre na fase pré-analítica. Estimativas sugerem que entre 61,9% (Carraro e Plebani, 2007) e 77,1% (Goswami *et al.*, 2010) dos equívocos ocorrem nessa etapa. Entre fatores que podem contribuir para o aumento desses erros, pode-se citar: o local onde é realizada a coleta e sua supervisão por profissional qualificado, rodízio de funcionários, falta de treinamento do pessoal e variáveis do próprio paciente.

O primeiro cuidado é quanto ao horário da coleta. O ideal é que seja realizada pela manhã e que o paciente faça um jejum de pelo menos 3h, para evitar lipemia na amostra. O tubo a ser coletado deve conter 10% de citrato de sódio, e deve ser o primeiro a ser coletado ou precedido apenas de tubo sem anticoagulante no caso da coleta de sangue para mais de um exame. Além disso, o paciente não deve ficar garroteado por mais de 1 minuto, pois ocorre ativação dos fatores de coagulação, o que altera o resultado dos exames. Se coletado com seringa a agulha deve ser retirada antes de passar o sangue para o tubo com anticoagulante. O volume de sangue em cada tubo com anticoagulante deve estar dentro da faixa correta e o sangue deve ficar em temperatura adequada, entre 20-25°C, pois temperaturas baixas ou altas também alteram a qualidade da amostra. Cuidados com velocidade e tempo de centrifugação também são importantes. Mesmo com todos os cuidados devidos, ainda pode-se ter alteração no resultado devido a outros fatores como: estresse, exercício físico, uso de medicações, período menstrual, gravidez, tipo sanguíneo.

No geral, dentre os exames de coagulação realizados, os pacientes com DvW3 têm um diagnóstico mais preciso, pois possuem níveis indetectáveis de FvW:Ag e níveis muito

baixos de FVIII, que são relativamente fáceis de detectar nos testes realizados. Quando se encontra um resultado compatível com doença de von Willebrand o ideal é pedir uma nova amostra para confirmação do diagnóstico.

O aumento da disponibilidade e a redução dos custos dos testes genéticos faz com que estes sejam cada vez mais utilizados para diagnóstico e confirmação de resultados de DvW3. O teste genético pela análise direta do gene *VWF* é mais simples do que o teste de coagulação, onde vários testes diferentes em amostras de plasma são necessários para fazer o diagnóstico. Além disso, os níveis plasmáticos de FvW variam devido a outras doenças subjacentes, estresse ou outras variáveis do paciente. No entanto, a determinação de que o gene a ser analisado é o *VWF* ainda depende de testes laboratoriais prévios ou de uma hipótese diagnóstica baseada em dados clínicos muito sólida. Ainda assim, existem alguns complicadores com a análise genética do *VWF*.

Em primeiro lugar, *VWF* é um gene altamente polimórfico, o que significa que há uma grande variabilidade em indivíduos saudáveis. Isso dificulta a definição de quais alterações são causadoras da doença. Uma vez que os tipos e frequências de alterações variam nas populações, além de se buscar informações em bancos de dados, o ideal seria analisar um grupo de indivíduos saudáveis. Um exemplo é a variante p.Pro2063Ser que foi encontrada em 17 pacientes no nosso estudo, alguns autores sugerem que ela seja patogênica, como o caso do Kasatkar e colaboradores (Kasatkar *et al.*, 2013). Eles encontraram essa variante em homozigose em 11 pacientes com DvW3, observaram sua segregação familiar (Figura 7) e detectaram que alguns familiares saudáveis eram portadores dessa variante, mas em heterozigose. Foi avaliada toda região codificante, região promotora e limites entre íntron e éxon desses pacientes e não encontraram outra mutação que pudesse ser a causa da doença. O estudo de Goodeve e colaboradores mostrou uma frequência alélica de 0,025 em uma população normal (Goodeve *et al.*, 2007), eles também analisaram 100 pacientes saudáveis sem histórico de sangramento, e essa mesma variante foi encontrada em 6 pacientes, mas em heterozigose. Fizeram uma análise de haplótipo usando marcadores intrônicos VNTR1, VNTR2 e VNTR3, que mostrou que os pacientes possuíam um haplótipo comum, sugerindo um efeito fundador nessa população. Entretanto, mesmo com todos esses testes demonstrando que essa variante tem potencial de ser patogênica em homozigose, inclusive através da análise *in silico* com o uso de preditores (Yadegari *et al.*, 2012), os testes funcionais realizados por outro grupo

mostraram que essa variante não seria patogênica (Eikenboom *et al.*, 2009). Kasatkar então afirma que esses testes podem não necessariamente simular a situação *in vivo*, e que para um típico fenótipo de DvW3 não precisaria teste funcional, mas questionamentos sobre defeitos na síntese ou liberação da proteína formada. Por outro lado, Hampshire e Goodeve continuaram afirmando ser uma variante neutra, dizem que em relação a p.Pro2063Ser existem várias evidências que contrariam a conclusão elaborada por Kasatkar (Hampshire e Goodeve, 2014). Uma delas seria a alta frequência na população saudável, que varia entre 0,6 e 2,5% em afro-americanos/caucasianos (Baronciani *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2011) e chega a 3% em indianos (Kasatkar *et al.*, 2013), utilizando o equilíbrio de Hardy-Weinberg pode-se prever 1/1100 indivíduos em homozigose para essa variante, o que sugeriria uma alta frequência populacional de DvW3 se ela fosse patogênica. Afirmam que como p.Pro2063Ser não tem efeito na expressão do FvW *in vitro* parece improvável que afete o FvW *in vivo*; isso seria corroborado por estudos em que pacientes com DvW possuem outra variante além da p.Pro2063Ser que explicaria mais diretamente o fenótipo da DvW. Como em estudos anteriores com a população indiana não foi possível explicar a causa de 8/54 (15%) pacientes (Baronciani *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2013), é provável que a verdadeira mutação causadora da doença ainda não tenha sido encontrada por Kasatkar e colaboradores e que o método utilizado por eles não é 100% sensível a todas as variações de sequência. A mutação causadora da doença poderia, por exemplo, ser uma variante sinônima que interrompe o splicing normal ou o enrolamento de proteínas, ou uma variante profunda intrônica causando a ruptura do splicing fora das regiões do VWF analisadas. Portanto, eles seguem afirmando que com as informações existentes atualmente p.Pro2063Ser é uma variante polimórfica comum neutra do VWF. No caso dos nossos pacientes, essa variante não foi a única encontrada, junto com ela também encontramos a p.Arg324* que gera um stop códon prematuro no propeptídeo, sendo a variante mais provável para a causa da doença.

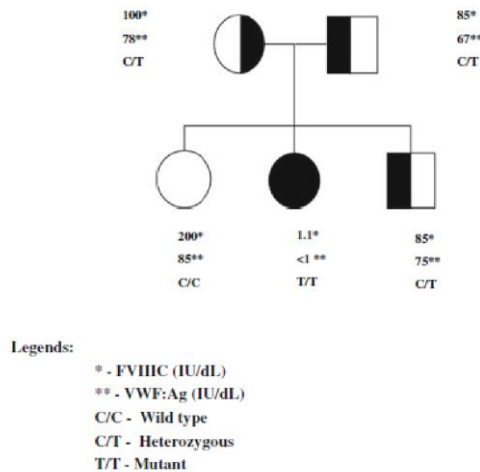


Figura 7: Segregação familiar da mutação p.Pro2063Ser em uma família representativa do artigo de Kasatkar, 2013.

Um segundo complicador é que o gene possui um pseudogene que se assemelha em 97% a sequência dos éxons 23-34 (Mancuso *et al.*, 1991), e com isso os pares de primers podem facilmente se anelar nos dois, tanto no *VWF* quanto no pseudogene do *VWF* e se isso acontece não conseguimos saber se aquele paciente possui aquelas variantes no *VWF* ou se elas fazem parte da amplificação do pseudogene. O mais correto a fazer nesses casos é observar a região que o par de primers ou o amplicon deveria estar cobrindo e verificar se todas as bases mutantes correspondem ao pseudogene. Quando só um trecho desses fragmentos é similar ao pseudogene a literatura nos diz que pode ter ocorrido uma conversão gênica, e a gravidade dessa conversão na possível causa da doença vai depender da extensão desses trechos e de quais bases foram mutadas (Surdhar *et al.*, 2001). Nós no NGS optamos por utilizar um painel pronto e não um customizado por nós, pois o pronto que passa por testes de qualidades prévios, e com isso garantiria a amplificação do *VWF* sem a amplificação conjunta do pseudogene do *VWF*.

Além disso, o fato de o *VWF* ser relativamente grande dificultou até os dias atuais a análise de todo gene. Nesse sentido, a técnica de NGS veio pra auxiliar essa detecção. Neste estudo padronizamos o sequenciamento do *VWF* utilizando um painel com outros genes envolvidos na coagulação (*FII*, *FV*, *FVII*, *FVIII*, *FIX*, *FX*, *FXI*, *LMAN1*, *MCFD2*, *FGA*, *FGB*, *FGG*), não foi encontrado outra variante com potencial de ser patogênica nesses outros genes da coagulação, nesses pacientes. O painel utilizado possuía 100% de cobertura para o *VWF*, profundidade média foi de 506 reads por amplicon. No método de

Sanger precisamos amplificar um éxon (dos 52) de cada vez, e analisar as sequências geradas para encontrar alguma variante, o que toma muito tempo e o gasto acaba sendo maior do que utilizar o NGS. Mas ainda assim ainda é utilizado para confirmação dos resultados encontrados no NGS, visto ser um método efetivo e já estabelecido na detecção de novas variantes.

De qualquer forma, a análise molecular fornece um resultado mais preciso e pode ajudar principalmente para definir diagnóstico de pacientes tipo 1 e diferenciar pacientes tipo 2, em aconselhamentos genéticos e futuras terapias gênicas. O uso de ferramentas moleculares não excluiria testes bioquímicos na detecção da doença, mas poderia auxiliar bastante, inclusive em terapias mais específicas dependendo da mutação encontrada, pois mesmo se fazendo novo teste bioquímico para confirmação de resultado, esse pode continuar dando alterado devido alguma variante externa, já os testes genéticos dariam o mesmo resultado.

Traçando um perfil da nossa população podemos inclusive focar em variantes específicas, que seriam mais comuns, fazendo um sequenciamento por Sanger somente daquele éxon, inicialmente, e reduzindo custos. De acordo com nossos resultados poderíamos, por exemplo, incluir a análise molecular do éxon 8, onde se encontra a mutação p.Arg324*, frequente em mais de 65% dos nossos pacientes e provável causa da DvW3 nesses pacientes.

Entretanto, mesmo sabendo de todas as vantagens dos testes moleculares, e não excluindo a necessidade de mais estudos em relação a eles, sabemos que no nosso país ainda estamos precisando focar em dar um primeiro atendimento e diagnóstico bioquímico para novos pacientes, além de um tratamento adequado para cada tipo de coagulopatia. Infelizmente temos muitas regiões do nosso país com número subestimado de pacientes, muita gente sem diagnóstico e sem tratamento.

No nosso estudo nós incluímos um número representativo de pacientes com DvW3 do nosso estado (65% das famílias) e fizemos a análise de todo gene do *VWF*, para encontrar as variantes que poderiam ser responsáveis pela doença. A partir disso podemos observar mutações comuns na nossa população, vistas em grande parte dos pacientes, o que sugere um efeito fundador. O fato dos pacientes e seus familiares estarem distribuídos da porção central até a porção norte do estado, com trânsito entre gerações dentro dessas regiões, e a presença de haplótipos idênticos corrobora essa teoria. Esse haplótipo comum,

com 15 variantes em homozigose nesses mesmos pacientes, fortalece a evidência de que existiu em algum momento um ancestral comum, mesmo que atualmente esses pacientes desconheçam esse parentesco.

Além disso, o número elevado de casamentos consanguíneos contribuiu para o grande número de homozigotos encontrados neste estudo; dentre os 26 pacientes analisados, 19 tiveram mutações possivelmente patogênicas em homozigose, 5 pacientes tiveram mutações patogênicas em heterozigose composta e apenas 2 tiveram 1 mutação danosa em heterozigose, precisando mais estudos para podermos evidenciar qual seria a causa da doença.

Além das variantes p.Pro2063Ser e p.Arg324* encontradas em 17 pacientes, observamos, em 8 pacientes, 10 mutações já descritas na literatura, e possivelmente patogênicas, sendo 4 missense (p.Arg273Trp, p.Gly967Asp, Gly2705Arg, Val1279Ile), 3 alterando a fase de leitura (p.Pro812fs, p.Leu2495fs, p.Pro2808fs) e 3 afetando o local de splice (c.5621-10C>T, c.5842+1G>A, c.5170+10C>T). Encontramos também 5 novas variantes, sendo 4 delas possivelmente relacionada com a doença (p.Glu835*, c.6976 + 5G>T, p.Gly1115_Lys1116insThr, p.Cys2296fs).

As mutações foram distribuídas ao longo de todo gene do *VWF* (Figura 8), e em cada local afetando de uma forma específica o gene. Alterações em qualquer um dos domínios, podem causar um dano estrutural grande na molécula de FvW modificando ligações, não permitindo a formação das estruturas essenciais para síntese, estocagem e/ou secreção da mesma. Nesse estudo podemos, por exemplo, verificar algumas alterações envolvendo o aminoácido Prolina, que é um aminoácido mais rígido e a troca desse aminoácido por outro deixa a estrutura mais flexível modificando a conformação, também observamos grande alteração estrutural na troca do aminoácido Glicina, que é o menor e mais flexível dos aminoácidos, e quando ocorre sua substituição por outro aquela região da molécula fica mais rígida. Essas mudanças conformacionais afetam não só a estrutura em si da molécula, mas as ligações que estas fazem com outras moléculas e com a própria proteína, podendo expor partes que antes ficavam mais internalizadas ou vice e versa, vindo inclusive a alterar a polaridade na superfície dessa proteína. E essas alterações devem abalar a montagem dos dímeros e posteriores formação de multímeros do FvW, essenciais para o seu funcionamento. No caso dos pacientes com DvW3, não é possível detectar na corrente sanguínea a presença desse fator. Porém ainda não existem muitos

estudos em relação a esse gene, principalmente ligados à análise estrutural que possam contribuir para aumentar o entendimento do efeito das mutações detectadas. Atualmente apenas 3 domínios são cristalografados (A1, A2 e A3) e estão depositados no PDB, o que limita estudos estruturais mais aprofundados.

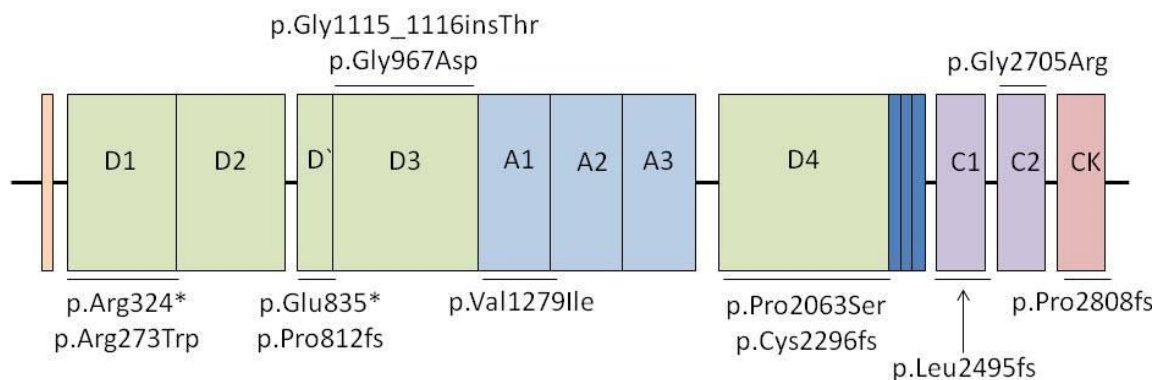


Figura 8: Mutações e domínios. Localização das mutações patogênicas nos respectivos domínios do FvW.

Não conseguimos fazer correlação entre a mutação encontrada e o tipo ou intensidade de sangramento nesses pacientes. Muitos estudos utilizam escores de sangramento semelhantes ao proposto em neste estudo (Xu *et al.*, 2017; Pathare *et al.*, 2018), porém estes apresentam limitações, tais como o fato das mulheres apresentarem valores maiores que os homens (em função de eventos relacionados a menorragia e parto), assim como crianças tem menor probabilidade de terem sofrido intervenções cirúrgicas (Rimmer e Houston, 2018). Além disso, geralmente os escores valorizam o número de episódios de sangramento, não levando em consideração o número de vezes em que o paciente apresentou os mesmos sintomas. Finalmente, os escores dependem do momento do diagnóstico e são influenciados pela percepção subjetiva dos indivíduos quanto à sua avaliação da intensidade do sangramento.

Nossos pacientes possuem idades bem variadas, de 15 a 62 anos de idade, isso dificulta um pouco a análise dos tipos de sangramentos e o grau de sangramento, pois nos últimos anos os diagnósticos aconteceram bem mais cedo e as medicações foram administradas, quando necessário, também mais cedo, com isso muitas vezes o paciente não chega a apresentar determinado sintoma que apresentaria sem a medicação. Além disso, neste estudo não foi possível realizar uma revisão clínica ampla dos pacientes, que

idealmente deveria ser feita por um mesmo profissional. Tivemos acesso às informações secundárias, que são coletadas no momento do atendimento, porém não há uma validação desses dados e nem uma padronização quanto à qualidade da informação coletada. Este pode ser um dos motivos pelos quais não conseguimos estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo neste estudo. Porém, ressalte-se que não existem estudos demonstrando uma correlação evidente entre os tipos de mutação e os escores de sangramento ou gravidade da doença entre pacientes com DvW3. Estudos recentes com número elevado de pacientes (Veyradier *et al.*, 2016; Elayaperumal *et al.*, 2018) apresentam correlações das mutações com os subtipos da Doença de von Willebrand e outros parâmetros bioquímicos, mas não com características clínicas relacionadas ao sangramento.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO

- *Avaliar dados clínicos dos pacientes com a DvW3:*

Os pacientes foram questionados sobre episódios de sangramento mais graves ao longo da vida, idade de início dos sintomas, os tipos de sangramentos e tratamento, além de consanguinidade dos pais. Entre os nossos pacientes 50% possuem pais consanguíneos. Todos os pacientes apresentaram pelo menos um tipo de sangramento mais prolongado, sendo o mais comum hematoma, que apareceu em todos os pacientes. Sangramento excessivo após corte aconteceu em todos os pacientes que sofreram esse dano. O primeiro sangramento foi percebido antes do primeiro ano de vida em 47% dos pacientes, sendo a maioria durante a vacinação ou no surgimento dos primeiros dentes de leite. Em relação ao tratamento realizado, todos recebem a mesma medicação, um combinado de FVIII+FvW, 12 desses pacientes fazem tratamento de 2 a 3 vezes por semana, e os outros 14 só recebem a medicação quando necessário, ou quando vão fazer algum procedimento dentário ou cirúrgico, quando sofrem alguma lesão ou tem episódios de sangramento mais graves.

- *Investigar mutações pontuais, pequenas deleções e inserções no gene VWF:*

Através do NGS detectamos 72 diferentes variantes em nossos pacientes. Sendo 31 em regiões intrônicas e as outras 41 em região codificante. Foram observadas mutações pontuais, que alteraram o aminoácido gerando algumas vezes um códon de parada prematuro; também ocorreram pequenas deleções e inserções que alteraram a fase de leitura, na maioria delas acarretando após alguns aminoácidos trocados um códon de parada prematuro e em um dos casos prolongando o número de aminoácidos (p.Pro2808fs).

Conseguimos explicar o fenótipo da DvW3, através da análise molecular, em 24 pacientes, em que encontramos mutações patogênicas em homozigose ou heterozigose composta. Apenas 2 pacientes precisam de mais análises para afirmar a causa da doença, pois nesses só encontramos uma mutação patogênica em heterozigose. Para esses pacientes, podemos analisar regiões de 5' e 3' UTR, regiões intrônicas mais profundas, e não encontrando mutação nessas regiões, podemos analisar genes que interferem no VWF.

- Analisar o papel das mutações encontradas nos defeitos causados na proteína, que impedem sua síntese, secreção e/ou estocagem.

As mutações encontradas nos nossos pacientes foram distribuídas ao longo de todo *VWF*, e como essa proteína está ausente na corrente sanguínea dos pacientes com *DvW3*, o defeito causado por elas deve afetar a síntese, estocagem ou liberação das mesmas. No propeptídeo encontramos 2 mutações no domínio D1, uma inclusive causando um códon de parada prematuro. Também foram encontradas 2 mutações no domínio CTCK, 2 no domínio D', onde ocorre a ligação ao *FVIII*, e 3 mutações nos domínios D3 (2 mutações) e A1 (1 mutação), responsáveis pela formação de multímeros.

Nessa tese de doutorado abordamos os aspectos moleculares da forma grave da *DvW3*, encontramos uma mutação comum na nossa população e com isso um possível efeito fundador. Não conseguimos fazer uma correlação entre a mutação e o nível de sangramento dos pacientes, esse sangramento parece estar ligado ao nível de *FVIII* que os pacientes apresentam, o que causa essa variação no nível de *FVIII* precisa ser estudo mais profundamente visto que esses pacientes não possuem o *FvW* circulante na corrente sanguínea. A *DvW* precisa ser mais assistida em todo território nacional, melhorando diagnóstico e tratamento para esses pacientes, e junto estudos moleculares devem ser aprimorados para aumentar entendimento do que causa a doença e com isso especificar tratamentos tornando-os mais efetivos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, F. et al. Phenotypic and molecular characterisation of type 3 von Willebrand disease in a cohort of Indian patients. **Thromb Haemost**, v. 109, n. 4, p. 652-60, Apr 2013. ISSN 2567-689X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407766>>.

ALLEN, S. et al. A novel von Willebrand disease-causing mutation (Arg273Trp) in the von Willebrand factor propeptide that results in defective multimerization and secretion. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 560-8, Jul 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887119>>.

AUSTEN, D.; RHYNES, I. **A Laboratory Manual of Blood Coagulation**. Oxford: Blackwell Scientific: 109 p. 1975.

BARONCIANI, L. et al. Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with type 3 von Willebrand disease. **Thromb Haemost**, v. 84, n. 4, p. 536-40, Oct 2000. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057846>>.

BARONCIANI, L. et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 30, n. 3, p. 264-70, 2003 May-Jun 2003. ISSN 1079-9796. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737944>>.

BECKER, R. C. Cell-based models of coagulation: a paradigm in evolution. **J Thromb Thrombolysis**, v. 20, n. 1, p. 65-8, Aug 2005. ISSN 0929-5305. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133899>>.

BELLISSIMO, D. B. et al. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. **Blood**, v. 119, n. 9, p. 2135-40, Mar 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197721>>.

BLOMBÄCK, M. Scientific visits to the Aland Islands. **Haemophilia**, v. 5 Suppl 2, p. 12-8, May 1999. ISSN 1351-8216. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401895>>.

BLOMBÄCK, M. et al. von Willebrand disease biology. **Haemophilia**, v. 18 Suppl 4, p. 141-7, Jul 2012. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726098>>.

BONTHRON, D. T. et al. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. **Nature**, v. 324, n. 6094, p. 270-3, 1986 Nov 20-26 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3491324>>.

BOUCHER, B. A.; TRAUB, O. Achieving hemostasis in the surgical field. **Pharmacotherapy**, v. 29, n. 7 Pt 2, p. 2S-7S, Jul 2009. ISSN 1875-9114. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558278>>.

BOWMAN, M. et al. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. **J Thromb Haemost**, v. 11, n. 3, p. 512-20, Mar 2013. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311757>>.

BRYCKAERT, M. et al. Of von Willebrand factor and platelets. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 2, p. 307-26, Jan 2015. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297919>>.

CARRARO, P.; PLEBANI, M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. **Clin Chem**, v. 53, n. 7, p. 1338-42, Jul 2007. ISSN 0009-9147. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525103>>.

CASTAMAN, G. et al. Different bleeding risk in type 2A and 2M von Willebrand disease: a 2-year prospective study in 107 patients. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 4, p. 632-8, Apr 2012. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22329792>>.

CLEMETSON, K. J. Platelets and primary haemostasis. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 220-4, Mar 2012. ISSN 1879-2472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178577>>.

COSTA, M. et al. Human endothelial cell-derived nuclear proteins that recognise polymorphic DNA elements in the von Willebrand factor gene promoter include YY1. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 2, p. 672-9, Aug 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522021>>.

DAMIN, D. C. et al. Von Willebrand factor in colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, v. 17, n. 1, p. 42-5, Jan 2002. ISSN 0179-1958. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12018453>>.

DENIS, C. V. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. **Int J Hematol**, v. 75, n. 1, p. 3-8, Jan 2002. ISSN 0925-5710. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11843287>>.

EIKENBOOM, J. et al. Expression of 14 von Willebrand factor mutations identified in patients with type 1 von Willebrand disease from the MCMDM-1VWD study. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 8, p. 1304-12, Aug 2009. ISSN 1538-7836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19566550>>.

EIKENBOOM, J. C. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 2, p. 365-79, Jun 2001. ISSN 1521-6926. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686105>>.

EIKENBOOM, J. C. et al. Dominant type 1 von Willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von Willebrand factor. **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2433-41, Oct 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8839833>>.

EIKENBOOM, J.C. et al. Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 6, p. 2221-4, Mar 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8134377>>.

ELAYAPERUMAL, S. et al. Type-3 von Willebrand disease in India-Clinical spectrum and molecular profile. **Haemophilia**, v. 24, n. 6, p. 930-940, Nov 2018. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29984440>>.

FEDERICI, A. B. et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. **Blood**, v. 113, n. 3, p. 526-34, Jan 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805962>>.

FISCHER, R. R.; GIDDINGS, J. C.; ROISENBERG, I. Hereditary combined deficiency of clotting factors V and VIII with involvement of von Willebrand factor. **Clin Lab Haematol**, v. 10, n. 1, p. 53-62, 1988. ISSN 0141-9854. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3259171>>.

FISCHER, R. R. et al. Inheritance and prevalence of von Willebrand's disease severe form in a Brazilian population. **J Inherit Metab Dis**, v. 12, n. 3, p. 293-301, 1989. ISSN 0141-8955. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2515369>>.

GILL, J. C. et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. **Blood**, v. 69, n. 6, p. 1691-5, Jun 1987. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3495304>>.

GOODEVE, A. et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). **Blood**, v. 109, n. 1, p. 112-21, Jan 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985174>>.

GORZIZA, R. P. et al. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 24, n. 2, p. 164-9, Mar 2013. ISSN 1473-5733. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249616>>.

GOSWAMI, B. et al. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. **Clin Chem Lab Med**, v. 48, n. 1, p. 63-6, 2010. ISSN 1437-4331. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047530>>.

GUPTA, P. K. et al. Gene conversions are a common cause of von Willebrand disease. **Br J Haematol**, v. 130, n. 5, p. 752-8, Sep 2005. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115133>>.

GUPTA, P.K. et al. Genetic defects in von Willebrand disease type 3 in Indian and Greek patients. **Blood Cells Mol Dis**, v. 41, n. 2, p. 219-22, 2008 Sep-Oct 2008. ISSN 1096-0961. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485763>>.

HAGER, K. et al. Blood coagulation factors in the elderly. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 9, n. 3, p. 277-82, 1989 Nov-Dec 1989. ISSN 0167-4943. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2640086>>.

HAMPSHIRE, D. J.; GOODEVE, A. C. p.P2063S: a neutral VWF variant masquerading as a mutation. **Ann Hematol**, v. 93, n. 3, p. 505-6, Mar 2014. ISSN 1432-0584. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775583>>.

HARVEY, P. J. et al. A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels. **Br J Haematol**, v. 109, n. 2, p. 349-53, May 2000. ISSN 0007-1048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848823>>.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Rev**, v. 17 Suppl 1, p. S1-5, Sep 2003a. ISSN 0268-960X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697207>>.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J Thromb Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003 Aug-Oct 2003b. ISSN 0929-5305. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760207>>.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 6, p. 958-65, Jun 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434702>>.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M.; ROBERTS, H. R. Cellular interactions in hemostasis. **Haemostasis**, v. 26 Suppl 1, p. 12-6, 1996. ISSN 0301-0147. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8904166>>.

HOFFMAN, M. M.; MONROE, D. M. Rethinking the coagulation cascade. **Curr Hematol Rep**, v. 4, n. 5, p. 391-6, Sep 2005. ISSN 1541-0714. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131441>>.

HOLMBERG, L. et al. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 2169-77, May 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486782>>.

HUIZINGA, E. G. et al. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. **Science**, v. 297, n. 5584, p. 1176-9, Aug 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183630>>.

JACQUEMIN, M. G.; SAINT-REMY, J. M. Factor VIII immunogenicity. **Haemophilia**, v. 4, n. 4, p. 552-7, Jul 1998. ISSN 1351-8216. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9873793>>.

JAMES, P. et al. Rare bleeding disorders - bleeding assessment tools, laboratory aspects and phenotype and therapy of FXI deficiency. **Haemophilia**, v. 20 Suppl 4, p. 71-5, May 2014. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762279>>.

JAMES, P. D.; LILLICRAP, D. The molecular characterization of von Willebrand disease: good in parts. **Br J Haematol**, v. 161, n. 2, p. 166-76, Apr 2013. ISSN 1365-2141. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23406206>>.

JAMES, P. D. et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 145-54, Jan 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190853>>.

JAMES, P. D. et al. Challenges in defining type 2M von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 9, p. 1914-22, Sep 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596142>>.

JOHANSSON, A. M. et al. Variation in the VWF gene in Swedish patients with type 1 von Willebrand Disease. **Ann Hum Genet**, v. 75, n. 4, p. 447-55, Jul 2011. ISSN 1469-1809. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21534937>>.

KANAJI, T. et al. A sequence analysis of von Willebrand factor mRNA, gene, and pseudogene in two patients with von Willebrand disease type 2B, and an investigation of gene conversion in its gene. **Int J Hematol**, v. 64, n. 1, p. 53-9, Jul 1996. ISSN 0925-5710. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757968>>.

KASATKAR, P.; GHOSH, K.; SHETTY, S. A common founder mutation p.P2063S in exon 36 of VWF in 11 unrelated Indian von Willebrand disease (VWD) families. **Ann Hematol**, v. 92, n. 8, p. 1147-8, Aug 2013. ISSN 1432-0584. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354996>>.

KASATKAR, P.; SHETTY, S.; GHOSH, K. Genetic heterogeneity in a large cohort of Indian type 3 von Willebrand disease patients. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92575, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675615>>.

KAUFMANN, J. E. et al. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. **J Clin Invest**, v. 106, n. 1, p. 107-16, Jul 2000. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880054>>.

KEIGHTLEY, A. M. et al. Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF:Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4277-83, Jun 1999. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361125>>.

KENTER, A. L.; BIRSHEIN, B. K. Chi, a promoter of generalized recombination in lambda phage, is present in immunoglobulin genes. **Nature**, v. 293, n. 5831, p. 402-4, Oct 1981. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6456417>>.

KOPPELMAN, S. J. et al. Requirements of von Willebrand factor to protect factor VIII from inactivation by activated protein C. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2292-300, Mar 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630390>>.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct 1991. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681511>>.

LIPPI, G. et al. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. **Semin Thromb Hemost**, v. 35, n. 1, p. 9-22, Feb 2009. ISSN 1098-9064. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308889>>.

LUCHTMAN-JONES, L.; BROZE, G. J. The current status of coagulation. **Ann Med**, v. 27, n. 1, p. 47-52, Feb 1995. ISSN 0785-3890. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7741998>>.

LYKKE-ANDERSEN, J.; SHU, M. D.; STEITZ, J. A. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1121-31, Dec 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163187>>.

LYONS, S. E. et al. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. **J Biol Chem**, v. 267, n. 7, p. 4424-30, Mar 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537829>>.

MALÝ, M. A. et al. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. **Physiol Res**, v. 56, n. 6, p. 685-95, 2007. ISSN 0862-8408. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17087602>>.

MANCUSO, D. J. et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. **Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 253-69, Jan 1991. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1988024>>.

MARCUS, A. J.; SAFIER, L. B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **FASEB J**, v. 7, n. 6, p. 516-22, Apr 1993. ISSN 0892-6638. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8472890>>.

MAZURIER, C. et al. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 2, p. 337-47, Jun 2001. ISSN 1521-6926. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686103>>.

MEIRELES, M. R. et al. Molecular characterization of haemophilia B patients in southern Brazil. **Haemophilia**, v. 23, n. 5, p. e457-e461, 09 2017. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722788>>.

MEYER, D. et al. Gene defects in 150 unrelated French cases with type 2 von Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease. **Thromb Haemost**, v. 78, n. 1, p. 451-6, Jul 1997. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9198195>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil 2016**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Brasília: Ministério da Saúde 2018.

MOHRI, H. et al. Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. **J Biol Chem**, v. 263, n. 34, p. 17901-4, Dec 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461363>>.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrhosis. **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 1, p. 1-9, Feb 2009. ISSN 1557-8224. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150304>>.

NG, C.; MOTTO, D. G.; DI PAOLA, J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. **Blood**, v. 125, n. 13, p. 2029-37, Mar 2015. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712990>>.

NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 3, p. 369-83, Jun 2003. ISSN 1521-6934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787532>>.

NYMAN, D. et al. Recent investigations of the first bleeder family in Aland (Finland) described by von Willebrand. **Thromb Haemost**, v. 45, n. 1, p. 73-6, Feb 1981. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6972630>>.

PATHARE, A. et al. Bleeding score in Type 1 von Willebrand disease patients using the ISTH-BAT questionnaire. **Int J Lab Hematol**, v. 40, n. 2, p. 175-180, Apr 2018. ISSN 1751-553X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29115727>>.

PEYVANDI, F. et al. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. **Haemophilia**, v. 12 Suppl 3, p. 82-9, Jul 2006. ISSN 1351-8216. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684001>>.

RIBBA, A. S. et al. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 3, p. 848-54, Sep 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583318>>.

RIDDEL, J. P. et al. Theories of blood coagulation. **J Pediatr Oncol Nurs**, v. 24, n. 3, p. 123-31, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1043-4542. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475978>>.

RIMMER, E. K.; HOUSTON, D. S. Bleeding by the numbers: The utility and the limitations of bleeding scores, bleeding prediction tools, and bleeding case definitions. **Transfus Apher Sci**, v. 57, n. 4, p. 458-462, Aug 2018. ISSN 1473-0502. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30037523>>.

ROSNOBLET, C. et al. Storage of tissue-type plasminogen activator in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 7, p. 1796-803, Jul 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397700>>.

ROSSET, C. et al. Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate haemophilia A patients from southern Brazil. **Haemophilia**, v. 19, n. 5, p. 773-81, Sep 2013. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711237>>.

RUGGERI, Z. M. et al. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. **N Engl J Med**, v. 302, n. 19, p. 1047-51, May 1980. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6767976>>.

RYDZ, N. et al. Changes in von Willebrand factor level and von Willebrand activity with age in type 1 von Willebrand disease. **Haemophilia**, v. 21, n. 5, p. 636-41, Sep 2015. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756206>>.

RÖHSIG, L. M. et al. von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 9, p. 1125-9, Sep 2001. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514835>>.

SADLER, J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 395-424, 1998. ISSN 0066-4154. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759493>>.

SADLER, J.E. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2089-93, Mar 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411289>>.

SADLER, J. E. et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. **J Thromb Haemost**, v. 4, n. 10, p. 2103-14, Oct 2006. ISSN 1538-7933. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889557>>.

SADLER, J. E.; GINSBURG, D. A database of polymorphisms in the von Willebrand factor gene and pseudogene. For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost**, v. 69, n. 2, p. 185-91, Feb 1993. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456432>>.

SCHNEPPENHEIM, R. et al. Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. **Hum Genet**, v. 94, n. 6, p. 640-52, Dec 1994. ISSN 0340-6717. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989040>>.

SCHWARTSMANN, G.; DAMIN, D. C.; ROISEMBERG, I. Malignant disease and von Willebrand factor. **Lancet Oncol**, v. 2, n. 12, p. 716-7, Dec 2001. ISSN 1470-2045. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902510>>.

SIMON, D.; BANDINELLI, E.; ROISEMBERG, I. Von Willebrand factor gene polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. **Hum Biol**, v. 72, n. 6, p. 1055-63, Dec 2000. ISSN 0018-7143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11236861>>.

SIMON, D. et al. Polymorphism in the promoter region of von Willebrand Factor gene and von Willebrand Disease Type 1. **Genet Mol Biol**: 2003.

SIMON, D.; PALATNIK, M.; ROISENBERG, I. Analysis of the -1185A/G von Willebrand factor (VWF) gene polymorphism in two Brazilian ethnic groups and its effect on the plasma VWF levels. **Thromb Res**, v. 105, n. 6, p. 519-22, Mar 2002. ISSN 0049-3848. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091053>>.

SIMON, D. et al. Association studies between -1185A/G von Willebrand factor gene polymorphism and coronary artery disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 6, p. 709-14, Jun 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792699>>.

SIMON, D.; ROISENBERG, I. Type 2N von Willebrand disease mutations in Brazilian individuals. **Haemophilia**, v. 10, n. 5, p. 473-6, Sep 2004. ISSN 1351-8216. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357773>>.

STASSEN, J. M.; ARNOUT, J.; DECKMYN, H. The hemostatic system. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 17, p. 2245-60, Sep 2004. ISSN 0929-8673. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379710>>.

SURDHAR, G. K. et al. Homozygous gene conversion in von Willebrand factor gene as a cause of type 3 von Willebrand disease and predisposition to inhibitor development. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 248-50, Jul 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439975>>.

SUTHERLAND, M. S. et al. The mutation spectrum associated with type 3 von Willebrand disease in a cohort of patients from the north west of England. **Haemophilia**, v. 15, n. 5, p. 1048-57, Sep 2009. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601990>>.

TSAI, H. M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4235-44, May 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639782>>.

TUDDENHAM, E. G. Factor VIII and haemophilia A. **Baillieres Clin Haematol**, v. 2, n. 4, p. 849-77, Oct 1989. ISSN 0950-3536. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513009>>.

VAN MOURIK, J. A.; ROMANI DE WIT, T. Von Willebrand factor propeptide in vascular disorders. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 1, p. 164-71, Jul 2001. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487004>>.

VEYRADIER, A. et al. A Laboratory Phenotype/Genotype Correlation of 1167 French Patients From 670 Families With von Willebrand Disease: A New Epidemiologic Picture. **Medicine (Baltimore)**, v.

95, n. 11, p. e3038, Mar 2016. ISSN 1536-5964. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26986123>>.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, n. 1, p. 1-7, Jan 2009. ISSN 1539-2864. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050668>>.

VISCHER, U. M.; BARTH, H.; WOLLHEIM, C. B. Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 3, p. 883-91, Mar 2000. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712417>>.

VOORBERG, J. et al. Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. **J Cell Biol**, v. 113, n. 1, p. 195-205, Apr 1991. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007623>>.

VOORBERG, J. et al. Domains involved in multimer assembly of von willebrand factor (vWF): multimerization is independent of dimerization. **EMBO J**, v. 9, n. 3, p. 797-803, Mar 1990. ISSN 0261-4189. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2311582>>.

WAGNER, D. D. Cell biology of von Willebrand factor. **Annu Rev Cell Biol**, v. 6, p. 217-46, 1990. ISSN 0743-4634. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2275814>>.

WAGNER, D. D. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. **Thromb Haemost**, v. 70, n. 1, p. 105-10, Jul 1993. ISSN 0340-6245. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694385>>.

WAGNER, D. D.; MARDER, V. J. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. **J Biol Chem**, v. 258, n. 4, p. 2065-7, Feb 1983. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6600453>>.

WILCOX, J. N. et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 8, p. 2839-43, Apr 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2704749>>.

XU, Y. et al. Relative contributions of bleeding scores and iron status on health-related quality of life in von Willebrand disease: a cross-sectional study. **Haemophilia**, v. 23, n. 1, p. 115-121, Jan 2017. ISSN 1365-2516. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27611464>>.

YADEGARI, H. et al. Mutation distribution in the von Willebrand factor gene related to the different von Willebrand disease (VWD) types in a cohort of VWD patients. **Thromb Haemost**, v.

108, n. 4, p. 662-71, Oct 2012. ISSN 2567-689X. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871923>>.

ZHANG, X. et al. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1330-4, Jun 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498171>>.

ZHANG, Z. P. et al. Identification of a new nonsense mutation in the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III. **Hum Mol Genet**, v. 1, n. 1, p. 61-2, Apr 1992. ISSN 0964-6906. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1301136>>.

ZIMMERMAN, T. S. et al. Determination of the von Willebrand's disease antigen (factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis. **J Lab Clin Med**, v. 86, n. 1, p. 152-9, Jul 1975. ISSN 0022-2143. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1080496>>.

<http://www.eclinpath.com/hemostasis/physiology/primary-hemostasis/print-11/> acesso em 11 de março de 2015.

ANEXO 1

Parecer consubstanciado ao CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Problemas de hemostasia no Rio Grande do Sul: Prevalência e caracterização molecular da Hemofilia B e da Doença de Von Willebrand

Pesquisador: FRANCISCO MAURO SALZANO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 45164015,3.0000,5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.359.825

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores atenderam as solicitações. Assim, recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa. Sugere-se aos pesquisadores substituir no TCLE o número da Resolução, de 196/12 para 466/12, e a palavra "cópia" por "via".

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo principal dar continuidade às pesquisas iniciadas há mais de meio século sobre os distúrbios de hemostasia que ocorrem em nosso meio; e mais especificamente seria uma continuação do Projeto de Pesquisa 15667 – "Coagulopatias hereditárias frequentes: melhorias no diagnóstico da doença de von Willebrand e suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia A grave", registrado no sistema de pesquisa da UFRGS e cujo prazo se encerrou em 30/12/2014.

O Projeto de pesquisa atual está dividido em dois Subprojetos:

1. Subprojeto 1: Caracterização molecular das mutações em pacientes com Hemofilia B; e
2. Subprojeto 2: Caracterização molecular das mutações em pacientes com a Doença de von

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 91.040-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Problemas de hemostasia no Rio Grande do Sul: Prevalência e caracterização molecular da Hemofilia B e da Doença de Von Willebrand

Pesquisador: FRANCISCO MAURO SALZANO

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 45164015.3.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.359.825

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores atenderam as solicitações. Assim, recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa. Sugere-se aos pesquisadores substituir no TCLE o número da Resolução, de 196/12 para 466/12, e a palavra "cópia" por "via".

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem como objetivo principal dar continuidade às pesquisas iniciadas há mais de meio século sobre os distúrbios de hemostasia que ocorrem em nosso meio; e mais especificamente seria uma continuação do Projeto de Pesquisa 15667 – "Coagulopatias hereditárias frequentes: melhorias no diagnóstico da doença de von Willebrand e suscetibilidade ao desenvolvimento de inibidores em hemofilia A grave", registrado no sistema de pesquisa da UFRGS e cujo prazo se encerrou em 30/12/2014.

O Projeto de pesquisa atual está dividido em dois Subprojetos:

1. Subprojeto 1: Caracterização molecular das mutações em pacientes com Hemofilia B; e
2. Subprojeto 2: Caracterização molecular das mutações em pacientes com a Doença de von

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farrowilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3730 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.359.825

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_513415.pdf	03/12/2015 10:02:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/09/2015 11:12:55	FRANCISCO MAURO SALZANO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Problemas de Hemostasia, RS.pdf	13/07/2015 12:57:50		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO (Assinada).pdf	14/06/2015 11:18:23		Aceito
Outros	Carta Aceite (HEMOCENTRO).pdf	13/05/2015 13:06:29		Aceito
Outros	ParecerCOMPESQ.pdf	13/05/2015 13:05:23		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Dezembro de 2015

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Fátima CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: wica@propesq.ufrgs.br

Página 03 de 03

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Problemas de hemostasia no Rio Grande do Sul – Prevalência e caracterização molecular da Hemofilia B e da Doença de von Willebrand”

Coordenador: Francisco M. Salzano

Pesquisadores: Eliane Bandinelli, Ana Paula M. Ornaghi, Mariana R. Meireles

Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INFORMAÇÕES

O Departamento de Genética da UFRGS está desenvolvendo o Projeto de Pesquisa indicado acima. O objetivo é investigar de maneira mais aprofundada os fatores genéticos responsáveis por essas doenças. A participação no estudo envolve informações familiares e clínicas, bem como a doação de 5 ml de sangue, que será utilizado para a realização dos testes de coagulação (dosagens do Fator VIII e outros de natureza diagnóstica) e extração do DNA, o material genético.

O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade. Toda a participação neste estudo é absolutamente sigilosa, bem como os resultados da avaliação clínica e dos exames genéticos. É permitida a desistência em qualquer etapa da avaliação, sem qualquer tipo de prejuízo ao participante. O estudo será financiado por verba de agências de fomento, sendo que nenhum custo incidirá sobre o paciente ou seus familiares.

O material genético excedente poderá ser armazenado ou não, conforme a decisão de cada paciente. O material que ficar armazenado poderá ser utilizado em novos exames ou para uso em novas pesquisas. No caso de serem propostas novas pesquisas com este material, elas serão avaliadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa local e nacional.

Garantimos que todos esses procedimentos estão de acordo com as normas previstas nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12 e nº 347/05, e que lhe será entregue uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os resultados dos exames serão comunicados aos participantes logo que finalizados, e qualquer esclarecimento a respeito estará à disposição com os pesquisadores acima indicados no Laboratório de Hemostasia, Departamento de Genética, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43-323, telefone 3308-6728. E-mails: francisco.salzano@ufrgs.br e eliane.bandinelli@ufrgs.br.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Problemas de hemostasia no Rio Grande do Sul Prevalência e caracterização molecular da Hemofilia B e da Doença de Von Willebrand

Eu, _____ (ou meu responsável legal), declaro que fui convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. Fui informado de que minha decisão em participar não comprometerá meu tratamento, sendo meus dados e os resultados de meus testes absolutamente sigilosos. Além disso, fui informado de que a qualquer momento posso solicitar desistência do estudo, sem qualquer prejuízo para meu tratamento.

Declaro que consinto em participar do estudo e que meus dados sejam incluídos na análise coletiva dos resultados.

Com relação ao armazenamento de material genético eu declaro que:

SIM: Autorizo manter meu material genético excedente (DNA) armazenado, sabendo que poderá ser usado, no futuro, para novas pesquisas, as quais serão aprovadas pelo Comitê de Ética.

NÃO: Não autorizo armazenar meu material genético após este exame.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2016.

Assinatura: _____

Nome: _____

ANEXO 3
CADASTRO DE PACIENTE

Genealogia nº _____ Paciente nº _____ Probando: Sim () Não () ABO _____ Rh+ _____
Nome: _____ Sexo: M () F ()
Idade: _____ Data de Nascimento: _____
Local de Nascimento: _____ Grupo étnico: Cauc() Negr() Outro()
Endereço: _____ Bairro: _____
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____
Nome do pai: _____
Idade: _____ Local de nascimento: _____ Vivo: Sim () Não ()
Causa de falecimento: _____
Pais consanguíneos: Sim() Não() Grau: _____
Origem: _____ Informante: _____
Entrevistador: _____ Data: ____/____/____

HISTÓRIA CLÍNICA

Sintomas (S-Sim; N-Não; P-Prejudicado; R-Raro)

- ()1- Primeira dentição ()2- Dentição Definitiva ()3- Equimoses e/ou hematomas
()4- Hemartroses ()5- Epistases ()6- Gengivorragias
()7- Hematúria ()8- Melena ()9- Hematemese
()10- Cortes ()11- Cirurgias ()12- Hipertmenorréia
()13- Outras hemorragias: _____

Primeiro sintoma (1-13): _____ Idade: _____

Tratamentos: Fator VIII () Crioprecipitado () Fator IX () Causas (1-13) _____

Último tratamento: menos de 7 dias () entre 7 e 15 dias () mais de 15 dias ()

Causa do encaminhamento atual:

Clínico (1-13): _____

Familiar: sim () não ()

Laboratorial: sim () não ()

Diagnóstico: sim () não ()

Diabetes Mellitus pessoal: sim () não () Diabete Mellitus familiar: sim () não ()

Outros afetados na família: sim () não ()

Possível diagnóstico: Hemofilia A () Hemofilia B () DvW () Outro: _____

ANEXO 4

Primers utilizados no sequenciamento de Sanger

Tabela S2: Sequências de primers senso e anti-senso utilizados para amplificar os 52 éxons do gene de *VWF*. Para o éxon 28 foi utilizado 2 pares de primers (28a e 28b), um para a síntese da metade inicial do éxon e o outro para a síntese da metade final, pois é um éxon extenso.

ExonFv	Sequencia de Primer Senso	Sequencia de Primer Anti-Senso
Promotor 1	GGTGGAAATGTCCTTGAG	GGTATTAGAAGTACCTCC
Promotor 2	CATGCTGATTCTGCCTCTG	GTTGAATGGACTGGCTAAAG
Promotor 3	AGAGCTGGAAGTGGAAATCC	TGAGAAACCACTAGGTTCCAA
1	AAGACCAGGGATCAAGTGTG	ATCAGTCAGTCCTGCATCTTC
2	CCTGGGACTGCTGTCTGTG	GTCTCTGGAATACAAGTCAA
3	TTCTATCAGAGGCAGTCTAAT	CCTTTCCACTCAGACACTGT
4	TGGGGCGTTTTCTGCTGAG	CATGTTGTAGGGTTCAGAAC
5	TGATCTAGGTCCTCAGCCACT	CAGGGAAGGCATGTTAGTGA
6	CTCCTGTGCTGCTCAGTAGT	GAAATGGCCCTGCGTAAGT
7	TTCCCTAGCAGGGCTAAGTC	CCGCACATACGTGACACAG
8	GAGAGGCTCAGGCTGTGG	GCAAACACAAGTGGCCTTC
9	ACACCACAGAACAAGTTCT	ACCAGTAGCCTCCAACCTCA
10	ATTCTGCTAGCACCAGCTCT	AACTTCTCGCTGCCTTGAGT
11	AAGGACGTCCATGCAGTTTT	GAGCTAACTGAAGTCTGGA
12	TTGAGGCCTTTCTCTGATTAA	GGCATGCAGGTCCCTTAAGGA
13	CATTGCTCTTCAGTGCTACC	CAGAGCACAAGGGGTACTTT
14	TTTACACTGCAGTTCACTTTCC	ACTGCCTCCGGAACGCACT
15	CTATTAGCAGCACTGGGCT	GTGCTGAACGAACACTAGGT
16	TTGGGGGTCACAGCTACAA	CCGTTTTCTCCCCAGCTC
17	CATTGGTAACGTTAGCAAGCT	ATTCCACACGTGAGGAATCT
18	CAGTGTGGAAGGTAGGTCCAT	CTCACTCATCCCTGCCTACA
19	TTACCCGTAGGCTCAAGTCT	CAAGTGCGGAAGGTCCCTGT
20	CCACGCTACAGGTCCTCAACTTCCTT	TTCTGCAGACAGATCCACAGAAC
21	GTACTIONAAAGGCCTGTGATGA	CATTACACCAGCTCTAAATG
22	CGTGGGCACTGAAGACAGAT	ACGTGCAGAGACATACATAG
23	AAGGAAGCTCAGGAATGGGT	ACTCTGTGTCCATAACCACCA
24	AGTGTGCTGACACCAGAA	ACACTCTGTGTCCATAACCA
25	AGAGTCTAGGCCCTATTGTC	ATGCAGTCCCTACTAACACT
26	GGTGACGCCCATAGTCCCC	TTCAATACAACATTCCCCCAC
27	AGAGATGCTCCTTGAGTGAT	TACCCAAAACCTAGTCTCTA
28a	ACTGTAGGGCTCAGAAGTGT	CACAGTGACTTGTGCCATGT
28b	CAAAGGGACGAGATCGTTAGCT	GATGCATGTAGCACCAGG

29-31	ATTGCCCTTGTACTIONCACGA	ATCCAAAAGTAACCCACGC
32	CAGCTCATTAAATATCTGTTGA	CCCATGAACAGAACTTAAAG
33-34	CTATGTCTCCACTGTAAACC	TGAGACTGGCTGCATGCAT
35	CAGAGCCCCAGTTTCCTAA	CTGAGCCCCGGAACAACATGAA
36	GTCAAGCTCTGTAAAGTCA	ATTGGCTCCGTTCTCATCA
37	ACCTTACTTGCTCTACTCTG	GATAAAGAATCTGGGGCACACA
38	AGCTGCAAGAAAGGTTGGGA	GTAAGAGTCAACCCTGCTG
39	GAATTCTGGGCTTCGTACCT	CTAGTAGGAGTTCTGTACGGT
40	GAATTCTGGGCTTCGTACC	CTTACCCACCTCCTTTTAC
41	CAGTAGAAGTCTGCATGAATA	GGATGGGCAGAAATAAAGATT
42	GCACCCTATAGCATAGCTGA	CTTAGTACATAGTAGGCTCAC
43	TGCATATGGGCGGAGACCA	GGCGACAGAGCGAGTCTC
44	GAAAATGCCAGACCAGTGAT	ATGAAACCAAGGTCAACGCTG
45	CCTGTGGTGGGACTTACATGTTA	TCAGGAGCCAAAAGTGGAAAGAG
46	GGAAAGGGCCGACCGATAC	GGCCAGGAAGTGAGTGTGA
47	GGAAGGCAGTGGGCCATAGGA	TCCCACACGCGTCCAGTC
48	GAGAGGCCAGCAAAAATCAG	CTTAGCCCCTCTTCCTTGAA
49-50	CACTGTCTTCTTGTTTCATG	TGCAAAGAGCCCCTGGACTTG
51	GACCTATTTCCAGCCCAGT	CTGATCTCACCCAGAAGCA
52	TTGGAGGGGGTTCAGGGAGAA	CTGCCACCGTTGCCATCTC

ANEXO 5

Amplicons utilizados no NGS

Request_ID	Target_ID	Gene_Symbol	Chromosome	Chr_Start	Chr_End	Num_Amplicons	Total_Bases	Covered_Bases	Missed_Bases	Coverage
IAD139627	191125	VWF	chr12	6076647	6076773	1	127	127	0	1
IAD139627	191130	VWF	chr12	6090947	6091162	2	216	216	0	1
IAD139627	191131	VWF	chr12	6092311	6092425	1	115	115	0	1
IAD139627	191132	VWF	chr12	6094206	6094290	1	85	85	0	1
IAD139627	191133	VWF	chr12	6094724	6094836	1	113	113	0	1
IAD139627	191141	VWF	chr12	6125250	6125403	1	154	154	0	1
IAD139627	191142	VWF	chr12	6125677	6125827	1	151	151	0	1
IAD139627	191143	VWF	chr12	6125915	6126041	1	127	127	0	1
IAD139627	191145	VWF	chr12	6131061	6131206	1	146	146	0	1
IAD139627	191168	VWF	chr12	6220027	6220139	1	113	113	0	1
IAD139627	191123	VWF	chr12	6061552	6061690	1	139	139	0	1
IAD139627	191126	VWF	chr12	6077288	6077338	1	51	51	0	1
IAD139627	191127	VWF	chr12	6078372	6078562	2	191	191	0	1
IAD139627	191135	VWF	chr12	6103023	6103374	3	352	352	0	1
IAD139627	191137	VWF	chr12	6105163	6105393	2	231	231	0	1
IAD139627	191140	VWF	chr12	6122642	6122816	1	175	175	0	1
IAD139627	191146	VWF	chr12	6131901	6132069	1	169	169	0	1
IAD139627	191153	VWF	chr12	6145549	6145662	1	114	114	0	1
IAD139627	191155	VWF	chr12	6155884	6155988	1	105	105	0	1
IAD139627	191163	VWF	chr12	6181492	6181613	1	122	122	0	1
IAD139627	191121	VWF	chr12	6058947	6059054	1	108	108	0	1
IAD139627	191149	VWF	chr12	6135067	6135217	1	151	151	0	1
IAD139627	191156	VWF	chr12	6161704	6161954	2	251	251	0	1
IAD139627	191162	VWF	chr12	6180458	6180514	1	57	57	0	1
IAD139627	191164	VWF	chr12	6182780	6182912	1	133	133	0	1
IAD139627	191129	VWF	chr12	6085272	6085431	1	160	160	0	1
IAD139627	191144	VWF	chr12	6127526	6128914	6	1389	1389	0	1
IAD139627	191150	VWF	chr12	6138503	6138659	1	157	157	0	1
IAD139627	191151	VWF	chr12	6140605	6140749	1	145	145	0	1
IAD139627	191158	VWF	chr12	6167010	6167215	1	206	206	0	1
IAD139627	191166	VWF	chr12	6204621	6204755	1	135	135	0	1
IAD139627	191159	VWF	chr12	6172115	6172225	1	111	111	0	1
IAD139627	191167	VWF	chr12	6219535	6219753	1	219	219	0	1
IAD139627	191122	VWF	chr12	6061005	6061054	1	50	50	0	1
IAD139627	191128	VWF	chr12	6080760	6080880	1	121	121	0	1
IAD139627	191134	VWF	chr12	6100980	6101189	1	210	210	0	1
IAD139627	191147	VWF	chr12	6132792	6132958	1	167	167	0	1
IAD139627	191152	VWF	chr12	6143849	6143997	1	149	149	0	1

IAD139627	191157	VWF	chr12	6166018	6166243	2	226	226	0	1
IAD139627	191160	VWF	chr12	6173407	6173555	1	149	149	0	1
IAD139627	191165	VWF	chr12	6184496	6184722	1	227	227	0	1
IAD139627	191120	VWF	chr12	6058176	6058374	2	199	199	0	1
IAD139627	191124	VWF	chr12	6062657	6062765	1	109	109	0	1
IAD139627	191136	VWF	chr12	6103576	6103778	2	203	203	0	1
IAD139627	191148	VWF	chr12	6134741	6134864	1	124	124	0	1
IAD139627	191154	VWF	chr12	6153452	6153622	1	171	171	0	1
IAD139627	191169	VWF	chr12	6230335	6230509	2	175	175	0	1
IAD139627	191170	VWF	chr12	6232303	6232367	1	65	65	0	1
IAD139627	191138	VWF	chr12	6120778	6120965	1	188	188	0	1
IAD139627	191139	VWF	chr12	6121248	6121301	1	54	54	0	1
IAD139627	191161	VWF	chr12	6174298	6174444	2	147	147	0	1
IAD139627	191139	VWF	chr12	6121248	6121301	1	54	54	0	1
IAD139627	191161	VWF	chr12	6174298	6174444	2	147	147	0	1