



**LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER**

***"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA E DE ALTERAÇÕES  
MOLECULARES DO RECEPTOR HEPÁTICO LRP1 E SUA  
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FATOR VIII"***

**CAMPINAS**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER**

***"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA E DE ALTERAÇÕES  
MOLECULARES DO RECEPTOR HEPÁTICO LRP1 E SUA  
CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FATOR VIII"***

**Orientadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELO ALUNO LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI**

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B548a Bittar, Luis Fernando, 1980-  
Avaliação da expressão proteica e de alterações moleculares do receptor hepático LRP1 e sua correlação com os níveis plasmáticos de fator VIII / Luis Fernando Bittar Sckayer. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tromboembolia venosa. 2. Inflamação. 3. Síndrome pós-trombótica. 4. Fator de von Willebrand. 5. Fator VIII. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of protein expression and molecular changes of hepatic LRP1 receptor and its correlation with plasma levels of factor VIII

**Palavras-chave em inglês:**

Venous thromboembolism

Inflammation

Post-thrombotic syndrome

Von Willebrand factor

Factor VIII

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Vânia Maris Morelli

Suely Meireles Rezende

Erich Vinícius de Paula

Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

**Data de defesa:** 19-12-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

---

## MEMBROS:

---

1. PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI



2. PROF(A). DR(A). VANIA MARIS MORELLI



3. PROF(A). DR(A). SUELY MEIRELES REZENDE



4. PROF(A).DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



5. PROF(A).DR(A). FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI



---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 19 de dezembro de 2013

---



## **DEDICATÓRIA**

À minha família, alicerces não apenas da minha existência, mas também das minhas conquistas.





## AGRADECIMENTOS

Á Deus que me deu o dom da vida e me concedeu esta grande oportunidade, satisfazendo os sonhos do meu coração e me fortalecendo nos momentos que mais precisei.

À Profa. Dra. Joyce, que desde o início desta jornada depositou confiança em mim, investiu em meu potencial, sempre me orientando e ensinando de forma atenciosa, carinhosa, encorajadora e exemplar.

Ao Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula pelos constantes ensinamentos, pelas motivações ao longo desta caminhada e por todo apoio.

Aos funcionários e estagiárias do Laboratório de Hemostasia que foram verdadeiros apoios para várias etapas deste projeto.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia, em especial a Elaine e Francesca pelo auxílio na coleta de amostras.

Á Dra. Adriana Duarte pela importante contribuição na padronização da digestão tecidual com collagenase.

Aos funcionários do serviço de gastrocirurgia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, em especial aos Prof. Dr. Elinton Adami Chaim e Dr. Martinho Antônio Gestic pela colaboração na aquisição das biópsias de fígado.

Ás funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro, Ana Lêda, Irene e Janine pela contribuição nas análises de citometria de fluxo.

Às Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, Dra. Suely Meireles Rezende, Dra. Vânia Maris Morelli, Dra. Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, e aos Profs. Dr. Fernando Ferreira Costa e Dr. Erich Vinícius de Paula, pelas excelentes e valiosas sugestões emitidas no exame de qualificação e na defesa da tese.

Aos pacientes e controles que aceitaram participar deste estudo.

Ao estatístico Roberto Zulli por toda atenção, ajuda e ensinamento com os cálculos e análises estatísticas deste projeto, sempre muito prestativo e dedicado.

À secretária da pós-graduação, Regina por toda orientação e apoio.

À minha família por todo incentivo e amor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS) pelo apoio financeiro.

**Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, bolsa de doutorado  
(processo nº: 2009/53543-6).**



## SUMARIO

<b>Resumo</b>	<b>27</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>35</b>
1.1 Tromboembolismo Venoso	37
1.2 Síndrome Pós-Trombótica	38
1.3 Fator VIII	40
1.4 O Receptor LRP1	44
1.5 O Papel do Receptor LRP1 no <i>Clearance</i> do Fator VIII	45
<b>2. Justificativa</b>	<b>51</b>
<b>3. Objetivos I</b>	<b>55</b>
<b>4. Casuística I</b>	<b>59</b>
4.1 Casuística I - Pacientes com TEV e Controles	61
<b>5. Metodologia I</b>	<b>65</b>
5.1 Metodologia I - Pacientes com TEV e Controles	67
5.1.1 Dosagem plasmática da atividade do Fator VIII	67
5.1.2 Dosagem sérica de Proteína C Reativa (PCR)	68
5.1.3 Tipagem sanguínea ABO	68
5.1.4 Classificação da Síndrome Pós-Trombótica	68
5.1.5 Extração de DNA	69
5.1.6 Reação em Cadeia da Polimerase	71
5.1.7 Sequenciamento de DNA	72
5.3 Análise estatística	74
<b>6. Resultados I</b>	<b>75</b>
6.1 Resultados I - Pacientes com TEV e Controles	77
<b>7. Discussão I</b>	<b>89</b>
7. Discussão Geral	91
7.1 - Pacientes com TEV e Controles	92
7.1.1 Características Clínicas	92
7.1.2 Fator VIII e Inflamação	92

7.1.3 Níveis plasmáticos de FVIII e síndrome pós-trombótica	95
7.1.4 Avaliação dos genes do FVIII e do LRP1	97
<b>3. Objetivos II</b>	<b>101</b>
<b>4. Casuística II</b>	<b>105</b>
4.1 Casuística II - Voluntários para biópsia hepática	107
<b>5. Metodologia II</b>	<b>109</b>
5.2 Metodologia II - Voluntários para biópsia hepática	111
5.2.1 Dosagem plasmática da atividade do Fator VIII	111
5.2.1 Dosagem plasmática do antígeno do Fator VIII	112
5.2.2 Dosagem plasmática do antígeno do Fator de von Willebrand	112
5.2.3 Dosagem sérica de Proteína C Reativa (PCR)	113
5.2.4 Tipagem sanguínea ABO	114
5.2.5 Digestão Tecidual Hepática com Colagenase tipo I	114
5.2.6 Citometria de Fluxo de Células Hepáticas	115
5.3 Análise estatística	119
<b>6. Resultados II</b>	<b>121</b>
6.2 Resultados II - Voluntários para biópsia hepática	123
<b>7. Discussão II</b>	<b>131</b>
7.2 - Voluntários para biópsia hepática	133
7.2.1 Avaliação da expressão protéica do LRP1 no fígado	133
7.2.2 Avaliação das dosagens de FVIII, FvW e PCR	138
<b>8. Conclusões</b>	<b>141</b>
<b>9. Referências Bibliográficas</b>	<b>145</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>173</b>
<b>11. Material Suplementar</b>	<b>183</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
aa	Aminoácidos
ACH	Anticoncepcional hormonal
APC	Aloficocianina
ASGPR	Receptor de asiloglicoproteína
AT	Antitrombina
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CEAP	Classificação Clínica Etiológica Anatômica Patofisiológica
CR	<i>Complement-type repeat</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; ácido dexorribonucléico
dNTP	deoxibucleotídeos trifosfato
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i>
EP	Embolia pulmonar
<i>et al.</i>	E outros (as)
FITC	Fluoresceína
FT	Fator tecidual
FII	Fator II da coagulação ou Protrombina

FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII da coagulação
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII ativado
FIX	Fator IX da coagulação
FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI da coagulação
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII da coagulação
FXIIa	Fator XII ativado
FXIII	Fator XIII da coagulação
FXIIIa	Fator XIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteínas de alto peso molecular



HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-11	Interleucina 11
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodaltons
LDL	Lipoproteínas de baixo peso molecular
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor–related protein 1</i>
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MIF	Média de intensidade de fluorescência
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio

NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de amônio
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; reação em cadeia da polimerase
PCR	Proteína C reativa
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PE	Ficoeritrina
pmol	Picomol
PS	Proteína S
RAP	<i>Receptor-associated protein</i>
Rho	Coefficiente de correlação de Spearman
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Real Time - Polymerase chain reaction</i>
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípido
SDS	Dodecil sulfato de sódio

sLRP1	LRP1 solúvel
SPT	Síndrome pós-trombótica
TBE	Tampão Trizma/ácido bórico/ EDTA
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i> ; inibidor da via do fator tecidual
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - alfa
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
TRH	Terapia de reposição hormonal
TVP	Trombose venosa profunda
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por mililitro
UI/dL	Unidade Internacional por decilitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrômetro
U/mL	Unidade por mililitro
u-PA	Ativador uroquinase do plasminogênio
VLDL	Lipoproteínas de baixíssimo peso molecular
VLDLR	<i>Very low density lipoprotein receptor</i>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração esquemática da cascata da coagulação	<b>41</b>
<b>Figura 2A:</b> Esquema da estrutura proteica do LRP1 e suas regiões de afinidade pelo FVIII	<b>48</b>
<b>Figura 2B:</b> Esquema da estrutura proteica do FVIII e suas regiões de afinidade pelo LRP1	<b>48</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema de seleção dos pacientes com TEV e controles	<b>62</b>
<b>Figura 4:</b> A mutação C 2767 T (Arg767Arg) no éxon 14 do gene do LRP1	<b>81</b>
<b>Figura 5:</b> A mutação C 2805 T (Thr780Ile) no éxon 14 do gene do LRP1	<b>82</b>
<b>Figura 6:</b> A mutação C 2870+167 T no íntron 14 do gene do LRP1	<b>82</b>
<b>Figura 7:</b> A mutação C 2870+197 T no íntron 14 do gene do LRP1	<b>82</b>
<b>Figura 8:</b> A mutação G 2996+26 A no íntron 15 do gene do LRP1	<b>82</b>
<b>Figura 9:</b> A mutação C 3137+54 T no íntron 16 do gene do LRP1	<b>83</b>
<b>Figura 10:</b> O Polimorfismo G 3137+81 A no íntron 16 do gene do LRP1	<b>83</b>
<b>Figura 11:</b> A mutação G 3137+111 A no íntron 16 do gene do LRP1	<b>83</b>
<b>Figura 12:</b> A mutação G 3264-172 A no íntron 17 do gene do LRP1	<b>84</b>
<b>Figura 13:</b> A mutação C 3264 - 3 T no íntron 17 do gene do LRP1	<b>84</b>
<b>Figura 14:</b> A mutação G 3376 (Ser970Ser) A no éxon 18 do gene do LRP1	<b>84</b>
<b>Figura 15:</b> O polimorfismo T 3380+114 C no íntron 18 do gene do LRP1	<b>84</b>
<b>Figura 16:</b> A mutação T 1444 - 22 C no íntron 9 do gene do FVIII	<b>85</b>
<b>Figura 17:</b> A mutação C 7053 + 32 (2332 +32) T na região 3' UTR do gene do FVIII	<b>85</b>
<b>Figura 18:</b> Estratégia de análise dos hepatócitos	<b>117</b>
<b>Figura 19:</b> Estratégia de análise das células de Kupffer	<b>118</b>
<b>Figura 20:</b> Estratégia de análise das células endoteliais sinusoidais	<b>119</b>
<b>Figura 21:</b> Dosagens plasmáticas de FVIII e FvW nas 3 coletas realizadas	<b>125</b>

## CONTINUAÇÃO DA LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 22:</b> Associação entre a idade x FVIII, FVIII:Ag, FvW e PCR basais nos voluntários	<b>126</b>
<b>Figura 23:</b> Correlação entre a expressão do LRP1 Total e o FVIII Coleta II	<b>128</b>
<b>Figura 24:</b> Associação entre os níveis plasmáticos do antígeno e atividade do FVIII	<b>128</b>
<b>Figura 25:</b> Associação entre os níveis plasmáticos de FVIII (atividade) x FvW	<b>129</b>
<b>Figura 26:</b> Associação entre os níveis plasmáticos de FVIII (antígeno) x FvW	<b>129</b>
<b>Figura 27:</b> Associações entre o marcador inflamatório PCR e os níveis de FVIII e FvW na Coleta I (pré-operatório)	<b>130</b>
<b>Figura 28:</b> Associações entre o marcador inflamatório PCR e os níveis de FVIII e FvW na Coleta III (12 horas de pós operatório)	<b>130</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características clínicas de pacientes com TEV e controles	<b>77</b>
<b>Tabela 2:</b> Medianas de FVIII e PCR em pacientes com TEV e controles em 2004 e 2011:	<b>78</b>
<b>Tabela 3:</b> Comparação de características clínicas e laboratoriais entre pacientes com níveis de FVIII acima e abaixo do P90	<b>79</b>
<b>Tabela 4:</b> Comparação de características clínicas e laboratoriais entre pacientes com e sem recorrência de TEV	<b>80</b>
<b>Tabela 5:</b> Níveis de FVIII e PCR de acordo com a classificação CEAP	<b>81</b>
<b>Tabela 6:</b> Prevalência das mutações e polimorfismos encontrados no grupo controle e no grupo de pacientes com TEV	<b>87</b>
<b>Tabela 7:</b> Níveis plasmáticos de FVIII de acordo com os genótipos nos pacientes com TEV	<b>88</b>
<b>Tabela 8:</b> Características clínicas entre os grupos de colecistectomia e gastroplastia redutora	<b>123</b>
<b>Tabela 9:</b> Comparação das análises laboratoriais entre os 2 grupos de voluntários	<b>124</b>
<b>Tabela 10:</b> Diferenças das análises laboratoriais entre voluntários caucasoides e afrodescendentes	<b>126</b>
<b>Tabela 11:</b> Correlações entre os níveis plasmáticos de FVIII e a expressão proteica do LRP1 em células hepáticas	<b>127</b>





## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1:</b> Principais polimorfismos do gene do LRP1 estudados na associação com níveis de FVIII e com o TEV	<b>49</b>
<b>Quadro 2:</b> Classes da SPT de acordo com a classificação CEAP	<b>69</b>
<b>Quadro 3:</b> Regiões dos genes do LRP1 e do FVIII analisadas	<b>71</b>
<b>Quadro 4:</b> Informações sobre as alterações moleculares encontradas no estudo	<b>86</b>
<b>Quadro 5:</b> Coletas de sangue periférico dos voluntários para biópsia hepática	<b>108</b>



# Resumo



**Introdução:** Aumento dos níveis de fator VIII (FVIII) é um fator de risco prevalente e independente para tromboembolismo venoso (TEV). Síndrome pós-trombótica (SPT) é uma complicação a longo prazo da trombose venosa profunda (TVP) de membros inferiores, que está presente em 20% -50% dos pacientes, e podem ser associados a um processo inflamatório crônico. O receptor *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) tem sido associado ao catabolismo do FVIII. **Metodologia:** Após uma mediana de 10 anos do primeiro episódio trombótico, avaliamos os níveis de FVIII em 68 pacientes com TEV e níveis elevados prévios deste fator, e 67 controles saudáveis. Posteriormente, foi analisada a presença de SPT em pacientes e sua relação com os níveis plasmáticos de FVIII. Além disso, foram avaliadas as regiões dos genes do FVIII e do LRP1 que codificam as regiões de afinidade entre eles, com o objetivo de verificar se essas alterações moleculares estão associadas aos níveis plasmáticos de FVIII, e com o TEV. Por último, foi avaliada a expressão proteica de LRP1 no fígado de 20 pacientes cirúrgicos. **Resultados:** Após 10 anos do primeiro episódio de TEV, os níveis de FVIII foram significativamente maiores em pacientes quando comparados aos controles (158,0 UI / dL vs 126,1 UI / dL,  $p < 0,001$ ). Pacientes com SPT grave apresentaram níveis aumentados de FVIII (182,0 UI / dL) quando comparados aos pacientes com SPT moderada (155,5 UI / dL,  $p < 0,001$ ) ou sem PTS (154,0 UI / dL,  $p < 0,001$ ). Apesar de encontrarmos 14 alterações moleculares nos genes do FVIII e do LRP1, não foi encontrada nenhuma relação entre essas alterações moleculares e os níveis plasmáticos de FVIII ou com o TEV. Além disso, não foi observada correlação entre a expressão do LRP1 nas células hepáticas e os níveis plasmáticos de FVIII. **Conclusões:** Nós demonstramos um aumento persistente dos níveis de FVIII em um subgrupo de pacientes com TEV, mas de uma magnitude muito menor após 10 anos do

primeiro episódio de TEV. Além disso, observamos uma associação significativa entre o aumento dos níveis plasmáticos de FVIII e SPT grave.

# **Abstract**





**Introduction:** Increased levels of factor VIII (FVIII) are a prevalent and independent risk factor for venous thromboembolism (VTE). Post-thrombotic syndrome (PTS) is a long-term complication of deep venous thrombosis (DVT) of the lower limbs that is present in 20%-50% of patients and can be associated to a chronic inflammatory process. The low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) has been associated with FVIII catabolism. **Methodology:** After a median of 10 years of the first thrombotic episode, we evaluated FVIII coagulation levels in 68 patients with VTE and previous high levels of FVIII and in 67 healthy controls. Subsequently, we analyzed the presence of PTS in patients and its relationship with plasma levels of FVIII. Moreover, we evaluated the regions of FVIII and LRP1 genes encoding regions of affinity between these proteins, with the objective of determining whether these molecular changes are associated with plasma levels of FVIII and VTE. Finally, we evaluated the protein expression of LRP1 in the liver of 20 surgical patients. **Results:** After 10-years median of the first VTE episode, FVIII levels were significantly higher in patients when compared to controls (158.0 IU/dL vs. 126.1 IU/dL;  $p < 0.001$ ). Patients with severe PTS showed increased levels of FVIII (182.0 IU/dL) when compared to patients with moderate PTS (155.5 IU/dL;  $p < 0.001$ ) or no PTS (154.0 IU/dL;  $p < 0.001$ ). Despite we have found 14 molecular changes in the FVIII and LRP1 genes, no relationship was found between these molecular alterations and FVIII levels or VTE. Moreover, no correlation was observed between LRP1 expression in the liver cells and plasma FVIII levels. **Conclusions:** We demonstrated a persistent increase of FVIII levels in a subset of patients with VTE, but in a much lower magnitude after 10 years of the first VTE episode. Moreover, we observed a significant association between increased plasma FVIII levels and severe PTS.



# 1. Introdução



## 1.1 - Tromboembolismo Venoso

A trombose é definida como um processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada do sistema hemostático normal, resultando na formação de um trombo que pode acometer tanto o sistema venoso como o arterial [1]. Os principais fatores envolvidos nesta resposta são a hipercoagulabilidade, estase venosa e alterações na parede vascular [2].

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença frequente, e por vezes, grave e fatal. A incidência do primeiro episódio de TEV aumenta com a idade, sendo de 1/100.000 na infância e de 1/100 em idosos [3], e é semelhante entre homens e mulheres [4].

Estudos norte-americanos demonstraram que afrodescendentes e caucasoides possuem incidências maiores de TEV (29/100.000 e 23/100.000, respectivamente) quando comparados aos hispânicos (14/100.000) e asiáticos (6/100.000) [5-8].

O TEV pode se manifestar como trombose venosa profunda (TVP), superficial e embolia pulmonar (EP). A primeira afeta principalmente as veias profundas de membros inferiores, embora possa acometer outros sítios venosos, tais como os vasos dos membros superiores, cerebrais, abdominais e retina [9].

Em sua fase aguda, a TVP provoca sintomas relacionados à obstrução venosa, tais como: edema, eritema e aumento da temperatura do membro afetado. A principal complicação nesta fase é o possível desprendimento do trombo ou de parte dele, que pode migrar para os vasos pulmonares e provocar a embolia pulmonar [9].

A trombofilia é definida como uma tendência à trombose, decorrente de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos. Os fatores de risco adquiridos clássicos já estabelecidos são: imobilização, gravidez, puerpério, câncer, uso de hormônios estrogênicos, trauma, cirurgia, presença de anticorpo antifosfolípido, dentre outros. A trombofilia hereditária decorre de defeitos genéticos que comprometem os mecanismos de anticoagulação, como a deficiência de proteína C, de proteína S, da antitrombina; ou que levam a um estado pró-coagulante, como a mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden), a mutação G20210A no gene da protrombina [10,11].

A trombofilia hereditária pode ser multigênica, sendo que o risco trombótico parece ser maior em pessoas com coexistência de trombofilias [10-13]. Da mesma forma, ocorre interação entre fatores de risco adquiridos e genéticos, onde observa-se um aumento do risco de trombose quando portadores de trombofilia hereditária são expostos a fatores de risco adquiridos [14,15].

Portanto, o TEV é uma doença multifatorial na qual ocorre uma interação dinâmica entre fatores de risco genéticos e adquiridos. No entanto, em aproximadamente 30% dos casos de TEV não se identifica fatores de risco associados, o que caracteriza o TEV idiopático ou espontâneo [16]. Isto leva a acreditar que existem fatores de risco adicionais para o TEV ainda não identificados.

## **1.2- Síndrome Pós-Trombótica**

A síndrome pós-trombótica (SPT) é uma complicação comum e crônica da TVP de membros inferiores, e se desenvolve em cerca de 20-50% dos pacientes com TVP de membros inferiores, sendo que 5-10 % dos pacientes desenvolvem a forma

grave. A maioria dos casos de SPT desenvolvem-se nos primeiros dois anos após a TVP. Manifestações clínicas da SPT variam de sintomas leves a sinais mais graves, como dor, edema e presença de úlceras no membro afetado. A SPT está associada à morbidade, baixa qualidade de vida e risco aumentado de recorrência [17].

Pacientes com SPT podem apresentar dor, sensação de peso, inchaço, câimbras, prurido ou formigamento no membro afetado. Os sintomas podem ser intermitentes ou persistentes, e tendem a ser agravados em pé ou andando, com melhora com o repouso e elevação da perna. Os sinais clínicos incluem edema, telangiectasias, hiperpigmentação, varizes e eczema venoso. Em casos mais graves podem aparecer úlceras, e estas tendem a ser crônicas, dolorosas, e de difícil cura, e muitas vezes ocorrem recidivas [18].

A fisiopatogenia da SPT decorre da hipertensão venosa que é causada principalmente por três fatores: (i) obstrução do vaso por trombo residual, (ii) destruição de válvulas venosas pelo trombo, (iii) processo inflamatório local agudo que danifica a parede do vaso e as válvulas venosas [19,20].

Em um estudo prospectivo recente, que incluiu 387 pacientes com TVP sintomática aguda, a resolução incompleta dos sintomas nas pernas um mês após a TVP foi um fator preditivo importante para o desenvolvimento da SPT durante os dois anos subsequentes [21]. Conforme resumido em duas revisões recentes, a trombose da veia femoral ou ilíaca (em comparação com TVP distal), antecedente de TVP ipsilateral, e maior índice de massa corporal estão associados a um risco mais elevado de SPT [22,23].

A associação de características clínicas como gênero e idade; e de trombofilias como fator V de Leiden, mutação no gene da protrombina, e deficiência dos anticoagulantes naturais, com o risco para SPT ainda é controversa [24-27].

Pouco se sabe sobre a influência dos níveis de marcadores de inflamação e de hipercoagulabilidade sobre o risco de desenvolvimento da SPT. Estudos recentes demonstraram que níveis elevados de marcadores inflamatórios [28-31] e D-dímero [24, 31-33], logo após o diagnóstico de TVP ou após alguns meses foram associados com o desenvolvimento de SPT.

O papel de fatores da coagulação tais como o fator VIII (FVIII) e o fator de von Willebrand (FvW) na ocorrência da SPT ainda é pouco conhecido e controverso. Goldenberg *et al* [34] mostrou uma associação entre níveis elevados de FVIII e ocorrência de SPT em pacientes pediátricos com TVP. Por outro lado, outros estudos não mostraram qualquer associação entre níveis elevados de FVIII e FvW com a ocorrência de SPT [24,31,35].

### **1.3 - Fator VIII**

O sistema hemostático é responsável não apenas por controlar sangramentos pós-lesão vascular, mas também manter o sangue fluido dentro dos vasos. O ponto central do sistema hemostático é a cascata da coagulação que consiste em uma série de reações enzimáticas, onde zimogênios dos fatores de coagulação são ativados em sequencia, culminando na formação do coágulo de fibrina [36].



A coagulação é iniciada com a exposição do fator tecidual (FT) e consequente formação do complexo FT-Fator VII ativado (FVIIa), que irá ativar o Fator IX (FIX) e Fator X (FX). Logo após a geração das primeiras moléculas de FX ativado (FXa), este é inibido pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI - *tissue factor pathway inhibitor*). Apesar desta rápida inibição, as poucas moléculas de trombina geradas são capazes de ativar o fator XI (FXI). O FXI ativado (FXIa) ativa o fator IX (FIX) que, por sua vez forma um complexo com o FVIII ativado (FVIIIa), para em seguida ativar o FX. O FXa, tendo o fator V ativado (FVa) como cofator, converte a protrombina (FII) em trombina. A trombina por sua vez atua sobre o fibrinogênio, convertendo-o em monômeros de fibrina, que serão polimerizados para formar o coágulo de fibrina. [36].

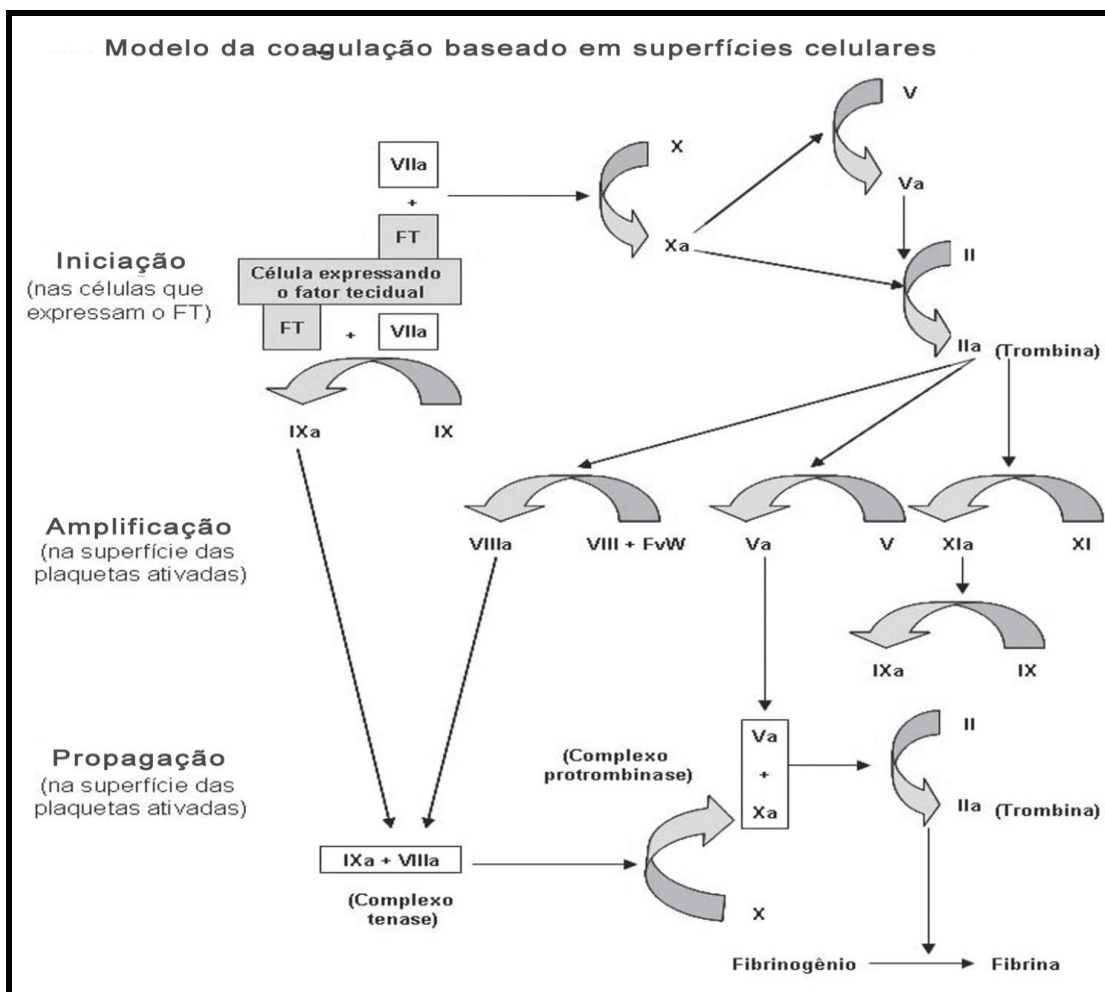


Figura 1: Ilustração esquemática da cascata da coagulação [37].

O FVIII é sintetizado principalmente no fígado, mas seu RNA mensageiro (RNAm) já foi detectado no baço, pulmões, linfonodos e rins. A observação de que humanos e cães com hemofilia A (deficiência de FVIII) poderiam ser curados com um transplante de fígado sugere que este é o principal sítio de síntese do FVIII. Estruturalmente, o FVIII possui três tipos de domínios: A1 – A2 – B – A3 – C1 – C2 [38].

O aumento do nível plasmático de FVIII é um fator de risco independente e prevalente para o primeiro episódio de TEV [39-45]. Um estudo realizado pelo nosso grupo confirmou esse resultado em uma população brasileira [46]. No entanto, o papel do FVIII elevado no risco de recidiva da doença ainda não está bem estabelecido [47-50].

Indivíduos com FVIII plasmático acima 150 UI/dL têm um risco 4,8 vezes maior de desenvolver TEV quando comparados àqueles com FVIII abaixo de 100 IU/dL. Observou-se também que para cada elevação de 10 UI/dL na dosagem do FVIII no plasma, o risco de episódios recorrentes aumenta em 24%. Portanto, o nível elevado do FVIII é também um fator de risco dose-dependente para o TEV [40].

Como o FVIII é uma proteína de fase aguda, uma das hipóteses para o seu aumento seria a resposta ao processo inflamatório agudo trombótico. Logo após o episódio de trombose há um aumento do FVIII e da proteína C reativa (PCR), também um marcador de fase aguda. Contudo, na evolução desses pacientes, após o período agudo, ocorre normalização dos níveis de PCR, sem que paralelamente ocorra o mesmo com o FVIII, descartando que este aumento de FVIII seja meramente consequência de uma resposta inflamatória aguda ocasionada pelo trombo [51-53].

O mecanismo pelo qual o FVIII elevado pode aumentar o risco de TEV tem sido investigado. Embora possa parecer óbvio que a elevação de um fator da coagulação deva aumentar a probabilidade do TEV, esta relação parece ser verdadeira somente para alguns fatores, tais como FVIII, FIX, FXI e protrombina [13,39,54]. Alguns estudos observaram que pacientes com TEV e níveis elevados de FVIII tinham uma maior geração de trombina do que pacientes com TEV e níveis normais de FVIII [55,56].

Apesar de inúmeros estudos, ainda não estão totalmente estabelecidos os mecanismos que interferem com a concentração plasmática do FVIII. De qualquer forma, sabe-se que o FvW, o tipo sanguíneo ABO, fatores genéticos, idade e sexo têm influência sobre o nível plasmático de FVIII [57,58].

A maior parte do FVIII circula no plasma associado ao FvW, sendo que apenas uma pequena fração permanece livre na circulação. A proporção fisiológica entre FVIII e FvW é de aproximadamente 1:50. A ligação entre eles é essencial para a sobrevivência do FVIII *in vivo*, e para evitar sua ativação inapropriada. Portanto, o nível plasmático de FVIII é influenciado pelo nível do FvW. Também está bem estabelecido que indivíduos do grupo sanguíneo O possuem níveis diminuídos de FVIII, quando comparados àqueles dos grupos não-O [59,60].

Os estudos que incluíram pacientes com TEV e aumento de FVIII sugerem um padrão de herança genética dos níveis elevados de FVIII [61,62]. Contudo, a análise do gene do FVIII, demonstrou inúmeros polimorfismos, mas sem qualquer correlação com os níveis elevados de FVIII [63-66]. Mesmo a análise da região promotora e da região terminal 3' do gene do FVIII não conseguiu identificar nenhuma alteração relacionada à concentração elevada do FVIII [67].

## 1.4 - O Receptor LRP1

O receptor LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*), também conhecido como CD91, é uma glicoproteína de membrana de 600 KDa, membro da família dos receptores endocíticos de LDL. Sua forma madura consiste de uma fração de 85 KDa (fragmento beta) que constituem as porções intracelular e transmembrana da glicoproteína. A fração extracelular (fragmento alfa) consiste de uma fração de 515 KDa e possui diversos sítios de interação com os ligantes do LRP1 [68].

O gene do LRP1 está localizado no cromossomo 12q13-14, e a proteína é expressa em vários tecidos, incluindo fígado (principal), pulmões, cérebro e placenta; e em vários tipos celulares, tais como hepatócitos, células de Kupffer, fibroblastos, células musculares lisas, adipócitos, neurônios, astrócitos, células epiteliais de glândula salivar, monócitos e macrófagos [69-72].

O LRP1 possui um amplo espectro de ligantes, sendo que os principais são: lipoproteínas, lipoproteínas de baixíssimo peso molecular (VLDLs), lipases, proteínas de matriz, fator de crescimento plaquetário, ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), ativador uroquinase do plasminogênio (u-PA), complexos t-PA / PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1), u-PA / PAI-1, trombina / PAI-1, trombina / antitrombina, TFPI, complexo fator VIIa / TFPI, FVIII / FVIIIa, FIXa, FXIa, proteína precursora  $\beta$  amiloide, entre outros [73].

Originalmente acreditava-se que o LRP1 tinha a função exclusiva de endocitose de seus ligantes para que estes fossem então degradados nos lisossomos intracelulares. No entanto, atualmente sabe-se que este receptor também atua na regulação de vias de sinalização celular [74].

Desde a sua identificação, as principais linhas de pesquisa envolvendo o LRP1 são o seu papel na doença de Alzheimer [75-90] e no *clearance* do FVIII. No entanto, nos últimos anos, o LRP1 tem sido investigado em diversos processos biológicos tais como metabolismo de lipídios [91,92], proteção da vasculatura [93-96], regulação da migração celular [97-101], na modulação da integridade da barreira hemato-encefálica [102,103], e regulação da resposta imune [104,105].

Além disso, tem sido investigado o papel do LRP1 em algumas condições clínicas, tais como metástases [106-115], diabetes [116-118], inflamação [119], processos infecciosos [120-122], artrite reumatoide [123], hipóxia [124,125], entre outras [126-130].

### **1.5 - O Papel do Receptor LRP1 no *Clearance* do Fator VIII**

As primeiras evidências do envolvimento do LRP1 no *clearance* do FVIII foram simultaneamente descritas por dois grupos de pesquisadores [57,131]. Estes autores mostraram em modelos *in vitro* (*surface plasmon resonance*) que o FVIII possui uma afinidade moderada pelo LRP1. Além disso, análises em modelo de cultura de células (fibroblastos) e modelo animal *in vivo* mostraram que o FVIII radioativo ( $^{125}\text{I}$ -FVIII) se liga especificamente ao LRP1 e que este receptor medeia a internalização e subsequente degradação do FVIII, indicando que o LRP1 desempenha um importante papel no ajuste do FVIII plasmático *in vivo*.

Bovenschen *et al* [132] utilizando um modelo animal transgênico deficiente de LRP1 hepático e controles normais, mostrou que os animais deficientes apresentam um aumento de 1,8 vezes nos níveis de FVIII na circulação. Além disso, os

autores observaram uma diminuição de 1,5 vezes no *clearance* do FVIII nos animais deficientes de LRP1 hepático em comparação aos animais controle, indicando que estes níveis aumentados de FVIII nos animais deficientes são, ao menos em parte, devido a um *clearance* diminuído do FVIII.

No entanto, ao se promover a superexpressão do *receptor-associated protein* (RAP), uma proteína com alta afinidade pelo LRP1, que compete com o FVIII pela ligação ao receptor, observou-se que os animais deficientes de LRP1 tiveram um aumento adicional de aproximadamente duas vezes nos níveis plasmáticos de FVIII [132]. Como o RAP possui alta afinidade por outros membros da família de receptores de LDL, este resultado sugeriu que outros receptores da mesma família poderiam contribuir no catabolismo do FVIII. Também não se pode descartar que o LRP1 presente em células extra-hepáticas possa ter uma ligação com o RAP hiperexpresso, contribuindo para esse aumento do FVIII.

Consequentemente, Bovenschen *et al* [133] utilizando um modelo animal transgênico deficiente de LRP1 hepático e do receptor de LDL (LDLR), e controles normais, mostrou que os animais deficientes de LRP1 hepático apresentavam um aumento de 1,8 vezes nos níveis de FVIII na circulação, enquanto que animais deficientes de LDLR mostraram valores de FVIII semelhantes aos animais controles. No entanto, animais deficientes simultaneamente para LRP1 hepático e LDLR apresentaram um aumento de 4,6 vezes nos níveis plasmáticos de FVIII.

Além disso, observou-se que o *clearance* de FVIII estava 1,6 vezes diminuído nos animais deficientes de LRP1 hepático em comparação aos animais controle, enquanto que os animais deficientes de LDLR apresentaram uma diminuição de 1,25 vezes (não estatisticamente diferente dos controles). Em contraste, animais

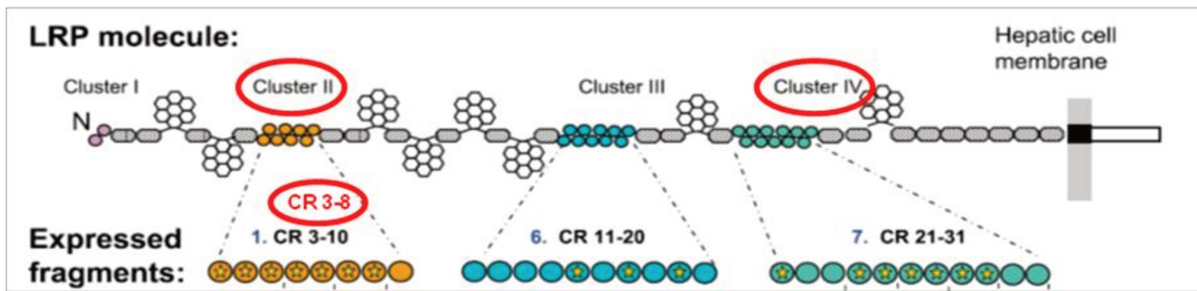
deficientes simultaneamente para LRP1 hepático e LDLR apresentaram uma diminuição de 4,8 vezes do *clearance* de FVIII. Estes resultados indicam que o LDLR parece contribuir com o LRP1 no catabolismo do FVIII [133].

Outro estudo avaliou o papel do *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR) no catabolismo do FVIII. No entanto, ao contrário do LDLR, o receptor VLDLR não mostrou um efeito aditivo ou sinérgico com o LRP1 no catabolismo do FVIII [134].

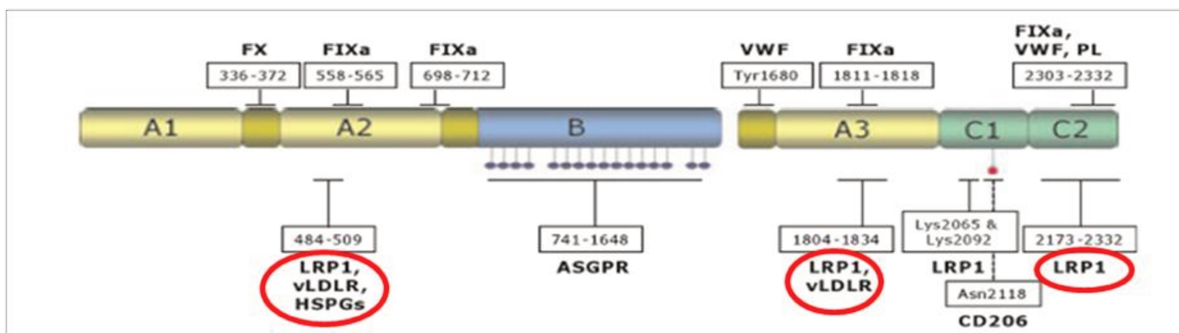
Análises estruturais mostraram que o LRP1 possui quatro *clusters* (I, II, III e IV), sendo que os *clusters* II e IV são os que possuem maior afinidade com os ligantes do LRP1 testados, dentre eles o FVIII [131,135]. Cada cluster do LRP1 é formado por um número variável de *complement-type repeats* (CRs), sendo que cada CR é composta por uma sequência de aproximadamente 40 aminoácidos [136,137].

O *cluster* II do LRP1 é composto por oito CRs, sendo demonstrado que o FVIII possui afinidade pelos seis primeiros CRs do cluster II [135,138,139]. Estudos estruturais demonstraram que o FVIII possui dois sítios de alta afinidade para o LRP1, localizados nos domínios A2 (*Arg484 a Phe509*) e A3 (*Lys1804 a Ala1834*), e também um sítio de baixa afinidade no domínio C2 (*Thr2303 a Tyr2333*) [131,138-143]. Portanto, o estudo da região do gene que codifica estas regiões de afinidade entre as proteínas seria de grande relevância.

A Figura 2 a seguir mostra de forma esquematizada a estrutura das proteínas do FVIII e do LRP1 e suas regiões de afinidade.



**Figura 2A: Esquema da estrutura proteica do LRP1 e suas regiões de afinidade pelo FVIII.** A figura mostra os quatro clusters da proteína do LRP1 compostos cada um por um número definido de *complement-type repeats* (CRs). Os clusters II e IV em destaque (círculos vermelhos) possuem afinidade pelo FVIII. A interação entre o cluster II e o FVIII foi estudada com mais detalhe, e foi identificado que os CRs 3 ao 8 (em destaque) são os responsáveis pela afinidade de interação entre o cluster II do LRP1 e o FVIII. Figura adaptada de Sarafanov *et al.*, 2007 [139].



**Figura 2B: Esquema da estrutura proteica do FVIII e suas regiões de afinidade pelo LRP1.** A figura mostra os domínios que compõem a estrutura proteica do FVIII e seus sítios de interação com diversas proteínas envolvidas na coagulação (destacadas em retângulos). Destacadas em círculos vermelhos, observamos os três sítios do FVIII que possuem afinidade pelo receptor LRP1. Figura adaptada de Lenting *et al.*, 2010 [144].

Vários estudos epidemiológicos analisaram a influência de polimorfismos já descritos no gene do LRP1 sobre os níveis plasmáticos de FVIII e



associação com TEV em humanos [62,145-148]. Particularmente, nosso grupo avaliou três desses polimorfismos em pacientes brasileiros com TEV. O resumo dos resultados obtidos por estes estudos estão apresentados no Quadro 1, a seguir:

**Quadro 1:** Principais polimorfismos do gene do LRP1 estudados na associação com níveis de FVIII e com o TEV.

<b>Alteração</b>	<b>Níveis de FVIII</b>	<b>Associação ao TEV</b>	<b>Referência</b>	<b>Casuística (N)</b>
<b>-25C/G</b>	Diminuição do FVIII	Não afeta	Marchetti <i>et al</i> , 2006 [146]	200
<b>C766T</b>	Não afeta	Efeito protetor	Cunningham <i>et al</i> , 2005 [145]	60
<b>C663T</b>	Aumento do FVIII	Risco	Vormittag <i>et al</i> , 2007 [147]	152
<b>D2080N</b>	Diminuição do FVIII	Não afeta	Morange <i>et al</i> 2005 [62] ;	427
			Mello <i>et al</i> 2008 [148]	249
<b>C220T</b>	Não afeta	Não afeta	Mello <i>et al</i> 2008 [148]	249
<b>A755P</b>	Não afeta	Não afeta	Mello <i>et al</i> 2008 [148]	249



## **2. Justificativa**



Tendo em vista que:

- O TEV é considerado um importante problema de Saúde Pública devido à expressiva incidência e taxa de mortalidade desta doença. O aumento do FVIII é considerado um fator de risco para o TEV e há discussão em relação a seu papel na recorrência da doença;

- Existe uma variação nos níveis de FVIII, que parece ser multifatorial, mas ainda não totalmente esclarecida;

- A SPT é uma complicação prevalente da TVP de membros inferiores, e está associada a um prejuízo significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados;

- Existe uma relação entre o receptor LRP1 e o catabolismo do FVIII plasmático;

- A análise de alterações moleculares nos genes do FVIII e do LRP1 podem indicar possíveis influências genéticas nos níveis plasmáticos elevados de FVIII e associação com o TEV;

- O LRP1 é expresso principalmente em células hepáticas, mas nenhum estudo avaliou sua relação com os níveis plasmáticos de FVIII em humanos;



## **3. Objetivos I**





Este estudo teve como objetivos:

- Avaliar a evolução a longo prazo dos níveis plasmáticos de FVIII em pacientes com antecedente de TEV e aumento de FVIII. Como o aumento do FVIII pode estar associado a um processo inflamatório, também se avaliou a sua associação com a SPT, considerada um processo inflamatório crônico (**Objetivo IA**);

- Avaliar a presença de mutações e/ou polimorfismos nas regiões dos genes do FVIII e do LRP1 que codificam as regiões de afinidade entre eles, e verificar se essas alterações moleculares estão associadas aos níveis plasmáticos de FVIII, e com o TEV. (**Objetivo IB**);



## **4. Casuística I**



#### **4.1 Casuística I - Pacientes com TEV e Controles**

Em 2004 foi realizado um estudo com pacientes que tiveram o primeiro episódio de TEV entre 1990 e 2004, acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas. Nesse estudo foram avaliados entre outros parâmetros o nível de FVIII após um tempo mínimo de três meses da suspensão do anticoagulante. Foram considerados elegíveis os pacientes que tivessem o diagnóstico objetivo de TEV, e a dosagem de FVIII [46].

Todos os pacientes tiveram o diagnóstico de TEV confirmado por exames de imagem que variou de acordo com o sítio acometido. Para TVP de membros inferiores e superiores foi utilizado o ultrassom com Doppler, enquanto na TVP portal e cerebral utilizou-se tomografia computadorizada, ressonância magnética ou angiografia. O diagnóstico de embolia pulmonar foi realizado pela cintilografia pulmonar de ventilação e perfusão.

Os critérios de exclusão foram idade inferior a 18 e superior a 70 anos, gestação ou puerpério, presença de neoplasia, doença renal, hepática, reumatológica, hipo/hipertireoidismo, síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAAF), uso de anticoncepcionais hormonais, terapia de reposição hormonal ou corticoide no momento da coleta de sangue.

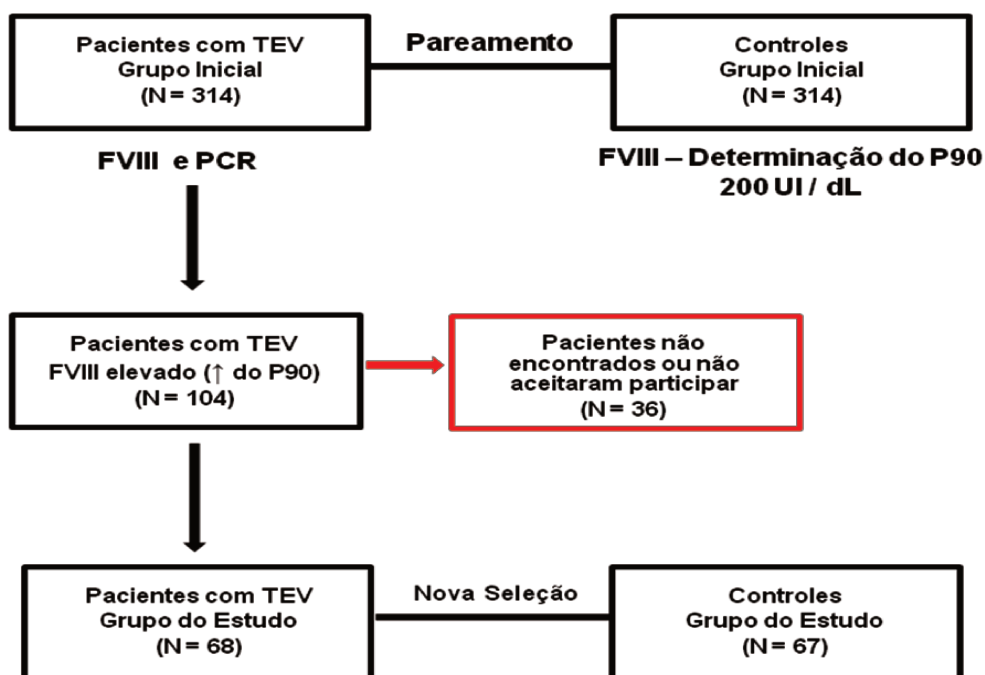
Os indivíduos do grupo controle do primeiro estudo foram selecionados a partir de alunos e funcionários do Hemocentro da UNICAMP, de acordo com o gênero, grupo sanguíneo ABO, idade aproximada (diferença máxima de cinco anos), etnia e área geográfica residencial dos pacientes. Os critérios de exclusão utilizados foram os mesmos do grupo de pacientes com TEV, incluindo apenas a

presença de história pessoal ou familiar de TEV. Para a classificação de etnia foi considerada a ascendência até a terceira geração, e aspectos físicos como cor da pele, textura dos cabelos e formato nasal.

A partir desses resultados, entre julho de 2010 a março de 2011 foram selecionados os pacientes para nosso estudo de acordo com o critério de inclusão, isto é, o aumento do FVIII acima do percentil 90 (P90). O P90 foi estabelecido a partir da análise dos níveis plasmáticos do FVIII do grupo controle do estudo de 2004.

Inicialmente foram considerados elegíveis 314 pacientes adultos com um episódio de TEV. O grupo controle deste estudo incluiu os mesmos critérios do grupo controle inicial.

A Figura 3 apresenta de forma esquematizada a seleção de pacientes com TEV e controles para o estudo:



**Figura 3:** Esquema de seleção dos pacientes com TEV e controles.

Em 2011, 7 anos após a primeira avaliação, os 104 pacientes que apresentaram níveis de FVIII acima do P90 (200 UI/dL) dos controles, na primeira avaliação, foram reconvocados para uma segunda análise. Deste total, 68 pacientes concordaram em participar do estudo. Seguindo os mesmos critérios de inclusão e exclusão do estudo de 2004, foram selecionados 67 novos controles.

É importante ressaltar que não houve diferença significativa nas características clínicas e nos níveis de FVIII e PCR na 1ª avaliação quando comparamos os 68 pacientes com TEV incluídos com os 36 pacientes não encontrados ou que não aceitaram participar do estudo (*dados não mostrados*).

Foi coletado um total 20 mL de sangue periférico para as dosagens de FVIII, proteína C reativa, tipagem sanguínea e extração de DNA. Para a determinação da atividade do FVIII foram coletados dois tubos contendo citrato de sódio a 3.2%, e para a dosagem de PCR um tubo seco sem anticoagulante. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos para separação do plasma e soro, e as alíquotas foram armazenadas em freezer -80° C. Para a determinação da tipagem sanguínea foi coletado um tubo com EDTA.





## **5. Metodologia I**



## **5.1 Metodologia I - Pacientes com TEV e Controles**

### **5.1.1 Dosagem plasmática da atividade do Fator VIII**

Para a determinação da atividade do FVIII foi empregado o método coagulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente de FVIII (Siemens<sup>®</sup>, Marburg, Germany) e reagentes para a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), em coagulômetro de leitura foto-óptica BCS XP (Siemens<sup>®</sup>, Marburg, Germany). É importante ressaltar que os reagentes e coagulômetro utilizados para esta análise são da mesma marca e modelo utilizados na primeira avaliação em 2004.

Inicialmente foi executada uma curva-padrão (tempo de coagulação em segundos *versus* diluição), obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (Siemens<sup>®</sup>, Marburg, Germany) em tampão veronal, com concentração inicial previamente determinada pelo fabricante.

Após a diluição da amostra em tampão veronal (volume final = 50 µL), foram adicionados 50 µL de plasma deficiente de FVIII, e então realizado o TTPa (realizados em duplicata). Os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão. A curva foi previamente testada com controle normal e patológico. Os resultados foram expressos em UI/dL. O valor de normalidade do laboratório, estabelecido em plasma de 50 indivíduos normais, foi de 60-150 UI/dL.

### **5.1.2 Dosagem sérica de Proteína C Reativa (PCR)**

A determinação da PCR foi feita através de método imunológico nefelométrico automatizado (Siemens<sup>®</sup>, Marburg, Germany). Os resultados foram expressos em mg/dL, e o valor de normalidade foi definido como < 0.5 mg/dL.

### **5.1.3 Tipagem sanguínea ABO**

Para a determinação do grupo sanguíneo ABO foi coletado um tubo contendo EDTA. A tipagem sanguínea foi realizada por método padrão através do sistema automatizado de microplaca PK-7200 (*Olympus*).

### **5.1.4 Classificação da Síndrome Pós-Trombótica**

A síndrome pós-trombótica (SPT) foi avaliada no mesmo dia da coleta de sangue, de acordo com a classificação Clínica-Etiológica-Anatômica-Patofisiológica (CEAP). A classificação CEAP é composta por sete classes, de acordo com manifestações clínicas apresentadas no membro inferior afetado pela TVP [Quadro 2]. Todos os pacientes foram avaliados pelo mesmo profissional.

**Quadro 2: Classes da SPT de acordo com a classificação CEAP**

<b>Classes</b>	<b>Severidade da SPT</b>	<b>Sintomas</b>
Classe 0	Ausente	Sem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa
Classe 1	Leve	Telangiectasias, veias reticulares, ou edema maleolar
Classe 2	Leve	Veias varicosas
Classe 3	Moderada	Edema sem alteração de pele
Classe 4	Moderada	Alteração de pele (hiperpigmentação, eczema venoso)
Classe 5	Grave	Alterações de pele com úlcera cicatrizada
Classe 6	Grave	Presença de úlceras de pele

### **5.1.5 Extração de DNA**

Amostras de sangue periférico (8 mL) tiveram o DNA genômico extraído pelo método fenol-clorofórmio, empregado rotineiramente em nosso laboratório.

O DNA foi extraído de 8 mL de sangue coletado com EDTA. Após centrifugação por 15 minutos a 3500 RPM, o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foram adicionados cinco volumes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  144mM e ½ volume de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10mM, sendo misturado por inversão, para lise das hemácias. As amostras foram centrifugadas a 2200 RPM durante 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido.

O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido adicionou-se 5 mL de tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6 KCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, EDTA 0,2mM) e 125  $\mu\text{L}$  de Triton X10 (Sigma Chemical, Alemanha). Após centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 5 mL TKM1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspenso com 400  $\mu$ L de TKM2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, pH 7.6 MgCl<sub>2</sub> 10 mM) e 25  $\mu$ L de SDS 10 (dodecil sulfato de sódio), para a lise dos leucócitos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 30 minutos. Após este período, foram acrescentados 180  $\mu$ L de NaCl 5M e homogeneizados com a própria ponteira. Esperou-se o tempo de 20 minutos em temperatura ambiente com a finalidade de precipitar as proteínas. Após este tempo, centrifugou-se a 12000 RPM por 5 minutos em microcentrífuga.

O sobrenadante contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 450  $\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico e 450  $\mu$ L de fenol bidestilado saturado com Tris-HCl pH 8.0, seguida de centrifugação à 12000 RPM por 5 minutos. Este processo foi repetido após a adição de 1 mL de clorofórmio/álcool-isoamílico. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de fundo cônico de 1500  $\mu$ L. Acrescentou-se 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M pH 5.2 e 1 mL de etanol absoluto gelado, e agitou-se por inversão para precipitação do DNA.

Em seguida, centrifugou-se por 3 minutos a 12000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, e uma nova centrifugação foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente para secar. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em aproximadamente 300  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 EDTA 1 mM), que permaneceu durante 16 horas sob refrigeração (4 °C) para sua total dissolução.

### 5.1.6 Reação em Cadeia da Polimerase

As regiões de interesse do gene do LRP1 e do FVIII foram amplificadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*PCR*), segundo procedimento descrito por Saiki *et al* [149]. Foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) específicos para amplificar os éxons 14 ao 20 do gene do LRP1 (região codificante dos CRs 1-8 do cluster II do LRP1), e os éxons 10-11 (*Arg*484 a *Phe*509 no domínio A2), éxon 16 (*Lys*1804 a *Ala*1834 no domínio A3) e éxon 26 (*Thr*2303 a *Tyr*2333 no domínio C2) do gene do FVIII (*Ver Quadro 3*).

**Quadro 3: Regiões dos genes do LRP1 e do FVIII analisadas**

Amplicons	Gene	Tamanho	Primers
LRP1 Ex.14/15	LRP1	891 pb	Sense: 5' TGGGGCTCCCAGGCTAATGGGGG 3' Antisense: 5' TGGGACCCTGGATCCTCCCCTCCC 3'
LRP1 Ex. 16/17	LRP1	527 pb	Sense: 5' CTTGTCCCACGACCGGGGTCTGACT 3' Antisense: 5' GGCCCCCTCGTCTCCCCTGCCTC 3'
LRP1 Ex. 18/19	LRP1	999 pb	Sense: 5' GGGGATGGAGCCCTGAGCAGGAGTG 3' Antisense: 5' GCCTTCCCTGGAGGGCCTGGCTG 3'
LRP1 Ex. 20	LRP1	295 pb	Sense: 5' GGCAGGGGGGCCCAAGCTGGGATC 3' Antisense: 5' GGGGGCTCGATCTCATCCCCACCC 3'
FVIII Ex. 10	FVIII	345 pb	Sense: 5' AGCCTCAAATTAATAATG 3' Antisense: 5' ACTTTAGACTGGAGCTTGAG 3'
FVIII Ex. 11	FVIII	362 pb	Sense: 5' CCCTTGCAACAACAACATGA 3' Antisense: 5' TTTCTTCAGGTTATAAGGGGACA 3'
FVIII Ex. 16	FVIII	456 pb	Sense: 5' AGCATCCATCTTCTGTACCA 3' Antisense: 5' TTGCACGTAGGATAAATATC 3'
FVIII Ex. 26	FVIII	344 pb	Sense: 5' ACTGGAAACAAGTAGAAGTG 3' Antisense: 5' TTAGCACAAAGGTAGAAGGC 3'

Foi realizada uma reação de amplificação para um volume final de 30  $\mu\text{L}$  contendo 0,5  $\mu\text{g}$  de DNA genômico, 1 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima polimerase (10 mM Tris pH 8.5), 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10  $\mu\text{M}$ ), 2 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 22  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. As reações foram submetidas às condições de ciclos pré-determinadas: 96° C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos com 40 segundos a 96° C, 40 segundos para anelamento dos “primers”, e 1 minuto para extensão do DNA complementar a 72° C. A reação de amplificação foi confirmada através de corrida eletroforética em gel de agarose a 2% em conjunto com o marcador de peso molecular de DNA 100 bp *Ladder* (Life Technologies<sup>®</sup>, USA).

Após purificação das amostras de PCR por kit comercial (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare), a quantificação foi feita através de corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, em conjunto com o marcador de quantificação de PCR *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies<sup>®</sup>, USA).

### **5.1.7 Sequenciamento de DNA**

Os fragmentos amplificados e purificados foram sequenciados utilizando o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Life Technologies<sup>®</sup>, USA), de acordo com instruções do fabricante, para posterior eletroforese em sequenciador automático (ABI PRISM<sup>®</sup> 3500 Genetic Analyzer), e análise das sequencias.

Para o sequenciamento automático direto das regiões gênicas amplificadas, foi utilizado 20-30 ng do produto de PCR purificado; 1,6 pmol de



oligonucleotídeo (sense e antisense em reações distintas); 1 µl da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *Big Dye*, 1 µl de solução tampão (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCL<sub>2</sub> 5 mM) e 10 µl de água destilada estéril. Em um termociclador automático as amostras foram submetidas a 25 ciclos de denaturação inicial a 96 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* por 15 segundos, e 60 °C por 4 minutos para a síntese. O produto da reação de sequenciamento foi submetido à purificação com 8 µl de água destilada estéril e 32 µl de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 RPM, o sobrenadante foi descartado, e em seguida colocado 100 µl de etanol 70%. A placa foi centrifugada novamente por 20 minutos a 4000 RPM e o sobrenadante descartado, sendo submetida à centrifugação invertida por 7 segundos a 200 RPM, e aquecida no termociclador a 65 °C por 5 minutos para completa remoção do etanol residual.

Para a eletroforese, adicionou-se 10 µl de formamida deionizada, as amostras foram então denaturadas a 96 °C por 5 minutos, e incubadas em gelo, para em seguida serem aplicadas no sequenciador automático ABI PRISM<sup>®</sup> 3500 Genetic Analyzer (*Life Technologies, USA*).

A análise dos resultados de sequenciamento foi realizada utilizando o *software* Chromas (versão 2.3.0.0), comparando-se a sequência nucleotídica das amostras dos voluntários do estudo com a sequência depositada do banco de dados do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI), código de acesso NG\_016444.1 para o gene do receptor LRP1, e NG\_011403.1 para o gene do FVIII.

### 5.3 Análise estatística

Para descrever o perfil dos grupos estudados foram feitas tabelas das frequências das variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram descritas como mediana, valores máximo e mínimo.

Para comparar as variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas.

Para comparar os níveis plasmáticos de FVIII entre a primeira (2004) e a segunda (2011) avaliações foi utilizado o teste de Wilcoxon.

No estudo dos polimorfismos foi usado o teste exato de Fisher, com o objetivo de avaliar as frequências dos genótipos, entre pacientes e controles. A comparação entre as concentrações de FVIII nos diversos genótipos foi realizada através do teste de Mann Whitney. Para estudo da distribuição genotípica dos polimorfismos foi utilizado o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O cálculo do risco de TEV associado aos polimorfismos foi determinado através do *odds ratio* (OR).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional *R Development Core Team*, versão 3.0.1.

## **6. Resultados I**



## 6.1 Resultados I - Pacientes com TEV e Controles

Sessenta e oito pacientes com TEV (19 homens e 49 mulheres) com uma idade mediana de 37 anos na época do diagnóstico (18 - 60 anos) e agora, nesta segunda análise, com uma idade mediana de 47 anos (28 -70 anos) foram incluídos no estudo. O grupo controle consistiu de 67 doadores saudáveis (25 homens e 42 mulheres) com idade mediana de 45 anos (29 -70 anos). Não houve diferença significativa de gênero, idade e grupo sanguíneo ABO entre pacientes e controles (Tabela 1).

**Tabela 1: Características clínicas de pacientes com TEV e controles**

	Pacientes (N = 68)	Controles (N=67)	P*
Idade – Mediana (Min – Max)	47 (28 – 70)	45 (29 – 70)	0,28
Gênero - Mulheres / Homens (%)	72% / 28%	62,7% / 37,3%	0,29
Tipagem ABO – Não-O / O (%)	67,7% / 32,3%	67,2% / 32,8%	1,00

O TEV foi espontâneo em 26 (38,2%) pacientes, e em 42 (61,8%) foi associado a um fator de risco como a cirurgia (7,3%), imobilização (17,7%), uso de contraceptivos orais (20,5%), gravidez e puerpério (11,8 %), ou outros fatores de risco (4,5%). Os sítios de TVP foram: membros inferiores (88,1%), circulação espleno-portal (7,4%) e membros superiores (4,5%). Três (4,5%) pacientes com episódios de TVP de membros inferiores também apresentaram embolia pulmonar.

Na primeira avaliação, em 2004, pacientes com TEV tinham níveis mais elevados de FVIII ( $p \leq 0,001$ ) em comparação aos controles. Em 2011, sete anos após a primeira avaliação e depois de um seguimento médio de 10 anos após o episódio de

TEV, esta diferença foi menor, mas ainda presente ( $p \leq 0,001$ ). Os níveis de PCR em pacientes com TEV estavam dentro dos valores normais em 2004 e em 2011 (Tabela 2).

**Tabela 2: Medianas de FVIII e PCR em pacientes com TEV e controles em 2004 e 2011:**

	Análise em 2004			Análise em 2011		
	Pacientes	Controles	P*	Pacientes	Controles	P*
<b>FVIII [IU/dL]</b>	235,8	127,2	<b><math>\leq 0,001</math></b>	158,0	126,1	<b><math>\leq 0,001</math></b>
<i>(Min – Max)</i>	(200,3 – 510)	(80,1 – 181)		(82 – 206)	(83,4 – 187,1)	
<b>PCR [mg/dL]</b>	0,22	NA		0,13	NA	<b>0,003</b>
<i>(Min – Max)</i>	(0,01 – 0,5)			(0,02 – 0,5)		

Notas: NA = Não Avaliado

Demonstramos uma diferença significativa entre os níveis de FVIII de pacientes com TEV em 2004 e 2011 ( $p \leq 0,001$ ).

Por se tratar de um critério de inclusão, todos os 68 pacientes incluídos neste estudo apresentavam FVIII acima do P90 (200,3 UI/dL) na primeira avaliação, em 2004. Na segunda avaliação, em 2011, o P90 foi de 169,8 UI/dL, e apenas 26,5% dos pacientes permaneciam acima deste percentil. Portanto, observamos uma diminuição significativa entre a porcentagem de pacientes acima do P90 em 2004 e 2011 ( $p < 0,001$ ).

Ao compararmos os pacientes com TEV e FVIII plasmático acima do P90 com aqueles abaixo do P90, observamos que os primeiros possuíam uma maior prevalência do grupo sanguíneo Não-O. Este achado pode ser explicado pelo fato de pacientes do grupo sanguíneo Não-O terem apresentado níveis significativamente aumentados de FVIII quando comparados com pacientes do grupo sanguíneo O [163,5

UI/dL (96 - 205) vs. 146,0 UI/dL (82 - 188) ;  $p < 0,001$ ]. Nenhuma outra diferença significativa foi observada (Tabela 3).

**Tabela 3: Comparação de características clínicas e laboratoriais entre pacientes com níveis de FVIII acima e abaixo do P90**

	Pacientes com FVIII < P90 (N = 50)	Pacientes com FVIII > P90 (N = 18)	P
Idade ( <i>Mediana</i> )	47	48,5	0,44
Gênero - <i>Mulheres/Homens</i>	36 / 14	13 / 5	1,00
Tipagem ABO – <i>Não-O / O</i>	30 / 20	17 / 1	<b>0,007</b>
FVIII 2004 ( <i>Mediana</i> )	232	239,5	0,49
PCR 2004 ( <i>Mediana</i> )	0,17	0,26	0,15
PCR 2011 ( <i>Mediana</i> )	0,12	0,19	0,29
Tempo após último episódio (anos)	9	10	0,63
Presença de SPT - Sim / Não *	32 / 10	16 / 2	0,31

\* Foram considerados apenas os pacientes com TVP de membro inferior.

Em sete anos de seguimento, a recidiva de TEV foi observada em 19,1% (N = 13) dos pacientes. No entanto, os pacientes com recorrência não apresentaram níveis significativamente elevados de FVIII em comparação com pacientes sem recorrência (160 UI/dL vs 158 UI/dL,  $p = 0,14$ ).

A Tabela 4 mostra as diferenças de características clínicas e laboratoriais entre pacientes com TEV recorrente e sem recorrência. Podemos observar uma

associação da recidiva de TEV com gênero masculino, com grupo sanguíneo Não-O e presença de SPT.

**Tabela 4: Comparação de características clínicas e laboratoriais entre pacientes com e sem recorrência de TEV**

	Pacientes Não recorrentes (N = 54)	Pacientes Recorrentes (N = 14)	P
Idade ( <i>Mediana</i> )	46,5	50	0,82
Gênero - <i>Mulheres/Homens</i>	42 / 12	7 / 7	<b>0,04</b>
Tipagem ABO – <i>Não-O / O</i>	34 / 20	13 / 1	<b>0,04</b>
FVIII 2004 ( <i>Mediana</i> )	235,6	240	0,16
PCR 2004 ( <i>Mediana</i> )	0,18	0,30	0,16
FVIII 2011 ( <i>Mediana</i> )	158	160	0,28
PCR 2011 ( <i>Mediana</i> )	0,12	0,17	0,13
Presença de SPT - Sim / Não *	12 / 12	10 / 2	<b>0,04</b>

\* Foram considerados apenas os pacientes com TVP de membro inferior.

Do total de 60 pacientes com TVP de membros inferiores, 60% (N = 35) apresentaram SPT, sendo que 13,4% (N = 8) foram classificados como SPT grave. A análise das alterações clínicas relacionadas à SPT e os níveis de FVIII demonstrou que as classes 5 e 6, que representam a SPT mais grave estavam associadas ao aumento do nível de FVIII, quando comparado com as outras classes ( $p \leq 0,001$ ). A Tabela 5 mostra a mediana de FVIII de acordo com a classificação clínica.

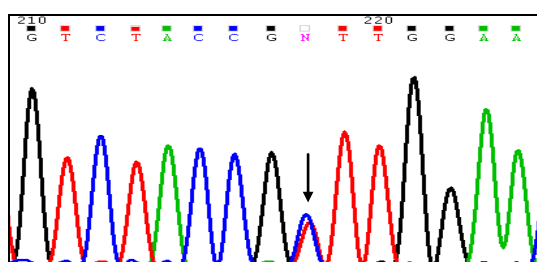


**Tabela 5: Níveis de FVIII e PCR de acordo com a classificação CEAP**

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5	Classe 6
<b>Frequência (Nº)</b>	24	5	4	12	7	3	5
<b>[%]</b>	40,0	8,4	6,6	20,0	11,6	5,0	8,4
<b>FVIII:C (Mediana)</b>							
<b>[IU/dL]</b>	155,4	159,8	157,1	157,2	154,6	185,5	182,1
<b>PCR (Mediana)</b>							
<b>[mg/dL]</b>	0,122	0,109	0,097	0,217	0,219	0,075	0,158
<b>Tipagem ABO</b>							
<b>[Não-O / O]</b>	16 / 8	2 / 3	2 / 2	9 / 3	6 / 1	3 / 0	4 / 1

*Avaliações moleculares:*

Foram identificadas um total de 14 alterações moleculares, sendo 12 no gene do LRP1 e duas no gene do FVIII. A seguir, as Figuras 4-17 mostram os cromatogramas de cada alteração molecular identificada.



**Figura 4: A mutação C 2767 T (Arg767Arg) no éxon 14 do gene do LRP1.**

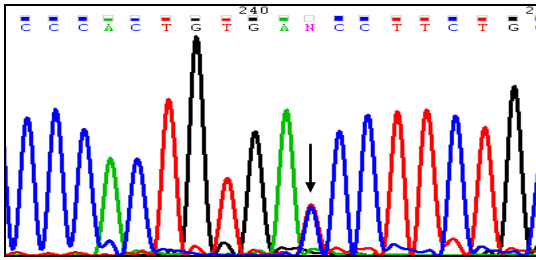


Figura 5: A mutação C 2805 T (Thr780Ile) no éxon 14 do gene do LRP1.

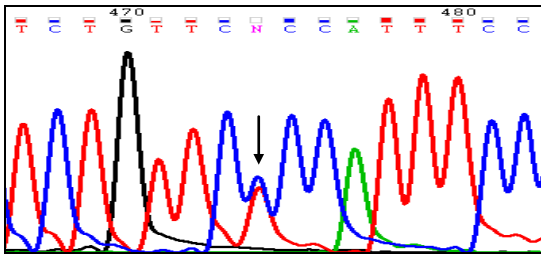


Figura 6: A mutação C 2870+167 T no íntron 14 do gene do LRP1.

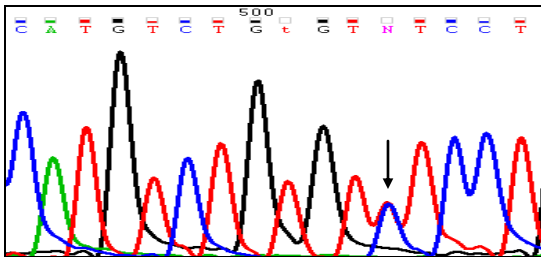


Figura 7: A mutação C 2870+197 T no íntron 14 do gene do LRP1.

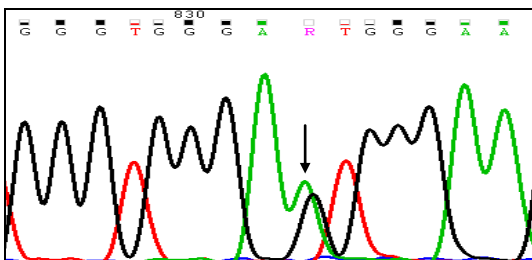
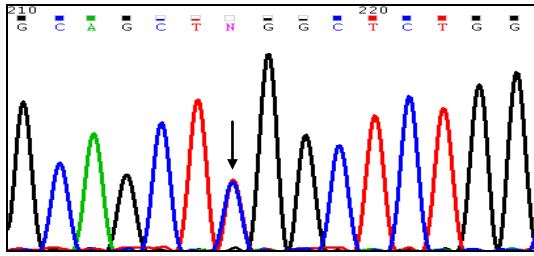
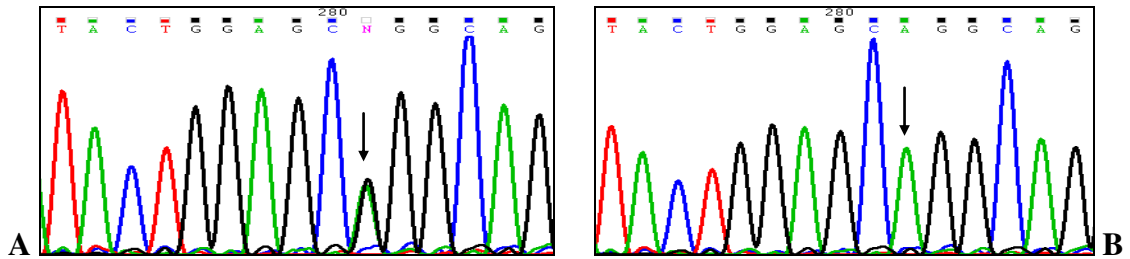


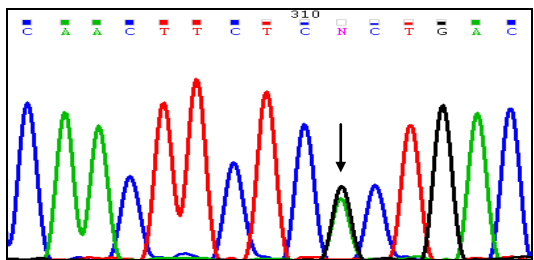
Figura 8: A mutação G 2996+26 A no íntron 15 do gene do LRP1.



**Figura 9:** A mutação C 3137+54 T no íntron 16 do gene do LRP1.



**Figura 10:** O Polimorfismo G 3137+81 A no íntron 16 do gene do LRP1. A heterozigose GA está representada pela letra "N" (Figura 13A), e a homozigose AA está representada na Figura 13B.



**Figura 11:** A mutação G 3137+111 A no íntron 16 do gene do LRP1.

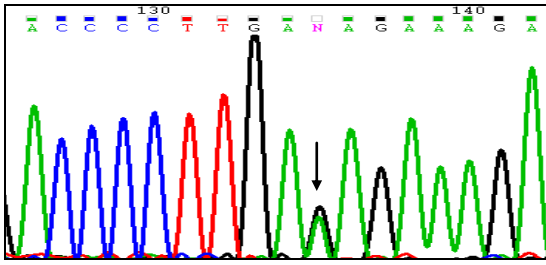


Figura 12: A mutação G 3264-172 A no íntron 17 do gene do LRP1.

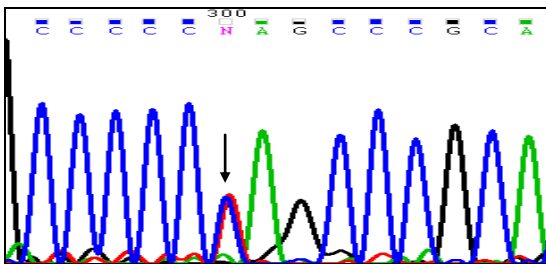


Figura 13: A mutação C 3264 - 3 T no íntron 17 do gene do LRP1.

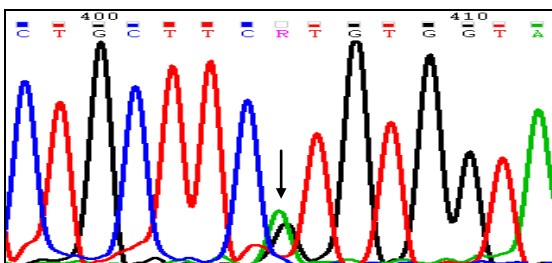


Figura 14: A mutação G 3376 (Ser970Ser) A no éxon 18 do gene do LRP1.

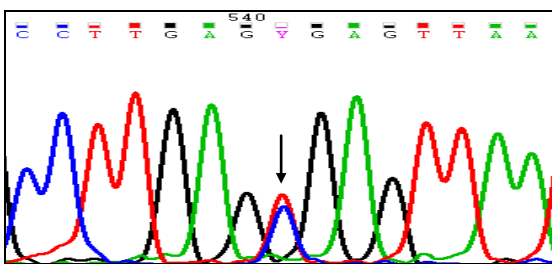
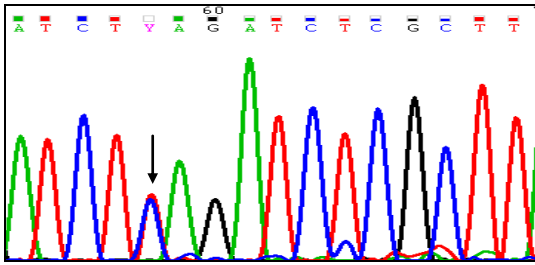
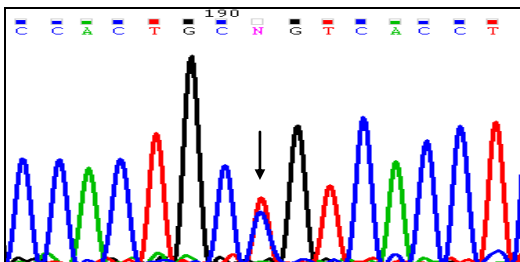


Figura 15: O polimorfismo T 3380+114 C no íntron 18 do gene do LRP1.



**Figura 16: A mutação T 1444 - 22 C no íntron 9 do gene do FVIII.**



**Figura 17: A mutação C 7053 + 32 (2332 +32) T na região 3' terminal não traduzida (3' UTR) do gene do FVIII.**

As alterações genéticas detectadas que já eram previamente descritas no *NCBI* foram classificadas em mutação (prevalência alélica < 1%) ou polimorfismo (prevalência alélica  $\geq$  1%) pela sua prevalência na população controle do *NCBI*, composta por 1000 indivíduos (2000 alelos) analisados. Já as alterações ainda não descritas foram classificadas de acordo com a sua prevalência no grupo controle do estudo [Ver Quadro 4 e Tabela 6].

Do total das 14 alterações moleculares encontradas, duas foram classificadas como polimorfismos e doze como mutações. Do total de mutações identificadas, três ainda não haviam sido descritas no banco de dados do *NCBI* (G 3137+111 A; G 3264-172 A, C 3264 - 3 T).

O Quadro 4 a seguir mostra informações sobre as alterações moleculares encontradas.

**Quadro 4: Informações sobre as alterações moleculares encontradas no estudo**

<b>Troca de nucleotídeo</b>	<b>Troca de aminoácido</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Código no NCBI</b>	<b>Classificação da alteração</b>
C 2767 T	Arg 767 Arg	LRP1 Exon 14	rs145618022	Mutação
C 2805 T	Thr 780 Ile	LRP1 Exon 14	rs34492744	Mutação
C 2870+167 T	NA	LRP1 Intron 14	rs35306126	Mutação
C 2870+197 T	NA	LRP1 Intron 14	rs34709055	Mutação
G 2996+26 A	NA	LRP1 Intron 15	rs138196021	Mutação
C 3137+54 T	NA	LRP1 Intron 16	rs181881519	Mutação
G 3137+81	NA	LRP1 Intron 16	rs1800174	Polimorfismo
G 3137+111 A	NA	LRP1 Intron 16	Não descrita	Mutação
G 3264-172 A	NA	LRP1 Intron 17	Não descrita	Mutação
C 3264 - 3 T	NA	LRP1 Intron 17	Não descrita	Mutação
G 3376 A	Ser 970 Ser	LRP1 Exon 18	rs78054559	Mutação
T 3380+114 C	NA	LRP1 Intron 18	rs34474417	Polimorfismo
T 1444 - 22 C	NA	FVIII Intron 9	rs5986899	Mutação
C 7053 + 32 T	NA	FVIII 3' UTR	rs5986887	Mutação

NA- Não Aplicável.

Como pode ser observada na Tabela 6, apesar de termos identificado várias alterações moleculares, nenhuma delas teve uma prevalência diferente no grupo de pacientes em relação aos controles.

**Tabela 6: Prevalência das mutações e polimorfismos encontrados no grupo controle e no grupo de pacientes com TEV**

<b>Alteração Molecular</b>	<b>Prevalência do alelo mutado no NCBI (%) *</b>	<b>Prevalência do alelo mutado no estudo Pacientes / Controles (%)</b>	<b>p</b>
C 2767 T	0,2	T: 0,73 / 0,74	1
C 2805 T	0,3	T: ZERO / 0,74	1
C 2870+167 T	0,6	T: ZERO / 0,74	1
C 2870+197 T	0,6	T: ZERO / 0,74	1
G 2996+26 A	0,1	A: 0,73 / ZERO	1
C 3137+54 T	0,1	T: 0,73 / ZERO	1
G 3137+81A	40	A: 41,2 / 37,3	0,59
G 3137+111 A	Não descrita	A: 0,73 / ZERO	1
G 3264-172 A	Não descrita	A: ZERO / 0,74	1
C 3264 - 3 T	Não descrita	T: 0,73 / ZERO	1
G 3376 A	0,1	A: 0,73 / ZERO	1
T 3380+114 C	2,2	C: 2,94 / ZERO	0,13
T 1444 - 22 C	0,7	C: 0,73 / ZERO	1
C 7053 + 32 T	0,9	T: 0,73 / ZERO	1

\* A prevalência das alterações moleculares postadas no *NCBI* é referente à análise de 1000 indivíduos controle, isto é, um total de 2000 alelos controle analisados.

As alterações moleculares observadas em apenas um paciente ou um controle, não puderam ser analisadas estatisticamente. Vale ressaltar que não se observou nenhum resultado muito discrepante entre os níveis de FVIII dos que apresentavam ou não essas alterações moleculares.

As alterações moleculares mais prevalentes não mostraram associação com os níveis de FVIII, conforme apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7: Níveis plasmáticos de FVIII de acordo com os genótipos nos pacientes com TEV**

<b>Alteração Molecular</b>	<b><i>Wild Type</i> Mediana (Min-Max)</b>	<b>N</b>	<b>Mutados Mediana (Min-Max)</b>	<b>N</b>	<b>p</b>
G 3137+81A	164 (112 - 194)	40	156 (126 - 205)	28	0,30
T 3380+114 C	157 (112 - 205)	64	168 (162 - 173)	4	0,33



## **7. Discussão I**



## 7. DISCUSSÃO GERAL

O TEV é uma doença multifatorial decorrente da interação dinâmica entre fatores de risco genéticos e adquiridos, embora em aproximadamente 30% dos pacientes não se identifica nenhum fator desencadeante.

Vários estudos já demonstraram que o aumento do nível plasmático de FVIII é um fator de risco independente, prevalente e dose dependente para o TEV [38-44]. Um dos grandes desafios na prática clínica é a identificação de fatores que possam contribuir para a retrombose, permitindo a seleção dos pacientes com maior risco e que teriam indicação de anticoagulação perene. A trombofilia hereditária está associada principalmente ao primeiro episódio trombótico, e os fatores de risco adquiridos assumem um papel importante na evolução e recorrência da trombose. Isso faz do FVIII, que é uma proteína de fase aguda, e de outras proteínas a ele associadas, candidatos interessantes a serem investigados em pacientes com TEV, e talvez até serem incorporados na avaliação a longo prazo após um primeiro episódio trombótico.

Atualmente os nomogramas têm sido enfatizados como promissores para avaliação do risco de retrombose, e o FVIII talvez possa ser um candidato interessante a ser incluído.

## **7.1 - Pacientes com TEV e Controles**

### **7.1.1 - Características clínicas**

Nesta casuística houve um predomínio de mulheres, talvez pelo fato destas estarem expostas a fatores de risco adicionais quando comparadas aos homens, tais como gestação, puerpério, uso de ACH e TRH.

Apesar da idade avançada ser um fator de risco bem estabelecido para TEV, a maioria dos pacientes com TEV deste estudo, cerca de 70%, apresentaram a doença com menos de 40 anos, e na sua maioria (62%) associado a um fator de risco adquirido.

Com relação à etnia, observamos um predomínio de indivíduos caucasoides em relação aos afrodescendentes. No entanto, devido ao perfil miscigenado da população brasileira, essa classificação não é tão adequada. Um estudo genético com brasileiros demonstrou que 30% daqueles considerados como caucasoides, pela cor da pele, apresentavam contribuição africana no total de DNA mitocondrial [150].

### **7.1.2- Fator VIII e Inflamação**

A análise deste estudo requer que se ressalte a seleção dos pacientes. A partir de um estudo realizado em 2004, que incluiu pacientes atendidos no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas entre 1990 e 2004, foram selecionados os pacientes para nosso estudo, de acordo com o critério de inclusão principal, o aumento do FVIII acima do P90.

Os métodos coagulométrico e cromogênico foram os dois métodos de aferição funcional do FVIII. Alguns estudos que confrontaram os métodos para a dosagem do FVIII observaram que estes mostraram alta correlação entre si [151,152]. De qualquer forma, o risco de evento trombótico associado a níveis elevados de FVIII já está bem estabelecido, independente do método de mensuração utilizado.

É importante ressaltar que em nosso estudo, estabelecemos um *cut-off* para definir os níveis elevados de FVIII, utilizando um valor de P90. Isto é mais adequado, pois como relatado por Wells *et al.* [153], a utilização de um valor fixo acima do valor normal de referência (150 UI/dL), que foi empregado por muitos outros autores, faz com que uma grande porcentagem tanto de pacientes como de controles sejam classificados com níveis elevados de FVIII plasmático.

Assim, o critério de inclusão de pacientes apenas com níveis de FVIII acima do P90 permitiu a análise de um grupo altamente selecionado acompanhado por um longo período, com um olhar mais detalhado sobre o tempo de evolução e o nível de FVIII. Esse é um ponto muito interessante, principalmente porque não há uma definição de todos os fatores envolvidos no aumento do FVIII, e por se manter aumentado além do tempo observado nas proteínas de fase aguda, a relação com o tempo pode contribuir para uma melhor avaliação.

Estudos prévios demonstraram níveis aumentados de FVIII em pacientes com TEV após um período médio de até cinco anos de seguimento [40,47,53]. Este estudo mostrou que com uma mediana de dez anos após o primeiro episódio de TEV, ainda observa-se níveis elevados de FVIII em comparação a controles saudáveis, mas com menor magnitude. Todos os pacientes ao serem incluídos neste estudo apresentavam níveis de FVIII acima do P90 na primeira avaliação, mas apenas 26,5%

deles permaneceram acima desse percentil após um período de sete anos de seguimento. Estes resultados foram publicados recentemente [154].

Nossos resultados sugerem a presença de um estímulo para aumentar os níveis de FVIII que poderia ser mais importante durante os anos iniciais do episódio de TEV. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que esses pacientes já apresentavam um aumento basal nos níveis de FVIII, que pode contribuir como um fator causal para o primeiro episódio de TEV [155].

Logo após o episódio trombótico o aumento do FVIII está acompanhado do aumento da PCR, um marcador de reação de fase aguda. A reação de fase aguda inicia-se após uma injúria, que no caso seria a trombose venosa. Entre as manifestações sistêmicas da reação de fase aguda está a alteração nas concentrações de várias proteínas plasmáticas, que são denominadas de proteínas de fase aguda, entre elas a PCR. Estas seriam definidas como proteínas produzidas no fígado com um aumento ou diminuição de 25% nos primeiros sete dias em resposta a um dano tecidual [156]. A produção destas proteínas esta sob a regulação de um grande número de citocinas (IL-6, IL-1, IL-11, TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -interferon, Fator de Crescimento Epidermal). A ocorrência de diferentes condições fisiopatológicas pode implicar em diferentes perfis de liberação de citocinas, com diferentes padrões de elevação de proteínas de fase aguda. O reconhecimento destes diferentes padrões pode proporcionar aos clínicos uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico e o acompanhamento das enfermidades inflamatórias.

Conforme descrito por outros autores [51-53], o aumento dos níveis de FVIII encontrado neste estudo não foi secundário a uma reação de fase aguda, uma vez que apesar da manutenção dos níveis aumentados de FVIII, todos os indivíduos

apresentavam valores normais de PCR. Além disso, a coleta de sangue foi realizada com um tempo mínimo de seis meses após o evento primário na primeira avaliação, e no mínimo um ano na segunda avaliação, períodos bastante afastados do processo agudo trombótico.

Contudo, não podemos afastar a presença de um processo inflamatório crônico, que pode induzir outro perfil de resposta, com aumento na produção de interleucinas, mas sem elevação da PCR. O aumento de IL-6 em pacientes com TEV tem sido descrito em alguns estudos [19,157], e recentemente isso foi demonstrado em um grupo de 77 pacientes brasileiros acompanhados em nosso serviço [158]. Esses resultados pontuam para a escolha de um marcador que melhor demonstre um processo inflamatório crônico, e que a PCR não é o exame de escolha.

### **7.1.3 - Níveis plasmáticos de FVIII e síndrome pós-trombótica**

A SPT é uma complicação comum da TVP de membros inferiores, caracterizada por uma inflamação crônica do membro afetado, e poderia, portanto causar um aumento nos níveis plasmáticos de FVIII, como uma resposta ao processo. Contudo, nenhum estudo demonstrou associação entre SPT e níveis de FVIII [24,31,35].

Stain *et al* [24] avaliaram 406 pacientes com TVP de membros inferiores e após 35 (18 - 220) meses verificaram que 43,3 % dos pacientes apresentavam SPT (1,4% graves). Bouman *et al* [31] demonstraram que a SPT estava presente em 19% dos 228 pacientes com TVP dos membros inferiores, acompanhados por um período de 2 anos. Os níveis de FVIII não estavam diferentes nos pacientes com ou sem a SPT.

Em nosso estudo, usando a classificação CEAP, que é um método sensível e específico para definir SPT [24], demonstramos que 60% dos pacientes apresentavam essa complicação, e que 13,4% foram classificados como graves. Estudos anteriores mostraram que a maioria dos pacientes desenvolvem a SPT nos primeiros dois anos após o episódio de TVP, mas uma minoria ainda é capaz de desenvolver a síndrome após este período. Além disso, apesar da incidência de SPT aumentar minimamente após dois anos do episódio, a severidade aumenta significativamente [23]. Portanto, estes achados prévios da literatura corroboram com a elevada incidência de SPT e de sua forma mais grave nesta casuística.

A descoberta mais interessante foi a associação significativa entre níveis aumentados de FVIII e SPT grave. Essa diferença de resultado com os outros estudos provavelmente é decorrente do tipo de análise da SPT, pois os outros estudos apenas referem presença ou ausência dessa complicação. Nosso estudo foi o único que comparou os níveis de FVIII de acordo com a gravidade da SPT.

Nossos resultados não mostraram uma associação entre a SPT e a PCR, corroborando o descrito por outros estudos [28]. Mais uma vez esses resultados evidenciam que a PCR não parece ser um bom marcador de inflamação crônica, mesmo na presença de um processo inflamatório crônico como a SPT.

O FvW desempenha um papel crítico na regulação dos níveis plasmáticos de FVIII. Uma possibilidade é que a SPT grave apresente lesão vascular e consequente aumento da secreção de FvW pelas células endoteliais, e isto poderia contribuir para o aumento dos níveis plasmáticos de FVIII encontrados nestes pacientes [159].



Nós encontramos uma taxa de recorrência do TEV de 19,1 %, o que é coerente com estudos anteriores. Apesar de não haver nenhuma diferença nos níveis de FVIII entre aqueles com e sem recorrência, a SPT foi significativamente mais comum no primeiro grupo. Esses resultados confirmam o de estudos anteriores que mostraram uma associação entre a recidiva da TVP e a ocorrência da SPT. Além disso, nossos resultados reforçam como descrito por outros autores, uma associação entre o gênero masculino e o grupo sanguíneo Não-O com a recorrência do TEV [24, 39, 160-164].

#### **7.1.4 – Avaliação dos genes do FVIII e do LRP1**

Há um consenso geral de que o aumento de FVIII é um fator de risco para o primeiro episódio de TEV, e sugere-se que além da resposta inflamatória possa haver alterações no gene do FVIII relacionados aos níveis desse fator [42].

Alguns estudos que avaliaram pacientes e familiares, demonstraram um padrão de herança genética nos níveis elevados do FVIII [61,62]. Contudo, apesar de análises do gene do FVIII ter demonstrado inúmeros polimorfismos e mutações, nenhuma das alterações moleculares identificadas mostrou qualquer correlação com os níveis elevados de FVIII ou com o TEV [62-66,165].

O LRP1 é a principal proteína associada ao catabolismo do FVIII e a análise do gene responsável pela codificação desse receptor também tem sido investigada, como uma possibilidade para explicar a influência genética sobre os níveis plasmáticos de FVIII. Durante os últimos anos, um grande número de estudos têm investigado alterações moleculares no gene do LRP1 em pacientes TEV. Apesar de

terem sido descritos diversos polimorfismos e mutações neste gene, a maioria deles não se correlacionou com os níveis plasmáticos aumentados de FVIII ou com o TEV [166].

Cunningham *et al.* [145] avaliaram quatro polimorfismos no gene do LRP1, para investigar alguma associação com TEV e níveis elevados de FVIII (> 150 UI/dL). Contudo, os resultados mostraram que os polimorfismos não estavam associados aos níveis aumentados de FVIII nesses pacientes com TEV. Um estudo realizado em nosso laboratório, onde foram avaliados três polimorfismos localizados no gene do LRP1, não mostrou nenhuma associação com níveis plasmáticos elevados de FVIII ou com o TEV [148].

Apenas um estudo mostrou uma associação do polimorfismo C663T (A217V) no gene do LRP1 com níveis plasmáticos aumentados de FVIII e com o TEV [147]. No entanto, outro estudo que incluiu 422 indivíduos saudáveis não demonstrou nenhuma influência desse polimorfismo nos níveis plasmáticos de FVIII [62].

Em nosso estudo, foram avaliadas regiões específicas dos genes do FVIII e do LRP1 responsáveis pela codificação de regiões proteicas relacionadas aos sítios de ligação entre essas proteínas. Alterações moleculares presentes nessas regiões gênicas poderiam resultar na alteração da afinidade entre o FVIII e o LRP1 e, conseqüentemente, a concentração do FVIII no plasma.

Apesar de termos identificado 14 mutações/polimorfismos, não foi observada qualquer associação entre os genótipos e as concentrações plasmáticas do FVIII, ou com o TEV. Devemos lembrar da seleção dos participantes deste estudo, que apresentavam níveis de FVIII acima do P90 mesmo três anos após o evento fonte, favorecendo a hipótese de que alterações genéticas pudessem contribuir para esse aumento.

Morange *et al.* [62] avaliou essas mesmas regiões apenas no gene do FVIII, em vinte indivíduos saudáveis, que apresentavam níveis extremos diminuídos (27 UI/dL - 48,5 UI/dL) ou aumentados (100 UI/dL - 206 UI/dL) desse fator. Com esse desenho de estudo interessante, haveria a chance de aumentar a probabilidade de encontrar polimorfismos envolvidos na regulação do *clearance* do FVIII. No entanto, os autores não encontraram nenhuma alteração molecular nestas regiões do gene do FVIII.

O fato do presente estudo não conseguir correlacionar alterações genéticas que codificam as regiões de ligação entre LRP1 e o FVIII, não exclui alterações em outras regiões que possam ter um papel na expressão desses genes. Também não podemos excluir que outros loci localizados em outras regiões genômicas possam ter um papel importante no grau de expressão desses genes, e conseqüentemente no nível dessas proteínas.

O LRP1 possui duas regiões com afinidade pelos seus ligantes, incluindo o FVIII, geralmente localizados nos clusters II e IV [135,167]. Em nosso estudo apenas foi avaliado regiões do cluster II, e não se pode afastar que polimorfismos e mutações localizados na região gênica codificante do cluster IV do LRP1 possam ter um papel sobre os níveis plasmáticos de FVIII e ao TEV.

Não se pode deixar de frisar que ambos os genes são extensos e polimórficos, e o presente estudo limitou-se a analisar pequenas regiões específicas.

Como a alteração dos níveis plasmáticos de fator VIII parece ser multigênica, reforça-se a necessidade de estudos adicionais envolvendo não somente o gene do FVIII, mas também outros genes relacionados, com o intuito de elucidar a origem dos níveis aumentados desse fator no TEV. Apesar de não termos encontrado

nenhuma relação entre as alterações moleculares e os níveis plasmáticos de FVIII e o TEV, estes dados contribuíram para o conhecimento nesta área.

## **3. Objetivos II**



- Avaliar a expressão proteica do receptor LRP1 em amostras de fígado de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos eletivos, e correlacioná-los com os níveis plasmáticos de FVIII e FvW (**Objetivo II**);





## **4. Casuística II**



## **4.2 Casuística II - Voluntários para biópsia hepática**

Foram incluídos 10 voluntários submetidos à colecistectomia e 10 submetidos à gastroplastia redutora acompanhados pelo Serviço de Gastrocirurgia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de janeiro a junho de 2013. Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 a 60 anos, cirurgia eletiva, e bom estado geral de saúde. Os critérios de exclusão foram: histórico de neoplasia, insuficiência renal ou hepática, presença de doença inflamatória ou infecciosa, e SAAF.

Os participantes tiveram seus prontuários revisados para análise da presença de outras doenças de base e consulta de resultados de exames pré-operatórios de função hepática, através da dosagem sérica de fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase, alanina transaminase e aspartato transaminase; e função renal (creatinina). Após verificar os critérios de inclusão e exclusão por análise do prontuário médico, os pacientes elegíveis eram entrevistados e convidados a participar do estudo, horas antes da cirurgia.

De cada paciente que aceitava participar do estudo foram realizadas três coletas de sangue periférico, conforme esquematizado no Quadro 5:

**Quadro 5: Coletas de sangue periférico dos voluntários para biópsia hepática**

<b>N° da Coleta</b>	<b>Momento da Coleta</b>	<b>Tubos de sangue Coletados</b>	<b>Exames Laboratoriais</b>
<b>Coleta I</b>	Pré-operatório – 4 horas antes da cirurgia (adesão do paciente à pesquisa)	1 tubo com citrato de sódio 3,2%  1 tubo sem anticoagulante  1 tubo com EDTA	FVIII e FvW  PCR e Perfil Lipídico  Tipagem sanguínea ABO
<b>Coleta II</b>	Pós-operatório – após fechamento da cavidade abdominal	1 tubo com citrato de sódio 3,2%	FVIII e FvW
<b>Coleta III</b>	12 horas após a cirurgia	1 tubo com citrato de sódio 3,2%  1 tubo sem anticoagulante	FVIII e FvW  PCR

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos para separação do plasma e soro, e as alíquotas foram armazenadas em freezer - 80° C. Para a determinação da tipagem sanguínea foi coletado um tubo com EDTA.

Durante a cirurgia, após a abertura da cavidade abdominal, antes do início da cirurgia, o primeiro procedimento foi a realização da biópsia hepática do segmento quatro do lobo direito do fígado, com a obtenção de um fragmento com aproximadamente 300 a 400 mg. O material coletado foi imediatamente conservado em refrigeração (4° C) em meio de cultura RPMI para análise no dia seguinte.

## **5. Metodologia II**



## 5.2 Metodologia II - Voluntários para biópsia hepática

### 5.2.1 Dosagem plasmática da atividade do Fator VIII

Para a determinação da atividade do FVIII foi empregado o método cromogênico, utilizando-se kit comercial (*Instrumental Laboratory, USA*). Na presença de concentrações ideais e conhecidas de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e fosfolipídios, FIXa e excesso de FX (reagente de fatores), a taxa de ativação do FX é linearmente proporcional à concentração de FVIII. O FXa hidrolisa o substrato cromogênico, liberando o cromóforo. A coloração emitida é então lida fotometricamente a um comprimento de onda de 405 nm pelo coagulômetro de leitura foto-óptica ACL TOP 500 (*Instrumental Laboratory, USA*). O FXa gerado, bem como a intensidade da coloração obtida no equipamento, é proporcional à atividade do FVIII na amostra. A hidrólise do substrato cromogênico pela trombina é prevenida pela adição de um inibidor de trombina sintético junto ao substrato.

Inicialmente foi executada uma curva-padrão obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (*Instrumental Laboratory, EUA*), em tampão, com concentração inicial previamente determinada pelo fabricante. Após a diluição da amostra em tampão (volume final = 50  $\mu\text{L}$ ), são adicionados 50  $\mu\text{L}$  de reagente de fatores, e 50  $\mu\text{L}$  de substrato cromogênico, e então realizada a leitura a 405 nm. Os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão. A curva foi previamente testada com controle normal e patológico. As análises foram realizadas em duplicata, e os resultados foram expressos em UI/dL. O valor de normalidade, estabelecido pelo fabricante do kit, foi de 50-200 UI/dL.

### **5.2.1 Dosagem plasmática do antígeno do Fator VIII**

O método utilizado para a dosagem do antígeno do FVIII plasmático foi o ensaio imunoenzimático (*Affinity Biologicals, Canadá*). Inicialmente, preparou-se a placa de ELISA onde foram colocados 100 µL de anticorpo de ovelha anti-FVIII capturante (previamente diluído em 1/100 em tampão de captura) em cada poço da placa. A placa foi deixada a 22° C por 2 horas. Então, a placa foi lavada três vezes com 200 µL de tampão de lavagem. Em seguida, amostras de plasma de pacientes e controles (ambos em triplicata), e a curva padrão foram preparadas através de diluições em tampão diluente, e então pipetados 100 µL em cada poço. A placa foi deixada a 22 °C por 2 horas. Então a placa foi lavada três vezes com 200 µL de tampão de lavagem.

O próximo passo foi adicionar em cada poço da placa 100 µL de anticorpo de ovelha anti-FVIII conjugado com peroxidase, e incubar a placa a 22 °C por 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com 200 µL de tampão de lavagem e então foram adicionados 100 µL substrato em cada poço da placa. A placa foi deixada a 22 °C por 15 minutos, com uma cobertura de papel alumínio. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de ácido sulfúrico a 2,5 M em cada poço da placa, para bloqueio da reação e, então realizada a leitura por espectrofotometria num comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos em UI/dL.

### **5.2.3 Dosagem plasmática do antígeno do Fator de von Willebrand**

O método utilizado para a dosagem do antígeno do FvW plasmático foi o ensaio imunoturbidimétrico, utilizando-se kit comercial (*Instrumental Laboratory, USA*).



O princípio do método consiste na adição da amostra contendo o antígeno do FvW à uma mistura contendo tampão e partículas de látex cobertas por anticorpos anti-FvW humano. À medida que as moléculas de FvW da amostra se aderem às partículas de látex, estas se aglutinam. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração do antígeno de FvW na amostra de plasma, e é determinada pela diminuição de luz captada pelo coagulômetro de leitura foto-óptica ACL TOP 500 (*Instrumental Laboratory, USA*) causada pelos agregados.

Inicialmente foi executada uma curva-padrão obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (*Instrumental Laboratory, USA*) em tampão, com concentração inicial previamente determinada pelo fabricante. As análises foram realizadas e duplicata, os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão, e expressos em UI/dL. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante do kit foram 41.1 UI/dL - 125.9 UI/dL para indivíduos do grupo sanguíneo O, e 61.3 UI/dL - 157.8 UI/dL para indivíduos do grupo sanguíneo Não-O.

#### **5.2.4 Dosagem sérica de Proteína C Reativa (PCR)**

A determinação da PCR foi feita através de método imunológico nefelométrico automatizado (Siemens, Marburg, Germany). Os resultados foram expressos em mg/dL, e o valor de normalidade foi definido como < 0.5 mg/dL.

### **5.2.5 Tipagem sanguínea ABO**

Para a determinação do grupo sanguíneo ABO foi coletado um (1) tubo contendo EDTA. A tipagem sanguínea foi realizada por método padrão, através do sistema automatizado de microplaca PK-7200 (*Olympus*).

### **5.2.6 Técnica de Digestão Tecidual Hepática com Colagenase tipo I**

A técnica de digestão tecidual hepática com colagenase tipo I proporciona a obtenção rápida de subpopulações celulares selecionadas de um fragmento de tecido complexo e heterogêneo. Cem miligramas (100 mg) de tecido foram incubados por 60 minutos a 37 °C em agitação (120 RPM) em solução contendo 20 mL de meio RPMI, 2 g de BSA-Fração V e 100 mg de colagenase tipo I (GIBCO). Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado.

Em seguida, ao *pellet* de células foram adicionados 10 mL de tampão de lise a base de cloreto de amônio e bicarbonato de potássio, e mantido em incubação em gelo por 15 minutos. A suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPM por 10 minutos, e então o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi acrescentada durante a padronização da técnica, pois a suspensão de células final continha um elevado número de hemácias. Análises mostraram que o uso do procedimento de lise não afetou a expressão do CD91 nas amostras.

O *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL de tampão PBS. A suspensão de células foi filtrada (duas vezes) em filtro de nylon de 100 µm (*BD*

*Biosciences, USA*) para separar aglomerados celulares e fragmentos teciduais da suspensão de células. Ao final, o *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL de tampão PBS.

### 5.2.7 Citometria de Fluxo de Células Hepáticas

A presença de muitos restos celulares e células mortas decorrentes do processo de digestão do tecido hepático com colagenase tipo I não permitiu a execução da análise por citometria de fluxo nos primeiros experimentos. Uma solução encontrada para melhorar esta análise foi o uso do marcador 7AAD (marcador de viabilidade celular), para excluir células mortas e restos celulares. Portanto, foram consideradas para estas análises, apenas as células 7AAD<sup>-</sup>.

Com essas medidas, as populações de hepatócitos, células endoteliais sinusoidais e células de Kupffer puderam ser identificadas pela citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos. Nesta padronização, foram utilizados seis anticorpos:

- CD31 FITC: marcador de células endoteliais, granulócitos, monócitos e plaquetas;
- CD14 FITC: marcador de células de *Kupffer*, macrófagos, monócitos, e em menor intensidade granulócitos, células NK e algumas subpopulações de células dendríticas;
- OV-6 FITC: marcador de hepatócitos;
- CD91 PE: “*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*” – LRP1;
- 7AAD: marcador de viabilidade celular;

- CD 45 APC: marcador de leucócitos em geral.

Para a marcação das células foi utilizada uma concentração de  $1 - 2 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  na suspensão de células. Volumes de 100  $\mu\text{L}$  de células foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente no escuro, com 5  $\mu\text{L}$  de cada anticorpo monoclonal, conforme painel descrito a seguir:

Tubo 1- "Controle Negativo" (apenas suspensão de células)

Tubo 2- OV-6 FITC / CD 91 PE / 7AAD

Tubo 3- CD14 FITC / CD 91 PE / 7AAD / CD 45 APC

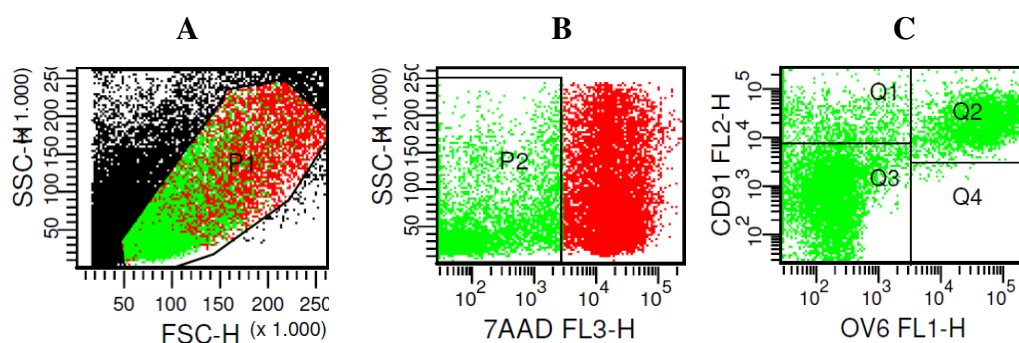
Tubo 4- CD31 FITC / CD 91 PE / 7AAD / CD 45 APC

O citômetro de fluxo utilizado foi o FACS Calibur (*BD Biosciences, USA*), e as análises foram realizadas através do *software* FACS Diva (*BD Biosciences, USA*).

Para cada tubo, foi realizada a aquisição de aproximadamente 50.000 eventos 7AAD<sup>-</sup>. A expressão do receptor LRP1 (CD91) foi calculada através da média de intensidade de fluorescência (MIF) fornecida pelo *software*. Os hepatócitos foram identificados como células OV-6<sup>+</sup>, as células de Kupffer como CD14<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>, e as células endoteliais sinusoidais como CD31<sup>+</sup> / CD45<sup>-</sup>. As Figuras 18-20 mostram a estratégia de análise dos hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais, respectivamente.

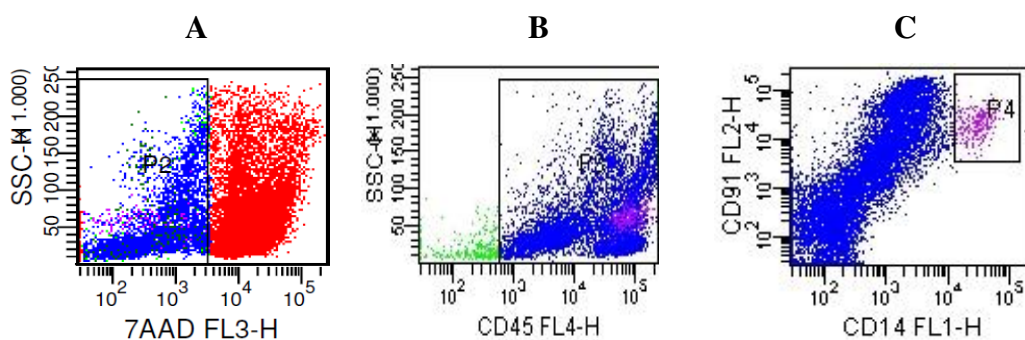
Para a análise dos hepatócitos, no *dot plot* FSC (tamanho) x SSC (granulosidade), os debris localizados à esquerda (Figura 18A) foram eliminados da

análise. Em seguida, com o objetivo de excluir aglomerados celulares remanescentes e células mortas, foram considerados para a análise somente as células negativas para o marcador de viabilidade celular 7AAD (Figura 18B). Por fim, no *dot plot* OV-6 x CD91 identificou-se os hepatócitos, e mensurou-se a expressão do receptor LRP1 (CD91) [Ver Figura 18].



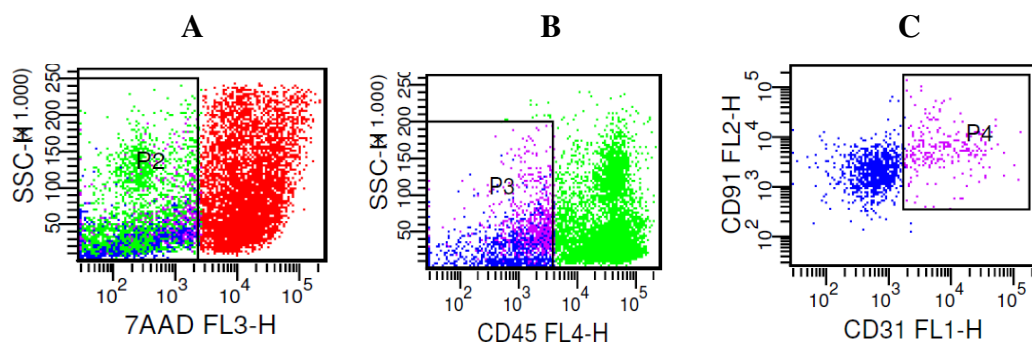
**Figura 18: Estratégia de análise dos hepatócitos.** A Figura 18A ilustra o *dot plot* FSC (tamanho) x SSC (granulosidade). A região P1 delimitada engloba os eventos avaliados. A Figura 18B ilustra o *dot plot* 7AAD (marcador de viabilidade celular) x SSC. Foram selecionadas as células 7AAD negativas (região P2) para a exclusão de fragmentos celulares e células mortas. A Figura 18C ilustra o *dot plot* OV6 (marcador de hepatócitos) x CD91 (LRP1).

Para a análise das células de Kupffer, a mesma estratégia de exclusão de debris e células mortas foi aplicada. Em seguida, no *dot plot* CD45 (leucócitos) x SSC foram selecionadas as células CD45 positivas. Por fim, no *dot plot* CD14 x CD91 (Figura 19C) identificou-se as células de Kupffer e mensurou-se a expressão do receptor LRP1 (CD91) [Ver Figura 19].



**Figura 19: Estratégia de análise das células de Kupffer.** A Figura 19A ilustra o *dot plot* 7AAD (marcador de viabilidade celular) x SSC. Foram selecionadas as células 7AAD negativas (região P2) para a exclusão de fragmentos celulares e células mortas. A Figura 19B ilustra o *dot plot* CD45 (marcador de linhagem leucocitária) x SSC. Foram selecionadas as células CD45 positivas (região P3). A Figura 19C ilustra o *dot plot* CD14 (marcador de macrófagos) x CD91 (LRP1).

Para a análise das células endoteliais sinusoidais, a mesma estratégia de exclusão de debris e células mortas foi aplicada novamente. Em seguida, no *dot plot* CD45 (leucócitos) x SSC foram selecionadas as células CD45 negativas. Por fim, no *dot plot* CD31 x CD91 identificou-se as células endoteliais sinusoidais e mensurou-se a expressão do receptor LRP1 (CD91). [Ver Figura 20].



**Figura 20: Estratégia de análise das células endoteliais sinusoidais.** A Figura 20A ilustra o *dot plot* 7AAD (marcador de viabilidade celular) x SSC. Foram selecionadas as células 7AAD negativas (região P2) para a exclusão de fragmentos celulares e células mortas. A Figura 20B ilustra o *dot plot* CD45 (marcador de linhagem leucocitária) x SSC. Foram selecionadas as células CD45 negativas até positivo fraco (região P3). A Figura 20C ilustra o *dot plot* CD31 (marcador de células endoteliais) x CD91 (LRP1).

### 5.3 Análise estatística

Para descrever o perfil dos grupos estudados foram feitas tabelas das frequências das variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram descritas como mediana, valores máximo e mínimo.

Para comparar as variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas.

Para análises de correlação entre as dosagens plasmáticas, séricas e expressão proteica foi utilizado o teste de correlação de Spearman ( $\rho$ ). Valores de  $\rho$  entre 0,2 a 0,4 foram considerados correlação fraca, valores entre 0,4 a 0,7 foram

considerações correlação moderada, e valores acima de 0,7 foram considerados correlação forte.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional *R Development Core Team*, versão 3.0.1.



## **6. Resultados II**



## 6.2 Resultados II - Voluntários para biópsia hepática

Dez pacientes submetidos à colecistectomia com uma idade mediana de 43 anos, e 10 pacientes submetidos à gastroplastia redutora com uma idade mediana de 53 anos foram incluídos no estudo. Todos os participantes do estudo eram do gênero feminino. Não houve diferença significativa das características clínicas entre os dois grupos incluídos (Tabela 8).

**Tabela 8: Características clínicas entre os grupos de colecistectomia e gastroplastia redutora**

Característica Clínica	Colecistectomia (N=10)	Gastroplastia (N=10)	p
Idade (Mediana; Mín-Máx)	43 (27 - 60)	53 (32 - 58)	0,65
Etnia (Caucasoide / Afro)	7 / 3	6 / 4	0,80
Grupo Sanguíneo ABO (Não O / O)	8 / 2	5 / 5	0,35

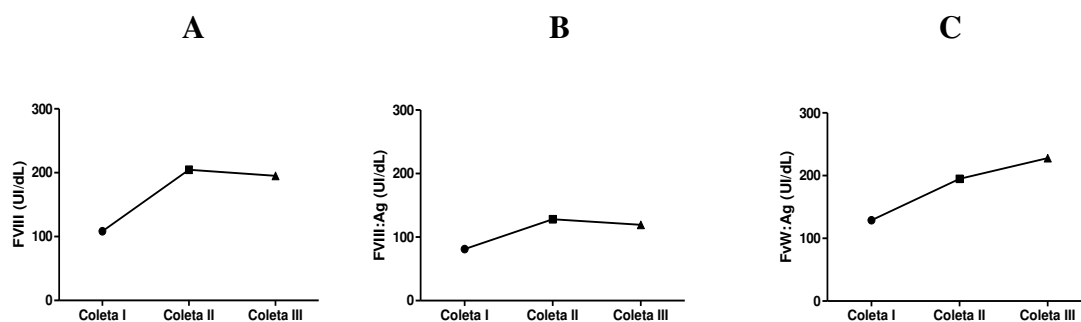
Apesar de termos voluntários de duas cirurgias distintas, os grupos mostraram similaridade em praticamente todas as avaliações laboratoriais realizadas (Tabela 9). Observou-se um aumento pronunciado de FvW e PCR na terceira coleta dos voluntários submetidos à gastroplastia redutora quando comparados aos voluntários submetidos à colecistectomia.

**Tabela 9: Comparação das análises laboratoriais entre os 2 grupos de voluntários**

Análises	Colecistectomia (n=10)	Gastroplastia (n=10)	p
CD91 em Hepatócitos	18458 (8159 – 46401)	30541 (14400 – 48520)	0,27
CD91 em Células de Kupffer	32938 (18502 – 52049)	26357 (22064 – 40722)	0,18
CD91 em Células Endoteliais	3820 (2539 – 9139)	5439 (2841 – 13381)	0,38
FVIII Coleta I	88,5 (70,0 – 176,6)	95,7 (80,7 – 185,5)	0,22
FVIII Coleta II	199,0 (86,9 – 354,5)	201,1 (86,9 – 209,6)	0,60
FVIII Coleta III	184,3 (78,7 – 209,6)	190,9 (93,5 – 368,2)	0,16
FVIII:Ag Coleta I	73,3 (48,8 - 120,9)	73,5 (50,6 - 248,1)	0,76
FVIII:Ag Coleta II	117,8 (54,5 - 185,1)	134,8 (64,3 - 260,4)	0,52
FVIII:Ag Coleta III	104, (73,2 - 171,4)	128,8 (48,2 - 194,7)	0,41
FvW Coleta I	91,4 (65,0 – 198,3)	116,9 (72,6 – 243,7)	0,14
FvW Coleta II	194,4 (79,7 – 233,3)	231,4 (120,0 – 237,8)	0,12
FvW Coleta III	203,3 (83,8 – 255,1)	242,5 (75,2 – 351,3)	<b>0,009</b>
PCR Coleta I	0,49 (0,03 – 1,13)	0,40 (0,06 – 2,47)	0,68
PCR Coleta III	2,45 (1,01 – 3,27)	7,97 (5,93 – 10,12)	<b>&lt;0,001</b>

Após verificarmos que ambos os grupos estudados apresentavam homogeneidade nos resultados laboratoriais, a segunda etapa do estudo foi avaliar no grupo total a existência de correlações entre as dosagens de fatores da coagulação, as características clínicas, e os níveis de expressão proteica do receptor LRP1.

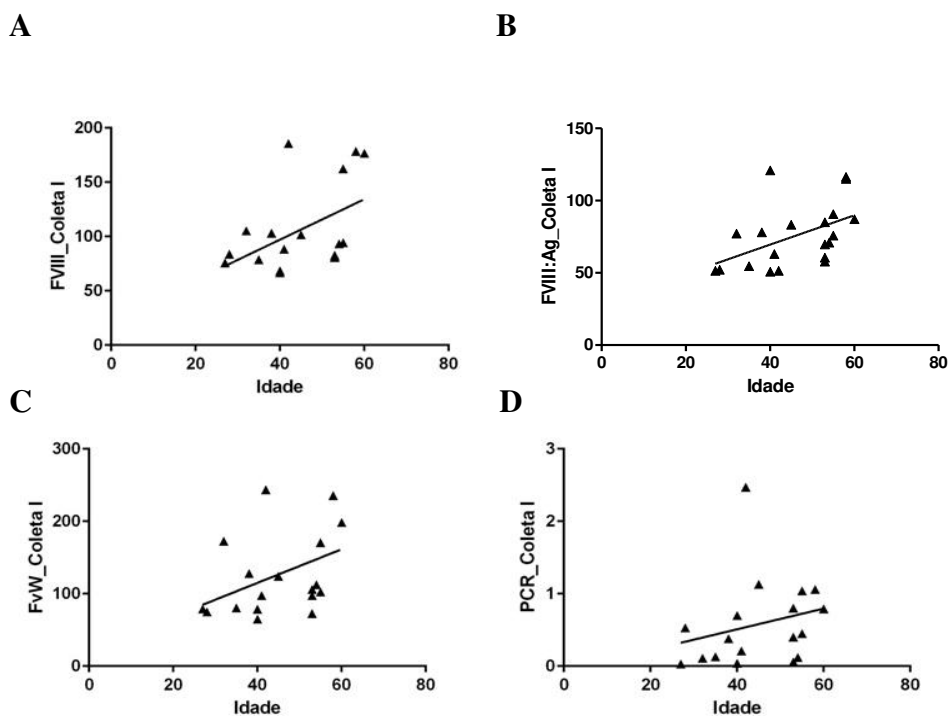
A Figura 21 mostra as medianas dos níveis plasmáticos de FVIII e FvW nas 3 coletas realizadas (I-pré-operatório, II-pós-operatório e III-12 horas pós-cirurgia) nos 2 grupos de cirurgias. Os grupos foram analisados conjuntamente uma vez que não apresentaram diferenças significativas entre si, exceto PCR e FvW na coleta III.



**Figura 21: Dosagens plasmáticas de FVIII e FvW nas 3 coletas realizadas.** Esta figura ilustra as medianas dos níveis da atividade do FVIII (Figura 21A), do antígeno do FVIII (Figura 21B), e do antígeno do FvW (Figura 21C) nas 3 coletas realizadas (I-pré-operatório, II-pós-operatório e III-12 horas pós-cirurgia).

A análise do FVIII e FvW mostrou que ocorre um aumento significativo nos níveis plasmáticos destes fatores no pós cirúrgico imediato (coleta II), com uma tendência de aumento do FvW ainda após 12 horas do procedimento cirúrgico (coleta III), enquanto que o FVIII já apresenta uma tendência ao declínio nessa última avaliação.

Observou-se correlações positivas entre a idade e os níveis plasmáticos basais de FVIII (atividade e antígeno), FvW, e séricos basais de PCR ( $p = 0,02$  ;  $\rho = 0,53$ ). A Figura 22 mostra as associações descritas acima:



**Figura 22: Associação entre a idade x FVIII, FVIII:Ag, FvW e PCR basais nos voluntários.** Esta figura ilustra a correlação positiva moderada da idade com os níveis basais (Coleta I) de FVIII:C (Figura 22A), FVIII:Ag (Figura 22B), FvW (Figura 22C), e PCR (Figura 22D) - Coeficiente de Correlação de Spearman rho = 0,53 ; p = 0,02

Com relação à etnia, observou-se que voluntários caucasoides possuem níveis basais aumentados de FVIII (atividade e antígeno) e PCR quando comparados aos voluntários afrodescendentes (Tabela 10). Nenhuma outra diferença foi observada de acordo com a etnia.

**Tabela 10: Diferenças das análises laboratoriais entre voluntários caucasoides e afrodescendentes**

Análises	Caucasoides (N = 13)	Afrodescendentes (N = 7)	p
FVIII (Coleta I)	110,2 (71,4 - 185,5)	81,2 (70,0 - 176,6)	<b>0,04</b>
FVIII:Ag (Coleta I)	90,3 (70,2 - 248,9)	67,8 (48,5 - 97,2)	<b>0,03</b>
PCR (Coleta I)	0,75 (0,11 - 2,47)	0,21 (0,03 - 0,79)	<b>0,02</b>

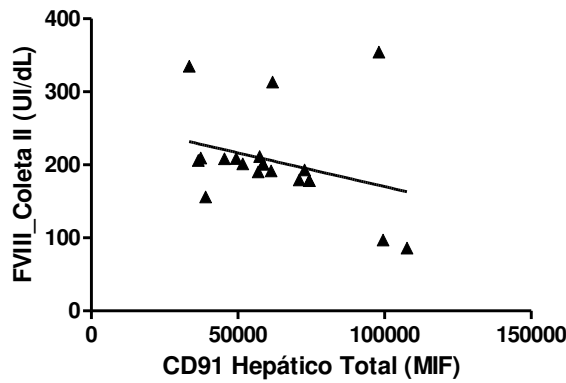
Com relação aos níveis de expressão proteica do receptor LRP1 (CD91), observou-se um predomínio nas células de Kupffer (MIF = 29580) e hepatócitos (MIF = 25693), e uma menor expressão nas células endoteliais sinusoidais (MIF = 5420). Apesar da hipótese inicial de uma possível correlação entre a expressão do receptor LRP1 nas células hepáticas e os níveis plasmáticos de FVIII, nossos resultados apenas demonstraram uma correlação inversa entre o nível de FVIII na coleta II e a expressão proteica de LRP1 nas células avaliadas em conjunto ( $\rho = -0,50$  ;  $p = 0,03$ ). [Ver Tabela 11].

**Tabela 11: Correlações entre os níveis plasmáticos de FVIII e a expressão proteica do LRP1 em células hepáticas**

	Hepatócitos	Céls. Kupffer	Céls. Endoteliais	Células Totais
FVIII:Ag Coleta I	$\rho = 0,33$ ; $p = 0,18$	$\rho = 0,08$ ; $p = 0,75$	$\rho = 0,33$ ; $p = 0,18$	$\rho = 0,18$ ; $p = 0,49$
FVIII:Ag Coleta II	$\rho = 0,26$ ; $p = 0,34$	$\rho = -0,12$ ; $p = 0,67$	$\rho = 0,37$ ; $p = 0,17$	$\rho = 0,04$ ; $p = 0,89$
FVIII:Ag Coleta III	$\rho = 0,10$ ; $p = 0,68$	$\rho = 0,06$ ; $p = 0,82$	$\rho = 0,08$ ; $p = 0,76$	$\rho = 0,01$ ; $p = 0,96$
FVIII Coleta I	$\rho = 0,30$ ; $p = 0,21$	$\rho = 0,20$ ; $p = 0,40$	$\rho = 0,11$ ; $p = 0,65$	$\rho = 0,23$ ; $p = 0,32$
FVIII Coleta II	$\rho = -0,33$ ; $p = 0,15$	$\rho = -0,23$ ; $p = 0,33$	$\rho = -0,16$ ; $p = 0,51$	<b><math>\rho = -0,50</math> ; <math>p = 0,03</math></b>
FVIII Coleta III	$\rho = -0,03$ ; $p = 0,88$	$\rho = -0,03$ ; $p = 0,89$	$\rho = 0,04$ ; $p = 0,86$	$\rho = -0,10$ ; $p = 0,66$

Rho – índice de correlação de Spearman

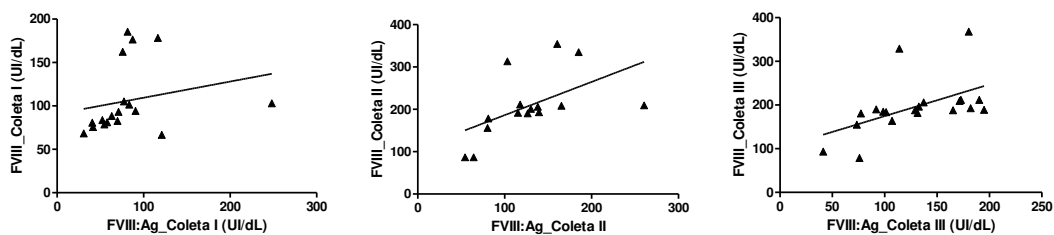
A Figura 23 mostra graficamente a correlação negativa entre a expressão do LRP1 total em células hepáticas e os níveis plasmáticos de FVIII da coleta II.



**Figura 23: Correlação entre a expressão do LRP1 Total e o FVIII Coleta II (rho = - 0,50 ; p = 0.03).**

Uma segunda análise de avaliação entre os níveis de FVIII e a expressão proteica do LRP1 foi a comparação das medianas dos níveis de FVIII plasmático entre voluntários com expressão de LRP1 acima do percentil 75 vs. abaixo do percentil 25. Novamente, não foram observadas diferenças significativas nessas análises (*Ver Anexo 3*).

Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre o antígeno e a atividade do FVIII nesse grupo de voluntários, nas três coletas realizadas (Figura 24).



**Figura 24: Associação entre os níveis plasmáticos do antígeno e atividade do FVIII**

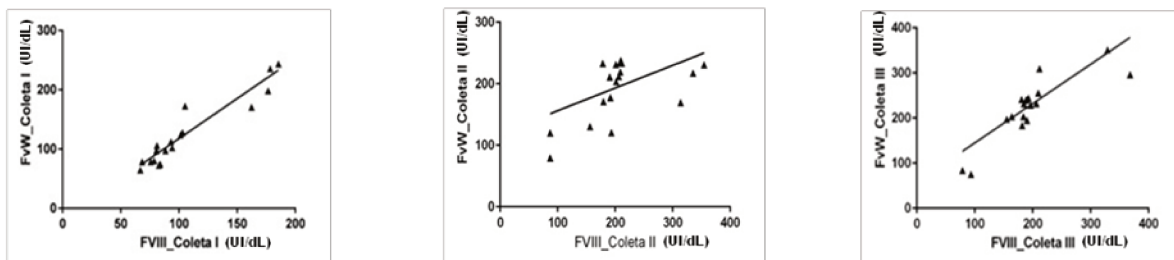
Coleta I: Coeficiente de Correlação de Spearman rho = 0,59 ; p = 0,01

Coleta II: Coeficiente de Correlação de Spearman rho = 0,73 ; p = 0,002

Coleta III: Coeficiente de Correlação de Spearman rho = 0,74 ; p p ≤ 0,001



Os fatores da coagulação FVIII e FvW foram analisados com relação a associação entre os níveis dos mesmos nas três coletas realizadas. Conforme visto nas Figuras 25 e 26, o FVIII (atividade e antígeno) e o FvW apresentaram uma correlação positiva estatisticamente significativa entre si nas três avaliações.

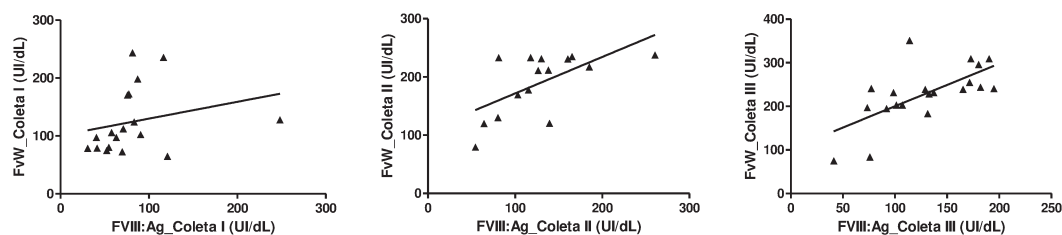


**Figura 25: Associação entre os níveis plasmáticos de FVIII (atividade) x FvW**

Coleta I: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,89$  ;  $p \leq 0,001$

Coleta II: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,47$  ;  $p = 0,04$

Coleta III: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,81$  ;  $p \leq 0,001$



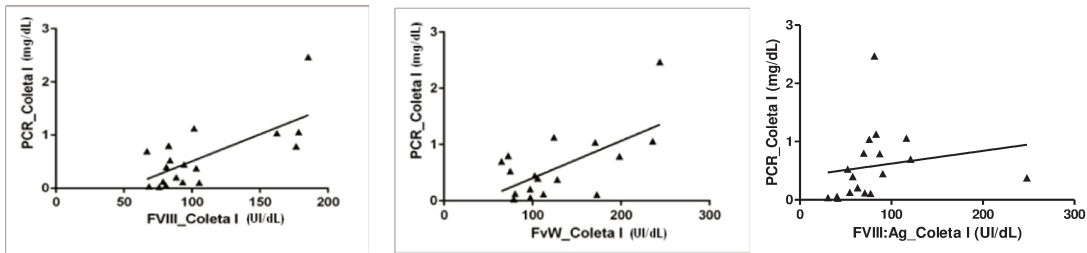
**Figura 26: Associação entre os níveis plasmáticos de FVIII (antígeno) x FvW**

Coleta I: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,49$  ;  $p = 0,04$

Coleta II: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,64$  ;  $p = 0,01$

Coleta III: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,70$  ;  $p \leq 0,001$

A associação da proteína C reativa (PCR) com os níveis dos fatores da coagulação como resposta de fase aguda (FVIII e FvW) mostrou correlação positiva estatisticamente significativa, tanto no pré operatório como no período de 12 horas do pós operatório (Ver Figuras 27 e 28).

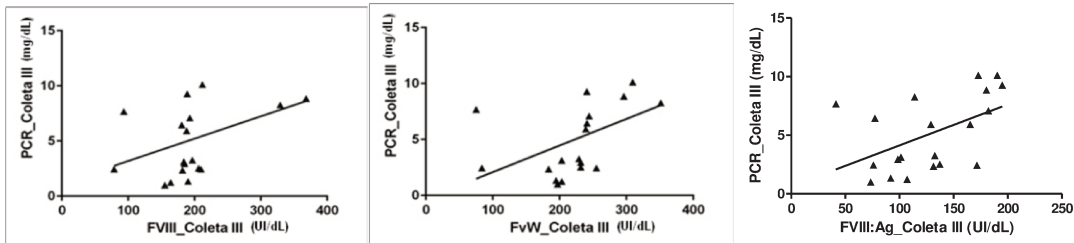


**Figura 27: Associações entre o marcador inflamatório PCR e os níveis de FVIII e FvW na Coleta I (pré-operatório)**

FVIII: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,64$  ;  $p = 0,003$

FVIII:Ag: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,61$  ;  $p = 0,007$

FvW:Ag: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,47$  ;  $p = 0,04$



**Figura 28: Associações entre o marcador inflamatório PCR e os níveis de FVIII e FvW na Coleta III (12 horas de pós operatório)**

FVIII: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,52$  ;  $p = 0,02$

FVIII:Ag: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,59$  ;  $p = 0,01$

FvW:Ag: Coeficiente de Correlação de Spearman  $\rho = 0,69$  ;  $p \leq 0,001$

## **7. Discussão II**



## 7.2 - Voluntários para biópsia hepática

### 7.2.1 – Avaliação da expressão proteica do LRP1 no fígado

Diversos estudos demonstraram que o receptor LRP1 tem um papel importante no *clearance* do FVIII [168]. Em meados de 1999, a partir de ensaios *in vitro* (*surface plasmon resonance*), dois estudos distintos mostraram que o FVIII possui uma afinidade moderada pelo receptor LRP1, e este último medeia a sua internalização para subsequente degradação intracelular. Posteriormente, estudos em modelos animais transgênicos deficientes de LRP1 hepático evidenciaram claramente o envolvimento do LRP1 no catabolismo do FVIII, ao demonstrarem que os animais deficientes de LRP1 hepático apresentavam um acúmulo de FVIII plasmático, e uma diminuição no catabolismo de FVIII humano [132,133].

A maioria dos estudos em humanos envolvendo o papel do LRP1 no catabolismo do FVIII limitou-se à investigação de polimorfismos genéticos. Isto porque apesar do LRP1 ser detectado em vários tecidos, seu principal sítio de expressão é o fígado [69,73], limitando a obtenção de amostras para sua análise. Neste estudo, pela primeira vez foi avaliada a expressão proteica do LRP1 em três subpopulações de células hepáticas provenientes de amostras saudáveis de fígado humano.

Para tal, foram utilizadas as técnicas de digestão tecidual com collagenase e citometria de fluxo. A digestão com collagenase tipo I proporciona a quebra das moléculas de colágeno, fibras reticulares presentes na matriz extracelular, proporcionando a obtenção de uma suspensão celular íntegra, proveniente de um tecido. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada na digestão de diversos tecidos, incluindo o hepático [169-178].

Baccarani *et al* [171] avaliaram a funcionalidade dos hepatócitos de fígados transplantados rejeitados, após a digestão com colagenase através de diversos métodos: função metabólica (*clearance* de diazepam), atividade proliferativa, e atividade sintética (RT-PCR de FIX e albumina). Não se observou alteração em nenhuma dessas atividades funcionais, mesmo com 10 dias após o isolamento das células.

Um outro ponto a ser considerado é quanto ao uso de células frescas ou armazenadas. Richert *et al* [174] demonstraram que a expressão de vários genes dos hepatócitos não foi diferente quando se utilizou células logo após sua coleta, ou armazenadas a 4° C por 3 a 24 horas antes das análises.

No entanto, estudos demonstraram que o congelamento das células hepáticas a - 80° C pode ocasionar a morte de grande parte delas [170,179,180]. Portanto, apesar de ser interessante a análise de todas as amostras conjuntamente, optamos por realizar os experimentos deste estudo utilizando amostras de fígado mantidas a 4° C por 12 horas, evitando assim a perda celular.

Neste estudo padronizamos a expressão do receptor LRP1 em três subpopulações de células hepáticas, isto é, hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais, correlacionado-as com os níveis plasmáticos de FVIII. O método de citometria de fluxo permitiu a quantificação da expressão do LRP1 na superfície destas células. É importante ressaltar que estes resultados são inéditos, pois estudos anteriores avaliaram a expressão do LRP1 em células hepáticas apenas por métodos semiquantitativos, como imunohistoquímica e imunofluorescência, e PCR em tempo real [181,182].

Apesar da hipótese inicial de uma possível correlação entre a expressão proteica do receptor LRP1 nas células hepáticas e os níveis plasmáticos de FVIII, não se observou qualquer correlação com qualquer um dos subtipos celulares, isto é, hepatócitos, células de Kupffer ou células endoteliais sinusoidais. Nossos resultados apenas demonstraram uma correlação negativa entre o nível de FVIII logo após a cirurgia (coleta II) e a expressão proteica de LRP1 nas células hepáticas avaliadas em conjunto.

O papel dos macrófagos na internalização e catabolismo do FVIII via LRP1 está bem estabelecido, e confirmado recentemente em estudo de cultura de macrófagos derivados de monócitos circulantes [183].

Rastegarlarlari *et al* [184] avaliaram os níveis plasmáticos de FVIII e FvW em animais deficientes de LRP1 em macrófagos. Estes animais apresentavam um acúmulo de FVIII e FvW plasmáticos, e uma diminuição no *clearance* do FVIII e do FvW. A superexpressão do RAP (antagonista do LRP1) nos animais deficientes causou um aumento adicional do FVIII plasmático, mas não do FvW, indicando que o papel do LRP1 no *clearance* do FvW está limitado aos macrófagos.

Além disso, evidenciou-se a relevância do *shear stress* na internalização do complexo FVIII-FvW [183,184]. As células endoteliais sinusoidais formam um estreito lúmen fenestrado, e as células de Kupffer exibem longos prolongamentos dentro desses espaços, proporcionando um nível de *shear stress* suficientemente alto para desencadear a endocitose do complexo FVIII-FvW por essas células.

Portanto, apesar de inúmeros estudos demonstrando o papel do LRP1 no catabolismo do FVIII ou do complexo FVIII-FvW, talvez somente nas situações de

alterações muito importantes, como as obtidas com modelos animais transgênicos ou *knockout* é que seja possível demonstrar essa correlação. Não podemos descartar que com a evolução do procedimento cirúrgico, a expressão proteica do LRP1 também se alterasse, contribuindo para a observação de uma associação com os níveis plasmáticos de FVIII na coleta II.

Outra hipótese é que outros receptores possam também contribuir para os níveis do FVIII. No final da década de 1990 foi identificada e caracterizada uma forma solúvel do LRP1 (sLRP1), presente no plasma de indivíduos saudáveis [185,186]. O sLRP1 é composto pela cadeia alfa e por parte da cadeia beta da molécula de LRP1, presente na superfície das células [187].

Quando presente, a forma solúvel de receptores pode inibir ou aumentar a função do receptor presente na superfície das células. O sLRP1 tem a capacidade de se ligar aos ligantes de LRP1, mas se é capaz de interferir no papel do LRP1 celular ainda é incerto.

O t-PA é um conhecido ligante do LRP1 presente nas superfícies celulares, e níveis elevados do sLRP já demonstraram uma redução significativa da degradação do t-PA por células Hep G2 (expressam LRP1 em sua superfície) [185].

O sLRP1 é o principal ligante periférico do peptídeo  $\beta$ -amilóide. [75-90]. Estudos recentes demonstraram que pacientes com doença de Alzheimer possuem níveis diminuídos de sLRP1, e aumento dos níveis do peptídeo  $\beta$ -amilóide, o que pode contribuir para o aumento de sua concentração no cérebro, e então desencadear a doença [188-190].



Portanto, esses estudos evidenciam a importância do sLRP1, e que apesar de ainda não ter sido investigado, talvez possa ter um papel na regulação dos níveis plasmáticos do FVIII.

Outro aspecto relacionado ao catabolismo do FVIII que tem sido investigado atualmente é o papel de outros receptores nesse processo. Uma vez que o domínio B do FVIII é altamente glicosilado, isto permite a sua interação com receptores reconhecedores de carboidratos, dentre eles o receptor de asialoglicoproteína (ASGPR). Já foi demonstrado que este receptor é capaz de se ligar ao FVIII [144].

Bovenschen *et al.* [191] observaram que a molécula inteira do FVIII, mas não o FVIII sem o domínio B é capaz de se ligar ao ASGPR. Isso indica que os glicanos presentes no domínio B são os responsáveis por mediar a ligação do FVIII ao ASGPR. No entanto, é importante ressaltar que alguns estudos mostraram que o FVIII inteiro e o FVIII sem o domínio B possuem sobrevidas semelhantes quando aplicados em hemofílicos [192,193]. Portanto, a relevância fisiológica do receptor ASGPR no clearance do FVIII permanece incerta.

Um estudo amplo de associação do genoma (GWAS) identificou uma associação significativa entre polimorfismos no gene do receptor de lectina CLEC4M e os níveis plasmáticos de FVIII e FvW. [194]. O receptor CLEC4M é expresso por células endoteliais [195], e alterações no seu gene têm sido associadas à suscetibilidade genética a patógenos [196,197]. No entanto, o seu papel no clearance de glicoproteínas é pouco conhecido.

Recentemente, dois estudos avaliaram o papel do CLEC4M no *clearance* do FvW e do FVIII. Através de ensaios *in vitro*, os autores mostraram que tanto o FvW,

o FVIII e o complexo FvW/FVIII são capazes de se ligar ao CLEC4M. Além disso, foi demonstrado que células HEK 293 transfectadas com CLEC4M são capazes de se ligar e internalizar o FvW e o FVIII. Estes resultados foram confirmados em um modelo *in vivo*, onde os autores observaram que ao induzir a expressão do CLEC4M no fígado dos animais observou-se uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de FvW e FVIII [198,199].

### **7.2.2 - Avaliação das dosagens de FVIII, FvW e PCR**

Em nosso estudo, observamos um aumento expressivo e significativo dos níveis de FVIII e de FvW entre a primeira e a segunda coletas. A partir da coleta II, os níveis plasmáticos de FVIII permaneceram estáveis até a coleta III, enquanto que o FvW ainda apresentava uma tendência à elevação. Isto pode ser explicado pela diferença de meia-vida dessas duas proteínas, sendo que o FVIII possui uma meia vida de aproximadamente 12 horas enquanto que a do FvW é de aproximadamente 24 horas [200,201].

A relação entre os níveis plasmáticos de FVIII e FvW já é bem estabelecida, sendo que essas proteínas circulam no plasma na forma de um complexo FVIII/FvW. A importância da formação desse complexo reside no fato que o FvW estabiliza a estrutura heterodimérica do FVIII, inibe a ligação precoce do FVIII ao FIXa, e previne a catabolismo precoce do FVIII [168].

Apesar de o FvW ter apresentado valores mais elevados na coleta III nos pacientes submetidos à gastroplastia, em relação aos pacientes colecistectomizados, quando avaliamos o grau de aumento em relação ao valor basal (coleta I), observa-se

uma semelhança entre os grupos. Portanto, o grau de aumento do FVIII e do FvW após os procedimentos cirúrgicos parece ser proporcional aos valores basais e semelhantes em ambos os grupos de pacientes cirúrgicos.

A PCR apresentou um aumento muito significativo após os procedimentos cirúrgicos, muito mais expressivo nos pacientes submetidos à gastroplastia redutora. Este aumento reflete o perfil de proteína de fase aguda da PCR. Como a gastroplastia redutora é um procedimento mais longo, com maior injúria tecidual, talvez justifique esse achado.

O FVIII e o FvW são proteínas consideradas de fase aguda, e o aumento observado entre a coleta I e II corrobora esse perfil [202]. Apesar da correlação entre a PCR e esses fatores, é evidente que a resposta da PCR é muito mais exacerbada.



## **8. Conclusões**



## 8. CONCLUSÕES

O aumento do FVIII em pacientes com TEV ainda se mantém, mas com um grau menor em relação aos primeiros anos após o episódio trombótico.

Apesar de a SPT apresentar componentes de inflamação crônica, somente os pacientes com grau mais avançado dessa sequela demonstraram níveis elevados de FVIII. Talvez o aumento do FVIII dependa de processos inflamatórios crônicos mais expressivos, ou outros mecanismos possam estar colaborando para esses achados.

Apesar das regiões gênicas avaliadas codificarem sequências proteicas importantes na interação entre o FVIII e o LRP1, nenhuma alteração teve relação com os níveis plasmáticos de FVIII ou com o TEV.

Apesar da detecção da expressão do receptor LRP1 em três subtipos de células hepáticas humanas (células endoteliais, células de Kupffer e hepatócitos), não houve correlação com os níveis plasmáticos de FVIII e FvW, em indivíduos saudáveis.





## **9. Referências Bibliográficas**



- 1- Loscalzo J. Pathogenesis of thrombosis. In: Williams WJ. Hematology. 5th Edition. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1525-31.
- 2- López JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2004: 439-56.
- 3- Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors, a focus on venous thrombosis. **Thromb Haemost** 1997; 78: 1-6.
- 4- Fowkes FJI, Price JF, Fowkes FGR. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: Systematic review. **Eur J Endovasc Surg** 2003; 25: 1-5.
- 5- White RH, Zhou H, Romanos PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. **Ann Intern Med** 1998; 128: 737-40.
- 6- White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. **Circulation** 2003; 107 (23 Suppl 1): 14-8.
- 7- Epidemiologia do tromboembolismo venoso. **J Vasc Br** 2002; 1(2): 83-4.
- 8- White RH, Dager WE, Zhou H, Murin S. Racial and gender differences in the incidence of recurrent venous thromboembolism. **Thromb Haemost** 2006; 96(3): 267-73.
- 9- Maffei FH, Rollo HÁ, Lastória S. Tromboses venosas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2004. p.855-78.
- 10- Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. **Thromb Haemost** 1999; 82(2): 610-9.
- 11- Robertoroye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. **Am J Hematol** 2001; 68: 256-68.

- 12- Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood** 1995; 85: 1504-8.
- 13- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood** 1996; 88: 3698-703.
- 14- Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet** 1994; 344: 1453-7.
- 15- Friederich PW, Sanson BJ, Simiono P. Frequency of pregnancy related venous thromboembolism in anticoagulant factor deficient women: implications for prophylaxis. **Ann Intern Med** 1996; 125: 955-60.
- 16- Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN *et al.* Relative impact of risk factors for deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. **Arch Intern Med** 2002; 162(11): 1245-8.
- 17- Kahn SR. The post thrombotic syndrome. **Thromb Res** 2011; 127(3): S89-S92.
- 18- Prandoni P and Kahn SR. Post-thrombotic syndrome: prevalence, prognostication and need for progress. **Br J Haematol** 2009; 145: 286-95.
- 19- Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SHM, van der Ven-Jongekrijg J, van der Graaf F, Wollersheim H. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. **J Vasc Surg** 2002; 35: 701-6.
- 20- Marchena-Yglesias PJ, Nieto Rodriguez JA, Serrano MS, Belinchon MO, Cortes CA, Diaz dT, et al. Acute-phase reactants and markers of inflammation in venous thromboembolic disease: correlation with clinical and evolution parameters. **An Med Interna** 2006; 23: 105-10.

- 21- Kahn SR, Shrier I, Julian JA, Ducruet T, Arsenault L, Miron MJ, et al. Determinants and time course of the post-thrombotic syndrome after acute deep venous thrombosis. **Ann Intern Med** 2008; 149: 698-707.
- 22- Kahn SR. How I treat postthrombotic syndrome. **Blood** 2009; 114: 4624-31.
- 23- Reich-Schupke S, Altmeyer P, Stücker M. What do we know of post-thrombotic syndrome? Current status of post-thrombotic syndrome in adults. **JDDG** 2010; 8: 81-6.
- 24- Stain M, Schonauer V, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, et al. The post-thrombotic syndrome: risk factors and impact on the course of thrombotic disease. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 2671-6.
- 25- Tick LW, Kramer MHH, Rosendaal FR, Faber WR, Doggen CJM. Risk factors for post-thrombotic syndrome in patients with a first deep venous thrombosis. **J Thromb Haemost** 2008; 6: 2075-81.
- 26- Spiezia L, Campello E, Giolo E, Villalta S, Prandoni P. Thrombophilia and the risk of post-thrombotic syndrome: retrospective cohort observation. **J Thromb Haemost** 2010; 8: 211-3.
- 27- Yamaki T, Hamahata A, Soejima K, Kono T, Nozaki M, Sakurai H. Factors Predicting Development of Post-thrombotic Syndrome in Patients with a First Episode of Deep Vein Thrombosis: Preliminary Report. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 2011; 41: 126-33.
- 28- Roumen-Klappe EM, Janssen MCH, van Rossum J, Holewijn S, van Bokhoven MMJA, Kaasjager K, Wollersheim H, den Heijer M. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post- thrombotic syndrome: a prospective study. **J Thromb Haemost** 2009; 7: 582-7.

- 29- Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome. **Thromb Haemost** 2009; 101(3): 505-12.
- 30- Wojcik BM, Wroblewski SK, Hawley AE, Wakefield TW, Myers Jr DD and Diaz JA. Interleukin-6: A Potential Target for Post-Thrombotic Syndrome. **Ann Vasc Surg** 2011; 25: 229-39.
- 31- Bouman AC, Smits JJM, ten Cate H, ten Cate-Hoek AJ. Markers of coagulation, fibrinolysis and inflammation in relation to post-thrombotic syndrome. **J Thromb Haemost** 2012; 10: 1532-8.
- 32- Latella J, Desmarais S, Miron M-J, Roussin A, Joyal F, Kassis J, Solymoss S, Desjardins L, Ginsberg JS, Kahn SR. Relation between D-dimer level, venous valvular reflux and the development of post-thrombotic syndrome after deep vein thrombosis. **J Thromb Haemost** 2010; 8: 2169-75.
- 33- Roberts LN, Patel RK, Chitongo PB, Bonner L, Arya R. Presenting D-dimer and early symptom severity are independent predictors for post-thrombotic syndrome following a first deep vein thrombosis. **British Journal of Haematology** 2013; 160(6): 817-24.
- 34- Goldenberg NA, Knapp-Clevenger R, Manco-Johnson MJ. Elevated Plasma Factor VIII and d-Dimer Levels as Predictors of Poor Outcomes of Thrombosis in Children. **N Engl J Med** 2004; 351: 1081-8.
- 35- Kreuz W, Stoll M, Junker R, Heinecke A, Schobess R, Kurnik K *et al.* Thrombosis and Post-Thrombotic Syndrome: Results of a Multicenter Study Familial Elevated Factor VIII in Children With Symptomatic Venous Thrombosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2006; 26: 1901-6.

- 36- Franco RF. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2004. p.739-48.
- 37- Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2010; 32(5): 416-21.
- 38- Vlot AJ , Koppelman SJ , Bouma BN , Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand factor. **Thromb Haemost** 1998; 79: 456-65.
- 39- Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbrouke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. **Lancet** 1995; 345: 152-5.
- 40- Kraaijenhagen RA, Anker PS, Koopman MMW, Reitsma PH, Prins MH, Van den Ende A, *et al.* High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk for venous thromboembolism. **Thromb Haemost** 2000; 83: 5-9.
- 41- Lensen R, Bertina RM, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. High factor VIII levels contribute to the thrombotic risk in families with factor V Leiden. **British Journal of Haematology** 2001; 114: 380-6.
- 42- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, Hamulya K, Van Pampus ECM, Koopman MMW, Prins MH, Van Der Meer J and Büller HR. Elevated levels of FVIII within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 79-84.
- 43- Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martínez-Sánchez E, Vallvé C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. **Thromb Haemost** 2005; 93: 468-74.

- 44- Bank I, Van de Poel MHW, Coppens M, Hamulyák K, Prins MH, Van der Meer J, Veeger NJGM, Büller HR, Middeldorp S. Absolute annual incidences of first events of venous thromboembolism and arterial vascular events in individuals with elevated FVIII - A prospective family cohort study. **Thromb Haemost** 2007; 98: 1040-4.
- 45- Kuipers S, Cannegieter SC, Doggen CJM, and Rosendaal FR. Effect of elevated levels of coagulation factors on the risk of venous thrombosis in long-distance travelers **Blood** 2009; 113: 2064-9.
- 46- Mello TBT, Machado TFG, Montavão SAL, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Assessing the Coagulation Factor Levels, Inherited Thrombophilia, and ABO Blood Group on the Risk for Venous Thrombosis Among Brazilians. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis** 2009; 15(4): 408-14.
- 47- Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M , Schneider B , *et al.* High plasma levels of factor VIII and risk or recurrent venous thromboembolism. **N Engl J Med** 2000; 343(7): 457-62.
- 48- Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. **JAMA** 2005; 293(19): 2352-61.
- 49- Hron G, Eichinger S, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Stain M, Gartner V, Kyrle PA. Family History for Venous Thromboembolism and the Risk for Recurrence. **The American Journal of Medicine** 2006; 119: 50-3.
- 50- Cosmi B, Legnani C, Cini M Favaretto E, Palareti G. D-dimer and factor VIII are independent risk factors for recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep vein thrombosis. **Thrombosis Research** 2008; 122: 610-7.
- 51- O'Donnell J, Tuddenham EGD, Manning RA, Kemball-Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia



screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. **Thromb Haemost** 1997; 77(5): 825-8.

**52-** Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. **Thromb Haemost** 1999; 81(5): 680-3.

**53-** O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of VIIIc in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. **Thromb Haemost** 2000; 83: 10-3.

**54-** Meijers JC, Tekelenberg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. **N Engl J Med** 2000; 342: 696-701.

**55-** O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan MA. Marked elevation of thrombin generation in patients with elevated FVIII:C and venous thromboembolism. **Br J Haematol** 2001; 115: 687-91.

**56-** Ryland JK, Lawrie AS, Mackie IJ, Machin SJ. Persistent high factor VIII activity leading to increased thrombin generation - A prospective cohort study. **Thromb Res** 2012;129(4): 447-52.

**57-** Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. **J Biol Chemist** 1999; 274(53): 37685-92.

**58-** Sousa NC, Annichino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro ML. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. **Haematologica** 2007; 92: 236-9.

- 59- Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, Berger M, Teuchert K, Spahn A, *et al.* High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. **Thromb Haemost** 2004; 92: 42-6.
- 60- Bertina RM. Elevated clotting factors levels and venous thrombosis. **Pathophysiol Haemost Thromb** 2004; 33: 395-400.
- 61- Kamphuisen PW, Houwing-Duistermaat JJ, van Houwelingen HC, Eikenboom JC, Bertina RM, Rosendaal FR. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. **Thromb Haemost** 1998; 79: 323-7.
- 62- Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Saut N, Pellegrina L, Alessi MC, *et al.* Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. **Br J Haematol** 2005; 128: 91-9.
- 63- Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Koster T, Blann AD, Vos HL, *et al.* High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. **Br J Haematol** 2001; 115: 156-8.
- 64- Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. **Clinica Chimica Acta** 2003; 330: 31-55.
- 65- Viel KR, Machiah DK, Warren DM, Khachidze M, Buil A, Fernstrom K, *et. al.* A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) structural gene and associations with plasma FVIII activity levels. **Blood** 2007; 109(9): 3713-24.
- 66- Ay M, Dolek B, Erdem G, Devecioglu O, Gozukirmizi N. Is There Any Correlation Between The Elevated Plasma Levels and Gene Variations of Factor VIII in Turkish Thrombosis Patients? **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis** 2011; 17(1): 46-50.

- 67-** Mansvelt EPG, Laffan M, McVey JH, Tuddenham EGD. Analysis of the F8 gene in individuals with with plasma factor VIII:C levels and associated venous thrombosis. **Thromb Haemost** 1998; 80: 561-5.
- 68-** Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. **J Clin Invest** 2001;108:7 79-84.
- 69-** Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein in human tissues. **Cell Tissue Res** 1992; 269: 375-82.
- 70-** Neels JG, Bovenschen N, Van Zonneveld A-J, Lenting PJ. Interaction between factor VIII and LDL receptor-related protein: Modulation of coagulation? **Trends Cardiovasc Med** 2000; 10: 8-14.
- 71-** Gonias SL, Wu L, Salicioni AM. Low density lipoprotein receptor- related protein: regulation of the plasma membrane proteome. **Thromb Haemost** 2004; 91: 1056-64.
- 72-** Bourazopoulou E, Kapsogeorgou EK, Routsias JG, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Functional expression of the alpha 2-macroglobulin receptor CD91 in salivary gland epithelial cells. **Journal of Autoimmunity** 2009; 33: 141-6.
- 73-** Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. **Physiol Rev** 2008; 88: 887-918.
- 74-** Pieper-Fürst U, Lammert F. Low-density lipoprotein receptors in liver: Old acquaintances and a newcomer. **Biochimica et Biophysica Acta** 2013; 1831: 1191-8.
- 75-** Wavrant-DeVrière F, Pérez-Tur J, Lambert J-C, Frigard B, Pasquier F, Delacourte A *et al.* Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters** 1997; 227: 68-70.

76- Baum L, Chen L, Ng H-K, Chan YS, Mak YT, Woo J *et al.* Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. **Neuroscience Letters** 1998; 247: 33-6.

77- Kamboh MI, Ferrell RE, DeKosky ST. Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. **Neuroscience Letters** 1998; 244: 65-8.

78- Hatanaka Y, Kamino K, Fukuo K, Mitsuda N, Nishiwaki-Ueda Y, Sato N *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and risk for late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. **Clin Genet** 2000; 58: 319-23.

79- Hyman BT, Strickland D, Rebeck GW. Role of the Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein in b-Amyloid Metabolism and Alzheimer Disease. **Arch Neurol** 2000; 57: 646-50.

80- Sánchez-Guerra M, Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J, Fontalba A *et al.* Case-control study and meta-analysis of low density lipoprotein receptor-related protein gene exon 3 polymorphism in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters** 2001; 316: 17-20.

81- Causevic M, Ramoz N, Haroutunian V, Davis K, Buxbaum JD. Lack of Association between the Levels of the Low-Density Lipoprotein Receptor Related Protein (LRP) and Either Alzheimer Dementia or LRP Exon 3 Genotype. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** 2003; 62(10): 999-1005.

82- Kölsch H, Ptok U, Mohamed I, Schmitz S, Rao ML, Maier W, Heun R. Association of the C766T Polymorphism of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Gene With Alzheimer's Disease. **American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)** 2003; 121B: 128-30.

83- Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Basile AM, Capurso S *et al.* Regional European Differences in Allele and Genotype Frequencies of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Polymorphism in Alzheimer's Disease.

**American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)** 2004; 126B: 69-73.

**84-** Bian L, Yang JD, Guo TW, Duan Y, Qin W, Sun Y *et al.* Association Study of the A2M and LRP1 Genes with Alzheimer Disease in the Han Chinese. **Biol Psychiatry** 2005; 58: 731-7.

**85-** Pritchard A, Harris J, Pritchard CW, St. Clair D, Lemmon H, Lambert J-C. Association study and meta-analysis of low-density lipoprotein receptor related protein in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters** 2005; 382: 221-6.

**86-** Bahia VS, Kok F, Marie SN, Shinjo SO, Caramelli P, Nitrini R. Polymorphisms of APOE and LRP Genes in Brazilian Individuals With Alzheimer Disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2008; 22: 61-5.

**87-** Deane R, Sagare A, Zlokovic B. The Role of the Cell Surface LRP and Soluble LRP in Blood-Brain Barrier A $\beta$  Clearance in Alzheimer's Disease. **Curr Pharm Des** 2008; 14(16): 1601-5.

**88-** Zhou Y-T, Zhang Z-X, Chan P, He X-M, Tang M-N, Wu C-B, Hong Z. Genetic association between low-density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and Alzheimer's disease in Chinese Han population. **Neuroscience Letters** 2008; 444: 109-11.

**89-** Shi YM, Zhou H, Zhang ZJ, Yu H, Bai F, Yuan YG. Association of the LRP1 gene and cognitive performance with amnesic mild cognitive impairment in elderly Chinese. **International Psychogeriatrics** 2009; 21(6): 1072-80.

**90-** Vázquez-Higuera JL, Mateo I, Sánchez-Juan P, Rodríguez-Rodríguez E, Pozueta A, Infante J *et al.* Genetic Interaction between Tau and the Apolipoprotein E Receptor LRP1 Increases Alzheimer's Disease Risk. **Dement Geriatr Cogn Disord** 2009; 28: 116-20.

- 91- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. **J Clin Invest** 1998; 101: 689-95.
- 92- Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, internalizing. **J Clin Invest** 2007; 117: 94-8.
- 93- Newton CS, Loukinova E, Mikhailenko I, Ranganathan S, Gao Y, Haudenschild C, Strickland DK. Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for co-receptor function. **J Biol Chem** 2005; 280: 27872-8.
- 94- Zhou L, Takayama Y, Boucher P, Tallquist MD, Herz J. LRP1 Regulates Architecture of the Vascular Wall by Controlling PDGFRb-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation. **PLoS ONE** 2009; 4(9): e6922.
- 95- Muratoglu SC, Belgrave S, Lillis AP, Migliorini M, Robinson S, et al. Macrophage LRP1 Suppresses Neo-Intima Formation during Vascular Remodeling by Modulating the TGF-b Signaling Pathway. **PLoS ONE** 2011; 6(12): e28846.
- 96- Yancey PG, Ding Y, Fan D, Blakemore JL, Zhang Y, Ding L *et al.* Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Prevents Early Atherosclerosis by Limiting Lesional Apoptosis and Inflammatory Ly-6C<sup>high</sup> Monocytosis Evidence That the Effects Are Not Apolipoprotein E Dependent. **Circulation** 2011; 124: 454-64.
- 97- Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CA, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1- dependent macrophage migration. **EMBO J** 2006; 25: 1860-70.
- 98- Spijkers PPEM, Costa Martins P, Westein E, Gahmberg CG, Zwaginga JJ, Lenting PJ. LDL-receptor-related protein regulates  $\beta$ 2-integrin-mediated leukocyte adhesion. **Blood** 2005; 105: 170-7.

- 99-** Woodley DT, Fan J, Cheng CH, Li Y, Chen M, Bu G, Li W. Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90 autocrine signaling to promote keratinocyte migration. **Journal of Cell Science** 2009; 122: 1495-8.
- 100-** Mantuano E, Jo M, Gonias SL, Campana WM. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP1) Regulates Rac1 and RhoA Reciprocally to Control Schwann Cell Adhesion and Migration. **J Biol Chemist** 2010; 285(19): 14259-66.
- 101-** Llorent-Cortes V, Barbarigo V, Badimon L. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Modulates the Proliferation and Migration of Human Hepatic Stellate Cells. **J Cell Physiol** 2012; 227: 3528-33.
- 102-** Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. **J Clin Invest** 2003; 112: 1533-40.
- 103-** Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganathan S, Lawrence DA, Strickland D, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. **Blood** 2007; 109: 3270-8.
- 104-** Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. **Nat Immunol** 2000; 1: 151-5.
- 105-** Binder RJ, Srivastava PK. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101: 6128-33.
- 106-** Li Y, Wood N, Parsons PG, Yellowlees D, Donnelly PK. Expression of alpha2 macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein on surfaces of tumour cells: a study using flow cytometry. **Cancer Lett** 1997; 111: 199-205.
- 107-** Li Y, Wood N, Grimsley P, Yellowlees D, Donnelly PK. In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein. **Invasion Metastasis** 1998; 18: 240-51.

**108-** Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G. Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. **Am J Pathol** 2002; 160: 237-46.

**109-** Benes P, Jurajda M, Zaloudík J, Izakovicová-Hollá L, Vácha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Res** 2003, **5**: R77-R81.

**110-** Sid B, Dedieu S, Delorme N, Sartelet H, Rath GM, Bellon G, Martiny L. Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator. **Int J Biochem Cell Biol** 2006; 38: 1729-40.

**111-** Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL. The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Regulates Cancer Cell Survival and Metastasis Development. **Cancer Res** 2007; 67(20): 9817-24.

**112-** Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and 9. **Cancer Res** 2009; 69(3): 879-86.

**113-** Jiao Y, Liu W. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for trichosanthin in 2 choriocarcinoma cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2010; 391: 1579-84.

**114-** Catusus L, Gallardo A, Llorente-Cortes V, Escuin D, Muñoz J, Tibau A, *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is associated with proliferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. **Human Pathology** 2011; 42: 1581-8.

**115-** Huang X-Y, Shi G-M, Devbhandari RP, Ke A-W, Wang Y, *et al.* Low Level of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Predicts an Unfavorable



Prognosis of Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. **PLoS ONE** 2012; 7(3): e32775.

**116-** Laatscha A, Merkel M, Talmudc PJ, Grewal T, Beisiegel U, Heerena J. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. **Atherosclerosis** 2009; 204: 105-11.

**117-** Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, Zhou L, Herz J, Kandror KV, Pilch PF. Proteomic Analysis of GLUT4 Storage Vesicles Reveals LRP1 to Be an Important Vesicle Component and Target of Insulin Signaling. **J Biol Chemist** 2010; 285(1): 104-14.

**118-** Nasarre L, Juan-Babot O, Gastelurrutia P, Lluçia-Valldeperas A, Badimon L, Bayes-Genis A, Llorente-Cortés V. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 is upregulated in epicardial fat from type 2 diabetes mellitus patients and correlates with glucose and triglyceride plasma levels. **Acta Diabetol** DOI 10.1007/s00592-012-0436-8

**119-** De Filippo A, Binder RJ, Camisaschi C,\* Beretta V, Arienti F,† Villa A, *et al.* Human Plasmacytoid Dendritic Cells Interact with gp96 via CD91 and Regulate Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology** 2008; 181: 6525-35.

**120-** Stebbing J, Gazzard B, Kim L, Portsmouth S, Wildfire A, Teo I, *et al.* The heat-shock protein receptor CD91 is up-regulated in monocytes of HIV-1-infected “true” long-term nonprogressors. **Blood** 2003; 101(10): 4000-4.

**121-** Kovac A, Erickson MA, Banks WA. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroinflammation** 2011; 8: 139-48.

**122-** Gudleski-O'Regan N, Greco TM, Cristea IM, Shenk T. Increased expression of LDL receptor-related protein 1 during human cytomegalovirus infection reduces virion cholesterol and infectivity. **Cell Host Microbe** 2012; 12(1): 86-96.

- 123-** Eriksson C, Rantapaa-Dahlqvist S, Sundqvist KG. T-cell expression of CD91 – a marker of unresponsiveness to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis. **APMIS** 2010; 118: 837-45.
- 124-** Castellano J, Aledo R, Sendra J, Costales P, Juan-Babot O, Badimon L, Llorente-Cortés V. Hypoxia Stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor–Related Protein-1 Expression Through Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Human Vascular Smooth Muscle Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2011; 31: 1411-20.
- 125-** Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. **Cardiovascular Research** 2012; 94: 469-79.
- 126-** Lillis AP, Greenlee MC, Mikhailenko I, Pizzo SV, Tenner AJ, Strickland DK, Bohlsón SS. Murine Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP) Is Required for Phagocytosis of Targets Bearing LRP Ligands but Is Not Required for C1q-Triggered Enhancement of Phagocytosis. **The Journal of Immunology** 2008; 181: 364-73.
- 127-** Lambert MP, Wang Y, Bdeir KH, Nguyen Y, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor–related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. **Blood** 2009; 114: 2290-8.
- 128-** Frazier-Wood AC, Kabagambe EK, Borecki IB, Tiwari HK, Ordovas JM, *et al.* Preliminary Evidence for an Association between LRP-1 Genotype and Body Mass Index in Humans. **PLoS ONE** 2012; 7(2): e30732.
- 129-** Wild JB, Stather PW, Sylvius N, Choke E, Sayers RD, Bown MJ. Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 1 and Abdominal Aortic Aneurysms. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery** 2012; 44: 127-32.
- 130-** Costales P, Castellano J, Revuelta-López E, Cal R, Aledo R, Llampayas O, *et al.* Lipopolysaccharide downregulates CD91/low-density lipoprotein receptor-related

protein 1 expression through SREBP-1 overexpression in human macrophages. **Atherosclerosis** 2013; 227: 79-88.

**131-** Lenting PJ, Neels JG, Van den Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H, *et al.* The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chemist** 1999; 274(34): 23734-9.

**132-** Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, *et al.* Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related deficiency. **Blood** 2003; 101(10): 3933-9.

**133-** Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, Bart J. M. van Vlijmen BJM. LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. **Blood** 2005; 106: 906-12.

**134-** Bovenschen N, Van Dijk KW, Havekes LM, Mertens K, Van Vlijmen BJM. Clearance of coagulation factor VIII in very low-density lipoprotein receptor knockout mice. **Br J Haematol** 2004; 126: 722-5.

**135-** Neels JG, Van den Berg BMM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, Van Zonneveld AJ. The second and forth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. **J Biol Chemist** 1999; 274(44): 31305-11.

**136-** Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. **J Biol Chem** 1989; 264: 21682-8.

**137-** Willnow TE, Orth K, Herz J. Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chemist** 1994; 269(22): 15827-32.

**138-** Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, Radtke KP, Khrenov AV, Ananyeva NM, *et al.* Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. **Biochemistry** 2006; 45: 1829-40.

**139-** Sarafanov AG, Makogonenko EM, Andersen OM, Mikhailenko IA, Ananyeva NM, Khrenov AV, *et al.* Localization of the low-density lipoprotein receptor-related protein regions involved in binding to the A2 domain of coagulation factor VIII. **Thromb Haemost** 2007; 98(6): 1170-81.

**140-** Bovenschen N, Boertjes RC, Van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. **J Biol Chemist** 2003; 278(11): 9370-7.

**141-** Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M, Saenko EL. Catabolism of the coagulation factor VIII. **Trends Cardiovasc Med** 2001; 11(6): 251-7.

**142-** Strickland DK, Medved L. Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-mediated clearance of activated blood coagulation co-factors and proteases: clearance mechanism or regulation? **J Thromb Haemost** 2006; 4: 1484-6.

**143-** Ananyeva NM, Makogonenkoa YM, Sarafanov AG, Pechikd IV, Gorlatovad N, Klaus Radtke KP *et al.* Interaction of coagulation factor VIII with members of the low-density lipoprotein receptor family follows common mechanism and involves consensus residues within the A2 binding site 484–509. **Blood Coagulation and Fibrinolysis** 2008; 19: 543-55.

**144-** Lenting PJ, Christophe OD, Guéguen P. The disappearing act of factor VIII. **Haemophilia** 2010; 16: 6-15.

**145-** Cunningham N, Laffan MA, Manning RA, O'Donnell JS. Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. **Blood Coagul Fibrinolysis** 2005; 16: 465-8.

- 146-** Marchetti G, Lunghi B, Legnani C, Cini M, Pinotti M, Mascoti F, *et al.* Contribution of low density lipoprotein receptor-related protein genotypes to coagulation factor VIII levels in thrombotic women. **Haematologica** 2006; 91: 1261-3.
- 147-** Vormittag R, Bencur P, Ay C, Tengler T, Vukovich T, Quehenberger P, *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) polymorphism 663 C-T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. **J Thromb Haemost** 2007; 5: 497-502.
- 148-** Mello TB, Siqueira LH, Montavão SA, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms are not risk factors for venous thromboembolism. **Thromb Res** 2008;121(5): 625-9.
- 149-** Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988 ; 239: 487-91.
- 150-** Alves SJ, da Silva SMS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SDJ, *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet** 2000; 67(3): 775.
- 151-** Chandler WL, Ferrel C, Lee J, Tun T, Kha H. Comparison of three methods for measuring factor VIII levels in plasma. **Am J Clin Pathol** 2003; 120(1): 34-9.
- 152-** Legnani C, Cosmi B, Cini M, Frascaro M, Guazzaloca G, Palareti G. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. **Br J Haematol** 2004; 124: 504-10.
- 153-** Wells PS, Langlois NJ, Webster MA, Jaffey J, Anderson JA. Elevated factor VIII is a risk factor for idiopathic venous thromboembolism in Canada - is it necessary to define a new upper reference range for factor VIII? **Thromb Hemost** 2005; 93(5): 842-6.

**154-** Bittar LF, de Paula EV, Montalvão SA, Mello TB, Annichino-Bizzacchi JM. Severe post-thrombotic syndrome is associated with higher levels of factor VIII. **Clin Appl Thromb Hemost** 2013; 19(5): 570-3.

**155-** Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, Folsom AR. Coagulation Factors, Inflammation Markers, and Venous Thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). **Am J Med.** 2002; 113: 636-42.

**156-** Kushner I and Rzewnicki D. The acute phase response: general aspects. In: Husby B (ed.) *Reactive Amyloidosis and the Acute Phase Response*. Bailliere's Clinical Rheumatology, 1994; 8: 513-30.

**157-** Reitsma PH, Rosendaal FR. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. **J Thromb Haemost** 2004; 2: 619-22.

**158-** Mazetto BM, Orsi FL, Barnabé A, De Paula EV, Flores-Nascimento MC, Annichino Bizzacchi JM. Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism. **Thromb Res** 2012; 130: 889-93.

**159-** Nossent AY, van Marion V, van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM, van Mourik JA, Eikenboom HCJ. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. **J Thromb Haemost** 2006; 4: 2556-62.

**160-** Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. **N Engl J Med** 2004; 350: 2558-63.

**161-** Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E, Pesavento R, Iotti M, Tormene D, Simioni P, Pagnan A. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. **Haematologica**

2007; 92: 199-205.

**162-** Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. **Lancet** 2010; 376: 2032-39.

**163-** Ribeiro DD, Lijfering WM, Barreto SM, Silva IBR, Chalup MMBS, Rosendaal FR, Rezende SM. Past provoking venous thrombosis risk situations on the risk of a recurrent thrombotic event: A cohort study. **Thromb Res** 2011; 128: 227-32.

**164-** Kyrle PA e Eischer L. Predicting the risk of recurrent venous thromboembolism: The Austrian Study on Recurrent Venous Thromboembolism (AUREC). **Hämostaseologie** 2013; 33: 201-9.

**165-** Nossent AY, Eikenboom JCJ, Vos HL, Bakker E, Tanis BC, Doggen CJM, Bertina RM, Rosendaal FR. Haplotypes encoding the factor VIII 1241Glu variation, factor VIII levels and the risk of venous thrombosis. **Thromb Haemost** 2006; 95: 942-8.

**166-** Franchini M, Montagnana M. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: new functions for an old molecule. **Clin Chem Lab Med** 2011; 49(6): 967-70.

**167-** Meijer AB, Rohlena J, van der Zwaan C, van Zonneveld AJ, Boertjes RC, Lenting PJ, and Mertens K. Functional duplication of ligand-binding domains within low-density lipoprotein receptor-related protein for interaction with receptor associated protein,  $\alpha$ 2-macroglobulin, factor IXa, and factor VIII. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1774: 714-22.

**168-** Lenting PJ, van Schooten CJM, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. **J Thromb Haemost** 2007; 5: 1353-60.

**169-** Osypiw JC, Allen RL, Billington D. Subpopulations of rat hepatocytes separated by Percoll density-gradient centrifugation show characteristics consistent with different acinar locations. **Biochem J** 1994; 304: 617-24.

- 170-** Alexandre E, Viollon-Abadie C, David P, Gandillet A, Coassolo P, Heyd B, Manton G *et al.* Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. **Cryobiology** 2002; 44: 103-13.
- 171-** Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM *et al.* Isolation of Human Hepatocytes From Livers Rejected for Liver Transplantation on a National Basis: Results of a 2-Year Experience. **Liver Transplantation** 2003; 9(5): 506-12.
- 172-** Richert L, Alexandre E, Lloyd T, Orr S, Viollon-Abadie C, Patel R *et al.* Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. **Liver International** 2004; 24: 371-78.
- 173-** Spotorno VG, Hidalgo A, Barbich M, Lorenti A, Zabal O. Culture of bovine hepatocytes: a non-perfusion technique for cell isolation. **Cytotechnology** 2006; 51: 51-6.
- 174-** Richert L, Liguori MJ, Abadie C, Heyd B, Manton G, Halkic N, Waring JF. Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. **DMD** 2006; 34(5): 870-9.
- 175-** Duret C, Gerbal-Chaloin S, Ramos J, Fabre JM, Jacquet E, Navarro F *et al.* Characterization, and Differentiation to Hepatocyte-Like Cells of Nonparenchymal Epithelial Cells from Adult Human Liver. **Cells** 2007; 25: 1779-90.
- 176-** Aoudjehane L, Podevin P, Scatton O, Jaffray P, Dusanter-Fourt I, Feldmann G *et al.* Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway. **FASEB J** 2007; 21: 1433-44.
- 177-** Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ *et al.* Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. **Blood** 2007; 110: 4077-85.



- 178-** Holt MP, Cheng L, Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. **J Leukoc Biol** 2008; 84: 1410-21.
- 179-** Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, Guyomard C. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. **Chemico-Biological Interactions** 1999; 121: 7-16.
- 180-** Stéphenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: Is it time to change the strategy ? **World J Gastroenterol** 2010; 16(1): 1-14.
- 181-** Hollestelle MJ, Geertzen HGM, Straatsburg IH, van Gulik TM, and van Mourik JA. Factor VIII expression in liver disease. **Thromb Haemost** 2004; 91: 167-75.
- 182-** Øie CI, Appa RS, Hilden I, Petersen HH, Gruhler A, Smedsrød B, Hansen J-B. Rat liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) express functional low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). **Journal of Hepatology** 2011; 55: 1346-52.
- 183-** Castro-Nunez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB. Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. **J Thromb Haemost** 2012; 10: 1929-37.
- 184-** Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete AM, Saint-Lu N *et al.* Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. **Blood** 2012; 119(9): 2126-34.
- 185-** Quinn KA, Grimsley PG, Dai Y-P, Michael Tapner M, Chesterman CN, and Owensby DA. Soluble Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Circulates in Human Plasma. **J Biol Chem** 1997; 272: 23946-51.
- 186-** Quinn KA, Pye VJ, Dai Y-P, Chesterman CN, Owensby DA. Characterization of the Soluble Form of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP). **Experimental Cell Research** 1999; 251: 433-41.
- 187-** Selvais C, D'Auria L, Tyteca D, Perrot G, Lemoine P, Troeberg L *et al.* Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein

receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. **FASEB J** 2011; 25: 2770-81.

**188-** Deane R, Sagare A, Zlokovic BV. The Role of the Cell Surface LRP and Soluble LRP in Blood-Brain Barrier A $\beta$  Clearance in Alzheimer's Disease. **Current Pharmaceutical Design** 2008; 14: 1601-05.

**189-** Sagare A, Deane R, Zlokovic BV. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: A physiological A $\beta$  homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. **Pharmacology & Therapeutics** 2012; 136: 94-105.

**190-** Liang F, Jia J, Wang S, Qin W, Liu G. Decreased plasma levels of soluble low density lipoprotein receptor-related protein-1 (sLRP) and the soluble form of the receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Neuroscience** 2013; 20: 357-61.

**191-** Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. **J Thromb Haemost** 2005; 3: 1257-65.

**192-** Kessler CM, Gill JC, White GC et al. B-domain deleted recombinant factor VIII preparations are bioequivalent to a monoclonal antibody purified plasma-derived factor VIII concentrate: a randomized, three-way crossover study. **Haemophilia** 2005; 11: 84-91.

**193-** Di Paola J, Smith MP, Klamroth R et al. ReFacto and Advate: a single-dose, randomized, two-period crossover pharmacokinetics study in subjects with haemophilia A. **Haemophilia** 2007; 13: 124-30.

**194-** Smith NL, Chen M-H, Dehghan A, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. **Circulation** 2010; 121(12): 1382-92.

- 195-** Khoo U-S, Chan KY, Chan VS, Lin CL. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. **J Mol Med** 2008; 86(8): 861-74.
- 196-** Chan VS, Chan KY, Chen Y, et al. Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. **Nat Genet** 2006; 38(1): 38-46.
- 197-** da Silva RC, Segat L, Zanin V, Arraes LC, Crovella S. Polymorphisms in DC-SIGN and L-SIGN genes are associated with HIV-1 vertical transmission in a Northeastern Brazilian population. **Human Immunology** 2012; 73: 1159-65.
- 198-** Rydz N, Swystun LL, Notley C., Paterson AD, Riches JJ, Sponagle K *et al.* The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. **Blood** 2013; 121(26): 5228-37.
- 199-** Swystun L, Notley C, Sponagle K, James PD, Lillicrap D. The endothelial lectin CLEC4M is a novel clearance receptor for factor VIII. **J Thromb Haemost** 2013, 11(Supl 2), ABSTRACTS OF THE XXIV CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS JUNE 29 - JULY 4, 2013, pag. 98.
- 200-** Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E *et al.* A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. **Blood** 2008; 111: 3540-45.
- 201-** Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? **Thromb Res** 2008; 122(4): S2-S8.
- 202-** Ryan K, O'Donnell JS. Elevated plasma factor VIII levels in patients with venous thrombosis – Constitutional risk factor or secondary epiphenomenon? **Thromb Res** 2012; 129: 105-6.



## **10. Anexos**



## Anexo 1 - Questionário

Questionário:

Data: \_\_\_\_\_, Código do Paciente: LRP \_\_\_\_\_

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

HC: \_\_\_\_\_, Data de nascimento: \_\_\_\_\_, Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_, Telefone: \_\_\_\_\_, Etnia: \_\_\_\_\_,

Endereço: \_\_\_\_\_

Sofre de algumas destas doenças:

Hipertensão arterial: \_\_\_\_\_, Diabetes: \_\_\_\_\_,

Hipo/Hipertireoidismo: \_\_\_\_\_,

Doença Renal: \_\_\_\_\_,

Neoplasia: \_\_\_\_\_,

Doença Hepática: \_\_\_\_\_,

Doença arterial coronariana: \_\_\_\_\_,

Doença infecciosa: \_\_\_\_\_,

Doença inflamatória: \_\_\_\_\_,

Síndrome do anticorpo antifosfolípido: \_\_\_\_\_,

Outras \_\_\_\_\_,

História de trombose venosa profunda na família:  Sim  Não

Se sim, qual o grau de parentesco: \_\_\_\_\_,

Está fazendo uso de algum medicamento:  Sim  Não Qual (is)? \_\_\_\_\_

.

\_\_\_\_\_.

É tabagista? \_\_\_\_\_, É etilista? \_\_\_\_\_.

Altura: \_\_\_\_\_ cm      Peso: \_\_\_\_\_ Kg      IMC: \_\_\_\_\_

FALC: \_\_\_\_\_      GGT: \_\_\_\_\_      AST: \_\_\_\_\_      ALT: \_\_\_\_\_

CREATININA: \_\_\_\_\_

## **Anexo 2.1 - TCLE para Voluntários de biópsia hepática:**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título do Projeto:** “*AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA E DE ALTERAÇÕES MOLECULARES DO RECEPTOR HEPÁTICO LRP1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FATOR VIII*”

**Responsáveis pelo projeto:** LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

Profa. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

Eu, \_\_\_\_\_,  
idade: \_\_\_\_\_, Data de Nascimento: \_\_\_\_\_,  
RG: \_\_\_\_\_, HC: \_\_\_\_\_,  
Rua/Av: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Telefone: \_\_\_\_\_.

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo. Trata-se de um estudo que pretende avaliar parâmetros da coagulação sanguínea (fator VIII e fator de von Willebrand) e alterações genéticas que podem influenciar estes parâmetros da coagulação sanguínea. Deveremos coletar 20 mL de sangue periférico para as análises laboratoriais necessárias. É essencial que o senhor (a) tenha feito jejum de 8 horas antes de cada coleta para melhor realização dos exames. Eventualmente, o senhor (a) poderá ser reconvocado a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da coleta do sangue, e discreta hemorragia durante a coleta da biópsia. Esta será realizada durante o procedimento cirúrgico.

Este estudo não oferecerá ao voluntário, outros riscos importantes.



O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento de doenças relacionadas à coagulação sanguínea, e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
  2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
  3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
  4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
  5. A sua discordância em participar do estudo não lhe trará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
- Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3521.8936).

Campinas, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do Voluntário

---

**Luis Fernando Bittar**

**Tel: (19) 3521 – 8755**

---

**Prof. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi**

**Tel: (19) 3521 – 8601**

Gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que o seu sangue possa ser armazenado, para que em estudos futuros aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, ele possa ser

utilizado novamente para continuarmos a fazer pesquisas relacionadas a distúrbios de coagulação:

\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura do Voluntário

## **Anexo 2.2 - TCLE para Pacientes com TEV e Controles:**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título do Projeto:** “*AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA E DE ALTERAÇÕES MOLECULARES DO RECEPTOR HEPÁTICO LRP1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE FATOR VIII*”

**Responsáveis pelo projeto:** LUIS FERNANDO BITTAR SCKAYER

Profa. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

Eu, \_\_\_\_\_,

idade: \_\_\_\_\_, Data de Nascimento: \_\_\_\_\_,

RG: \_\_\_\_\_, HC: \_\_\_\_\_,

Rua/Av.: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_.

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo. Trata-se de um estudo que pretende avaliar parâmetro da coagulação sanguínea (fator VIII) e alterações genéticas que podem influenciar este parâmetro da coagulação sanguínea. Deveremos coletar 20 mL de sangue periférico para as análises laboratoriais necessárias. É essencial que o senhor (a) tenha feito jejum de 8 horas antes de cada coleta para melhor realização dos exames. Eventualmente, o senhor (a) poderá ser reconvocato a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da coleta do sangue. Este estudo não oferecerá ao voluntário, outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento de doenças relacionadas à coagulação sanguínea, e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
5. A sua discordância em participar do estudo não lhe trará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3521.8936).

Campinas, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do Voluntário

---

**Luis Fernando Bittar**

**Tel: (19) 3521 – 8755**

---

**Prof. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi**

**Tel: (19) 3521 – 8601**

Gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que o seu sangue possa ser armazenado, para que em estudos futuros aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, ele possa ser utilizado novamente para continuarmos a fazer pesquisas relacionadas a distúrbios de coagulação:

\_\_\_\_\_.

---

Assinatura do Voluntário

**Anexo 3 - Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII entre voluntários com expressão proteica do LRP1 < P25 vs. > P75 :**

**3.1 - Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII entre voluntários com expressão proteica do LRP1 em hepatócitos do LRP1 < P25 (N=5) vs. > P75 (N=6)**

	<b>LRP1 Hepatócitos &lt; P25</b>	<b>LRP1 Hepatócitos &gt; P75</b>	<b>p</b>
<b>FVIII:Ag Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	63,1 (31 - 120,9)	90,7 (54,6 - 248,1)	0,31
<b>FVIII:Ag Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	117,1 (64,3 - 185,1)	151,3 (81,1 - 260,4)	0,41
<b>FVIII:Ag Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	106,5 (77,2 - 137,1)	123,6 (48,2 - 194,7)	0,69
<b>FVIII Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	80,7 (70,0 - 93,2)	98,7 (78,7 - 178,4)	0,08
<b>FVIII Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	201,5 (86,9 - 335,3)	217,3 (178,4 - 354,5)	0,79
<b>FVIII Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	183,7 (163,8 - 368,2)	184,7 (93,5 - 211,7)	0,93

**3.2 - Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII entre voluntários com expressão proteica do LRP1 em células de Kupffer do LRP1 < P25 (N=5) vs. > P75 (N=5):**

	<b>LRP1 Cél. Kupffer &lt; P25</b>	<b>LRP1 Cél. Kupffer &gt; P75</b>	<b>p</b>
<b>FVIII:Ag Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	70,3 (57,8 - 120,9)	87,2 (54,6 - 248,1)	1,00
<b>FVIII:Ag Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	138,9 (130,1 - 185,1)	126,4 (103 - 260,4)	0,55
<b>FVIII:Ag Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	117,8 (48,2 - 137,1)	131,2 (73,2 - 194,7)	0,73
<b>FVIII Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	81,2 (70,0 - 93,2)	94,2 (75,8 - 176,1)	0,40
<b>FVIII Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	201,1 (193,3 - 335,3)	209,6 (190,5 - 354,5)	1,00
<b>FVIII Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	188,1 (93,5 - 206,1)	189,1 (155,3 - 196,6)	0,67

**3.3 - Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII entre voluntários com expressão proteica do LRP1 em células endoteliais < P25 (N=5) vs. > P75 (N=5):**

	<b>LRP1 Endoteliais &lt; P25</b>	<b>LRP1 Endoteliais &gt; P75</b>	<b>p</b>
<b>FVIII:Ag Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	77,2 (48,8 - 87,2)	75,8 (54,6 - 248,1)	0,54
<b>FVIII:Ag Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	103,3 (54,5 - 165,2)	149,9 (115,2 - 260,4)	0,34
<b>FVIII:Ag Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	113,8 (75,8 - 181,9)	131,1 (48,2 - 194,7)	1,00
<b>FVIII Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	105,3 (70,0 - 185,5)	94,2 (78,7 - 162,4)	0,54
<b>FVIII Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	190,5 (86,9 - 208,7)	193,3 (179,5 - 354,5)	0,31
<b>FVIII Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	192,8 (78,7 - 329)	189,1 (93,5 - 209,6)	0,69

**3.4 - Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII entre voluntários com expressão proteica do LRP1 Total < P25 (N=5) vs. > P75 (N=5):**

	<b>LRP1 Total &lt; P25</b>	<b>LRP1 Total &gt; P75</b>	<b>p</b>
<b>FVIII:Ag Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	70,9 (48,8 - 120,9)	103,5 (54,6 - 248,1)	0,41
<b>FVIII:Ag Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	138,2 (64,3 - 185,1)	137,8 (81,1 - 260,4)	0,73
<b>FVIII:Ag Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	121,9 (101,2 - 181,9)	151,9 (91,8 - 194,7)	0,88
<b>FVIII Coleta I - Mediana (Mín-Máx)</b>	88,4 (70,0 - 105,3)	103,1 (78,7 - 178,4)	0,54
<b>FVIII Coleta II - Mediana (Mín-Máx)</b>	208,4 (156,2 - 354,5)	178,4 (86,9 - 209,6)	0,22
<b>FVIII Coleta III -Mediana (Mín-Máx)</b>	192,8 (163,8 - 368,2)	190,1 (181,8 - 211,7)	1,00

# **11. Material Suplementar**





### 11.1 - Dados clínicos dos pacientes com TEV:

Código	Idade	Gênero	Etnia	GSO	Recorrência	Fator de Risco	SPT
AVCi 131	54	masc	caucas	Não O	Sim	Imobilização	Classe 3
TR 1192	37	fem	caucas	O	Não	ACO/TRH	Classe 2
TR 1238	43	fem	caucas	O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 1796	47	masc	afro desc	Não O	Não	Espontânea	Classe 4
TR 1864	33	fem	afro desc	Não O	Não	Espontânea	Classe 2
TR 1865	34	fem	caucas	O	Não	Imobilização	Classe 1
TR 1941	62	fem	caucas	O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 2027	47	fem	afro desc	Não O	Não	Imobilização	Classe 4
TR 2054	62	masc	caucas	O	Não	Espontânea	Indisponível
TR 208	35	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 3
TR 2099	50	fem	caucas	Não O	Não	Espontânea	Classe 6
TR 21	59	fem	caucas	Não O	Sim	Imobilização	Classe 4
TR 2121	42	fem	caucas	O	Não	Múltiplos	Classe 6
TR 2177	41	fem	afro desc	Não O	Não	Puerpério	Classe 1
TR 220	61	fem	caucas	Não O	Não	Imobilização	Classe 3
TR 2219	46	fem	afro desc	Não O	Não	Imobilização	Classe 3
TR 2231	43	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 3
TR 2234	48	masc	afro desc	O	Não	Imobilização	Classe 0
TR 227	38	masc	afro desc	Não O	Não	Espontânea	Classe 5
TR 2411	51	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 2474	61	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 1
TR 2533	41	fem	caucas	O	Não	ACO/TRH	Classe 3
TR 2534	47	masc	afro desc	Não O	Sim	Espontânea	Classe 6
TR 2552	51	fem	caucas	Não O	Não	Espontânea	Indisponível
TR 2570	30	fem	caucas	Não O	Não	Gestação	Classe 0
TR 2696	46	masc	caucas	Não O	Sim	Cirurgia	Classe 0
TR 2723	47	fem	caucas	Não O	Não	Puerpério	Classe 3
TR 2746	56	fem	caucas	O	Não	Imobilização	Classe 1
TR 2832	42	fem	afro desc	Não O	Não	Puerpério	Classe 1
TR 2865	27	fem	afro desc	Não O	Não	ACO/TRH	Indisponível
TR 288-1	50	masc	caucas	Não O	Sim	Cirurgia	Classe 4
TR 29	57	fem	caucas	Não O	Não	Puerpério	Classe 5
TR 2908	57	fem	caucas	Não O	Não	Imobilização	Classe 0
TR 2924	26	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 2
TR 2960	31	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 2965	46	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 3057	60	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 3064	37	fem	caucas	Não O	Não	Cirurgia	Classe 3
TR 3117	57	fem	caucas	O	Não	Gestação e Imobilização	Classe 0
TR 3119	70	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 2
TR 3123	57	fem	caucas	O	Não	Imobilização	Classe 0
TR 3129	32	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 4
TR 3152	42	fem	caucas	Não O	Não	Puerpério	Classe 4
TR 3157	39	masc	caucas	Não O	Não	Espontânea	Classe 6
TR 3170	45	fem	afro desc	Não O	Não	Gestação	Classe 0

<b>Código</b>	<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>Etnia</b>	<b>GSO</b>	<b>Recorrência</b>	<b>Fator de Risco</b>	<b>SPT</b>
TR 3181	54	fem	afro desc	Não O	Sim	Espontânea	Classe 3
TR 3182	69	masc	caucas	Não O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 3213	42	fem	afro desc	Não O	Sim	Espontânea	Classe 0
TR 3224	24	fem	caucas	Não O	Sim	Gestação	Classe 3
TR 3270	55	fem	afro desc	O	Não	Espontânea	Indisponível
TR 3304	50	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 3349	47	fem	caucas	Não O	Não	Espontânea	Indisponível
TR 3374	55	masc	caucas	Não O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 3384	50	masc	caucas	Não O	Sim	Espontânea	Classe 4
TR 3480	37	fem	afro desc	Não O	Não	Cirurgia	Classe 3
TR 3482	40	masc	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 35	42	fem	caucas	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 3578	57	fem	afro desc	Não O	Não	ACO/TRH	Classe 0
TR 3592	53	masc	caucas	Não O	Sim	Imobilização	Classe 5
TR 3601	20	masc	caucas	O	Sim	Espontânea	Classe 4
TR 431	42	masc	caucas	O	Não	Def de PC	Classe 0
TR 618	52	fem	caucas	Não O	Sim	ACO/TRH	Classe 3
TR 630	39	fem	caucas	Não O	Não	Espontânea	Indisponível
TR 794	57	fem	caucas	O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 833	54	fem	afro desc	Não O	Sim	Espontânea	Indisponível
TR 855	51	masc	caucas	Não O	Não	Espontânea	Classe 0
TR 941	70	masc	afro desc	O	Não	Cirurgia	Classe 0
TR 957	57	masc	caucas	Não O	Não	Imobilização	Classe 6

**Código:** identificação numérica do paciente; **fem:** feminino; **masc:** masculino;

**caucas:** caucasóide; **afro desc:** afro descendente; **ACO:** anticoncepcional hormonal;

**TRH:** terapia de reposição hormonal; **GSO:** grupo sanguíneo ABO;

**SPT:** síndrome pós-trombótica.

## 11.2 - Dados laboratoriais dos pacientes com TEV:

<b>Código</b>	<b>FVIII:C 2011</b>	<b>FVIII:C 2004</b>	<b>PCR 2011</b>	<b>PCR 2004</b>
AVCi 131	155	203,5	0,228	0,32
TR 1192	154	208	0,0974	0,04
TR 1238	126	235,5	0,146	0,27
TR 1796	153	205,8	0,219	0,22
TR 1864	163	230,9	0,156	0,03
TR 1865	126	257	0,0173	0,06
TR 1941	134	206,2	0,148	0,35
TR 2027	205	374	0,441	0,25
TR 2054	165	257,7	0,328	0,61
TR 208	96	238,3	0,0719	0,01
TR 2099	206	296	0,049	0,04
TR 21	179	238,3	0,259	0,26
TR 2121	188	202	0,0546	0,65
TR 2177	189	213,8	0,366	0,84
TR 220	184	252,6	0,606	0,32
TR 2219	182	270,8	0,671	0,75
TR 2231	171	216,9	0,0173	0,18
TR 2234	142	231	0,0745	0,09
TR 227	178	330	0,0173	0,27
TR 2411	160	240,8	0,109	0,94
TR 2474	154	227,4	0,379	0,15
TR 2533	82	229	0,0967	0,12
TR 2534	160	510,1	0,158	0,68
TR 2552	165	206	0,0321	0,04
TR 2570	156	235,8	0,12	0,59
TR 2696	189	215,6	0,0812	0,5
TR 2723	151	270,1	0,0173	0,37
TR 2746	160	246	0,0911	0,1
TR 2832	158	226,2	0,0644	0,56
TR 2865	148	203,8	0,038	0,02
TR 288-1	151	262,8	0,712	Não avaliado
TR 29	171	245,2	0,171	0,18
TR 2908	151	315,5	0,305	0,5
TR 2924	132	202,1	0,0173	0,01
TR 2960	147	223,3	0,0534	0,38
TR 2965	153	228,5	0,17	0,1
TR 3057	112	214,5	0,0682	0,17
TR 3064	157	495,8	0,0951	0,03
TR 3117	138	307	0,0806	Não avaliado
TR 3119	160	239,5	Não avaliado	Não avaliado
TR 3123	141	210,1	0,267	Não avaliado
TR 3129	149	213,4	0,0707	0,2
TR 3152	165	401,2	0,679	1,36
TR 3157	178	226,8	0,224	Não avaliado
TR 3170	164	284,3	0,122	Não avaliado

<b>Código</b>	<b>FVIII:C 2011</b>	<b>FVIII:C 2004</b>	<b>PCR 2011</b>	<b>PCR 2004</b>
TR 3181	171	336,3	0,21	0,79
TR 3182	154	287,9	0,0266	0,04
TR 3213	127	408,8	0,171	0,11
TR 3224	156	345,4	0,365	0,31
TR 3270	161	200,3	0,26	Não avaliado
TR 3304	158	238	0,497	0,22
TR 3349	158	202	0,525	0,49
TR 3374	164	228,3	0,0545	Não avaliado
TR 3384	154	232	0,0777	Não avaliado
TR 3480	165	227	0,855	Não avaliado
TR 3482	166	299,5	0,034	0,13
TR 35	173	235,8	0,131	0,12
TR 3578	166	223	0,223	Não avaliado
TR 3592	199	316,4	0,0752	0,09
TR 3601	143	214,9	0,108	Não avaliado
TR 431	148	313,8	0,174	Não avaliado
TR 618	180	240,3	0,898	Não avaliado
TR 630	158	290,3	0,0192	0,04
TR 794	133	224	0,499	Não avaliado
TR 833	182	209,2	0,0546	Não avaliado
TR 855	157	326	0,0847	Não avaliado
TR 941	146	255	0,128	0,35
TR 957	186	235,7	0,49	0,19

### 11.3 - Dados clínicos e laboratoriais dos controles:

Controles 2011	Idade	Gênero	Etnia	GSO	FVIII:C
2	30	masc	afro desc	O	95,2
7	45	masc	caucas	O	83,2
8	48	masc	caucas	O	120,9
10	47	fem	caucas	Não-O	104,4
11	24	masc	afro desc	O	95,7
12	36	fem	caucas	O	100,1
13	46	masc	caucas	O	96,2
14	44	fem	caucas	O	102,1
15	33	fem	caucas	Não-O	125,1
16	37	masc	caucas	O	84,2
17	30	masc	afro desc	Não-O	147,5
18	25	fem	caucas	O	111,4
19	49	masc	afro desc	Não-O	135,5
20	24	masc	afro desc	O	96,3
21	30	masc	caucas	O	91,4
22	25	fem	afro desc	O	112,7
23	45	masc	caucas	O	87,5
24	38	fem	afro desc	O	85,8
25	39	fem	caucas	Não-O	106,2
26	26	fem	afro desc	Não-O	83,4
27	25	masc	afro desc	O	86,6
28	43	masc	caucas	Não-O	150,3
29	47	masc	caucas	O	102,1
30	27	masc	afro desc	Não-O	124,5
31	35	masc	caucas	Não-O	141,2
33	54	fem	afro desc	O	87,8
34	29	fem	caucas	O	86,2
35	56	masc	afro desc	O	89,2
36	25	masc	caucas	Não-O	151,4
37	33	masc	caucas	O	98,8
38	35	fem	caucas	Não-O	151,7
39	47	masc	caucas	O	106,6
40	35	fem	afro desc	Não-O	165,4
41	42	masc	caucas	O	95,6
42	53	masc	afro desc	Não-O	134
43	48	fem	caucas	Não-O	168,8
44	51	fem	caucas	Não-O	169,6
45	49	fem	caucas	Não-O	132,7
46	50	fem	caucas	Não-O	136,2
47	42	fem	caucas	Não-O	126,2
48	46	fem	caucas	Não-O	185,3
49	56	fem	caucas	Não-O	137,1
50	48	fem	caucas	Não-O	170,3
51	42	fem	caucas	Não-O	125,5
52	43	fem	caucas	Não-O	154,2
53	51	fem	caucas	Não-O	187,1

<b>Controles 2011</b>	<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>Etnia</b>	<b>GSO</b>	<b>FVIII:C</b>
54	51	fem	caucas	Não-O	150,8
55	46	fem	afro desc	Não-O	165,2
56	50	fem	caucas	Não-O	116,6
57	46	fem	caucas	Não-O	125,1
58	49	fem	caucas	Não-O	132,5
59	51	fem	caucas	Não-O	142,5
60	40	fem	caucas	Não-O	110,6
61	55	fem	caucas	Não-O	115,6
62	60	fem	caucas	Não-O	145,2
63	47	fem	caucas	Não-O	144,2
64	54	fem	caucas	Não-O	160,1
65	51	fem	afro desc	Não-O	120,5
66	59	fem	afro desc	Não-O	187,1
67	49	fem	caucas	Não-O	178,6
68	48	fem	caucas	Não-O	155,5
69	68	fem	caucas	Não-O	167,6
70	29	masc	caucas	Não-O	164,2
71	43	masc	caucas	Não-O	169,3
72	36	fem	caucas	Não-O	175
72	52	masc	afro desc	Não-O	171,3
74	51	fem	caucas	Não-O	176,6

**Controles 2011:** identificação numérica do controle; **fem:** feminino; **masc:** masculino; **caucas:** caucasóide; **afro desc:** afro descendente; **GSO:** grupo sanguíneo ABO.

**11.4 - Dados clínicos e avaliação da expressão do LRP1 (CD91) dos voluntários para biópsia hepática:**

<b>Código</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>Etnia</b>	<b>GSO</b>	<b>CD91_Hepatócito</b>	<b>CD91_Kupffer</b>	<b>CD91_Endotelial</b>	<b>CD91_Total</b>
LRP 11	Colecistectomia	55	Fem	Caucas	O	46401	52049	9139	107599
LRP 12	Colecistectomia	54	Fem	Caucas	Não-O	12146	20811	3482	36439
LRP 13	Gastroplastia	32	Fem	Caucas	Não-O	14844	27674	2841	45359
LRP 14	Gastroplastia	53	Fem	Afro desc	O	30541	22611	5420	58572
LRP 15	Gastroplastia	41	Fem	Afro desc	Não-O	9497	23539	4260	37296
LRP 16	Colecistectomia	35	Fem	Caucas	O	45085	45289	7666	98040
LRP 17	Colecistectomia	55	Fem	Caucas	O	30243	32994	7642	70879
LRP 18	Gastroplastia	58	Fem	Caucas	O	36266	30588	7466	74320
LRP 19	Colecistectomia	45	Fem	Caucas	Não-O	18815	32883	5712	57410
LRP 20	Colecistectomia	60	Fem	Afro desc	O	16218	37250	3406	56874
LRP 21	Gastroplastia	53	Fem	Caucas	Não-O	37233	22064	13381	72678
LRP 22	Gastroplastia	38	Fem	Caucas	Não-O	48520	40722	10184	99426
LRP 23	Gastroplastia	53	Fem	Afro desc	O	30541	22611	5420	58572
LRP 24	Colecistectomia	40	Fem	Caucas	O	11066	18502	3830	33398
LRP 25	Colecistectomia	40	Fem	Afro desc	O	8159	28105	2722	38986
LRP 26	Colecistectomia	28	Fem	Caucas	O	30195	28572	2539	61306
LRP 27	Gastroplastia	53	Fem	Afro desc	Não-O	14429	31735	5459	51623
LRP 28	Gastroplastia	42	Fem	Caucas	O	21190	25040	3114	49344
LRP 29	Colecistectomia	27	Fem	Afro desc	O	18100	39856	3809	61765
LRP 30	Gastroplastia	58	Fem	Caucas	O	36266	30588	7466	74320

**Código:** identificação numérica do voluntário; **fem:** feminino; **caucas:** caucasóide;

**afro desc:** afro descendente; **GSO:** grupo sanguíneo ABO.

**11.5 - Dados das dosagens plasmáticas de FVIII dos voluntários para biópsia hepática:**

<b>Código</b>	<b>FVIII:Ag Coleta I</b>	<b>FVIII:Ag Coleta II</b>	<b>FVIII:Ag Coleta III</b>	<b>FVIII:Cr Coleta I</b>	<b>FVIII:Cr Coleta II</b>	<b>FVIII:Cr Coleta III</b>	<b>FVIII:Cg Coleta I</b>	<b>FVIII:Cg Coleta II</b>	<b>FVIII:Cg Coleta III</b>
LRP 11	90,65	115,24	131,16	94,2	191,7	181,8	117,8	181,2	179,5
LRP 12	70,92	138,16	106,82	93,2	206,3	163,8	106,6	215,7	139,1
LRP 13	77,2	165,23	181,89	105,3	208,4	192,8	134	408,4	199,6
LRP 14	60	130	125	81,2	201,1	188,1	100,9	342	375,5
LRP 15	63,12	104,31	94,5	80,7	86,9	368,2	127,4	328,3	315,1
LRP 16	54,64	160,34	91,8	78,7	354,5	190,1	109,5	367,8	188,3
LRP 17	75,75	80,5	171,36	162,4	179,5	209,6	145,8	162,7	252,5
LRP 18	116,48	81,05	172,54	178,4	178,4	211,7	167,9	155,7	231
LRP 19	83,27	117,74	98,43	101,5	211,5	184,7	131,6	468,9	305,6
LRP 20	87,22	126,42	132,46	176,6	190,5	196,6	188,3	383,4	435,1
LRP 21	69,69	139,49	41,17	82,8	193,3	93,5	184,8	226,5	131,6
LRP 22	248,1	260,43	194,66	103,1	209,6	189,1	114,6	190,2	155,7
LRP 23	57,75	130,1	128,78	81,2	201,1	188,1	100,9	342	375,5
LRP 24	120,89	185,04	137,06	70	335,3	206,1	145,8	490,2	371,6
LRP 25	48,8	80,31	101,2	71,4	156,2	183,9	80,7	157,2	174,4
LRP 26	52,23	54,48	75,75	83,8	86,9	78,7	154,2	131,6	102,8
LRP 27	50,6	87,5	77,2	80,7	201,5	180,7	89,8	368,9	177,8
LRP 28	81,42	135,3	113,78	185,5	208,7	329	177,8	428,2	255
LRP 29	41,46	103	73,23	75,8	313,6	155,3	70,7	213,6	130,4
LRP 30	116,48	81,05	172,54	178,4	178,4	211,7	167,9	155,7	231




**11.6 - Dados das dosagens de FvW e PCR dos voluntários para biópsia hepática:**

<b>Código</b>	<b>FvW Coleta I</b>	<b>FvW Coleta II</b>	<b>FvW Coleta III</b>	<b>PCR Coleta I</b>	<b>PCR Coleta III</b>
LRP 11	102,4	177,6	183,6	0,45	2,36
LRP 12	112,3	211,8	203,2	0,12	1,24
LRP 13	172,5	235	244,1	0,11	7,1
LRP 14	105,9	231,4	239,3	0,4	5,93
LRP 15	97,3	120	296,1	0,21	8,86
LRP 16	80,3	230,9	194,8	0,13	1,34
LRP 17	170,7	170,9	255,1	1,04	2,44
LRP 18	235,6	233	309,3	1,06	10,12
LRP 19	124	233,3	231,6	1,13	2,96
LRP 20	198,3	211,1	228,9	0,79	3,27
LRP 21	72,6	120,3	75,2	0,8	7,68
LRP 22	127,9	237,8	240,7	0,38	9,28
LRP 23	105,9	231,4	239,3	0,4	5,93
LRP 24	64,9	217,3	231,7	0,7	2,53
LRP 25	78,7	130,4	203,3	0,04	3,13
LRP 26	74,8	79,7	83,8	0,53	2,46
LRP 27	97,4	203,3	241	0,06	6,46
LRP 28	243,7	219,4	351,3	2,47	8,27
LRP 29	78,9	169,4	197	0,03	1,01
LRP 30	235,6	233	309,3	1,06	10,12

## 11.7 - Cópia do artigo publicado contendo resultados parciais da tese [Ref. 154]:

Brief Report

### Severe Post-thrombotic Syndrome is Associated With Higher Levels of Factor VIII

Clinical and Applied  
Thrombosis/Hemostasis  
19(5) 570-573  
© The Author(s) 2012  
Reprints and permission:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1076029612462760  
cath.sagepub.com  


Luis Fernando Bittar, MSc<sup>1</sup>, Erich V. de Paula, MD, PhD<sup>1</sup>,  
Silmara A. L. Montalvão, MSc<sup>1</sup>, Tayana B.T. Mello, MD, PhD<sup>1</sup>, and  
Joyce M. Annichino-Bizzacchi, MD, PhD<sup>1</sup>

#### Abstract

Increased levels of factor VIII (FVIII) are a prevalent and independent risk factor for deep venous thrombosis (DVT). After a median of 10 years of the first DVT, we evaluated FVIII coagulation levels in 55 patients with DVT of the lower limbs and previous high levels of FVIII and in 74 controls. Subsequently, we analyzed the presence of post-thrombotic syndrome (PTS) in patients and its relationship with FVIII levels. After a median of 10 years of the first DVT, the FVIII levels were still significantly higher in patients when compared to controls ( $P < .001$ ). Patients with severe PTS showed increased levels of FVIII when compared to patients with moderate or absent PTS ( $P < .001$ ). We demonstrated a persistent increase in FVIII levels in a subset of patients with DVT, but in a lower magnitude after 10 years of the first DVT episode. Moreover, we observed a significant association between increased FVIII levels and severe PTS.

#### Keywords

deep venous thrombosis, factor VIII, post-thrombotic syndrome

#### Introduction

Deep venous thrombosis (DVT) is a multifactorial disease, and increased levels of coagulation factor VIII (FVIII) have been established as a risk factor for DVT.<sup>1-4</sup> The main determinants of FVIII in plasma are the von Willebrand factor (VWF) and the ABO blood group.<sup>5,6</sup> We recently demonstrated that increased levels of FVIII is a risk factor for DVT in Brazilian patients (Odds ratio [OR] = 3.0; 95% confidence interval [CI 95%] 1.6-5.7;  $P < .001$ ).<sup>7</sup> Although FVIII is an acute phase protein, results from previous studies suggested that increased FVIII levels in patients with DVT are independent of an acute reaction.<sup>8,9</sup>

The nature of the relationship between inflammation and DVT is not yet established. C-reactive protein (CRP) does not appear to be useful in predicting future or diagnosis of acute DVT.<sup>10,11</sup> Several markers of inflammation are elevated in acute DVT, and this altered inflammatory profile is more likely to be a result rather than a cause of DVT.<sup>12,13</sup>

The median follow-up of previous studies that analyzed persistent increase in FVIII in patients with DVT was about 1 to 5 years,<sup>9,14,15</sup> and in this study we evaluated a subset of patients with high levels of FVIII after a median of 10 years of the first thrombotic episode.

Post-thrombotic syndrome (PTS) is a long-term complication of DVT of the lower limbs, which is present in 20% to

50% of symptomatic patients.<sup>16,17</sup> The many factors that contribute to the incidence and severity of PTS, such as age, gender, obesity, residual DVT, location, and extent of DVT, are controversial.<sup>18</sup> The PTS can be a confounding effect in studies evaluating the association of DVT and inflammatory biomarkers because it is associated with a chronic inflammatory process and despite the increase of FVIII levels are not associated with acute reactions, may be the stimulus for this alteration may contribute to this increase. The relationship between PTS and inflammatory markers is still controversial.<sup>19,20</sup>

In the present study, we evaluated FVIII levels in a subset of patients with DVT, after a median of 10 years of the first thrombotic episode, and previous high levels of this coagulation factor. Moreover, since chronic inflammation of affected member can be present, and constitute a stimulus to

<sup>1</sup>Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

#### Corresponding Author:

Luis Fernando Bittar, Molecular Biology and Hemostasis Laboratory, Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, 480 Carlos Chagas Street, Campinas, SP 13083-878, Brazil.  
Email: lfbsscayer@hotmail.com

**Table 1.** Clinical Characteristics of Patients With Deep Venous Thrombosis and the Control Group.

	Patients With DVT (N = 55)	Controls (N = 74)	P
Gender; male/female	16/39 (29.4%/70.6%)	28/46 (37.8%/62.2%)	.35
Age; median (minimum-maximum)	47 (20-70)	45 (21-70)	.27
Ethnicity; caucasian/Afro-descents	40/15 (72.7%/27.3%)	56/18 (75.7%/24.3%)	.74
ABO blood group; Non-O/O	37/18 (67.3%/32.7%)	50/24 (67.6%/32.4%)	.88

Abbreviation: DVT, deep venous thrombosis.

increase FVIII levels, we also analyzed the association between clinical PTS and FVIII levels.

## Design and Methods

### Patients and Controls

Our initial cohort consisted of 230 adult patients with a first episode of acute DVT of lower limbs, between January 1990 and September 2004, followed up at the outpatient clinic of University of Campinas. Patients with cancer, liver, renal, or systemic inflammatory diseases were excluded. Deep venous thrombosis was confirmed by imaging tests. In 2004, in a first assessment, FVIII levels were evaluated in all these patients and in 230 matched controls. In 2011, all patients from this initial cohort who originally presented with FVIII levels above the 90th percentile ( $n = 81$ ) were recruited for a second assessment of FVIII activity. In total, 55 patients (68%) agreed to participate and provided informed consent. Totally, 74 healthy controls were again selected according to age, gender, ABO blood group, and the same exclusion criteria were used for the study entry.

### Laboratory Methods

Factor VIII levels were measured by a 1-stage clotting assay with FVIII-deficient plasma (Siemens, Marburg, Germany). The FVIII tests were performed in duplicate on an automated coagulation analyzer (BCS XP, Siemens). C-reactive protein levels were determined in the same samples by a nephelometric method (Siemens). Factor VIII levels were considered only in the presence of normal CRP levels. ABO blood group was determined by agglutination and adsorption-elution test.

### Determination of PTS

The severity of PTS was evaluated by the clinical score (range 0-6) of the revised Clinical, Etiologic, Anatomic and Pathophysiologic (CEAP) classification.<sup>21</sup> In the CEAP classification, patients with class 0 represent no visible or palpable signs of venous disease symptoms of PTS; class 1 telangiectasias, reticular veins, or malleolar flare; class 2 varicose disease; class 3 edema without skin changes; class 4 skin changes ascribed to venous disease (pigmentation, lipodermatosclerosis); class 5 skin changes with healed ulcer; and class 6 skin changes with active ulceration. Post-thrombotic syndrome was defined as absent for classes 0 to 2, moderate for classes 3 and 4, and severe for classes 5 and 6.

### Statistical analysis

Factor VIII levels were described as median (minimum-maximum). Medians between patients and controls were compared by the Mann-Whitney test. Medians of FVIII between the first and second analyses in both groups were compared by the analysis of variance test for repeated measures. Clinical characteristics (age, gender, ethnicity, ABO blood group) between patients and controls were compared by the Fisher exact and Mann-Whitney tests. A  $P$  value  $< .05$  was considered statistically significant. All analysis was performed using the R Foundation for Statistical Computing, version 2.13.2.

### Results

Median age of the 55 patients (16 male and 39 female) was 47 years (range 20-70), and median of the first DVT episode was 10 years (range 8-15). In the first measure of FVIII, in our initial cohort, the median of the first DVT episode was 3 years (range 1-8). The control group consisted of 74 participants (28 male and 46 female) with a median age of 45 years (range 21-70). There was no significant difference between patients and controls related to gender, age, ethnicity, and ABO blood group (see Table 1).

Deep venous thrombosis was spontaneous in 17 (31%) patients. In the remaining 38 (69%) patients, associated risk factors were surgery (8.3%), immobilization (20.5%), oral contraceptive use (22.5%), pregnancy and puerperium (13.5%), among other less prevalent causes (4.2%).

Factor VIII levels were significantly higher in patients when compared to controls (158.0 IU/dL, 82.0-216.0 vs 126.1 IU/dL, 83.4-187.1;  $P < .001$ ). Those patients also showed higher plasma FVIII when compared to controls (235.8 IU/dL, 200.3-510.0 vs 127.2 IU/dL, 80.1-211.0;  $P < .001$ ) when previously analyzed with a median of 3 years after venous thrombosis. Factor VIII levels were significantly lower at the moment when compared to the initial assessment ( $P < .001$ ), with a mean reduction of 33%.

Importantly, only 17 (30.9%) of 55 patients included in this study still presented increased FVIII levels (above P90). C-reactive protein levels in patients with DVT were between normal values (0.13 mg/dL) but significantly lower when compared to the first measure with 3-year median after venous thrombosis (0.22 mg/dL;  $P = .003$ ).

Unfortunately, only 68% of the patients analyzed in the first assessment and with FVIII levels above 90th percentile were included in this study. So, we also compared the FVIII levels

**Table 2.** Factor VIII and C-Reactive Protein Levels According to the Clinical, Etiologic, Anatomic and Pathophysiologic Classification.<sup>3</sup>

	No PTS	PTS	Severe PTS	P
Prevalence, N (%)	24 (43.7%)	23 (41.8%)	8 (14.5%)	NA
FVIII, IU/dL, median (min-max)	154 (112-189)	156 (82-184)	182 (171-216)	<.001
CRP, mg/dL, median (min-max)	0.109 (0.017-0.381)	0.197 (0.017-0.5)	0.117 (0.017-0.5)	.48

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; FVIII, factor VIII; PTS, post-thrombotic syndrome; NA = not available.

<sup>3</sup> Normal ranges: FVIII:C (62-151 IU/dL), CRP (< 0.5 mg/dL).

between this group and those who did not respond to our invite, and there was no significant difference (235.8 IU/dL vs 256.1 IU/dL;  $P = .26$ ).

Regarding PTS, a total of 31 (56.3%) of 55 patients presented PTS and 8 (14.5%) were classified as severe PTS. Table 2 shows the median of FVIII and CRP levels according to the PTS classification. Classes 5 and 6, representing severe PTS, were associated with significantly increased levels of FVIII (182.0 IU/dL, range 171-216), when compared to patients with moderate PTS (155.5 IU/dL, 82-184;  $P = .002$ ) or no PTS (154.0 IU/dL, 112-189;  $P < .001$ ). There was no statistical correlation or difference between CRP levels and PTS classification.

Deep venous thrombosis recurrence was observed in 12 (21.8%) of 55 patients, but there was no difference in FVIII levels between patients with and without recurrence (160.0 IU/dL vs 158.0 IU/dL;  $P = .14$ ). The majority of the patients with DVT recurrence presented PTS (83%), and this prevalence was significantly different from the patients without recurrence (49%), ( $P = .049$ ).

## Discussion

Previous studies demonstrated increased FVIII levels in patients with DVT after a median of 5 years of follow-up.<sup>9,14,15</sup> In this study, we showed that patients with a median of 10 years after the first episode of DVT presented higher FVIII levels when compared to healthy controls, but the magnitude of this difference was significantly lower than that observed at earlier time points, and only a minority of patients still presented FVIII levels above the 90th percentile. It is important to point out that in our study we established an appropriate reference range of high FVIII levels, using a percentile value. These findings suggest the presence of stimulus to increase FVIII levels that could be stronger during the initial years of the DVT episode. On the other hand, we could not rule out the possibility that those patients present an increased basal FVIII level that could contribute as a causal factor for the first episode of DVT.

There is general consensus agreement that increased FVIII is a risk factor for the first DVT episode and that in several cases, these increased FVIII levels represent a genetic characteristic of the patient, as opposed to a mere inflammatory response.<sup>22</sup> However, whether higher FVIII levels increase the risk of recurrent DVT is still controversial.<sup>14,23</sup> A possible explanation for these apparent discrepant results is the fact that in a proportion of patients followed in these studies, increased

FVIII resulted from acquired causes such as PTS or other more subtle proinflammatory state, not revealed by CRP levels.

In a recent prospective study, Tichelaar et al demonstrated that following acute venous thrombosis, although FVIII:C levels remained persistently elevated in 72% of participants for at least 6 months, the CRP levels had corrected to within the normal range by 3 months in the majority of patients. These findings clearly suggest that in patients with elevated plasma FVIII levels, the post-thrombotic acute phase response is of minor importance, and other more important unidentified factors are responsible for maintaining high FVIII levels in the longer term.<sup>24</sup>

So, we investigated the possibility that PTS, a common complication of DVT characterized by a chronic inflammation of the affected member, such as edema, increased temperature, and skin lesions, could be related to the FVIII levels. We used CEAP classification, which is a sensitive and specific method to define PTS. According to this method, we demonstrated that 56.3% of the patients presented PTS, with 14.5% classified as severe. The most interesting finding was the significant association between increased FVIII levels and severe PTS. Post-thrombotic syndrome was not associated with CRP levels, in accordance with a previous study.<sup>19</sup> The VWF plays a critical role in regulating plasma FVIII levels. A possibility is that in severe PTS, the vascular injury with increased endothelial cell secretion of VWF could contribute to the increased plasma FVIII levels found in those patients.<sup>25</sup>

In this subset of patients the recurrence was 21.8% in a median of 10 years, which is similar to that described in other populations.<sup>26</sup> However, the number of patients in our study is much smaller than previous studies. Although there was no difference in FVIII levels between those with and without recurrence, PTS was more common in the first one. One explanation for this association might be the fact that PTS and recurrent DVT share similar risk factors. We could also speculate that recurrence could contribute to the PTS development. Most of the patients (10 of 12) with recurrent DVT presented with mild PTS, which is not clinically associated to an important local limb inflammation, and may be this could explain why they did not show higher FVIII in comparison to those without recurrence. The number of patients of this study is small and studies with larger numbers of patients with DVT are necessary to confirm and expand these data and results.

## Conclusions

In conclusion, we demonstrated a persistent increase in FVIII levels in a subset of patients after 10 years of the first DVT, but

in a much lower magnitude than that observed in the first 3 years of the disease. In addition, according to our predefined criteria, only one-third of patients with initially increased FVIII levels still presented this alteration. Finally, we observed a significant association between increased FVIII levels and severe PTS. These data highlight the importance that PTS is to be regarded as a potential confounding effect in studies that evaluate the association of DVT with FVIII.

#### Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia do Sangue (INCTS) for the financial support.

#### References

- Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet*. 1995;345(8943):152-155.
- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, et al. Elevated levels of FVIII within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):79-84.
- Bank I, Van de Poel MHW, Coppens M, et al. Absolute annual incidences of first events of venous thromboembolism and arterial vascular events in individuals with elevated FVIII - A prospective family cohort study. *Thromb Haemost*. 2007;98(5):1040-1044.
- Kuipers S, Cannegieter SC, Doggen CJM, Rosendaal FR. Effect of elevated levels of coagulation factors on the risk of venous thrombosis in long-distance travelers. *Blood*. 2009;113(9):2064-2069.
- Tirado I, Mateo J, Soria JM, et al. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2005;93(3):468-474.
- Flinterman LE, Vlieg AVH, Rosendaal FR, Doggen CJM. Venous thrombosis of the upper extremity: effect of blood group and coagulation factor levels on risk. *Br J Haematol*. 2010;149(1):118-123.
- Teixeira Mello TB, Machado TF, Montavão SA, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Assessing the coagulation factor levels, inherited thrombophilia, and ABO blood group on the risk for venous thrombosis among Brazilians. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15(4):408-414.
- Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Vos HL, et al. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost*. 1999;81(5):680-683.
- O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of VIIIc in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):10-13.
- Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost*. 2005;94(2):362-365.
- Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med*. 2002;113(8):636-642.
- Christiansen SC, Næss IA, Cannegieter SC, Hammerstrøm J, Rosendaal FR, Reitsma PH. Inflammatory cytokines as risk factors for a first venous thrombosis: a prospective population-based study. *PLoS Med*. 2006;3(8):1414-1419.
- Roumen-Klappe EM, den Heijer M, van Uum SHM, van der Ven-Jongekrijg J, van der Graaf F, Wollersheim H. Inflammatory response in the acute phase of deep vein thrombosis. *J Vasc Surg*. 2002;35(4):701-706.
- Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, et al. High plasma level of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000;343(7):457-462.
- Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MMW, et al. High plasma concentration of factor VIII: C is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):5-9.
- Kahn SR. The post thrombotic syndrome. *Thromb Res*. 2011;127(suppl 3):S89-S92.
- Prandoni P and Kahn SR. Post-thrombotic syndrome: prevalence, prognostication and need for progress. *Br J Haematol*. 2009;145(3):286-295.
- Reich-Schupke S, Altmeyer P, Stücker M. What do we know of post-thrombotic syndrome? Current status of post-thrombotic syndrome in adults. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010;8(2):81-87.
- Roumen-Klappe EM, Janssen MCH, van Rossum J, et al. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. *J Thromb Haemost*. 2009;7(4):582-587.
- Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome. *Thromb Haemost*. 2009;101(3):505-512.
- Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, et al. American Venous Forum International Ad Hoc Committee for Revision of the CEAP Classification. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg*. 2004;40(6):1248-1252.
- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, et al. Elevated levels of FVIII within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):79-84.
- Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA*. 2005;293(19):2352-2361.
- Tichelaar V, Mulder A, Kluin-Nelemans H, Meijer K. The acute phase reaction explains only a part of initially elevated factor VIII: C levels: a prospective cohort study in patients with venous thrombosis. *Thromb Res*. 2012;129(2):183-186.
- Nossent AY, van Marion V, van Tilburg NH, et al. von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2006;4(12):2556-2662.
- Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica*. 2007;92(2):199-205.