

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do**  
**Adulto**

**Samuel da Silva Freitas**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA DE VON**  
**WILLEBRAND TIPO 2**

**Belo Horizonte – MG**

**2017**

**Samuel da Silva Freitas**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA DE VON  
WILLEBRAND TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Meireles Rezende

Co-orientador: Dr. Daniel Gonçalves Chaves

**Belo Horizonte – MG**

**2017**

F866c Freitas, Samuel da Silva.  
Caracterização molecular da Doença de von Willebrand Tipo 2  
[manuscrito]. / Samuel da Silva Freitas. - - Belo Horizonte: 2017.  
94f. : il.  
Orientador: Suely Meireles Rezende.  
Coorientador: Daniel Gonçalves Chaves.  
Área de concentração: Saúde do Adulto.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Medicina.

1. Doença de von Willebrand/diagnóstico. 2. Transtornos da  
Coagulação Sanguínea. 3. Variação Genética. 4. Dissertações Acadêmicas.  
I. Rezende, Suely Meireles. II. Chaves, Daniel Gonçalves. III. Universidade  
Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 312



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO  
ADULTO



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 2**

**SAMUEL DA SILVA FREITAS**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 30 de junho de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Suely Meireles Rezende - Orientadora  
UFMG

Prof. Daniel Gonçalves Chaves - Coorientador  
HEMOMINAS

Profa. Maria Raquel Santos Carvalho  
UFMG

Dr. Daniel Dias-Ribeiro  
HC-UFMG

Belo Horizonte, 30 de junho de 2017.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor**

Prof. Jaime Arturo Ramírez

### **Vice-Reitora**

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

### **Pró-Reitora de Pós-Graduação**

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

### **Pró-Reitora de Pesquisa**

Profa. Adelina Martha dos Reis

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **Chefe do Departamento de Clínica Médica**

Prof. Unai Tupinambás

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

### **Coordenadora**

Profa. Teresa Cristina Abreu Ferrari

### **Sub-coordenador**

Profa. Suely Meireles Rezende

### **Colegiado**

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Rosângela Teixeira

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Suely Meireles Rezende

*Dedico este trabalho ao meu pai,  
Ubirajara Alves de Freitas, que me  
incentivou a continuar nos estudos e  
assim, poder chegar até aqui.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força, sustento e sabedoria.

Ao Dr. Daniel Gonçalves Chaves pela orientação, confiança, paciência, dedicação e compreensão, fundamentais para conclusão deste trabalho.

À Dra. Suely Meireles Rezende, pela orientação e apoio.

Aos meus pais Ubirajara Alves de Freitas e Selma Ferreira da Silva Freitas, pelo apoio, incentivo, dedicação e zelo que me ajudaram nos momentos turbulentos durante esta jornada.

À minha avó Maria da Conceição, que foi peça fundamental para o meu desenvolvimento pessoal.

À minha namorada Risia Caroline Fernandes Botelho, pelo apoio, conforto, amor e companheirismo me dado, principalmente em momentos difíceis.

Aos meus amigos da Fundação HEMOMINAS, que tanto me fizeram rir e me divertiram, mesmo em momentos delicados.

À Sony, Microsoft e Nintendo pelos momentos de descanso e prazer, com os vídeo-games, durante os períodos de estresse.

A todas as pessoas, que de alguma forma fizeram parte dessa jornada.

*Faça os seus medos terem medo de  
você!*

*Bruce Wayne*



## RESUMO

A doença de von Willebrand (DVW) é o transtorno de sangramento hereditário mais comum, com prevalência sintomática da doença de 1:1.000 a 1:10.000 indivíduos. A DVW está associada a defeitos genéticos no gene do Fator von Willebrand (FVW), levando a deficiências quantitativas (tipos 1 e 3) ou qualitativas (tipo 2) do fator. O diagnóstico dos subtipos 2A, 2B, 2M e 2N pode ser difícil, uma vez que requer a realização de testes de coagulação específicos que não estão amplamente disponíveis em laboratórios de coagulação, particularmente em países em desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi identificar variantes associadas à DVW do tipo 2, sequenciando os exons 17, 18, 20 e 28 do gene do FVW em uma coorte de pacientes clinicamente diagnosticados como do tipo 2 da doença. Os exons 17, 18, 20 e 28 do gene do FVW de 42 probandos foram sequenciados. Um total de 19 variantes foram identificadas em 34 probandos. A maioria das sequências variantes foram encontradas no exon 28 (84,2%). Variantes potencialmente patogênicas foram identificadas em 18 probandos (42,8%) com DVW do tipo 2. Foram encontradas 10 variantes potencialmente patogênicas e nove variantes potencialmente benignas na coorte estudada. Em conclusão, foram encontradas oito variantes potencialmente patogênicas em 13 probandos associados aos subtipos 2A, 2B e 2M e nove variantes potencialmente benignas. Uma boa resposta ao DDAVP foi observada em pacientes que apresentaram quatro variantes potencialmente patogênicas: Met740Ile, Arg1315Cys, Arg1374Cys e Arg1597Gln.

Palavras-chave: Doença de von Willebrand, coagulopatia, diagnóstico, variantes genéticas, sequenciamento.

## ABSTRACT

von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder, with a prevalence of symptomatic patients of 1:1,000 to 1:10,000. VWD is associated with genetic defects in the von Willebrand factor (vWF) gene, leading to quantitative (types 1 and 3) or qualitative deficiencies (type 2) of the factor. Diagnosis of subtypes 2A, 2B, 2M and 2N can be difficult as it requires the performance of specific coagulation tests, which are not broadly available in coagulation laboratories, particularly in developing countries. The aim of this study was to identify variants associated with type 2 VWD by sequencing the exons 17, 18, 20 and 28 of the *VWF* gene in a cohort of patients clinically diagnosed as type 2 VWD. Exons 17, 18, 20 and 28 from *VWF* gene of 42 probands were sequenced. A total of 19 variants were identified in 34 probands. Most of the sequence variants were found in exon 28 (84.2%). Potentially pathogenic variants were identified in 18 probands (42.8%) with type 2 VWD. In conclusion, 10 potentially pathogenic variants and nine potentially benign variants were found in this cohort. In conclusion, eight potentially pathogenic variants in 13 probands associated with subtypes 2A, 2B and 2M and nine potentially pathogenic variants were encountered. A good response to DDAVP was observed in patients who presented four potentially pathogenic variants: Met740Ile, Arg1315Cys, Arg1374Cys and Arg1597Gln.

**Keywords:** von Willebrand disease, bleeding, diagnosis, genetic variants, sequencing.

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1</b> Iniciadores e características das reações em cadeia da polimerase para amplificação dos exons 17, 18, 20 e 28 do gene do FvW.....	30
<b>Tabela 2</b> Características dos probandos incluídos neste estudo.....	32
<b>Tabela 3</b> Caracterização de variantes potencialmente patogênicas do gene do FvW encontradas nos probandos.....	34
<b>Tabela 4</b> Frequência das variantes potencialmente benignas em diferentes populações.....	35

## LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Representação do locus, gene, mRNA e glicoproteína do FvW .....	14
<b>Figura 2</b> Representação da multimerização e distribuição dos multímeros do FvW.....	15
<b>Figura 3</b> Testes para o diagnóstico da doença de von Willebrand.....	18
<b>Figura 4</b> Representação das divergências entre o gene do FVW e o pseudogene do FVW.....	29
<b>Figura 5</b> Alinhamento de três variantes potencialmente benignas com resíduos não conservados em espécies de primatas...	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADAMTS13** Desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina, 13ª enzima da família ADAMTS

<b>DVW</b>	Doença de von Willebrand
<b>FVIII</b>	Fator VIII
<b>FVIII:C</b>	Atividade de coagulação do fator VIII
<b>FVW</b>	Fator de von Willebrand
<b>FVW:Ag</b>	Antígeno do fator de von Willebrand
<b>FVW:CB</b>	Ligação do fator de von Willebrand ao colágeno
<b>FVW:FVIII</b>	Ligação do fator de von Willebrand ao fator VIII da coagulação
<b>FVW:Rco</b>	Cofator de ristocetina
<b>Gplb</b>	Glicoproteína Ib
<b>GWAS</b>	Estudo de associação genômica ampla
<b>ISTH</b>	International Society of Thrombosis and Haemostasis
<b>MAPM</b>	Multímeros de alto peso molecular
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RIPA</b>	Agregação Plaquetária Induzida por Ristocetina
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento
<b>TS</b>	Tempo de sangria
<b>TTPA</b>	Tempo de tromboplastina parcial ativada

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Doença de von Willebrand.....	16
1.2 O gene e o pseudogene do fator de von Willebrand.....	16
1.3 O fator de von Willebrand.....	17
1.4 Diagnóstico.....	19
1.4.1 Escore de sangramento.....	19
1.4.2 Diagnóstico clínico.....	19
1.4.3 Diagnóstico Laboratorial.....	20
1.5 Classificação e genética da doença de von Willebrand.....	22
1.6 Justificativa.....	24
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
3.1 Pacientes.....	27
3.2 Coleta de dados e variáveis.....	27
3.3 Testes de coagulação.....	27
3.4 Coleta de sangue e extração de DNA.....	28
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase.....	28
3.6 Sequenciamento do DNA.....	25
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Variantes identificadas.....	33
4.2 Associação fenótipo-genótipo.....	36
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Científica - HEMOMINAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO B - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Científica - HEMOES.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO C - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Científica - HEMORIO.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO D - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Científica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO E - Formulário de dados.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO F - Formulário de escore de sangramento ISTH.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de von Willebrand

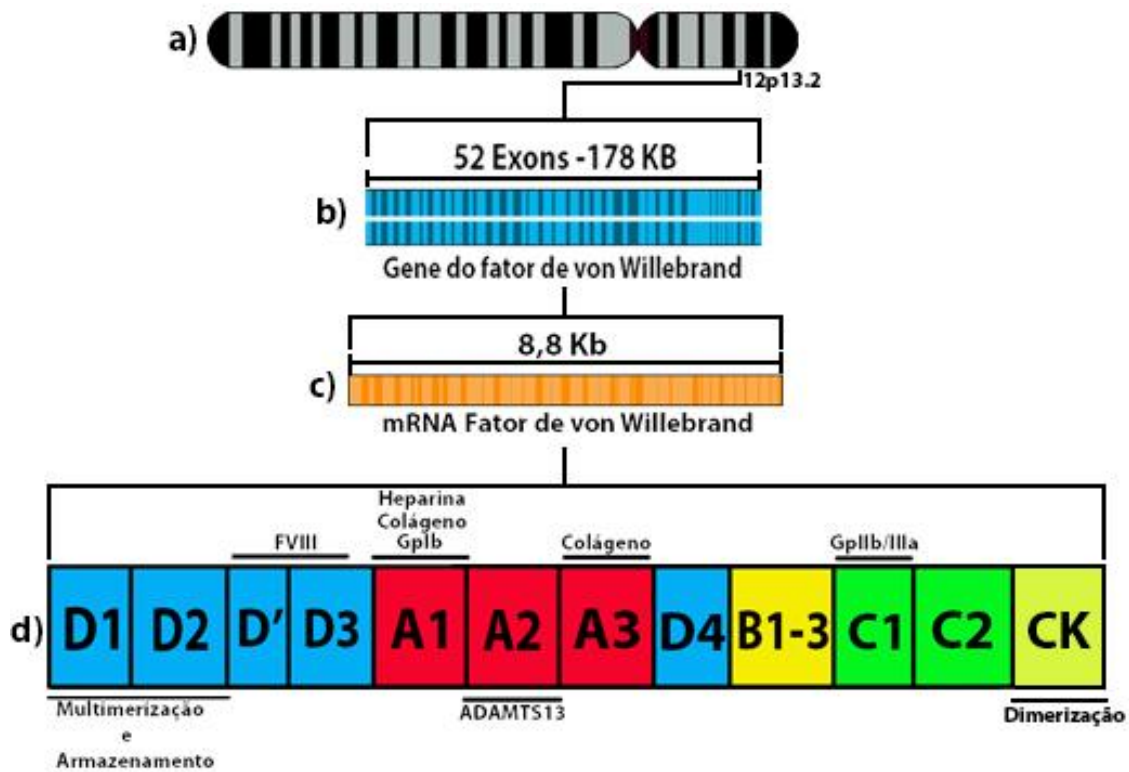
Dentre as coagulopatias hereditárias, a doença de von Willebrand (DVW) é a desordem hemorrágica mais comum (BERBER *et al.*, 2013), com uma prevalência sintomática que vai de 1:1.000 (DE FARIA *et al.*, 2015) a 1:10.000 (NG *et al.*, 2015). A DVW é causada por alterações quantitativas ou qualitativas do fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína multimérica sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos (TOSETTO *et al.*, 2015). A função do FvW é promover a agregação plaquetária e a adesão de plaquetas ao subendotélio lesado (ARGYRIS *et al.*, 2016) e também transportar o fator VIII (FVIII) da coagulação pela circulação até o momento de sua ativação, impedindo que o mesmo sofra proteólise precoce (CASTAMAN *et al.*, 2014).

A DVW é classificada em três tipos. As deficiências quantitativas do FvW podem ser classificadas como tipo 1, forma mais branda com deficiência parcial, ou tipo 3, forma mais grave da doença com deficiência completa do FvW. O tipo 2 é caracterizado por deficiências qualitativas do FvW (BUDDE, 2008) e é classificado em quatro subtipos: 2A, 2B, 2M e 2N.

### 1.2 O gene e o pseudogene do fator de von Willebrand

O gene do FvW está localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p13.3) (BERBER *et al.*, 2013). É um gene extenso com 52 exons distribuídos ao longo de 178 kilobases (kb) (Figura 1) e é altamente conservado entre muitas espécies (NG *et al.*, 2015). O RNA mensageiro (mRNA) do FvW possui aproximadamente 8.8 kb (Figura 1) (COLLINS *et al.*, 1987).





**Figura 1. Representação do locus, gene, mRNA e glicoproteína do FvW.**

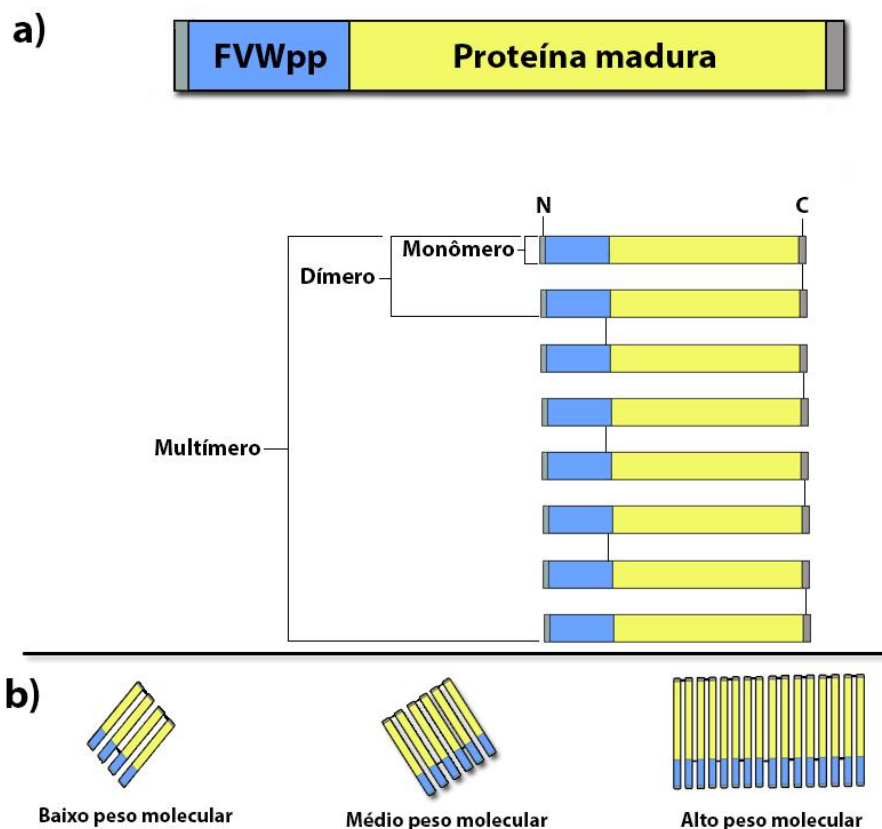
(a) O gene do FvW está localizado no braço curto do cromossomo 12, na região 1, banda 3 e sub-banda 2. (b) O gene possui 52 exons ao longo de 178 kb. (c) O mRNA possui aproximadamente 8,8 kb. (d) A glicoproteína do FvW é composta por domínios que se ligam a outras moléculas e possuem funções e sítios de ligação e clivagem que estão indicadas acima ou abaixo nas linhas pretas.

Existe um pseudogene do FvW localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2) que corresponde às sequências dos exons 23 a 34 do gene do FvW. O pseudogene apresenta homologia de 97% com o gene do FvW (EIKENBOOM *et al.*, 1994). A presença de múltiplos códons de terminação sugere que este é um gene não funcional em humanos (GINSBURG *et al.*, 1992). O pseudogene possui uma sequência de 25 kb que corresponde à sequência codificadora dos domínios A1, A2 e A3 do FvW (NICHOLS *et al.*, 2008). A homologia entre o pseudogene e o gene funcional dificulta o processo de identificação de mutações no gene do FvW.

### 1.3 O fator de von Willebrand

A estrutura do FvW compreende um pré-pro-FvW composto por um peptídeo sinal de 22 aminoácidos (aa), um propeptídeo (ppFvW) de 741 aa e a

proteína madura com 2.050 aa (MANCUSO *et al.*, 1989). Após a tradução do FvW, o pré-pro-FvW é transportado para o retículo endoplasmático, onde o peptídeo sinal é removido e são formadas ligações dissulfeto entre as porções C-terminais, originando os dímeros de FvW (HABERICHTER, 2015). Posteriormente, os dímeros são unidos através da porção N-terminal, também por ligações dissulfeto, formando os multímeros do FvW de peso molecular variável (500 a 20.000 kDa) (Figura 2) (HABERICHTER, 2015; TONACO *et al.*, 2010). No aparelho de Golgi, o ppFvW é clivado da proteína madura e ambos são armazenados nos grânulos reguladores da secreção, nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais e nos grânulos- $\alpha$  dos megacariócitos (JAMES *et al.*, 2011).



**Figura 2. Representação da multimerização e distribuição dos multímeros do FvW.**

a) Monômeros do FvW ligam-se uns aos outros por ligações dissulfeto na porção C-terminal, formando os dímeros do FvW. Esses dímeros ligam-se a outros dímeros através de ligações dissulfeto nas porções N-terminais. A ligação dos dímeros forma os multímeros de FvW. b) Os multímeros de FvW podem ter baixo, médio ou alto peso molecular, de acordo com a agregação dos dímeros.

Os domínios D1 e D2 (ppFvW), auxiliam na multimerização do FvW (FEDERICI *et al.*, 2002) através das ligações dissulfeto entre as porções N-terminais dos dímeros de FvW. Os domínios D' e D3 fazem a interação com o FVIII, que uma vez ligado ao FvW, é protegido da proteólise no plasma antes de sua ativação no processo de coagulação (CASTAMAN *et al.*, 2014). O domínio A1 possui o sítio de ligação à Gplb, ao colágeno do subendotélio lesado e à heparina. O sítio de ligação da enzima ADAMTS13, que cliva o FvW (MANNUCCI *et al.*, 2004), encontra-se no domínio A2. O domínio A3 liga-se ao colágeno. O domínio C1 liga-se à GpIIb/IIIa e o domínio CK é responsável pela formação dos dímeros do FvW através das ligações dissulfeto nas porções C-terminais.

## **1.4 Diagnóstico**

### **1.4.1 Escore de sangramento**

A avaliação clínica da presença e gravidade dos sintomas hemorrágicos é um importante passo para a avaliação de pessoas com suspeita de DVW. O escore de sangramento, um questionário desenvolvido pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (*International Society of Thrombosis and Haemostasis - ISTH*) (RODEGHIERO *et al.*, 2010), avalia a presença de manifestações hemorrágicas e a gravidade dessas manifestações com o objetivo de indicar possíveis distúrbios hemorrágicos e orientar a investigação diagnóstica. No questionário, a presença e a gravidade das manifestações hemorrágicas são pontuadas de 0 (sem sintoma ou sintomatologia trivial) a 4 (maior gravidade de manifestação, de acordo com cada característica hemorrágica). O somatório das pontuações gera um escore. Um resultado de escore maior que 3 em homens e maior que 5 em mulheres é sugestivo de alteração da hemostasia, o que demanda investigação diagnóstica para a doença hemorrágica (RODEGHIERO *et al.*, 2009).

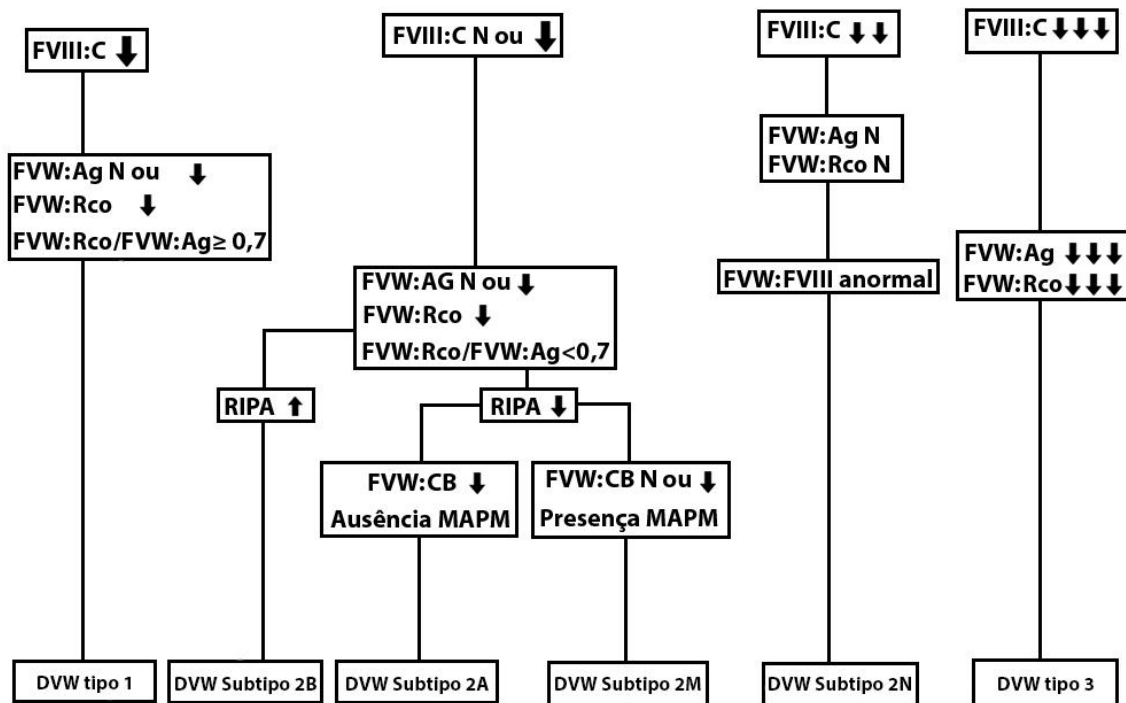
### **1.4.2 Diagnóstico clínico**

O diagnóstico clínico da DVW é realizado através do histórico de sangramento pessoal e familiar. As manifestações hemorrágicas mais comuns são sangramentos cutâneo-mucosos (epistaxe, menorragia, hematoquezia,

melena, hematomas, equimoses) e sangramentos após extrações dentárias, outros procedimentos invasivos e cirurgias (BISS *et al.*, 2010). Sangramentos profundos e de maior gravidade, tais como hemartroses e sangramento intracraniano são raros na DVW, mas podem ocorrer nos indivíduos com o tipo 3 da doença. Mediante suspeita clínica, testes de triagem e confirmatórios são necessários para caracterizar o tipo e o subtipo da DVW (FEDERICI *et al.*, 2002). Esses testes têm como objetivo avaliar a quantidade e a funcionalidade do FvW no plasma.

#### **1.4.3 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico da DVW é complexo devido à heterogeneidade da doença. Fatores como idade, grupo sanguíneo ABO, ciclo menstrual e reposição hormonal podem influenciar as concentrações plasmáticas do FvW dificultando o diagnóstico. Os testes para o diagnóstico laboratorial da DVW podem ser divididos em três categorias: (i) testes de triagem; (ii) testes confirmatórios; e (iii) testes especiais, que permitem classificar o subtipo da doença (VEYRADIER *et al.*, 1998). Os resultados combinados dos testes confirmatórios e especiais podem caracterizar o tipo e subtipo da DVW (Figura 3).



**Figura 3. Testes para o diagnóstico da DVW.** O fluxograma apresenta a orientação para o diagnóstico da DVW a partir da dosagem do FVIII.

FVIII:C = atividade do fator VIII; FvW:Ag = antígeno do fator de von Willebrand; FvW:Rco = atividade do cofator de ristocetina; FvW:FVIII = teste de ligação do FvW ao FVIII; RIPA = agregação plaquetária induzida por ristocetina; MAPM = multímeros de alto peso molecular. Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, Brasil. Manual de Diagnóstico e Tratamento da Doença de von Willebrand, 2006.

Baixos níveis da atividade coagulante do fator VIII (FVIII:C), FvW:Rco e FvW:Ag associados à razão  $FvW:Rco/FvW:Ag > 0,7$  sugerem um diagnóstico de DVW tipo 1. Níveis normais ou baixos de FVIII:C associados à razão  $FvW:Rco/FvW:Ag \leq 0,7$  sugerem um diagnóstico dos subtipos 2A, 2B e 2M. Estes resultados associados ao aumento da agregação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA) em baixas doses sugerem o diagnóstico de subtipo 2B da DVW. Altas concentrações de RIPA associados à baixa ligação do FvW ao colágeno (FvW:CB) e ausência dos multímeros de alto peso molecular (MAPM) sugere o diagnóstico de DVW subtipo 2A. Porém, se for detectada a presença dos MAPM, o diagnóstico sugestivo é do subtipo 2M. Dosagem de FVIII:C entre 10%-40% associados a concentrações normais de FvW:Rco e FvW:Ag, porém com ligação anormal entre FvW e FVIII (FvW:FVIII) sugere o diagnóstico de

DVW subtipo 2N. As concentrações do FVIII:C de 0,5%-1% e níveis indetectáveis de FvW:Rco e FvW:Ag indicam um diagnóstico do tipo 3 da DVW.

### 1.5 Classificação e genética da doença de von Willebrand

Os tipos 1 e 3 da DVW são deficiências quantitativas do FvW e correspondem a 65%-80% e 1%-5% dos casos, respectivamente, enquanto o tipo 2, que corresponde a 20%-35% dos casos, é classificado como deficiência qualitativa do FvW (LILLICRAP, 2013).

No tipo 1 da DVW ocorre uma redução dos multímeros de diferentes pesos moleculares do FvW, mas a proteína apresenta função normal (LILLICRAP, 2013; SADLER *et al.*, 2006). A transmissão é de caráter autossômico dominante. As mutações relacionadas ao tipo 1 da DVW podem estar localizadas em qualquer parte do gene. No banco de dados de registros de mutações do gene do FvW (*VWF Database Mutation Registry*. Disponível em: <http://www.ragtimedesign.com/vwf/mutation/>. Acesso em 30 de Maio de 2017), da ISTH, encontram-se registradas 163 mutações associadas ao tipo 1 da DVW. Essas mutações são de diversos tipos, tais como deleções, inserções e mutações pontuais.

O tipo 2A é o mais comum entre as variantes do tipo 2 da DVW (JAMES *et al.*, 2011). As mutações associadas ao subtipo 2A estão localizadas nos exons 11, 12, 14, 15, 16, 22, 26, 28, 51 e 52 que codificam os domínios A1 e A2 do FvW. As variantes levam à diminuição da afinidade do FvW pelas plaquetas e à perda dos MAPM, podendo ser essa perda alta ou intermediária (SADLER *et al.*, 2006). O subtipo 2A é transmitido como caráter autossômico dominante.

As mutações no gene do FvW associadas ao subtipo 2B localizam-se no exon 28, que codifica o domínio A1. Este domínio é responsável pela ligação do FvW à GpIb das plaquetas. As mutações reportadas são do tipo “ganho de função”, isto é, atuam promovendo um aumento da afinidade do FvW pelas plaquetas (BERROU *et al.*, 2015), ocasionando formação do complexo FvW-plaquetas sem que haja ligação do FvW ao colágeno do subendotélio lesado. Isso leva à remoção do complexo FvW-plaquetas da circulação, podendo ocasionar trombocitopenia. A ligação do FvW às plaquetas também pode

favorecer a sua clivagem pela enzima ADAMTS13, diminuindo os MAPM (JAMES *et al.*, 2011). O subtipo 2B é transmitido como caráter autossômico dominante e 56 mutações no exon 28 associadas a este subtipo foram registradas.

As mutações no gene do FvW associadas ao subtipo 2M estão localizadas nos exons 17, 27, 28, 30, 31 e 52 que codificam os domínios A1 e A3 do FvW (LILLICRAP, 2013). As mutações que envolvem o domínio A1 alteram a conformação da proteína, dificultando a ligação do FvW à Gplb das plaquetas. As mutações que envolvem o domínio A3 diminuem a afinidade do FvW pelo colágeno subendotelial (RIDDELL *et al.*, 2009). O subtipo 2M é semelhante ao subtipo 2A, pois ambos apresentam deficiências de ligação do FvW à Gplb das plaquetas, porém no subtipo 2M é detectada a presença dos MAPM, o que não ocorre no subtipo 2A. O subtipo 2M tem transmissão autossômica dominante.

As mutações associadas ao subtipo 2N estão localizadas nos exons 4, 9, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26 e 27 do gene do FvW, que codificam os domínios D' e D3 do FvW. As mutações que caracterizam o subtipo 2N reduzem a afinidade de ligação do FvW ao FVIII (SADLER *et al.*, 2006). Normalmente, os indivíduos com subtipo 2N apresentam um padrão multimérico normal. A ligação FvW-FVIII é importante para impedir a proteólise precoce do FVIII na corrente sanguínea, sendo que a alteração no sítio dessa ligação favorece a degradação do FVIII antes de sua ativação, reduzindo os níveis plasmáticos desse fator de coagulação. Como consequência, os testes laboratoriais podem evidenciar baixos níveis de FVIII e níveis normais de FvW, ocasionado, em alguns casos, um falso diagnóstico de hemofilia A leve (VEYRADIER *et al.*, 1998). Os indivíduos com subtipo 2N da DVW são homozigotos recessivos ou heterozigotos compostos (JAMES *et al.*, 2011; SADLER, 1994).

O tipo 3 é caracterizado pela ausência ou níveis plasmáticos muito baixos do FvW (LAK *et al.*, 2000; SADLER *et al.*, 2006). Esse tipo da DVW é considerado o mais grave. As mutações associadas ao tipo 3 estão localizadas nos exons 3 a 11, 14 a 21, 23 a 26, 28, 29, 32, 35 a 37, 41 a 43, 45 e 49 a 52 do gene do FvW, que codificam os domínios D1, D2, D4 e CK. As mutações impedem a dimerização ou multimerização do FvW, tendo como consequência

a retenção e ausência de secreção do FvW no retículo endoplasmático para o plasma (ALLEN *et al.*, 2001). Os indivíduos com DVW tipo 3 podem ser homocigotos recessivos ou heterocigotos compostos.

Em uma análise realizada no banco de dados do ISTH foram encontradas 163 mutações registradas associadas ao tipo 1 e 130 mutações registradas em associação ao tipo 3 da DVW. Com relação às mutações registradas relacionadas à DVW do tipo 2 foram: 104 mutações associadas ao subtipo 2A, sendo que 79,8% delas estão localizadas no exon 28; 56 mutações no exon 28 associadas ao subtipo 2B, variando entre mutações pontuais e inserções; 31 mutações associadas ao subtipo 2M, sendo que 77,4% estão localizadas no exon 28 e 60 mutações associadas ao subtipo 2M, sendo que 29,8% estão localizadas nos exons 17, 18 e 20.

## 1.6 Justificativa

A doença de von Willebrand (DVW) é o transtorno de sangramento hereditário mais comum, com prevalência sintomática da doença de 1:1.000 a 1:10.000 indivíduos (DE FARIA *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2015), sendo a distribuição da DVW similar em homens e mulheres. Contudo, a DVW é diagnosticada com maior frequência em mulheres devido à presença de sangramentos graves após o início dos ciclos menstruais e após o parto (PAYANDEH *et al.*, 2013). Mesmo a DVW sendo a mais comum dentre as coagulopatias hereditárias, o seu diagnóstico é difícil devido à penetrância incompleta e a influência de fatores genéticos e ambientais nos níveis do FvW (GOODEVE *et al.*, 2006) associados às incertezas quanto à relação dos testes laboratoriais e à função *in vivo* (LAFFAN *et al.*, 2004). Ainda, a falta de suspeição clínica e a escassez de centros especializados para realização dos exames necessários para a confirmação do tipo e/ou subtipo da doença dificultam seu diagnóstico.

A utilização de técnicas moleculares para o diagnóstico da DVW tem fornecido importantes informações de associação genótipo/fenótipo. Em particular, na DVW do tipo 2 as análises dos defeitos estruturais e funcionais do FvW têm ajudado a compreender a fisiopatologia da doença (SCHNEPPENHEIM *et al.*, 2005).



As dificuldades relacionadas ao diagnóstico da DVW podem favorecer a utilização de técnicas moleculares, especialmente no tipo 2, no qual as variantes genéticas encontram-se localizadas em “clusters” de exons específicos. Por último, o sequenciamento do gene do FVW pode viabilizar o diagnóstico conclusivo da DVW.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar as bases moleculares de uma coorte de pacientes diagnosticados com DVW tipo 2

### **2.2 Objetivos específicos**

Caracterizar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes diagnosticados com DVW tipo 2.

Identificar as variantes potencialmente patogênicas e benignas associadas aos subtipos da DVW tipo 2.

Estudar a associação fenotípico-genotípica dos pacientes com DVW tipo 2.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Pacientes

Os pacientes foram recrutados em quatro centros de tratamento no Brasil (HEMOMINAS em Minas Gerais; HEMOES no Espírito Santo; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em São Paulo; e HEMORIO no Rio de Janeiro) por médicos locais. Todos os participantes/responsáveis assinaram termo de consentimento (Anexos A, B, C e D). Este estudo de coorte foi aprovado pelos Comitês de Ética dos centros participantes.

Os critérios de elegibilidade incluíram pacientes com a DVW do tipo 2, acima de 8 anos, classificados como tal quando pelo menos uma medida da relação  $FVW:Rco/FVW:Ag$  era  $\leq 0,7$ . Também foram incluídos pacientes suspeitos de DVW do tipo 2 com elevado escore de sangramento (ES) e níveis reduzidos de FVIII:C (<30%), mesmo que a relação  $FVW:Rco/FVW:Ag$  fosse superior a 0,7.

#### 3.2 Coleta de dados e variáveis

Um questionário estruturado foi utilizado por todos os centros de tratamento para coletar dados sócio-demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento (Anexo E). As variáveis coletadas foram: sexo, data de nascimento, comorbidade, consanguinidade, resposta ao DDAVP, grupo sanguíneo, escore de sangramento (ES), FVIII:C, FvW:Ag, FvW:Rco, contagem de plaquetas, tipo e subtipo de VWD e história familiar de DVW. O

ES recomendado pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH-BAT) foi aplicado para fins diagnósticos e para avaliar a tendência hemorrágica (RODEGHIERO *et al.*, 2010) (Anexo F). A resposta clínica à desmopressina (DDAVP) foi considerada eficaz quando os níveis de FvW:C e FvW:Rco aumentaram de 2 a 5 vezes após 1-2 horas de infusão intravenosa em comparação com os níveis basais antes da infusão DDAVP (CASTAMAN *et al.*, 2003).

Foram considerados como pacientes com sangramento maior aqueles indivíduos que apresentaram manifestações como hemartrose, sangramento gastrointestinal, sangramento pós-parto, hematoma muscular, sangramento

intracraniano ou qualquer outra característica de sangramento interno. O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre  $ES \geq 10$  e a ocorrência de sangramento maior, assim como, a resposta ao DDAVP e  $ES < 10$ , e os pacientes com cosanguinidade e a ocorrência de hemorragia maior.

### **3.3 Testes de coagulação**

Os valores normais de referência considerados para FVW:Ag e FVW:Rco foi de 50%-150%. O intervalo de referência da razão FVW:Rco/FVW:Ag foi considerado como  $>0,7-1,2$ . Uma relação FVW:Rco/FVW:Ag  $\leq 0,7$  foi considerada indicativa de DVW do tipo 2 (LAFFAN *et al.*, 2004). Testes laboratoriais foram realizados localmente em cada centro de tratamento.

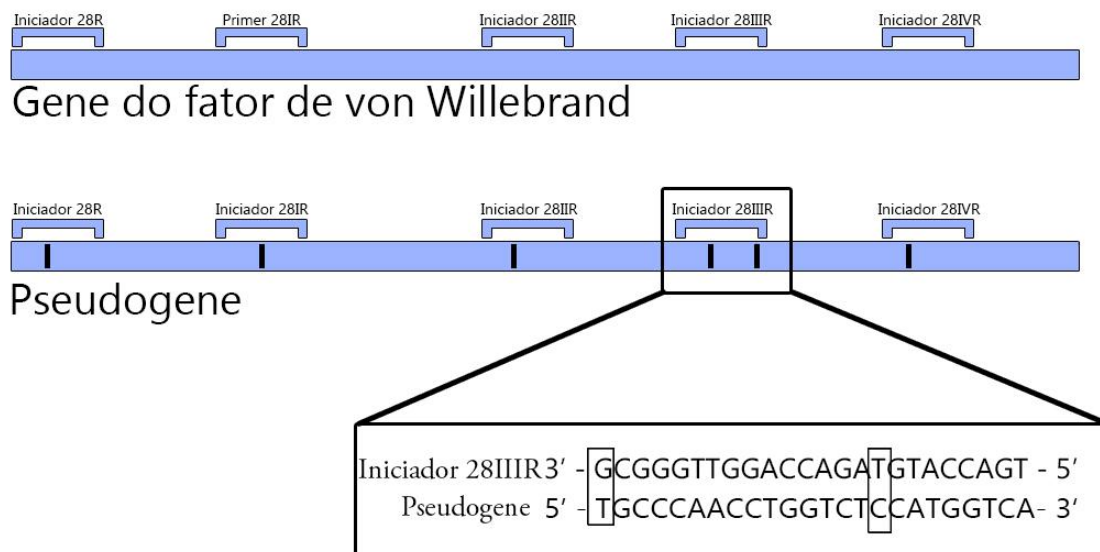
### **3.4 Coleta de sangue e extração de DNA**

Sangue periférico dos participantes foi coletado utilizando tubos vacutainer contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas e a camada leucocitária foi separada para extração de DNA utilizando o kit de extração BIOPUR Mini Spin Plus 250 (Mobius Life Science, Pinhais, Brasil). A extração de DNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de sangue foram coletadas entre 02/03/2015 e 31/01/2017. Os resultados dos exames de coagulação foram coletados pelos hemocentros participantes, após a coleta de sangue, e enviados juntamente com as amostras para a Fundação Hemominas.

### 3.5 Reação em cadeia da polimerase

O banco de dados do ISTH (<http://www.ragtimedesign.com/vwf/mutation/>) foi avaliado para identificar variantes no gene do FvW associadas à DVW do tipo 2. De acordo com este banco de dados, 206 das 251 (82%) variantes associadas a esse tipo da DVW foram localizadas nos exons 17, 18, 20 e 28 do gene e essas regiões gênicas foram selecionadas para serem sequenciadas neste estudo.

Oito pares de iniciadores foram desenhados para cobrir as regiões exônicas e os limites de intron-exon dos exons 17, 18, 20 e 28 do gene do FvW. Devido à grande extensão do exon 28 (1.347 pares de bases), foram feitos cinco pares de iniciadores para amplificar esta região. A análise do exon 28 pode ser complicada devido à presença de um pseudogene parcial não-funcional do FvW no cromossomo 22q11 (EIKENBOOM *et al.*, 1994), que corresponde a 12 exons (exons 23 a 34) do gene do FvW. De fato, apenas 2,9% das sequências no exon 28 do gene do FvW não são homólogas ao pseudogene. Portanto, os iniciadores para amplificar o exon 28 foram estrategicamente desenhados para incorporar diferenças nas sequências das duas regiões (Figura 4).



**Figura 4. Representação das divergências entre o gene do FvW e o pseudogene do FvW.** A figura mostra o posicionamento dos cinco iniciadores desenhados para o exon 28 do gene do FvW. O pseudogene do FvW foi incluído na figura, apontando as divergências que impedem as ligações dos iniciadores.

A reação de PCR foi realizada com 1X PCR Buffer, 150 ng de DNA genômico,  $MgCl_2$  1,5  $\mu M$ , 15 pmol de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 50  $\mu M$  de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em um volume final de 25  $\mu L$ . A PCR foi realizada com o seguinte protocolo: 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, anelamento de 57°C a 67°C (de acordo com a condição específica dos iniciadores) (Tabela 1) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. O último passo consistiu em uma fase de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR PureLink (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos).

**Tabela 1.** Lista de iniciadores e características da reação em cadeia da polimerase para amplificação dos exons 17, 18, 20 e 28 do gene do FvW.

Exon	Iniciadores F/R	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
<b>17</b>	17F	AGAGTGGATGGGAGGTGAAG	61	243
	17R	CCATCCACACGTGAGGAAT		
<b>18</b>	18F	GCAACTCTGAGTCTCTTGAA	60	330
	18R	CCTGCCTACAAGAAAAGTAA		
<b>20</b>	20F	CTGTGTTCTTCATTGCCTC	60	311
	20R	AGATCCACAGAACCCAACCT		
<b>28</b>	28F	GGGAATATGGAAGTCATTG	57	515
	28R	ACAGTGTGTATTTCAAGACCT		
<b>28I</b>	28I-F	CCCAGAAGTGGGTCCGCGTGGCC	65	448
	28I-R	CACAGAGGTAGCTAACGATCTCG		
<b>28II</b>	28II-F	ACCTCAAGCAGATCCGCCTCATC	64	478
	28II-R	GCCCAGTGTGGTCCTGTTGCCG		
<b>28III</b>	28III-F	CCATGGTTCTGGATGTGGCGTTCCG	59	341
	28III-R	TGACCATGTAGACCAGGTTGGGCG		
<b>28IV</b>	28IV-F	CGGCAACAGGACCAACTGGGC	67	438
	28IV-R	AAGCCAGGATTAGAACCCGAGTCG		

pb, pares de bases; F, iniciador senso; R, iniciador anti-senso.

### 3.6 Sequenciamento do DNA

A reação de sequenciamento utilizou o kit BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix e o tampão de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 de 0,75X (ThermoFisher, Waltham, Estados Unidos) com a adição de 15 pmol de

iniciadores (senso ou anti-senso) e 5-10 µg do produto da PCR purificado em um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em microplacas utilizando um termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos). Os ciclos de temperatura foram configurados de acordo com as instruções do fabricante (96°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos a 96°C por 15 segundos e 50°C por 15 segundos). O passo de extensão final foi de 60°C por 4 minutos.

Para a purificação dos produtos de sequenciamento, foram adicionados 90 µL de solução de purificação (67% de etanol, acetato de sódio 0,1 M) à reação de sequenciamento. As placas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 150 µL de etanol 70% e as placas foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as placas foram deixadas para secar à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem, foram adicionados 10µL de Formamide Hi-Di™ (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) e as placas foram colocadas em um termociclador a 95°C por 5 minutos para a desnaturação do DNA.

O sequenciamento foi realizado em um aparelho Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster, Estados Unidos). A sequência do tipo selvagem do gene FVW (registro CCDS8539.1) foi obtida a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e o alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, Estados Unidos). O banco de dados de mutações do ISTH (<http://www.ragtimedesign.com/vwf/mutation/>) e o banco de dados do NCBI foram utilizados como referência para verificar mutações relatadas. A frequência das variantes encontradas foi verificada no *1.000 Genome Project Phase 3* utilizando a versão Genome Reference GRCh37 (<http://grch37.ensembl.org/index.html>).

Este estudo seguiu a nomenclatura recomendada pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* e pela *Association of Molecular Pathology*, adotando o termo “variante” para a mudança de nucleotídeos no DNA (RICHARDS *et al.*, 2015).

#### 4. RESULTADOS

Um total de 40 probandos pertencentes a famílias não relacionadas, com DVW de tipo 2 foram incluídos no estudo: 19 probandos cadastrados na Fundação Hemominas, 15 probandos cadastrados no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, três probandos cadastrados no HEMOES e três probandos cadastrados no HEMORIO. A idade média foi de 36,5 anos (intervalo interquartil [IIQ], 22,7-47,2), dos quais 57,5% (n = 23) eram do sexo feminino. Vinte e oito probandos foram testados para DDAVP, dos quais 15 (53,5%) tiveram resposta positiva. Todos os probandos que responderam ao escore de sangramento avaliado (90%; n=36) e 13 probandos do sexo masculino (81,2%) apresentaram o valor do escore de sangramento maior que 3. Dezoito probandos do sexo feminino (90%) apresentaram o valor do escore de sangramento maior que 5 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características dos probandos incluídos neste estudo.

<b>Características</b>	<b>Valores</b>
Mediana de idade, em anos (IIQ)	36.5 (22.75 - 47.25)
	<b>n (%)</b>
Feminino	23 (57.5)
Escore de sangramento¥	
Masculino > 3	13 (81.2)
Feminino > 5	18 (90.0)
Sintomas de sangramento	
Extração de dentes	26 (72.2)
Cutâneo	25 (69.4)
Pequenas feridas	22 (61.1)
Epistaxe	21 (58.3)
Grupo sanguíneo não-O§	12 (44.4)
FVIII:C ≤ 30%£	06 (19.5)
FVW:Ag < 50%	16 (40.0)
FVW:Rco < 50%	34 (85.5)
FVW:Rco/FVW:Ag ≤ 0.7	40 (100.0)
Resposta ao DDAVP#	17 (60.7)

IIQ, intervalo interquartil;

¥ Escore de sangramento não foi coletado em quatro probandos (10.0%)

§ Um total de 13 probandos (32.5%) não foram testados para o grupo sanguíneo ABO

£ Um total de nove probandos (22.5%) não foram testados para FVIII:C

# Não houve informação de teste/resposta ao DDAVP em 12 probandos (30.0%)



#### 4.1 Variantes identificadas

Dezenove variantes foram identificadas em 32 probandos. A maioria das sequências variantes foi encontrada no exon 28 (84,2%), seguido pelos exons 17 (5,3%), 18 (5,3%) e 20 (5,3%) do gene do FVW (Tabelas 3 e 4). Oito variantes (42,1%), já relatadas no banco de dados ISTH, foram identificadas como potencialmente patogênicas: Met740Ile (rs2228317 - subtipo 2M), Pro1266Leu (rs61749370 - subtipo 2B), Arg1308Cys (rs61749387 - subtipo 2B), Arg1341Gln (rs61749403 - subtipo 2B) Val1360Ala (rs267607338 - subtipo 2M), Leu1580Val (rs61750114 - subtipo 2A), Arg1597Trp (rs61750117 - subtipo 2A) e Arg1597Gln (rs61750577 - subtipo 2A). Duas de 19 variantes (10,5%) foram descritas no banco de dados do ISTH com classificação indefinida: Arg1315Cys (rs61749395 – subtipo 2A, 2M ou tipo 1) e Arg1374Cys (rs61750071 – subtipo 2A, 2M ou tipo 1) (Tabela 3).

Nove de 19 variantes (47,4%), não relacionadas ao fenótipo da DVW, foram identificadas como potencialmente benignas: Thr789Ala (rs1063856) encontrada em seis pacientes, Gln852Arg (rs267607376) encontrada em 14 pacientes, Asn1435Ser (rs11063987) encontrada em um paciente, Ile1380Val (rs11063988) encontrada em um paciente, Ser1486Leu (rs149424724) encontrada em um paciente, Asp1472His (rs1800383) encontrada em cinco pacientes, Val1565Leu (rs1800385) encontrada em dois pacientes, Tyr1584Cys (rs1800386) encontrada em um paciente e Thr1381Ala (rs216311) encontrada em nove pacientes (Tabela 4).

**Tabela 3.** Caracterização de variantes potencialmente patogênicas do gene do FVW encontradas no probandos deste estudo

SNP	Mudança no DNA	Mudança no amino ácido	Número do exon	Associação com o subtipo da DVW	Estudos de expressão de proteína	Associação confirmada*	Referência
rs2228317	c.2220G>A	Met740Ile	17	Subtipo 2M	Sim	Não	Jacobi et al., 2012
rs61749370	c.3797C>T	Pro1266Leu	28	Subtipo 2B	Não	Não	James, 2006; Federeci et al., 2009; Gupta et al., 2008
rs61749387	c.3922C>T	Arg1308Cys	28	Subtipo 2B	Não	Não	Randi et al., 1991; Donnér et al., 1991; 1992
rs61749395	c.3943C>T	Arg1315Cys	28	(2A, 2M ou tipo 1)	Sim	Não	Aznar, 1998; Ribba et al., 2001
rs61749403	c.4022G>A	Arg1341Gln	28	Subtipo 2B	Não	Não	Cooney et al., 1991
rs267607338	c.4079T>C	Val1360Ala	28	Subtipo 2M	Não	Não	Kasatkar et al., 2014; Bowman et al., 2013; Sutherland et al., 2009
rs61750071	c.4120C>T	Arg1374Cys	28	(2A, 2M ou tipo 1)	Sim	Não	Hilbert et al., 1995
rs61750114	c.4738C>G	Leu1580Val	28	Subtipo 2A	Não	Não	Unpublished
rs61750117	c.4789C>T	Arg1597Trp	28	Subtipo 2A	Sim	Sim	Ginsburg et al., 1989
rs61750577	c.4790G>A	Arg1597Gln	28	Subtipo 2A	Sim	Sim	Nishio et al., 2004

\*De acordo com os estudos de expressão de proteínas. SNP, Polimorfismo de Único Nucleotídeo

**Tabela 4.** Frequência de variantes potencialmente benignas encontradas neste estudo de acordo com as diferentes populações

SNP	Mudança no DNA	Mudança de Amino Ácido	Número do Exon	Frequência polimórfica*				
				AMR	EUR	AFR	EAS	SAS
rs1063856	c.2365A>G	Thr789Ala	18	0.241	0.367	0.638	0.091	0.218
rs216321	c.2555G>A	Gln852Arg	20	0.073	0.086	0.042	0.209	0.115
rs11063988	c.4138A>G	Ile1380Val	28	0.009	0.000	0.116	0.000	0.000
rs216311	c.4141A>G	Thr1381Ala	28	0.220	0.400	0.008	0.250	0.210
rs11063987	c.4304A>G	Asn1435Ser	28	0.009	0.000	0.109	0.000	0.000
rs1800383	c.4414G>C	Asp1472His	28	0.115	0.100	0.551	0.108	0.153
rs149424724	c.4457C>T	Ser1486Leu	28	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000
rs1800385	c.4693G>T	Val1565Leu	28	0.280	0.076	0.006	0.370	0.234
rs1800386	c.4751A>G	Tyr1584Cys	28	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000

\*Frequências populacionais obtidas do 1.000 Genome Project

SNP, Single nucleotide polymorphism; AMR, Americanos; EUR, Europeus; AFR, Africanos; EAS, leste Asiáticos; SAS, Sul Asiáticos

## 4.2 Associação fenótipo-genótipo

Cinco probandos (12,5%) apresentaram variantes associadas ao subtipo 2A: Arg1597Gln (n=2); Arg1597Trp (n=2) e Leu1580Val (n=1). Cinco probandos (12,5%) apresentaram variantes associadas ao subtipo 2B: Arg1341Gln (n=2), Arg1308Cys (n=2) e Pro1266Leu (n=1). Dois probandos (5%) apresentaram variantes associadas ao subtipo 2M: Met740Ile (n=1) e Val1360Ala (n=1). Cinco probandos (12,5%) apresentaram variantes não associadas a um tipo específico de DVW: Arg1315Cys (n=3) e Arg1374Cys (n=2) (Tabela 3).

O sangramento maior foi detectado em pacientes com as seguintes variantes potencialmente patogênicas: Arg1341Gln (n=1), Arg1308Cys (n=1), Pro1266Leu (n=1), Met740Ile (n=1), Arg1315Cys (n=2), Val1360Ala (n=1) e Arg1374Cys (n=1).

O escore de sangramento foi avaliado para 36/40 probandos (90%) e 42/46 pacientes (91,3%). Um total de 15 probandos (41,6%) apresentou o ES  $\geq 10$  e sete (46,6%) deles apresentaram variantes que denifiram um subtipo específico da DVW (2B, n=3; 2A, n=4) (Tabela suplementar 1). Os probandos com ES  $\geq 10$  apresentaram sangramento cutâneo como a manifestação mais frequente (100%), seguido por sangramento por pequenas feridas e sangramento após extração de dente(s) (86,6% cada uma). No grupo dos probandos com ES  $< 10$ , sangramento após extração de dente(s) foi a manifestação mais frequente (57,1%), seguido por epistaxe (47,6%). Um total de 7/24 pacientes (29,2%) com o ES  $< 10$  apresentou sangramento maior contra 10/18 pacientes (55,6%) com ES  $\geq 10$  que apresentaram sangramento maior ( $p=0,08$ , *Odds Ratio*=3,03, 95% IC= 7,5-11,7). Interessantemente, 7/24 pacientes apresentaram sangramento maior mesmo tendo ES  $< 10$  (Tabela suplementar 1). Cinco variantes potencialmente patogênicas (Pro1266Leu, Arg1315Cys, Arg1341Gln, Arg1597Gln e Arg1597Trp) foram associadas ao sangramento maior e ES  $\geq 10$ .

A resposta ao DDAVP foi obtida em 15 dos 31 probandos (48,3%) que fizeram o teste. Considerando as variantes potencialmente patogênicas, a resposta ao DDAVP ocorreu nos pacientes que apresentaram as seguintes variantes: Met740Ile (relacionada à DVW 2M), Pro1266Leu (relacionada à DVW 2B), Arg1597Gln (relacionada à DVW 2A), Arg1315Cys e Arg1374Cys

(ambas relacionadas a tipo ainda não especificado de DVW). A falta de resposta ao DDAVP foi associada com as seguintes variantes: Val1360Ala (relacionada ao subtipo 2M), Arg1597Trp (relacionada ao subtipo 2A), Arg1374Cys (relacionada a um tipo não específico da DVW), Arg1341Gln e Arg1308Cys (ambas relacionadas ao subtipo 2B)

## 5. DISCUSSÃO

Foi estudada, a nível molecular, uma coorte de 40 probandos brasileiros com DVW do tipo 2. Foram encontradas oito variantes potencialmente patogênicas associadas aos subtipos 2A, 2B e 2M em 12 probandos e nove variantes potencialmente benignas em 25 probandos após o sequenciamento dos exons 18, 20 e 28 do gene do FvW. Cinco variantes patogênicas (Pro1266Leu, Arg1315Cys, Arg1341Gln, Arg1597Gln e Arg1597Trp) foram encontradas em pacientes com sangramento maior e ES  $\geq$  10. A boa resposta ao DDAVP foi encontrada em pacientes com quatro variantes potencialmente patogênicas: Met740Ile, Arg1315Cys, Arg1374Cys e Arg1597Gln. Estudos anteriores também reportaram a boa resposta ao DDAVP em pacientes com a variante Arg1315Cys. Por outro lado, a variante Arg1374Cys não foi relacionada ao aumento do FVW:Rco após a infusão de DDAVP (CASTAMAN et al., 2008).

Neste estudo, variantes potencialmente patogênicas foram detectadas em 42,5% dos probandos estudados. Seis membros familiares de probandos também foram incluídos neste estudo e cinco deles apresentaram as mesmas variantes encontradas em seus parentes. Todas as variantes encontradas neste estudo já estavam publicadas no banco de dados de DVW do ISTH.

A variante Met740Ile está associada ao subtipo 2M da DVW no banco de dados ISTH e foi detectada em um paciente neste estudo. No entanto, um estudo anterior, que realizou análises de expressão dessa variante, mostrou presença de estrutura de multimérica normal e sugeriu que esta modificação é um polimorfismo benigno não associado à DVW (JACOBI et al., 2012). A variante Val1360Ala é descrita em associação com o subtipo 2M e tipo 3 da DVW no banco de dados ISTH e especialmente ao tipo 3 em estudos anteriores (KASATKAR et al., 2014; BOWMAN et al., 2013; SUTHERLAND et al., 2009). Em nosso estudo, o probando com esta variante apresentou FvW:Ag de 65%, mostrando que esta variante não está relacionada à DVW do tipo 3 (KASATKAR et al., 2014; BOWMAN et al., 2013; SUTHERLAND et al., 2009).

A variante Pro1266Leu foi detectada em um probando neste estudo. Alguns estudos sugerem que esta variante está associada ao tipo 1 e ao subtipo 2B da DVW (HOLMBERG et al., 1993; EIKENBOOM et al., 1993;

GOODEVE *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2007). A variante Arg1308Cys foi associada ao subtipo 2B da DVW em diferentes estudos (DONNER *et al.*, 1991; 1992; RANDI *et al.*, 1991). O probando que possui esta variante em nosso estudo tinha níveis de FvW:Rco abaixo de 50%, FvW:Ag de 65% e razão  $FvW:Rco/FvW:Ag \leq 0,7$ , resultados compatíveis com este subtipo da DVW.

Dois probandos apresentaram a variante Arg1341Gln. Esta variante foi associada ao subtipo 2B (COONEY *et al.*, 1991). Um probando com esta variante apresentou níveis de FvW:Ag e FvW:Rco anormais (baixas concentrações) e o outro probando apresentou níveis normais de FvW:Ag e FvW:Rco. Os probandos não tinham resultado para o teste de RIPA, não sendo possível a confirmação do subtipo 2B.

As variantes Arg1597Trp e Arg1597Gln estão associadas ao subtipo 2A da DVW (GINSBURG *et al.*, 1989; NISHIO *et al.*, 2004). Três dos quatro pacientes deste estudo portadores destas variantes apresentaram baixos níveis de FvW:Rco e níveis normais de FvW:Ag, o que é compatível com o subtipo 2A da DVW. A variante Leu1580Val está associada ao subtipo 2A no banco de dados ISTH. Um probando apresentou essa variante, mas os resultados laboratoriais do probando não puderam confirmar com precisão o subtipo da DVW.

As variantes Arg1315Cys e Arg1374Cys estão associadas aos subtipos 2A, 2M e ao tipo 1 da DVW (CASAÑA *et al.*, 1998; RIBBA *et al.*, 2001; PENAS *et al.*, 2005; GOODEVE *et al.*, 2007; JAMES *et al.*, 2007; CORRALES *et al.*, 2009). Os resultados dos probandos incluídos neste estudo não foram suficientes para inferir o tipo/subtipo da DVW associado a essas variantes.

As variantes com frequência alélica acima de 5% são consideradas "prováveis benignas" por serem comuns em vários grupos étnicos (RICHARDS *et al.*, 2015). Cinco variantes potencialmente benignas apresentaram frequências acima de 5% na maioria das populações e sem sinais de associação com a DVW: Ile1380Val, Asn1435Ser, Asp1472His, Ser1486Leu e Val1565Leu.

Um estudo de GWAS associou a variante Thr789Ala com baixos níveis plasmáticos do FvW:Ag (DESCH *et al.*, 2013). Contudo, a mesma variante não apresentou significância clínica em outro estudo, que apresentou frequência de 23% na população iraniana (SHAHBAZI *et al.*, 2012). A variante Gln852Arg foi

associada com baixa agregação plaquetária induzida por colágeno e com altos níveis plasmáticos de FVIII (VAIDYA *et al.*, 2010). Os resultados laboratoriais dos pacientes com esta variante não permitiram nenhuma associação.

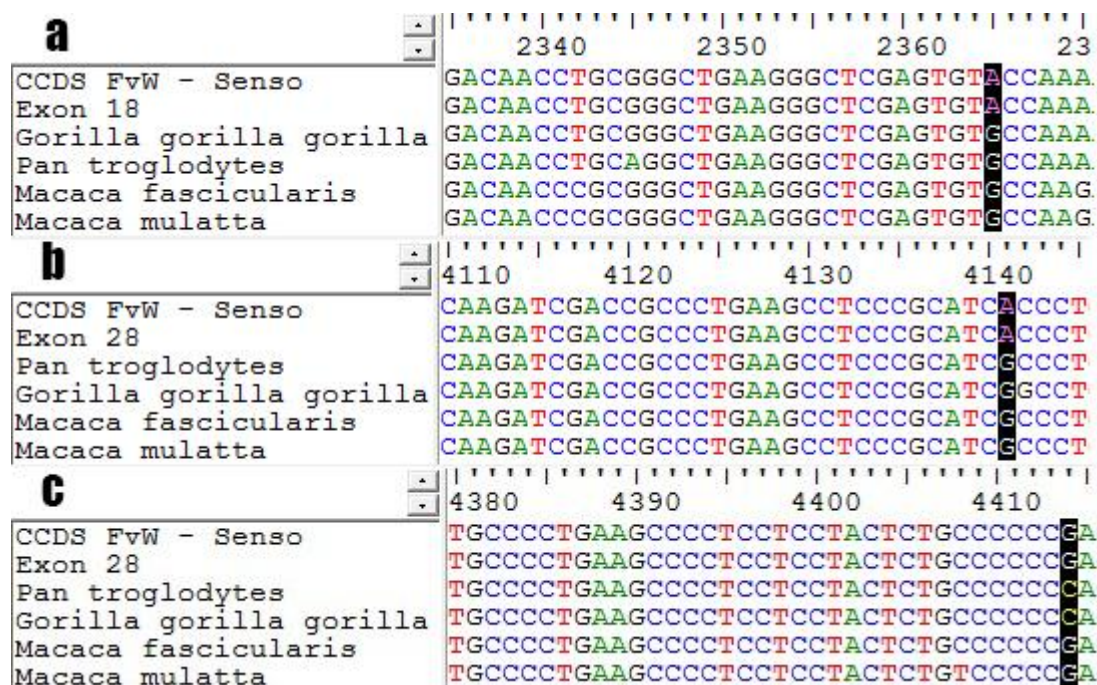
Em outros estudos, a variante Thr1381Ala foi associada a baixas razões FvW:Rco/FvW:Ag e níveis plasmáticos mais baixos do FvW:Ag em indivíduos sem DVW (FLOOD *et al.*, 2009; 2010; ZHONGHAI *et al.*, 2013). Neste estudo, três probandos portadores desta variante apresentaram níveis plasmáticos reduzidos de FvW:Rco. Adicionalmente, um desses pacientes também apresentou uma variante associada com o subtipo 2B da DVW (Arg1308Cys). Os resultados do nosso estudo corroboram com os resultados anteriores de que a variante Thr1381Ala provavelmente está relacionada a baixos níveis de FvW:Ag.

A variante Tyr1584Cys foi relacionada à susceptibilidade de proteólise do FvW pela ADAMTS13 (BOWEN, 2003). Outros estudos identificaram que esta variante é mais prevalente em pacientes com a DVW tipo 1 (O'BRIEN *et al.*, 2003; BOWEN *et al.*, 2005). Esta variante foi encontrada em um probando neste estudo que apresentou o resultado limítrofe de FvW:Rco (43%), níveis ligeiramente reduzidos de FvW:Ag (71%) e níveis normais de FVIII:C (59%). Tais resultados laboratoriais não são compatíveis com a classificação para o tipo 1 da DVW, como visto em alguns estudos anteriores.

A conservação de resíduos de todas as variantes encontradas foi avaliada. Elas foram comparadas com a sequência de DNA selvagem de quatro espécies de primatas (*Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta*). Todas as variantes potencialmente patogênicas apresentaram conservação de resíduo nas quatro espécies avaliadas. Entre as nove variantes potencialmente benignas, seis variantes apresentaram conservação nas quatro espécies de primatas analisadas: Gln852Arg (exon 20); Ile1380Val, Asn1435Ser, Ser1486Leu, Val1565Leu e Tyr1584Cys (exon 28). Duas variantes, Thr789Ala (exon 18) e Thr1381Ala (exon 28), não apresentaram conservação em nenhuma das espécies comparadas, enquanto que, a variante Asp1472His (exon 28) não apresentou conservação nas espécies *Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla* (Figura 5). A conservação de resíduos das variantes potencialmente patogênicas nas espécies próximas à espécie humana, associada aos resultados obtidos nesta pesquisa, reforça a hipótese



de que estas variantes podem causar a DVW. Novos estudos podem elucidar a ação das variantes potencialmente benignas que apresentaram conservação de resíduo, porquanto, estas variantes podem interagir com outras variantes causando alguma alteração no fator de von Willebrand.



**Figura 5. Alinhamento de três variantes potencialmente benignas com resíduos não conservados em espécies de primatas.** A figura apresenta o alinhamento de três variantes com quatro espécies de primatas: *Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta*. A e B) Variantes Thr789Ala (c.2365A>G) e Thr1381Ala (c.4141A>G) não apresentam conservação em nenhuma das espécies comparadas. C) A variante Asp1472His (c.4414G>C) não apresenta resíduo conservado nas espécies *Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla*.

Este estudo possui algumas limitações que precisam ser mencionadas: (I) os testes de coagulação não foram realizados de forma centralizada, pois foram realizados nos laboratórios de cada centro participante; (II) o sequenciamento foi centralizado em regiões específicas do gene do FvW, onde as variantes relacionadas à DVW do tipo 2 são conhecidas por estarem agrupadas. Esta pode ter sido a razão pela qual encontramos variantes associadas em menos de 50% dos pacientes estudados. (III) Devido ao

histórico de colonização do Brasil, a população brasileira apresenta intensa miscigenação. Tal característica pode ter contribuído para que outros exons sejam os mais afetados nesta população e não aqueles que foram incluídos nesta pesquisa. A principal força deste estudo é que fomos capazes de coletar dados hemorrágicos e pontuação do ES de quase 100% dos indivíduos incluídos e resposta a DDAVP em 68,8% dos participantes inscritos. Isso nos permitiu realizar observações genótipo-fenótipo relacionadas à gravidade do sangramento, à pontuação do ES e à resposta ao DDAVP.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foram encontradas oito variantes potencialmente patogênicas, em 12 probandos, associadas aos subtipos 2A, 2B e 2M da DVW. Também foram encontradas nove variantes potencialmente benignas em 25 probandos. Cinco variantes potencialmente patogênicas (Pro1266Leu, Arg1315Cys, Arg1341Gln, Arg1597Gln e Arg1597Trp) foram associadas ao sangramento maior e  $ES \geq 10$ . A resposta ao DDAVP foi aparentemente associada a quatro variantes potencialmente patogênicas: Met740Ile, Arg1315Cys, Arg1374Cys e Arg1597Gln.

## 7. REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; JAN, R.; KANNAN, M.; OBSER, T.; HASSAN, M.I.; OYEN, F.; BUDDE, U.; SAXENA, R.; SCHNEPPENHEIM, R. Characterisation of mutations and molecular studies of type 2 von Willebrand disease: *Thrombosis and Haemostasis*, v.109(1), p.39–46, 2012.

ALLEN, S.; GOODEVE, A.C.; PEAKE, I.R.; DALY, M.E. Endoplasmic reticulum retention and prolonged association of a von Willebrand's disease-causing von Willebrand factor variant with ERp57 and calnexin. *Biochemical and biophysical research communications*, v.280(2), p. 448-53, 2001.

ARGYRIS, P.P.; ANIM, S.O.; KOUTLAS, L.G. Maxillary pseudotumor as initial manifestation of von Willebrand disease, type 2: report of a rare case and literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v.121(2), p.e27-e31, 2016.

BERBER, E.; PEHLEVAN, F.; AKIN, M.; CAPAN, O.Y.; KAVAKLI, K.; CAGLAYAN, S.H. A Common VWF Exon 28 Haplotype in the Turkish Population. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, v.19(5), p.550-6, 2013.

BERROU, E.; KAUSKOT, A.; ADAM, F.; HAREL, A.; LEGENDRE, P.; LAVENU BOMBLED, C.; ROTHSCHILD, C.; PREVOST, N.; CHRISTOPHE, O.D.; LENTING, P.J.; DENIS, C.V.; ROSA, J.P.; BRYCKAERT, M. Apoptotic Platelet Events Are Not Observed in Severe von Willebrand Disease-Type 2B Mutation p.V1316M. *PLoS ONE*, v.10(12), 2015.

BISS T.T.; BLANCHETTE, V.S.; CLARK, D.S.; BOWMAN, M.; WAKEFIELD, C.D.; SILVA, M.; LILLICRAP, D.; JAMES, P.D.; RAND, M.L. Quantitation of bleeding symptoms in children with von Willebrand disease: use of a standardized pediatric bleeding questionnaire. *J Thromb Haemost.*, v.8(5), p.950-6, 2010.

BOWMAN, M.; TUTTLE, A.; NOTLEY, C.; BROWN, C.; TINLIN, S.; DEFOREST, M.; LEGGO, J.; BLANCHETTE, V.S.; LILLICRAP, D.; JAMES, P.; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada.. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *J Thromb Haemost.*, v.11(3), p.512-20, 2013.

BUDDE, U. Diagnosis of von Willebrand disease subtypes: implications for treatment. *Haemophilia*, v.14, p.27-38, 2008.

CASTAMAN, G.; LETHAGEN, S.; FEDERICI, A.B.; TOSETTO, A.; GOODEVE, A.; BUDDE, U.; BATLLE, J.; MEYER, D.; MAZURIER, C.; FRESSINAUD, E.; GOUDEMAM, J.; EIKENBOOM, J.; SCHNEPPENHEIM, R.; INGERSLEV, J.; VORLOVA, Z.; HABART, D.; HOLMBERG, L.; PASI, J.; HILL, F.; PEAKE, I.; RODEGHIERO, F. Response to desmopressin is influenced by the genotype

and phenotype in type 1 vonWillebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood*, v.111(7), p.3531-9, 2008.

CASTAMAN, G.; HILLARP, A.; GOODEVE, A. Laboratory aspects of von Willebrand disease: test repertoire and options for activity assays and genetic analysis. *Haemophilia*, v.20, p.65-70, 2014.

COLLINS, C.J.; UNDERDAHL, J.P.; LEVENE, R.B.; RAVERA, C.P.; MORIN, M.J.; DOMBALAGIAN, M.J.; RICCA, G.; LIVINGSTON, D.M.; LYNCH, D.C. Molecular cloning of the human gene for von Willebrand factor and identification of the transcription initiation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.84(13), p.4393-7, 1987.

COONEY, K.A.; NICHOLS, W.C.; BRUCK, M.E.; BAHOU, W.F.; SHAPIRO, A.D.; BOWIE, E.J.; GRALNICK, H.R.; GINSBURG, D. The molecular defect in type IIB von Willebrand disease. Identification of four potential missense mutations within the putative Gplb binding domain. *J Clin Invest.*, v.87(4), p.1227-33, 1991.

DESCH, K.C.; OZEL, A.B.; SIEMIENIAK, D.; KALISH, Y.; SHAVIT, J.A.; THORNBURG, C.D.; SHARATHKUMAR, A.A.; MCHUGH, C.P.; LAURIE, C.C.; CRENSHAW, A.; MIREL, D.B.; KIM, Y.; CROPP, C.D.; MOLLOY, A.M.; KIRKE, P.N.; BAILEY-WILSON, J.E.; WILSON, A.F.; MILLS, J.L.; SCOTT, J.M.; BRODY, L.C.; LI, J.Z.; GINSBURG, D. Linkage analysis identifies a locus for plasma von Willebrand factor undetected by genome-wide association. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.110(2), p.588-93, 2013.

DE FARIA, F.C.; HENNEBERG, R.; DO NASCIMENTO, A.J.; KUBO, K.S.; FRIGERI, H.R.; DA SILVA, P.H. Von Willebrand Disease Lab Diagnosis. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, v.32(2), p.135-40, 2015.

EIKENBOOM, J.C.; REITSMA, P.H.; PEERLINCK, K.M.; BRIËT, E. Recessive inheritance of von Willebrand's disease type I. *Lancet*, v.341(8851), p.982-6, 1993.

EIKENBOOM, J.C.; VINK, T.; BRIËT, E.; SIXMA, J.J.; REITSMA, P.H. Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.91(6), p. 2221-4, 1994.

FEDERICI, A.B.; CASTAMAN, G.; MANNUCCI, P.M. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. *Haemophilia*, v.8(5), p.607-21, 2002.

GINSBURG, D.; BOWIE, E.J. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Blood*, v.79(10), p.2507-19, 1992.

GOODEVE, A.; EIKENBOOM, J.; CASTAMAN, G.; RODEGHIERO, F.; FEDERICI, A.B.; BATLLE, J.; MEYER, D.; MAZURIER, C.; GOUDEMANT, J.; SCHNEPPENHEIM, R. Phenotype and genotype of a cohort of families

historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). **Blood**, v.109(1), p.112-21, 2006.

GOODEVE, A.; EIKENBOOM, J.; CASTAMAN, G.; RODEGHIERO, F.; FEDERICI, A.B.; BATLLE, J.; MEYER, D.; MAZURIER, C.; GOUDEMANT, J.; SCHNEPPENHEIM, R.; BUDDE, U.; INGERSLEV, J.; HABART, D.; VORLOVA, Z.; HOLMBERG, L.; LETHAGEN, S.; PASI, J.; HILL, F.; HASHEMI SOTEH, M.; BARONCIANI, L.; HALLDEN, C.; GUILLIATT, A.; LESTER, W.; PEAKE, I. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). **Blood**, v.109(1), p.112-21, 2007.

HABERICHTER, S.L. von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. **Blood**, v.126(15), p.1753-61, 2015.

HOLMBERG, L.; DENT, J.A.; SCHNEPPENHEIM, R.; BUDDE, U.; WARE, J.; RUGGERI, Z.M. von Willebrand factor mutation enhancing interaction with platelets in patients with normal multimeric structure. **J Clin Invest.**, v.91(5), p.2169-77, 1993.

JAMES, P.D.; NOTLEY, C.; HEGADORN, C.; LEGGO, J.; TUTTLE, A.; TINLIN, S.; BROWN, C.; ANDREWS, C.; LABELLE, A.; CHIRINIAN, Y.; O'BRIEN, L.; OTHMAN, M.; RIVARD, G.; RAPSON, D.; HOUGH, C.; LILLICRAP, D. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. **Blood**, v.109(1), p.145-54, 2007.

JAMES, P.D.; GOODEVE, A.C. von Willebrand disease. **Genetics in Medicine**, v.13(5), p. 365-76, 2011.

KASATKAR, P.; SHETTY, S.; GHOSH, K. Genetic heterogeneity in a large cohort of Indian type 3 von Willebrand disease patients. **PLoS ONE**, v.9(3), p.e92575, 2014.

LAFFAN, M.; BROWN, S.A.; COLLINS, P.W.; CUMMING, A.M.; HILL, F.G.H.; KEELING, D.; PEAKE, I.R.; PASI, K.J. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. **Haemophilia**, v.10(3), p.199-217, 2004.

LAK, M.; PEYVANDI, F.; MANNUCCI, P.M. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. **British journal of haematology**, v.111(4), p.1236-9, 2000.

LILLICRAP, D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. **Blood**, v. 122,(23), p. 3735–3740, 2013.

MANCUSO, D.J.; TULEY, E.A.; WESTFIELD, L.A.; WORRALL, N.K.; SHELTON-INLOES, B.B.; SORACE, J.M.; ALEVY, Y.G.; SADLER, J. E. Structure of the gene for human von Willebrand factor. **Journal of Biological Chemistry**, v.264(33), p.19514-27, 1989.

MANNUCCI, P.M.; CAPOFERRI, C.; CANCIANI, M.T. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. **British Journal of Haematology**, v.126(2), p.213-8, 2004.

NG, C.; MOTTO, D.G.; DI PAOLA, J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. **Blood**, v.125(13), p.2029-37, 2015.

NICHOLS, W.L.; HULTIN, M.B.; JAMES, A.H.; MANCO-JOHNSON, M.J.; MONTGOMERY, R.R.; ORTEL, T.L.; RICK, M.E.; SADLER, J.E.; WEINSTEIN, M.; YAWN, B.P. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). **Haemophilia**, v.14(2), p.171-232, 2008.

PAYANDEH, M.; RAHIMI, Z.; KANSESTANI, A.N.; HEMMATI, S.; ALEYASIN, M.; ZARE, M.E.; NOURE, Z.; HASHEMIAN, A.H.; GOHARDEHI, F. Clinical Features and Types of Von Willebrand Disease in Women with Menorrhagia Referred to Hematology Clinic of Kermanshah. **Int J Hematol-Oncol Stem Cell Res**, v.7(2), p.1-5, 2013.

RIDDELL, A.F.; GOMEZ, K.; MILLAR, C.M.; MELLARS, G.; GILL, S.; BROWN, S.A.; SUTHERLAND, M.; LAFFAN, M.A.; MCKINNON, T.A.J. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. **Blood**, v.114(16), p.3489-96, 2009.

RODEGHIERO, F.; CASTAMAN, G.; TOSETTO, A. How I treat von Willebrand disease. **Blood**, v.114(6), p.1158-65, 2009.

RODEGHIERO, F.; TOSETTO, A.; ABSHIRE, T.; ARNOLD, D.M.; COLLER, B.; JAMES, P.; NEUNERT, C.; LILLICRAP, D. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. **J Thromb Haemost**, v.8(9), p.2063-5, 2010.

SADLER, J.E. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb Haemost.**, v.71(4), p.520-5, 1994.

SADLER, J.E.; BUDDE, U.; EIKENBOOM, J.C.; FAVALORO, E.J.; HILL, F.G.; HOLMBERG, L.; INGERSLEV, J.; LEE, C.A.; LILLICRAP, D.; MANNUCCI, P.M.; MAZURIER, C.; MEYER, D.; NICHOLS, W.L.; NISHINO, M.; PEAKE, I.R.; RODEGHIERO, F.; SCHNEPPENHEIM, R.; RUGGERI, Z.M.; SRIVASTAVA, A.; MONTGOMERY, R.R.; FEDERICI, A.B.; Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.4(10), p.2103-14, 2006.

SCHNEPPENHEIM, R.; BUDDE, U. Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: A 2004 update. **Semin Hematol**, v.42(1), p.15-28, 2005.

SUTHERLAND, M.S.; KEENEY, S.; BOLTON-MAGGS, P.H.B.; HAY, C.R.M.; WILL, A.; CUMMING, A.M. The mutation spectrum associated with type 3 von Willebrand disease in a cohort of patients from the North West of England. **Haemophilia**, v.15(5), p.1048-57, 2009.

SZÁNTÓ, T.; SCHLAMMADINGER, A.; STAELENS, S.; DE MEYER, S. F.; FRESON, K.; PAREYN, I.; VAUTERIN, S.; HÁRSFALVI, J.; DECKMYN, H.; VANHOORELBEKE, K. The A/T1381 polymorphism in the A1-domain of von Willebrand factor influences the affinity of von Willebrand factor for platelet glycoprotein Iba. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98(1), p. 178–185, 2007.

TONACO, L.C.; RIOS, D.R.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; DUSSE, L.M. S. Púrpura trombocitopênica trombótica: o papel do fator von Willebrand e da ADAMTS13. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32(2), p.155-61, 2010.

TOSETTO, A.; CASTAMAN, G. How I treat type 2 variant forms of von Willebrand disease. **Blood**, v.125(6), p. 907-14, 2015.

VEYRADIER, A.; FRESSINAUD, E.; MEYER, D. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 28(4), p. 201–210, 1998.



**Tabela suplementar 1.** Dados clínicos complementares dos pacientes.

Número paciente	Sexo	Idade	Consanguinidade	Resposta ao DDAVP	ABO	FVIII:C	FVW:Rco	FVW: Ag	Rco/Ag	Escore de sangramento	Sintomas de sangramento	Variantes genéticas encontradas
<b>1</b>	F	35	Sim	Sim	O	59	43	71	0,6	7	SC, SPF, SED, ME, SCO, OS	Tyr1584Cys
<b>2</b>	M	22	Não	Sim	O	203	42	79	0,5	7	SPF, EP, SG, SCO	Met740Ile; Thr789Ala; Gln852Arg;
<b>3</b>	F	39	Não	NI	O	23	25	83	0,3	8	SPF, SED, ME, HM, OS	ND
<b>4</b>	F	44	Não	Sim	O	71	51	81	0,6	6	SPF, SCTM, ME, SCO, OS	Thr789Ala
<b>5</b>	F	23	Sim	NI	A	117	51	147	0,3	32	SPF, SCTM, SED, SC, EP, SG, HT, ME, SCO, OS, HPP	Gln852Arg; Arg1341Gln; Ile1380Val; Asn1435Ser
<b>6#</b>	F	51	Sim	NI	A	80	69	71	0,9	19	SPF, SCTM, SED, SC, EP, ME, SCO, OS	Thr1381Ala; Gln852Arg; Arg1341Gln
<b>7</b>	F	25	Sim	Sim	NI	33	22	37	0,5	28	SPF, SED, SC, EP, HE, ME, HM, OS	Gln852Arg; Arg1315Cys
<b>8</b>	F	62	NI	NI	NI	NI	20	56	0,3	NI	NI	Gln852Arg; Asp1472His; Arg1597Gln
<b>9</b>	F	67	Sim	NI	O	100	92	154	0,5	11	SPF, SCTM, SED, SC, ME, HM, SCO, HPP, OS	Pro1266Leu; Asp1472His
<b>10</b>	F	40	Não	NI	O	NI	17	180	0,1	7	HM, OS	ND
<b>11</b>	F	29	Não	NI	NI	NI	16	52	0,3	17	SPF, SCTM, SC, EP, SG, ME, HM, OS	ND
<b>12</b>	F	23	NI	NI	NI	NI	26	65	0,4	NI	NI	Gln852Arg; Thr1381Ala; Arg1308Cys
<b>13</b>	F	57	Não	NI	NI	NI	45	92	0,4	6	SED, ME, SCO, OS	Gln852Arg; Leu1580Val
<b>14</b>	M	17	Sim	NI	O	86	29	68	0,4	2	SCTM	Asp1472His
<b>15</b>	M	46	NI	NI	NI	NI	28	63	0,4	NI	NI	Gln852Arg; Ser1486Leu

Número paciente	Sexo	Idade	Consanguinidade	Resposta ao DDAVP	ABO	FVIII:C	FVW:Rco	FVW: Ag	Rco/Ag	BAT escore	Sintomas de sangramento	Variantes genéticas encontradas
16	F	34	NI	NI	NI	NI	52	87	0,5	NI	NI	Thr789Ala; Gln852Arg; Asp1472His; Arg1597Trp
17	M	53	Não	Sim	O	30	28	50	0,5	14	SPF, SED, SC, EP, HE, SCO, OS	ND
18#	M	56	Não	NI	B	NI	NI	NI	NI	11	SPF, EP, SCO	ND
19	F	77	Sim	Sim	NI	107	51	92	0,5	11	SPF, SED, SC, EP, SG, HT, HM, SCO, OS	Thr1381Ala
20#	F	51	Não	Não	O	NI	NI	NI	NI	0	NI	Asp1472His
21	M	40	Não	Sim	B	20	33	60	0,5	8	SPF, SED, EP, SG, HT	Arg1315Cys
22	M	11	Não	Não	A	67	33	65	0,5	7	SPF, SED, SC, EP, SG	Val1360Ala
23	F	35	Não	Sim	O	43,6	13	63	0,3	19	SPF, SED, SC, EP, ME, HM, SCO, OS	Arg1597Gln
24	M	12	Sim	Sim	O	NI	16	21	0,7	6	SCTM, SED, SC, SCO, OS	Val1565Leu
25	M	45	Não	Não	B	84	20	108	0,1	7	SED, SC, EP, SCO	Val1565Leu; Thr1381Ala
26	M	18	Não	Não	NI	102	42	72	0,5	6	SC, EP, HE, SCO	ND
27	F	36	Não	Sim	O	64	16	37	0,4	18	SPF, SED, SC, HE, ME, HM, SCO, OS	Gln852Arg
28	M	37	Não	Não	A	90	24	55	0,4	4	SPF, SED, OS	ND
29	F	17	Não	Não	O	54	9	46	0,1	11	SPF, SED, SC, EP, ME	Arg1597Trp
30	F	41	Não	Sim	NI	33	14	28	0,5	4	SED, EP	Thr1381Ala
31	M	17	Não	Não	NI	48	6	18	0,3	6	SPF, SED, EP, SCO	Arg1341Gln
32	M	58	Não	Não	B	43	21	39	0,5	8	SCTM, EP, SG	Arg1308Cys
33	F	45	Não	Sim	O	33	15	38	0,3	10	SED, SC, HE, HT, ME	Gln852Arg
34	F	24	Não	Não	NI	102	9	21	0,4	10	SED, SC, HE, HT, ME	ND
35	M	33	Não	Sim	A	54	13	33	0,3	8	SED, EP, SG, SCO	Gln852Arg; Arg1374Cys

Número paciente	Sexo	Idade	Consanguinidade	Resposta ao DDAVP	ABO	FVIII:C	FVW:Rco	FVW: Ag	Rco/Ag	BAT escore	Sintomas de sangramento	Variantes genéticas encontradas
<b>36</b>	M	6	Não	Sim	NI	69	37	57	0,6	1	SC	Thr789Ala
<b>37</b>	M	8	Não	Não	O	55	9	33	0,2	10	SPF, SED, SC, EP	Thr789Ala
<b>38</b>	F	52	Sim	Não	A	13	10	16	0,6	17	SPF, SED, SC, EP, ME, SCO	Thr1381Ala
<b>39</b>	M	56	Não	Não	A	28	10	18	0,5	4	SPF, SED	Arg1374Cys; Thr1381Ala
<b>40</b>	F	37	Não	Não	A	NI	9	25	0,3	2	ME	Arg1315Cys
<b>41</b>	F	13	Não	Não	A	37	9	27	0,3	11	SPF, SC, EP, ME, SCO	Gln852Arg
<b>42#</b>	M	58	Não	Não	A	42	9	13	0,6	8	SPF, SED, EP, SCO	ND
<b>43</b>	M	8	Não	Sim	O	56	11	17	0,6	2	SC, EP	Thr789Ala
<b>44#</b>	F	68	Não	Não	O	37	9	33	0,2	11	SPF, SCTM, SED, SC, EP, ME	Gln852Arg
<b>45</b>	F	56	Não	NI	B	117	87	120	0,7	15	SPF, SCTM, SED, SC, EP, ME, HM, HPP	ND
<b>46#</b>	F	19	Não	NI	B	100	69	130	0,5	5	SED, SC, ME	Thr1381Ala

SPF, Sangramento por pequenas feridas; SCTM, Sangramento após cirurgia ou trauma maior; SED, Sangramento após extração de dentes/dentes; SC, Sangramento cutâneo; EP, Epistaxe; SG, Sangramento gastrointestinal; HE, Hematuria; HT, Hemartrose; ME, Menorragia; HM, Hematoma muscular; SCO, Sangramento na cavidade oral; OS, Outros tipos de sangramentos; HPP, Hemorragia pós-parto; NI, Não informado; ND, Não detectado; #Parentes: Paciente 20 (irmã da paciente 4); Paciente 6 (mãe da paciente 5); Paciente 18 (pai da paciente 11); Paciente 44 (mãe da paciente 30); Paciente 42 (pai do paciente 36); Paciente 46 (filha da paciente 45).

**TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA**

Projeto: *Desenvolvimento e implantação de testes para diagnóstico e acompanhamento especializado de pacientes com doença de von Willebrand no estado de Minas Gerais.*

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com a participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício a que tem direito em seu centro de tratamento.

Você tem doença de von Willebrand e vem sendo acompanhado na Fundação Hemominas. A doença de von Willebrand pode ser classificada em tipos 1, 2A, 2B, 2M, 2N e 3, dependendo da atividade e da quantidade do Fator de von Willebrand na circulação. Muitas pessoas que têm doença de von Willebrand não sabem o tipo da doença que possuem. Este projeto de pesquisa tem como objetivo definir o tipo de doença de von Willebrand dos pacientes atendidos na Fundação Hemominas. O diagnóstico será feito através do sequenciamento de partes do seu DNA que ficam no gene do Fator de von Willebrand.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será separado e estocado no Laboratório de Pesquisa no Hemocentro de Belo Horizonte e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Ao aceitar participar deste projeto, você também autoriza a consulta de seu prontuário médico pela equipe de pesquisadores. Os pesquisadores consultarão seus registros (prontuários) para conhecer e analisar dados como (I) Gênero, (II) Uso de hormônio, (III) Data de nascimento, (IV) História familiar, (V) Grupo sanguíneo ABO e Rh, (VI) Tipo presumível de DVW antes da análise do projeto, (VII) Se já fez dose-teste para uso de DDAVP, (VIII) Se já fez uso terapêutico de DDAVP, (IX) Se teve resposta objetiva ao DDAVP, (X) Resultado de exames basais, após uma e quatro horas da aplicação endovenosa de DDAVP, (XI) Resultado da contagem de plaquetas e última sorologia viral nos últimos 24 meses, (XII) Resultado do teste RIPA 1,2 e 0,6 e (XIII) Qual(is) modalidades terapêuticas foram utilizadas nas últimas 5 intercorrências clínicas hemorrágicas, pré-operatório e/ou preparo para o parto nos últimos cinco anos. Os resultados dos testes genéticos realizados serão repassados a você pelo médico do estudo e anexados ao seu prontuário. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue (dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção) e quebra de confidencialidade. Para minimizar esses riscos, apenas profissional técnico treinado fará a coleta de sua amostra. Além disso, apenas pesquisadores autorizados e treinados terão acesso ao seu prontuário. É importante salientar que o resultado do sequenciamento pode não detectar a mutação existente no gene do Fator de von Willebrand, pois nem toda a extensão do gene será analisada. Serão analisadas somente as regiões chamadas de exon 17, exon 18, exon 19, exon 20 e exon 28 do gene do Fator de von Willebrand. No caso de não encontrarmos mutações nessas regiões, você será ficar sabendo sobre isso através do médico do estudo.

Você não será identificado quando o sangue coletado ou os registros médicos forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura e acompanhamento dos seus prontuários médicos. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade. Você terá garantia de ressarcimento de suas despesas (transporte, alimentação, etc.) caso compareça ao centro de tratamento para fins exclusivos da pesquisa. Você tem garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Este Termo de Consentimento deverá ser rubricado na primeira folha e assinado na segunda folha pelo participante e pelo pesquisador responsável pelo projeto. Este Termo de Consentimento será elaborado em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra do participante.

**Declaração de consentimento**

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar como sujeito da pesquisa deste projeto.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador - Daniel Gonçalves Chaves

Contato com o pesquisador: (31) 3768 4587 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br (Daniel G. Chaves)  
(31) 3409 9746 - srezende@medicina.ufmg.br (Suely M. Rezende)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa: (31) 3768 4587 - cep@hemominas.mg.gov.br

## TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Projeto: *Desenvolvimento e implantação de testes para diagnóstico e acompanhamento especializado de pacientes com doença de von Willebrand.*

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com a participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício a que tem direito em seu centro de tratamento.

Você tem doença de von Willebrand e vem sendo acompanhado no HEMOES. A doença de von Willebrand pode ser classificada em tipos 1, 2A, 2B, 2M, 2N e 3, dependendo da atividade e da quantidade do Fator de von Willebrand na circulação. Muitas pessoas que têm doença de von Willebrand não sabem o tipo da doença que possuem. Este projeto de pesquisa tem como objetivo definir o tipo de doença de von Willebrand dos pacientes atendidos no HEMOES. O diagnóstico será feito através do sequenciamento de partes do seu DNA que ficam no gene do Fator de von Willebrand.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será enviado ao Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas (Minas Gerais) e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Ao aceitar participar deste projeto, você também autoriza a consulta de seu prontuário médico pela equipe de pesquisadores. Os pesquisadores consultarão seus registros (prontuários) para conhecer e analisar dados como (I) Gênero, (II) Uso de hormônio, (III) Data de nascimento, (IV) História familiar, (V) Grupo sanguíneo ABO e Rh, (VI) Tipo presumível de DVW antes da análise do projeto, (VII) Se já fez dose-teste para uso de DDAVP, (VIII) Se já fez uso terapêutico de DDAVP, (IX) Se teve resposta objetiva ao DDAVP, (X) Resultado de exames basais, após uma e quatro horas da aplicação endovenosa de DDAVP, (XI) Resultado da contagem de plaquetas e última sorologia viral nos últimos 24 meses, (XII) Resultado do teste RIPA 1,2 e 0,6 e (XIII) Qual(is) modalidades terapêuticas foram utilizadas nas últimas 5 intercorrências clínicas hemorrágicas, pré-operatório e/ou preparo para o parto nos últimos cinco anos. Os resultados dos testes genéticos realizados serão repassados a você pelo médico do estudo e anexados ao seu prontuário. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue (dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção) e quebra de confidencialidade. Para minimizar esses riscos, apenas profissional técnico treinado fará a coleta de sua amostra. Além disso, apenas pesquisadores autorizados e treinados terão acesso ao seu prontuário. É importante salientar que o resultado do sequenciamento pode não detectar a mutação existente no gene do Fator de von Willebrand, pois nem toda a extensão do gene será analisada. Serão analisadas somente as regiões chamadas de exon 17, exon 18, exon 19, exon 20 e exon 28 do gene do Fator de von Willebrand. No caso de não encontrarmos mutações nessas regiões, você ficará sabendo sobre isso através do médico do estudo.

Você não será identificado quando o sangue coletado ou os registros médicos forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura e acompanhamento dos seus prontuários médicos. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade. Você terá garantia de ressarcimento de suas despesas (transporte, alimentação, etc.) caso compareça ao centro de tratamento para fins exclusivos da pesquisa e solicite esse benefício. Você tem garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Este Termo de Consentimento deverá ser rubricado na primeira folha e assinado na segunda folha pelo participante e pelo pesquisador responsável pelo projeto. Este Termo de Consentimento será elaborado em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra do participante.

**Declaração de consentimento**

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar como sujeito da pesquisa deste projeto.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador – Alessandra Nunes Loureiro Prezotti

Contato com o pesquisador: (27) 3636-7930 ou 98141-9011 – aprezeni@yahoo.com (Alessandra Prezotti)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa: (27) 3335-7326 - cepucam@gmail.com

## TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Projeto: *Desenvolvimento e implantação de testes para diagnóstico e acompanhamento especializado de pacientes com doença de von Willebrand.*

Vimos pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido convidar você a participar de um projeto de pesquisa. A participação neste estudo é voluntária. Você não terá nenhum gasto com a participação no estudo. Você tem o direito de escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perda de qualquer benefício a que tem direito em seu centro de tratamento.

Você tem doença de von Willebrand e vem sendo acompanhado no HEMORIO. A doença de von Willebrand pode ser classificada em tipos 1, 2A, 2B, 2M, 2N e 3, dependendo da atividade e da quantidade do Fator de von Willebrand na circulação. Muitas pessoas que têm doença de von Willebrand não sabem o tipo da doença que possuem. Este projeto de pesquisa tem como objetivo definir o tipo de doença de von Willebrand dos pacientes atendidos no HEMORIO. O diagnóstico será feito através do sequenciamento de partes do seu DNA que ficam no gene do Fator de von Willebrand.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames laboratoriais. Este material será enviado ao Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas (Minas Gerais) e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Ao aceitar participar deste projeto, você também autoriza a consulta de seu prontuário médico pela equipe de pesquisadores. Os pesquisadores consultarão seus registros (prontuários) para conhecer e analisar dados como (I) Gênero, (II) Uso de hormônio, (III) Data de nascimento, (IV) História familiar, (V) Grupo sanguíneo ABO e Rh, (VI) Tipo presumível de DVW antes da análise do projeto, (VII) Se já fez dose-teste para uso de DDAVP, (VIII) Se já fez uso terapêutico de DDAVP, (IX) Se teve resposta objetiva ao DDAVP, (X) Resultado de exames basais, após uma e quatro horas da aplicação endovenosa de DDAVP, (XI) Resultado da contagem de plaquetas e última sorologia viral nos últimos 24 meses, (XII) Resultado do teste RIPA 1,2 e 0,6 e (XIII) Qual(is) modalidades terapêuticas foram utilizadas nas últimas 5 intercorrências clínicas hemorrágicas, pré-operatório e/ou preparo para o parto nos últimos cinco anos. Os resultados dos testes genéticos realizados serão repassados a você pelo médico do estudo e anexados ao seu prontuário. Os riscos e desconfortos deste estudo incluem o desconforto de coletar o sangue (dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da punção) e quebra de confidencialidade. Para minimizar esses riscos, apenas profissional técnico treinado fará a coleta de sua amostra. Além disso, apenas pesquisadores autorizados e treinados terão acesso ao seu prontuário. É importante salientar que o resultado do sequenciamento pode não detectar a mutação existente no gene do Fator de von Willebrand, pois nem toda a extensão do gene será analisada. Serão analisadas somente as regiões chamadas de exon 17, exon 18, exon 19, exon 20 e exon 28 do gene do Fator de von Willebrand. No caso de não encontrarmos mutações nessas regiões, você ficará sabendo sobre isso através do médico do estudo.

Você não será identificado quando o sangue coletado ou os registros médicos forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza a leitura e acompanhamento dos seus prontuários médicos. Na divulgação dos resultados, seu nome não será mostrado, garantindo a você sigilo e privacidade. Você terá garantia de ressarcimento de suas despesas (transporte, alimentação, etc.) caso compareça ao centro de tratamento para fins exclusivos da pesquisa e solicite esse benefício. Você tem garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Este Termo de Consentimento deverá ser rubricado na primeira folha e assinado na segunda folha pelo participante e pelo pesquisador responsável pelo projeto. Este Termo de Consentimento será elaborado em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra do participante.

## Declaração de consentimento

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar como sujeito da pesquisa deste projeto.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador – Marília Renni

Contato com o pesquisador: mrenni25@gmail.com (Marília Renni)

Contato Comitê de Ética em Pesquisa: (21) 2505-2415 – cep@hemorio.rj.gov.br

## TA - TERMO DE ASSENTIMENTO PARA PESQUISA CIENTÍFICA

### (PARTICIPANTES MAIORES DE 7 ANOS E MENORES DE 12 ANOS)

Projeto: *Desenvolvimento e implantação de testes para diagnóstico e acompanhamento especializado de pacientes com doença de von Willebrand.*

Estamos convidando você para participar de uma pesquisa. Você não é obrigado a participar. Seus pais já estão sabendo que você foi convidado a participar. Você pode escolher não fazer parte ou desistir do estudo em qualquer momento, sem perder qualquer benefício a que você tem direito em seu centro de tratamento.

Você foi diagnosticado com doença de von Willebrand e vem sendo acompanhado pelos médicos. Existem seis tipos e subtipos da doença de von Willebrand, mas muitas pessoas que têm doença de von Willebrand não sabem o tipo da doença que possuem. Nós queremos fazer um teste de laboratório para definir o tipo de doença de von Willebrand que o paciente tem.

Se você concordar em participar deste estudo, você será solicitado a fornecer um pouco de sangue (5mL) para exames. O seu sangue será separado e guardado no Hemocentro de Belo Horizonte, em Minas Gerais, e será usado apenas para esta pesquisa. Precisamos também de ter algumas informações sobre a sua saúde e a sua doença de von Willebrand e por isso precisamos olhar o seu prontuário médico. O pesquisador vai fazer também algumas perguntas pra você. Você não é obrigado a responder o que você não quer.

Os resultados dos testes realizados serão dados a você e aos seus pais pelo médico. Se aceitar participar deste estudo, você pode sentir a dor da picada de uma agulha e uma pequena chance de cor roxa no local da retirada do seu sangue. Além disso, há o risco de divulgação dos seus dados pessoais para outras pessoas sem a vontade dos pesquisadores. Para diminuir esse risco, apenas pessoas treinadas farão a coleta de sua amostra e somente pesquisadores autorizados e treinados terão acesso ao seu prontuário e aos seus dados.

Este Termo de Assentimento deverá ser rubricado na primeira folha e assinado na segunda folha por você e pelo pesquisador responsável pelo projeto. Este Termo de Assentimento foi elaborado em duas vias, sendo uma do pesquisador e outra do participante.

#### Declaração de assentimento

Declaro que fui informado sobre os métodos e meios de coleta de material a ser utilizado, as inconveniências, riscos que podem vir a ocorrer em consequência da pesquisa. Dou meu assentimento de livre e espontânea vontade para participar deste projeto.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Na parte de trás desse documento você pode encontrar os telefones e e-mails dos pesquisadores e dos Comitês de Ética em Pesquisa.

Contato com o pesquisador: (31) 3768 4587 - daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br (Daniel G. Chaves)  
(16) 2101 9300 - lucooliveira@yahoo.com.br (Luciana Correa O. de Oliveira)  
(27) 3636 7920 - aprezoti@yahoo.com (Alessandra Nunes Loureiro Prezotti)

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: (31) 3768-4585 - cep@hemominas.mg.gov.br

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP: (16) 3602-2228 - cep@hcrp.usp.br

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Espírito Santo: (27) 3335-7326 - cepucam@gmail.com

# ANEXO E

## Caracterização molecular da doença de von Willebrand tipo 2 Formulário de dados

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Sexo:  Masculino  Feminino

Data de Nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Data da coleta dos dados: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Diagnóstico (Tipo e Subtipo): \_\_\_\_\_

### Questionário

1. O paciente faz o uso de algum medicamento não relacionado ao tratamento da doença de von Willebrand?

Sim

Não

1.1 se sim, qual(is)? Há quanto tempo?

---



---

2. O paciente possui outra(s) doença(s)?  Sim  Não

2.1 Se sim, qual (is)?

---



---

3. Existe consanguinidade na família?  Sim  Não

3.1 Entre quais familiares?  Pais  Avós paternos  Avós maternos

4. Existe algum outro membro da família diagnosticado com DvW?  Sim  Não



4.1 Se sim, por favor, liste os nomes completos e parentesco com o paciente dos membros diagnosticados:

---

---

---

---

5. O paciente realizou teste com DDAVP?  Sim  Não

5.1 Caso a resposta do item 5 tenha sido SIM, houve resposta ao DDAVP?

*Obs: considera-se resposta ao DDAVP se houve aumento dos níveis de FVIII:C e FVW:Rco de 2 a 5 vezes em relação aos níveis basais, entre 1-2 horas após a infusão DDAVP.*

Sim  Não

5.2 Qual foi a via de aplicação do DDAVP no teste?  Subcutânea  Intravenosa

6. Qual o grupo sanguíneo do paciente  A  B  AB  O

6.1 E o Rh:  Positivo  Negativo

Favor preencher a tabela com as três últimas dosagens com especificação de data (dia/mês/ano).

(Na opção TE, se o exame realizado não constar nas opções, favor descrevê-lo no campo TE).

	TE*	Data	Resultado	TE	Data	Resultado	TE	Data	Resultado
FVIII:C <sup>A</sup> :									
Fibrogênio <sup>B</sup>									
Antígeno FvW <sup>C</sup>									
Cofator de ristocetina <sup>D</sup>									
Contagem de plaquetas <sup>E</sup>									
Tempo de sangria <sup>F</sup>									
RIPA a 0,6 nmol/l									
RIPA a 0,75 nmol/l									
RIPA a 1,2 nmol/l									
RIPA a 1,5 nmol/l									
TTPA									

\*Tipo de exame

A. FVIII:C = 1. Coagulometria / 2. Cromogênico

B. Fibrogênio = 1. Coagulometria

C. FvW: Ag = 1. ELISA / 2. RIA

D. FvW:Rco = 1. ELISA

E. Contagem de plaquetas = 1. Automatizado / 2. Manual

F. Tempo de sangria = 1. Duke / 2. Ivy

## Caracterização molecular da doença de von Willebrand tipo 2

Formulário de escore de sangramento ISTH. Traduzido de *Supplementary material to the official communication of the SSC* (Julho, 2011)

Nome completo: \_\_\_\_\_

Nº prontuário: \_\_\_\_\_

Hemocentro: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_

### 1. Epistaxe

1.1 Você já teve epistaxe espontânea?

- Sim  Não ou trivial (ir para 2)

1.2 Já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim  Não (resolveu espontaneamente; ir para 1.6)

1.3 Se a resposta de item 1.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta  
 Cauterização  
 Curativo  
 Antifibrinolítico  
 Terapia com ferro  
 Terapia com desmopressina  
 Tratamento com plasma  
 Tratamento com concentrado de plaquetas  
 Tratamento com concentrados de fator  
 Transfusão do concentrado de hemácias

1.4 Quantas vezes em sua vida, você recebeu qualquer um dos tratamentos acima (# 1.3)?

- 1 – 2  
 3 a 5  
 6 a 10  
 Mais que 10

1.5 Com que idade você teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano  
 Entre 1 a 5 anos  
 Entre 6 a 12 anos  
 Entre 13 a 25 anos  
 Depois dos 25 anos

**1.6** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano
- 1 por ano
- 2-5 todo ano
- 1-3 todo mês
- 1 toda semana

**1.7** Duração em média de um episódio, que não necessitou de atendimento médico

- 1 minuto ou menos
- 1 -10 minutos
- Mais que 10 minutos

## 2. Hemorragias cutâneas (Contusões, equimoses, púrpura, hematomas subcutâneos)

**2.1** Você já teve alguma das hemorragias cutâneas acima?

- Sim  Não ou trivial (ir para 3)

**2.2** Já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim  Não (ir para 2.6)

**2.3** Se a resposta do item 2.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrados de fator
- Transfusão de concentrado de hemácias

**2.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (# 2.3)?

- 1 – 2
- 3 a 5
- 6 a 10
- Mais que 10

**2.5** Com que idade você teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano
- Entre 1 a 5 anos
- Entre 6 a 12 anos
- Entre 13 a 25 anos
- Depois dos 25 anos

**2.6** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano
- 1 por ano
- 1-5 a cada seis meses
- 1-3 por mês
- 1 por semana

**2.7** Tipo de hemorragia

- Petéquia
- Equimoses
- Hematomas

**2.8** Local

- Locais expostos
- Locais não expostos
- Ambos

**2.9** Tamanho

- $\leq 1$  cm
- $> 1$  cm
- Extenso (do tamanho de um palmo ou maior)

**2.10** Quantas lesões  $> 1$  cm, em áreas expostas, nas manifestações mais severas?

- $\leq 5$
- $> 5$

**2.11** Local da petéquia

- Limitado a membros inferiores
- Espalhado

### 3. Sangramento por pequenas feridas (não necessitando de pontos)

**3.1** Você teve algum sangramento prolongado resultante de pequenos ferimentos?

- Sim
- Não ou trivial (ir para 4)

**3.2** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim
- Não (ir para 4)

**3.3** Se a resposta do item 3.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Hematomas cirúrgico
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrados de fator
- Transfusão de concentrado de hemácias

**3.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (#3.3)?

- 1 – 2
- 3 a 5
- 6 a 10
- Mais que 10

**3.5** Com que idade você teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano
- Entre 1 a 5 anos
- Entre 6 a 12 anos
- Entre 13 a 25 anos
- Depois dos 25 anos

**3.6** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano
- 1 por ano
- 2-5 por ano
- 1-3 por mês
- 1 por semana

**3.7** Duração em média de um único episódio

- 1 a 10 minutos
- Mais que 10 minutos

## 4. Hematúria

**4.1** Você já teve hematúria?  Sim  Não (ir para 5)

**4.2** Se a resposta de 4.1 for sim, por favor especifique

Presença de doença urológica associada  Sim (ir para 5)  Não

Especifique:

Litíase

Infecção

Doenças do Rim/Bexiga

**Por favor, responda as seguintes perguntas somente para sintomas espontâneos (resposta 4.1)**

**4.3** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico  Sim  Não (ir para 4.7)

**4.4** Se a resposta do item 4.3 é sim, por favor especifique

Apenas consulta

Cirurgia

Terapia com ferro

Tratamento com desmopressina

Tratamento com plasma

Tratamento com concentrado de plaquetas

Tratamento com concentrados de fator

Transfusão do concentrado de hemácias

**4.5** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (# 4.4)?

1 - 2

3 a 5

6 a 10

Mais que 10

**4.6** Com que idade teve os primeiros sintomas?

Antes de 1 ano

Entre 1 a 5 anos

Entre 6 a 12 anos

Entre 13 a 25 anos

Depois dos 25 anos

**4.7** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano
- 1 por ano
- 1-5 a cada seis meses
- 1-3 a cada mês
- 1 a cada semana

## 5. Hemorragia gastrointestinal (Hematêmese, Melena, Hematoquezia)

**5.1** Alguma vez já teve hemorragia gastrointestinal?

- Sim
- Não (ir para 6)

**5.2** Se a resposta do item 5.1 é sim, por favor especifique

Tipo de hemorragia

- Hematêmese
- Melena
- Hematoquezia

Associado com a presença de doença Gastrointestinal

- Sim
- Não

Especifique:

- Úlcera
- Hipertensão portal
- Angiodisplasia

**Por favor, responda as seguintes perguntas somente para sintomas espontâneos**

**5.3** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim
- Não (ir para 5.7)

**5.4** Se a resposta do item 5.3 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Hematomas cirúrgico
- Antifibrinolíticos
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrados de fator
- Transfusão do concentrado de hemácias



**5.5** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (#5.4)?

- 1 - 2
- 3 a 5
- 6 a 10
- Mais que 10

**5.6** Com que idade teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano
- Entre 1 a 5 anos
- Entre 6 a 12 anos
- Entre 13 a 25 anos
- Depois dos 25 anos

**5.7** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano
- 1 por ano
- 1-5 a cada seis meses
- 1-3 a cada mês
- 1 a cada semana

## 6. Hemorragia na cavidade oral (Erupção dentária, espontânea ou após a escovação/uso do fio dental, sangramento gengival, sangramento após mordida nos lábios ou língua)

**6.1** Você já teve sangramento na cavidade oral?

- Sim
- Não ou trivial (ir para 7)

**6.2** Já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim
- Não (ir para 6.6)

**6.3** Se a resposta do item 6.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Hemostasia cirúrgica (curativo, suturas, cauterização)
- Antifibrinolíticos
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrados de fator
- Transfusão de concentrado de hemácias

**6.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (# 6.3)?

- 1 - 2
- 3 a 5
- 6 a 10
- mais que 10

6.5 Com que idade teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano  
 Entre 1 a 5 anos  
 Entre 6 a 12 anos  
 Entre 13 a 25 anos  
 Depois dos 25 anos

6.6 Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano  
 1 por ano  
 1-5 a cada seis meses  
 1-3 a cada mês  
 1 a cada semana

6.7 Duração em média de um único episódio

- 1 a 10 minutos  
 Mais que 10 minutos

## 7. Sangramento após extração de dente / dentes

7.1 Você já teve sangramento após a extração de dente(s)?

- Sim  Não

7.2 Por favor especifique o número de extrações

- Se não fez extração, ir para 8

**Por favor, preencha um dos seguintes formulários para cada extração dentária**

Idade quando extraiu

Tipo de extração

- Decíduo  
 Permanente  
 Molar

Medidas tomadas para prevenir o sangramento

- Nenhuma  
 Antifibrinolíticos  
 Desmopressina  
 Plasma ou concentrado de fatores da coagulação  
 Infusão de plaquetas

Sangramento após a extração?

- Sim  Não

Medidas tomadas para controlar o sangramento

- Nenhuma
- Ressutura
- Curativo
- Antifibrinolíticos
- Desmopressina
- Plasma ou concentrado de fatores da coagulação
- Transfusão do concentrado de hemácias
- Infusão de plaquetas

## 8. Sangramento após cirurgia ou trauma maior

8.1 Já teve algum sangramento após uma cirurgia ou trauma maior?

- Sim  Não

8.2 Por favor especifique o número de cirurgias / trauma maior

Se não fez cirurgia, ir para 9

**Por favor, preencha um dos seguintes formulários para cada episódio grave de cirurgia ou trauma**

Idade da Intervenção/Trauma

Tipo de cirurgia

- Maior abdominal
- Maior torácica
- Ginecológica
- Outras
- Amigdalectomia/Adenoides
- Faringe / Nariz

Medidas tomadas para prevenir o sangramento

- Nenhuma
- Antifibrinolíticos
- Desmopressina
- Plasma ou concentrado de fatores da coagulação
- Infusão de plaquetas

Sangramento após a intervenção?

- Sim  Não

Medidas tomadas para controlar o sangramento

- Nenhuma
- Hemostasia cirúrgica
- Antifibrinolíticos
- Desmopressina
- Plasma ou concentrado de fatores da coagulação
- Infusão de plaquetas
- Transfusão de concentrado de hemácias

## 9. Menorragia

**9.1** Você já teve menstruação intensa e prolongada (menorragia)?

- Sim       Não ou trivial (ir para 10)

Se a resposta de 9.1 é sim, por favor especifique

- Absorvente trocado com frequência maior do que a cada 2 horas
- Menstruação com duração maior que 7 dias
- Coágulos ou extravasamentos

Comprometimento das atividades diárias (trabalho, trabalhos domésticos, exercícios, atividades sociais)

- Nunca ou raramente
- Na maioria das menstruações

**9.2** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim       Não (ir para 9.6)

**9.3** Se a resposta do item 9.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Avaliação das imagens do PBAC \_\_\_\_\_
- Terapia com Antifibrinolíticos
- Terapia com ferro
- Terapia hormonal
- Antifibrinolíticos combinados com terapia hormonal
- Histerectomia / Ablação endometrial
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrado de fatores
- Transfusão de concentrado de hemácias
- Internação e tratamento de emergência

**9.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (# 9.3)?

- 1 - 2  
 3 a 5  
 6 a 10  
 Mais que 10

**9.5** Com que idade teve os primeiros sintomas?

- Na menarca  
 Entre 14 -25 anos  
 Após os 25 anos

**9.6** Você já teve que se ausentar do trabalho/escola por causa da menorragia?

- Menos que duas vezes por ano  
 Mais que duas vezes por ano

**9.7** Duração da menorragia

- Desde a menarca  
 Mais que 12 meses  
 Menos que 12 meses

**9.8** Você já teve menorragia aguda que necessitou de tratamento de emergência/internação

- Sim       Não

Quantas vezes: \_\_\_\_\_

## 10. Hemorragia pós-parto

**10.1** Quantas gestações bem sucedidas (nascidos vivos)

**10.2** Você já teve hemorragia pós-parto

- Sim    Não ou trivial (ir para 11)

**10.3** Ocorrência

- Nas primeiras 24 horas após o parto (primário)  
 Entre 24 horas e 6 meses pós-parto (secundário)  
 Ambos primário e secundária

**10.4** Quanto tempo durou o corrimento vaginal (lóquio)?

- Menos que 6 semanas  
 Mais que 6 semanas

**10.5** Troca de absorvente com frequência maior que a cada 2 horas?

Sim  Não

**10.6** Sangramento causou atraso na alta hospitalar/reinternação?

Sim  Não

**10.7** Você já teve sintomas que necessitou de tratamento médico?

Sim  Não

**10.8** Se a resposta do item 10.7 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta / infusão ocitocina intravenosa
- Medicamentos uterotônicos adicionais
- Terapia com ferro
- Terapia com antifibrinolíticos
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrado de fatores
- Transfusão de concentrado de hemácias
- Qualquer procedimento que exigiu exame sob anestesia
- Balão/Tamponamento uterino
- Qualquer procedimento que necessitou de cuidados intensivos ou intervenção cirúrgica (inclui: histerectomia, ligação artéria ilíaca interna, embolização das artérias uterinas, suturas intrauterina)

**10.9** Número de partos que exigiam qualquer um dos tratamentos acima (# 10.8)?

## 11. Hematomas musculares (espontâneos)

**11.1** Você já teve hematomas musculares ou hemartroses?

Sim  Não ou trivial (ir para 12)

Se sim, foi espontâneo ou trauma?

Sim, espontâneo  Não, relacionado a trauma

**11.2** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim  Não (ir para 11.6)

**11.3** Se a resposta do item 11.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta  
 Tratamento com desmopressina  
 Drenagem Cirúrgica  
 Tratamento com plasma  
 Tratamento com concentrado de plaquetas  
 Tratamento com concentrados de fator  
 Transfusão de concentrado de hemácias

**11.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (11.3)?

- 1 - 2  
 3 a 5  
 6 a 10  
 Mais que 10

**11.5** Com que idade teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano  
 Entre 1 a 5 anos  
 Entre 6 a 12 anos  
 Entre 13 a 25 anos  
 Depois dos 25 anos

**11.6** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano  
 1 por ano  
 1-5 a cada seis meses  
 1-3 a cada mês  
 1 a cada semana

## 12. Hemartroses

**12.1** Você já teve hematomas musculares ou hemartroses?

- Sim  Não ou trivial (ir para 12)

Se sim, foi espontâneo ou trauma?

- Sim, espontâneo  Não, relacionado a trauma

**12.2** Você já teve sintomas que necessitou de atendimento médico?

- Sim  Não (ir para 11.6)

**12.3** Se a resposta do item 12.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta  
 Tratamento com desmopressina  
 Drenagem Cirúrgica  
 Tratamento com plasma  
 Tratamento com concentrado de plaquetas  
 Tratamento com concentrados de fator  
 Transfusão de concentrado de hemácias

**12.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (12.3)?

- 1 - 2  
 3 a 5  
 6 a 10  
 Mais que 10

**12.5** Com que idade teve os primeiros sintomas?

- Antes de 1 ano  
 Entre 1 a 5 anos  
 Entre 6 a 12 anos  
 Entre 13 a 25 anos  
 Depois dos 25 anos

**12.6** Número, aproximado, de episódios que não necessitou de atendimento médico

- Menos que 1 por ano  
 1 por ano  
 1-5 a cada seis meses  
 1-3 a cada mês  
 1 a cada semana

## 13. Hemorragia do SNC

**13.1** Você já teve sangramento craniano ou na coluna vertebral?

- Sim  Não ou trivial (ir para 14)

Se sim, foi espontâneo ou trauma?

- Sim, espontâneo  Não, relacionado a trauma



**13.2** Se a resposta do item 13.1 é sim, por favor especifique

Tipo de Sangramento

- Subdural  
 Intracerebral  
 Subaracnóide

Diagnóstico por

- Tomografia computadorizada  
 Ressonância nuclear magnética  
 Angiografia

**13.3** Tipo de tratamento

- Consulta  
 Drenagem Cirúrgica  
 Tratamento com plasma, plaquetas ou concentrado de fatores

**13.4** Com que idade você teve sangramento no SNC?

- Antes de 1 ano  
 Entre 1 a 5 anos  
 Entre 6 a 12 anos  
 Entre 13 a 25 anos  
 Depois dos 25 anos

## 14. Outros tipos de sangramentos

**14.1** Alguma vez já teve algum tipo de sangramento descrito abaixo?

- |   |                              |                              |
|---|------------------------------|------------------------------|
| Sangramento excessivo do coto umbilical | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Cefalohematoma                          | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Sangramento na circuncisão              | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Sangramento após punção venosa          | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Sangramento devido à sucção             | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| Sangramento de ovulação (em mulheres)   | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |

**14.2** Algum dos sintomas acima necessitou de atendimento médico?

- Sim  Não

**14.3** Se a resposta do item 14.2 é sim, por favor especifique

- Apenas consulta
- Antifibrinolíticos
- Cirurgia
- Tratamento com desmopressina
- Tratamento com plasma
- Tratamento com concentrado de plaquetas
- Tratamento com concentrados de fator
- Transfusão de concentrado de hemácias

**14.4** Quantas vezes na sua vida recebeu algum dos tratamentos acima (14.3)?

- 1 - 2
- 3 a 5
- 6 a 10
- Mais que 10

Tabela 1. Escore de sangramento

Sintomas (até o momento do diagnóstico)	Score				
	0 <sup>s</sup>	1 <sup>s</sup>	2	3	4
Epistaxe	Não/Trivial	- >5/anos ou - mais que 10 minutos	Apenas consulta*	Vedação ou cauterização ou antifibrinolíticos	Transfusão de sangue ou terapia de reposição (uso de componentes sanguíneos e hemostático rFVIIa) ou desmopressina
Cutâneos	Não/Trivial	Para 5 ou mais contusões (> 1 cm) em áreas expostas	Apenas consulta*	Extenso	Hematomas espontâneos que necessitou de transfusão sanguínea
Sangramento de pequenas feridas	Não/Trivial	Presente	Apenas Consulta*	Hemostasia cirúrgica ou Antifibrinolíticos	Transfusão sanguínea, terapia de reposição ou desmopressina
Cavidade Oral	Não/Trivial	Presente	Apenas Consulta*	Hemostasia cirúrgica ou antifibrinolíticos	Transfusão sanguínea, terapia de reparo ou desmopressina
Hemorragia gastrointestinal	Não/Trivial	Presente (não associado com úlceras, hipertensão portal, hemorroidas, angiodisplasia)	Apenas Consulta*	Hemostasia cirúrgica, antifibrinolíticos	Transfusão sanguínea, terapia de reparo ou desmopressina
Hematúria	Não/Trivial	Presente (macroscópico)	Apenas Consulta*	Hemostasia cirúrgica, terapia com ferro	Transfusão sanguínea, terapia de reparo ou desmopressina
Extração dentária	Não/Trivial ou sem efeito	Relatada em =<25% de todos os procedimentos , nenhuma intervenção **	Relatada em >25% de todos os procedimentos , nenhuma intervenção **	Ressutura ou vedação	Transfusão sanguínea, terapia de reparo ou desmopressina
Cirurgia	Não/Trivial ou sem efeito	Relatada em =<25% de todos os procedimentos, nenhuma intervenção **	Relatada em >25% de todos os procedimentos , nenhuma intervenção **	Hemostasia cirúrgica ou antifibrinolíticos	Transfusão sanguínea, terapia de reparo ou desmopressina

<b>Menorragia</b>	Não/Trivial	Apenas consulta* ou - Troca de absorvente com frequência maior que a cada 2 horas ou coágulos e extravasamentos ou PBAC <sup>S</sup>	- Dispensa do trabalho/escola > 2/ano ou necessitou antifibrinolíticos ou	- Exigiu o tratamento de Antifibrinolíticos combinado com terapia hormonal - Presente desde a	- Menorragias agudas que necessitou de internação hospitalar e tratamento de emergência ou - Necessitou de transfusão de sangue , terapia de substituição, desmopressina ou
		pontuação >100 <sup>#</sup>	Terapia hormonal ou de ferro	menarca e > 12 meses	- Necessitou de dilatação e curetagem ou ablação endometrial ou hysterectomia
<b>Hemorragia pós-parto</b>	Não / trivial ou ausência de parto	Apenas Consulta* - Utilização de oxitocina ou - Lóquios > 6 semanas	- Terapia com ferro ou - Antifibrinolíticos	- Necessitou de transfusão de sangue, terapia de reposição ou desmopressina - necessitou de exame sob anestesia e/ou o uso de balão uterino/Compressa para tamponar o uterino	Qualquer procedimento que necessitou de cuidados intensivos ou intervenção cirúrgica (por exemplo, hysterectomia, ligação da artéria ilíaca interna, embolização das artérias uterinas, sutura uterina)
<b>Hematomas Musculares</b>	Nunca	Pós trauma, sem terapia	Espontâneos, sem terapia	Espontâneo ou traumático, necessitou de desmopressina ou Terapia de substituição	Espontâneo ou traumático, Necessitou de intervenção cirúrgica ou Transfusão sanguínea
<b>Hemartroses</b>	Nunca	Pós trauma, sem terapia	Espontâneas, sem terapia	Espontâneo ou traumático, necessitou de desmopressina ou Terapia de substituição	Espontâneo ou traumático, Necessitou de intervenção cirúrgica ou Transfusão sanguínea
<b>Sangramento no SNC</b>	Nunca	-	-	Subdural, qualquer intervenção	Intercerebral, qualquer intervenção
<b>Outros sangramentos</b>	Não/Trivial	Presente	Apenas Consulta*	Hemostasia cirúrgica, antifibrinolíticos	Transfusão sanguínea ou terapia de substituição ou desmopressina

<sup>S</sup> Sigla do inglês – Pictorial Blood Assessment Chart

Além da orientação oferecida pela tabela, é obrigatório conferir o texto para informações mais detalhadas.

<sup>§</sup> Distinção entre 0 e 1 é de fundamental importância . Pontuação 1 significa que o sintoma é julgado como presente na história do paciente pelo entrevistador, mas não se qualifica para uma pontuação 2 ou mais.

\* Única consulta: o paciente procurou avaliação médica e foi ou encaminhado para um especialista ou oferecido para investigação laboratorial detalhada.

\*\* Exemplo: uma extração/cirurgia, resultando em sangramento (100%): a pontuação a ser atribuída é 2; 2 extrações/cirurgias, 1, resultando em sangramento (50%): a pontuação a ser atribuída é 2; 3 extrações/cirurgias, 1, resultando em sangramento (33%): a pontuação a ser atribuída é 2; 4 extrações/cirurgias, 1, resultando em sangramento (25%): a pontuação a ser atribuída é de 1.

# Se já está disponível no momento da coleta.

^ Incluem: sangramento no coto umbilical, cefalohematoma, hematoma bochecha causado por sucção durante peito/uso de mamadeira, hemorragia conjuntival ou sangramento excessivo após a circuncisão ou punção venosa . A presença na infância requer investigação detalhada independentemente do escore geral.