

Trabalho de Projecto

Mestrado Integrado em Medicina

**ACTIVIDADE DE ADAMTS13 E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI-ADAMTS13 NO SÍNDROME ANTÍ-FOSFOLÍPIDO**

Duarte Nuno Cunha Rego

Orientador: Dr. Manuel César Araújo Campos

Co-Orientador: Dra. Sara Maria Simões Morais

Porto 2010

ÍNDICE:

TÍTULO	1
INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS	1
UNIDADES DE INVESTIGAÇÃO	1
EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO	1
Constituição	1
Aluno	1
Orientadores	1
Supervisores	1
Outros investigadores	2
Funções e responsabilidades	2
Tempo afecto ao projecto	2
RESUMO	2
DESENHO DO ESTUDO.....	3
CALENDARIZAÇÃO.....	3
Duração	3
Datas de início e conclusão	3
Cronograma de execução.....	3
A. PLANO CIENTÍFICO.....	5
1. Introdução e estado da arte	5
2. Problemas.....	6
3. Hipótese de trabalho	7
4. Objectivos	7
5. Implicações	7
6. Enquadramento, motivações e condições de execução	7
7. Desenho do estudo e metodologia	8
7.1. Tipo de estudo.....	8
7.2. Participantes e elegibilidade	8
7.2. Selecção dos participantes.....	8
7.3. Material e métodos	9
7.5. Tarefas	9
7.6. Recolha de dados.....	10

7.7. Tratamento de dados e análise estatística.....	11
8. Resultados esperados	11
9. Indicadores de produção científica	12
10. Bibliografia	12
B. QUESTÕES ÉTICAS	14
Informação aos doentes participantes no estudo	15
Termo de consentimento informado.....	15
Informação aos dadores participantes no estudo	16
Termo de consentimento informado.....	16
C. PLANO FINANCEIRO	17
1. Orçamento	17
2. Financiamento	17
ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS	18
EXECUÇÃO DO PROJECTO.....	19
Resultados.....	19
Actividade ADAMTS-13.....	19
Anticorpo anti-ADAMTS-13	19
Antigénio ADAMTS-13	20
Discussão	20
ANEXOS	22
Formulário para recolha de dados	22
PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL	23
HSA/CHP	23
PEDIDO DE FINANCIAMENTO	25
Bolsa de iniciação à investigação clínica	25
TERMOS DE RESPONSABILIDADE.....	26
Termo de Responsabilidade do Investigador Principal e Responsável no CHP	26
DECLARAÇÕES DE ALUNOS E ORIENTADORES / SUPERVISORES	27
Aluno.....	27
Orientadores / Supervisores	27
TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL	29
Serviços	29
Departamentos.....	29

TÍTULO

ACTIVIDADE DE ADAMTS13 E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ADAMTS13 NO SÍNDROME ANTI-FOSFOLÍPIDO

INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA) (HSA/CHP)

- Departamento de Medicina, Serviço de Hematologia Clínica

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP)

UNIDADES DE INVESTIGAÇÃO

Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica da Universidade do Porto (UMIB/ICBAS/UP)

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

Constituição

Aluno

- **Duarte Rego:** Aluno do Curso de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP e HSA/CHP, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Orientadores

- **Dr. Manuel Campos:** Médico Especialista de Hematologia Clínica; Chefe de Serviço; Director do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP; Responsável pelas áreas clínica e laboratorial da Trombose e Hemostase; Professor Auxiliar Convidado de Medicina-Hematologia do 5º ano do ICBAS/UP.
- **Dra. Sara Morais:** Médica Especialista de Imunohemoterapia; Assistente Hospitalar Graduada; Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP; Co-responsável pelas áreas clínica e laboratorial da Trombose e Hemostase.

Supervisores

- **Prof. Doutora Margarida Lima:** Médica Especialista em Imunohemoterapia e Investigadora do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP; Professora Convidada do

ICBAS/UP, responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

Outros investigadores

- Técnico(a) do Laboratório de Hematologia – Dra. Mónica Pereira.

Funções e responsabilidades

- A execução do projecto, incluindo a recolha de dados e a sua análise, ficará ao cargo do Aluno.
- Aos Orientadores caberá a função de orientação da execução do projecto e a de supervisão científica.

Tempo afecto ao projecto

- Aluno: 20% durante cerca de 10 meses
- Orientador e Co-orientador: 5% durante 10 meses
- Outros investigadores (técnico de investigação): 10% durante 3 meses
- Total: 1 Pessoa a 20% durante 10 meses (2) + 2 pessoas a 5% durante 10 meses (0.5 + 0.5) + 1 pessoa a 10% durante 3 meses (0,3) = 3,3 pessoas*mês

RESUMO

INTRODUÇÃO: A existência de anticorpos anti-fosfolípido (aFL) é necessária para a ocorrência do Síndrome Anti-fosfolípido (SAF). No entanto, nem todos os doentes com aFL manifestam o SAF, o que implica que outros factores estejam envolvidos na sua patogenia. A existência de semelhanças na patogenia e clínica do SAF e da Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) levanta a hipótese de que a disfunção da ADAMTS-13, comprovadamente associada a PTT, também possa estar envolvida na fisiopatologia do SAF.

OBJECTIVOS: Este estudo tem como objectivos avaliar a existência de uma associação entre a actividade da ADAMTS-13 e a ocorrência de SAF nos doentes com aFL e avaliar a prevalência de anticorpos (Ac) anti-ADAMTS-13 e de actividade reduzida da ADAMTS-13 em doentes com SAF, comparando-as quer com as observadas em doentes com aFL sem SAF,

quer com as observadas em indivíduos normais.

MATERIAL E MÉTODOS: Serão estudados 30 doentes com aFL, com ou sem SAF, e 15 controlos (indivíduos normais). A avaliação da antigenemia da ADAMTS-13, a pesquisa e quantificação do título de Ac anti-ADAMTS-13 e a medição da actividade da ADAMTS-13 serão efectuadas pelo método de ELISA, recorrendo a kits de diagnóstico comercializados.

RESULTADOS ESPERADOS E IMPLICAÇÕES: Espera-se que nos doentes com aFL os níveis médios de função da ADAMTS13 sejam menores do que nos indivíduos saudáveis (controlos) e que o título médio de anticorpo anti-ADAMTS13 seja superior nos primeiros. De igual modo, espera-se que nos doentes com aFL e SAF os níveis médios de função da ADAMTS13 sejam inferiores aos dos doentes com aFL que não desenvolvem SAF e que o título médio de anticorpo anti-ADAMTS13 seja superior nos primeiros. Se a hipótese de trabalho se confirmar, a existência de disfunção da ADAMTS13 poderá ser usada como um indicador de risco de desenvolvimento de SAF em doentes com aFL.

DESENHO DO ESTUDO

Estudo nacional, institucional, observacional, transversal, analítico, clínico e laboratorial, de tipo caso-controlo, feito em seres humanos.

CALENDARIZAÇÃO

Duração

10 meses (Agosto/Setembro a Abril/Maio)

Datas de início e conclusão

Agosto /Setembro de 2009 a Abril/Maio de 2010

Cronograma de execução

Janeiro a Abril de 2009	Elaboração da proposta
Maio 2009	Entrega da proposta – Submissão à aprovação institucional
Junho 2009	Apresentação da proposta nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica
Julho e Agosto de 2009	Preparação para a implementação do projecto Identificação dos potenciais participantes

Setembro a Dezembro de 2009	Apresentação da proposta em reunião do Serviço de Hematologia Clínica Observação dos doentes; recolha dos dados; colheita de amostras de sangue
Janeiro a Março de 2010	Realização das análises
Abril a Maio de 2010	Análise e tratamento estatístico dos dados; interpretação dos resultados
Junho 2010	Apresentação dos resultados nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica

A. PLANO CIENTÍFICO

1. Introdução e estado da arte

O diagnóstico de Síndrome Anti-fosfolípido (SAF) baseia-se, segundo os critérios revistos de Sapporo (Wilson WA *et al*, 1999; Miyakis S *et al*, 2006), em dois componentes major: a presença no soro de, pelo menos, um tipo de anticorpos conhecidos como anticorpos anti-fosfolípido (aFL) e a ocorrência de, pelo menos, uma de entre várias potenciais manifestações clínicas da doença, nomeadamente, trombooses vasculares, quer sejam arteriais, venosas ou microvasculares, ou morbilidade gestacional como três ou mais abortamentos de repetição antes das dez semanas de gestação, um ou mais mortes fetais após as dez semanas de gestação com morfologia fetal normal documentada ou um ou mais partos pré-termo de recém-nascido morfologicamente normal decorrentes de eclâmpsia, pré-eclâmpsia ou insuficiência placentar. Apesar de estas manifestações ocorrerem em diversas doenças, no SAF elas ocorrem, por definição, no contexto de aFL. Os aFL são dirigidos contra proteínas séricas ligadas a fosfolípidos aniónicos e podem ser detectados através de testes para o anticoagulante lúpico, testes de ELISA para determinação de anticorpos anticardiolipina ou anti- β 2 glicoproteína I. O significado clínico de outros auto-anticorpos (como aqueles dirigidos à protrombina, anexina V, fosfatidilserina e fosfatidilinositol) permanece incerto.

O SAF classifica-se em «primário» quando não está associado a outra doença subjacente e de «secundário» se associado a outras doenças autoimunes, maioritariamente o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES). O risco de fenómenos tromboembólicos pode elevar-se com o aumento do título de aFL e do número de tipos de aFL presentes num determinado indivíduo (Neville C *et al*, 2005), contudo, a simples presença destes anticorpos não implica a ocorrência destes fenómenos, sendo até relativamente frequente a presença de aFL em indivíduos saudáveis (Vaarala O *et al*, 1986; Sammaritano LR, 2000). Este facto indica que serão necessários mais factores, que conduzam a um desequilíbrio do balanço hemostático no sentido trombótico, e condicionem o desenvolvimento do síndrome (Mackworth-Young CG, 2000).

O SAF e a TTP possuem características em comum, nomeadamente, patogénese relacionada com a imunidade (especificamente por auto-anticorpos), a trombocitopenia, que é um aspecto essencial na TTP e muito comum no SAF, tendo inclusivamente, durante vários anos, sido um dos critérios de diagnóstico deste; a ocorrência de activação das células endoteliais e plaquetas, muito particularmente na micro-circulação, nas duas condições clínicas resultando num estado pró-trombótico. Além disto, existem descrições do desenvolvimento das

duas doenças no mesmo doente (Amoura Z *et al*, 2004) e é relativamente comum a presença de aFL em doentes com PTT o que indica um possível factor de associação entre as duas doenças.

A patogénese da TTP resulta da actividade diminuída de ADAMTS-13, quer por deficiência de produção (rara) ou, mais comumente, por inibição através de auto-anticorpos IgG e IgM (Furlan M *et al*, 1998; Tsai HM *et al*, 1998). Estas duas etiologias podem ser distinguidas através do cálculo do título de antígeno ADAMTS13 no soro do doente, quando este valor se situa dentro das faixas de referência para a população saudável tal significa que a disfunção da ADAMTS13 resulta de anticorpos dirigidos contra o local catalítico da enzima ADAMTS13.

A ADAMTS13 é uma protease específica para o factor de von Willebrand (FvW) que actua na ligação peptídica Y(842)-M(843) da cadeia A2 (Furlan M *et al*, 1996; Tsai H, 1996). A sua disfunção resulta na acumulação sérica de multímeros de FvW de peso molecular muito grande (>20.000kDa). Estes multímeros interagem mais avidamente com as membranas plaquetárias e matriz subendotelial e o seu excesso pode resultar em agregação plaquetária, na formação de trombos ricos em plaquetas e FvW e consequente trombocitopenia (Moake JL, 1997).

O papel da disfunção da ADAMTS13 na etiopatogenia de condições pró-trombóticas de natureza autoimune além da PTT, não é claro. A actividade da ADAMTS13 pode estar moderadamente diminuída (<25%) em diversas doenças, crónicas ou agudas, sendo que uma actividade gravemente diminuída é bastante específica para CID induzida por sépsis ou PTT primária (Furlan M *et al*, 1998; Tsai HM *et al*, 1998; Ono T *et al*, 2006; Hyun J *et al*, 2009). Existem algumas evidências de que a actividade e os níveis da ADAMTS13 estão envolvidos na fisiopatologia do SAF em doentes com aFL. Tal é sugerido pela associação e semelhanças, já referidas, entre PTT e SAF, mais especificamente, pelos resultados de estudos que apontam para um papel da ADAMTS13 no SAF (Austin SK, 2008). Assim, este poderá ser um dos factores envolvidos no desequilíbrio do balanço hemostático no sentido trombótico, necessário para que ocorra o SAF.

2. Problemas

A fisiopatologia do SAF em doentes com aFL não é ainda bem conhecida.

A presença de aFL no soro é um dos critérios para o diagnóstico de SAF, mas nem todos os doentes com aFL desenvolvem SAF e as manifestações clínicas são heterogéneas, no tipo (tromboses arteriais, venosas e/ou microvasculares ou morbilidade gestacional) e na

gravidade.

3. Hipótese de trabalho

Com base na revisão bibliográfica e na fisiopatologia do SAF formula-se a seguinte hipótese de trabalho: a ADAMTS13 está implicada na fisiopatologia do SAF em doentes com aFL.

4. Objectivos

O objectivo geral deste estudo é avaliar a existência de uma associação entre a actividade da ADAMTS13 e a ocorrência de SAF nos doentes com aFL.

Os objectivos específicos são avaliar a prevalência de anticorpos anti-ADAMTS13 e actividade enzimática reduzida da ADAMTS13 em doentes com SAF comparando-as quer com as observadas em doentes com aFL sem SAF, quer com as observadas em indivíduos normais.

5. Implicações

Se a hipótese de trabalho se confirmar, a existência de disfunção da ADAMTS13 poderá ser usada como um indicador de risco de desenvolvimento de SAF em doentes com SAF.

6. Enquadramento, motivações e condições de execução

Os Orientadores integram a UMIB/UP uma Unidade de Investigação reconhecida pela FCT.

Têm larga experiência no estudo das alterações primárias e secundárias da hemostase, nomeadamente do SAF. Esta experiência resulta do contacto com doentes com estas patologias quer em regime de internamento ou urgência hospitalar quer durante o seguimento de doentes na consulta de Trombose e Hemostase. Além disto, o Serviço de Hematologia Clínica e os orientadores deste estudo estão frequentemente envolvidos em projectos de investigação e ensaios clínicos tendo publicados diversos artigos.

O aluno sente-se motivado para este projecto pelas seguintes razões: é a sua primeira experiência na área da investigação clínica e trata-se de um estudo que é desenvolvido numa área (trombose e hemostase) que o agrada pela interacção dinâmica entre o raciocínio clínico e colocação de hipóteses de investigação e a compreensão e integração dos fenómenos fisiopatológicos subjacentes. Além disso, é sua convicção que os resultados que sejam obtidos poderão mais tarde ser clinicamente úteis, resultando daí benefício para os doentes.

7. Desenho do estudo e metodologia

7.1. Tipo de estudo

Estudo nacional, institucional, observacional, transversal, analítico, clínico e laboratorial, de tipo caso-controlo, feito em seres humanos.

7.2. Participantes e elegibilidade

Doentes

Serão estudados doentes com aFL que frequentem a Consulta de Trombose e Hemostase do SHC/CH, ou que se apresentem no serviço de Urgência e que cumpram os critérios de diagnóstico revistos de Sapporo para SAF ou que apenas apresentem aFL. A selecção da amostra será feita por conveniência. Pretendemos estudar 30 doentes com aFL, dos quais pelo menos 15 com SAF.

Em princípio, a participação no estudo será efectuada por altura das consultas programadas. Se houver necessidade de deslocações extra ao hospital, serão pagas as despesas de deslocação.

Controlos

Os controlos (n=15) serão indivíduos saudáveis (dadores benévolos de sangue recrutados da Consulta de Dadores de Sangue do HSA), cuja idade média e proporção de sexos sejam semelhantes às da amostra de doentes estudada.

A participação no estudo será efectuada por altura da dádiva de sangue.

7.2. Selecção dos participantes

Doentes

Crítérios de inclusão: Ser doente da Consulta de Trombose e Hemostase do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP ou recorrer ao Serviço de Urgência do HSA/CHP; ter aFL, com ou sem critérios para diagnóstico de SAF; concordar em participar no estudo.

Crítérios de exclusão: Serão excluídos os doentes que apresentem outros distúrbios da hemostase que não seja o SAF ou com doença neoplásica.

Controlos

Crítérios de inclusão: Ser dador de sangue do HSA/CHP; concordar em participar no

estudo.

CrITÉRIOS de exclusão: Primeiras dádivas; história de distúrbios da hemostase.

7.3. Material e métodos

Colheitas de sangue

Doentes – As colheitas serão efectuadas pelas Enfermeiras do Serviço de Hematologia Clínica.

Controlos – Dadores de sangue. As colheitas serão efectuadas antes da dádiva, pelas Enfermeiras de serviço na Sala de Colheitas de Dadores.

Amostras de sangue

Serão colhidas duas amostras de sangue em tubos com citrato trissódico (2 tubos com 4,5 ml de sangue cada).

Análises a efectuar

Serão efectuadas as seguintes análises:

a) Quantificação do antigénio ADAMTS13: Os níveis de antigénio ADAMTS-13 no plasma serão medidos recorrendo a um kit de teste (IMUBIND® ADAMTS13 ELISA, American Diagnostica inc., Pfungstadt, Alemanha), utilizando o método de ELISA (Feys *et al*, 2006).

b) Estudo da actividade da ADAMTS13: Será avaliada a actividade enzimática da ADAMS-13 no plasma por método de ELISA, usando um kit de testes (DG-ADAMTS-13 Activity®, Grifols S.A., Barcelona, Espanha).

c) Pesquisa de anticorpos anti-ADAMTS13: Será avaliada a presença de anticorpos anti-ADAMS-13 no plasma por método de ELISA, com determinação do título, com recurso a um kit de diagnóstico (IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA, American Diagnostica inc., Pfungstadt, Alemanha).

7.5. Tarefas

Fase pré-projecto

- Revisão da literatura e redacção da proposta :
- Duarte Rego, sob supervisão da Dra. Sara Morais e do Dr. Manuel Campos

- Janeiro – Maio 2009
- Submissão da proposta à aprovação e apresentação:
- Duarte Rego
- Maio e Junho 2009
- Identificação dos potenciais participantes:
- Dra. Sara Morais
- Julho e Agosto 2009

Fase projecto

- Convocação dos doentes / colheita das amostras / recolha de dados clínicos:
- Convocação dos doentes: Dra. Sara Morais
- Recolha de dados: Duarte Rego, sob supervisão da Dra. Sara Morais
- Colheita das amostras: Técnico do Serviço de Hematologia Clínica (a designar)
- Setembro – Dezembro 2009
- Realização das análises:
- Técnico do Serviço de Hematologia Clínica: Dra. Mónica Pereira
- Janeiro – Março 2009
- Análise dos dados, interpretação dos resultados, discussão e conclusões:
- Duarte Rego, Dra. Sara Morais, Dr. Manuel Campos
- Abril - Maio 2010

7.6. Recolha de dados

Variáveis principais

Dados demográficos (sexo e idade)

Critérios de diagnóstico da doença

Anticorpos anti-ADAMTS13

Actividade ADAMTS13

Antigénio ADAMTS13

7.7. Tratamento de dados e análise estatística

Estatística descritiva

Para a caracterização da amostra, serão analisadas variáveis numéricas (idade, dados analíticos, etc.) e categóricas (sexo, etc.)

A descrição será feita na forma de proporções de sexos, média/mediana das idades (consoante a distribuição seja simétrica ou assimétrica, respectivamente) e outros. Para efeitos descritivos da amostra no contexto específico desta doença será indicada se o doente preenche ou não os critérios de diagnóstico de SAF, tratando-se assim de uma variável categórica. Para caracterização da amostra em relação à ADAMTS13 serão analisadas três variáveis categóricas, anticorpo anti-ADAMTS13 (presente/ausente), actividade ADAMTS13 (normal/reduzida) e antigenemia ADAMTS13 (normal/reduzida), e duas variáveis numéricas, média/mediana de título de anticorpo anti-ADAMTS13 e média/mediana da actividade de ADAMTS13.

Estatística inferencial

A análise estatística será feita em software estatístico SPSS (*Statistical Program for the Social Sciences*), versão 15.0.

Os dados clínicos e laboratoriais serão analisados e comparados entre grupos através de teste não paramétrico (Teste Mann-Whitney) para variáveis categorias e medianas e teste paramétrico (Teste t-Student) para médias (se aplicável).

8. Resultados esperados

Espera-se que:

a) Nos doentes com aFL os níveis médios de função da ADAMTS13 sejam menores do que nos indivíduos saudáveis (controlos) e que o título médio de anticorpo anti-ADAMTS13 seja superior nos primeiros;

b) Nos doentes com aFL e SAF os níveis médios de função da ADAMTS13 sejam inferiores aos dos doentes com aFL que não desenvolvem SAF e que o título médio de anticorpo anti-ADAMTS13 seja superior nos primeiros.

9. Indicadores de produção científica

A proposta de projecto de investigação será apresentada nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica em Junho de 2009 e em reunião do Serviço de Hematologia Clínica.

A divulgação dos resultados será efectuada através de apresentação de poster ou comunicação oral no Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica em Junho de 2010, a organizar no HSA/CHP, pelos alunos da DIIC.

Está também prevista a apresentação dos resultados em congresso da especialidade.

10. Bibliografia

1. Amoura Z, Costedoat-Chalumeau N, Veyradier A, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS-13 deficiency in two patients with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50:3260–3264.
2. Austin SK, Starke RD, Lawrie AS, Cohen H, Machin SJ, Mackie IJ. The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome: ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction. *Br J Haematol*. 2008;141(4):536-44.
3. Feys HB, Liu F, Dong N, Pareyn I, Vauterin S, Vandeputte N, et al. ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. *J Thromb Haemost* 2006;4:955-62.
4. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998;339:1578–84.
5. Furlan M, Robles R, Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-4234.
6. Hyun J, Kim HK, Kim JE, Lim MG, Jung JS, Park S, Cho HI. Correlation between plasma activity of ADAMTS-13 and coagulopathy, and prognosis in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 2009;124(1):75-9.
7. Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol* 2004;136:393–401.
8. Miyakis S, Lockshin, MD, Atsumi, T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295.

9. Moake JL. Studies on the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 1997;43:83-89.
10. Neville, C, Rauch, J, Kassis, J, et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003;90:108.
11. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with the development of renal failure. *Blood* 2006;107:528-534.
12. Sammaritano LR, Khamashta MA. Drug-induced antiphospholipid antibodies. *Hughes Syndrome: Antiphospholipid Syndrome* 2000;1:144-154.
13. Starke R, Machin S, Scully M, Purdy G, Mackie I. The clinical utility of ADAMTS13 activity, antigen and autoantibody assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007;136:649-55.
14. Tsai H. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996;87:4235-4244.
15. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998;339:1585–94.
16. Vaarala O, Kleemola M, Palosuo T, et al. Anticardiolipin in response to acute infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;41:8–15.
17. Vesely SK, George JN, Lammle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake MA, et al. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood* 2003;102:60-8.
18. Wilson, WA, Gharavi, AE, Koike, T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309.
19. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:4043-9.

B. QUESTÕES ÉTICAS

Os participantes serão informados (médicos do Sector de Trombose e Hemostase do Serviço de Hematologia Clínica ou médico de serviço nos Dadores de Sangue) sobre a natureza e os objectivos da investigação e sobre os seus riscos e benefícios.

Só serão incluídos neste estudo participantes e capazes de compreender a informação dada e tendo assinado e datado o termo de Consentimento Informado, de forma livre e esclarecida.

Não existem riscos inerentes à participação no estudo de investigação.

Os benefícios do estudo serão eventuais benefícios indirectos, a longo prazo, decorrentes de uma melhor compreensão da doença.

No plano financeiro do estudo está previsto o pagamento das despesas relativas a eventuais deslocações de doentes ao hospital para participação no projecto de investigação.

ACTIVIDADE DE ADAMTS13 E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ADAMTS13 NO SÍNDROME ANTI-FOSFOLÍPIDO (SAF)

Informação aos doentes participantes no estudo

Gostaríamos de contar com a sua colaboração neste estudo de investigação que tem como Investigadores Responsáveis o Dr. Manuel Campos e a Dra. Sara Morais, do Serviço de Hematologia Clínica.

Com este estudo pretendemos conhecer melhor o papel de uma enzima, a ADAMTS13, na síndrome anti-fosfolípido, uma doença que pode determinar o aparecimento de trombozes.

Se concordar em participar, será efectuada a colheita de duas amostras de sangue (2 tubos, cerca de 10 ml) para realizar as análises que fazem parte deste estudo e serão registados alguns dados clínicos importantes para interpretar os resultados.

Todos os dados serão confidenciais. A participação não acarretará riscos para si. Também não haverá benefícios imediatos, embora a longo prazo possam existir benefícios indirectos resultantes de um melhor conhecimento da doença. Se desejar, pode ser ressarcido sobre as despesas de deslocação ao hospital, até ao valor máximo de 5 Euros por deslocação, mediante a entrega de comprovativo. Esta compensação só é aplicável no caso de se deslocar ao hospital no âmbito exclusivo do projecto.

Termo de consentimento informado

Eu, abaixo-assinado, fui informado sobre o estudo de investigação acima mencionado. Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais. Sei que posso recusar-me a participar no estudo sem nenhum tipo de penalização por este facto. Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas. Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e autorizo a colheita de do meu sangue para a realização das análises que fazem parte deste estudo, bem como a recolha de alguns dados clínicos que são importantes para interpretar os resultados. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do participante no estudo:

Assinatura

Data

Nome do médico:

Assinatura

Data

ACTIVIDADE DE ADAMTS13 E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ADAMTS13 NO SÍNDROME ANTI-FOSFOLÍPIDO (SAF)

Informação aos dadores participantes no estudo

Gostaríamos de contar com a sua colaboração neste estudo de investigação que tem como Investigadores Responsáveis o Dr. Manuel Campos e a Dra. Sara Morais, do Serviço de Hematologia Clínica.

Com este estudo pretendemos conhecer melhor o papel de uma enzima, a ADAMTS13, na síndrome anti-fosfolípido, uma doença que pode determinar o aparecimento de trombooses.

Para efectuar este estudo necessitamos de estudar, para além dos doentes, pessoas normais. Por isso, pedimos a sua colaboração.

Se concordar em participar, será efectuada a colheita de duas amostras de sangue (2 tubos, cerca de 10 ml) para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Todos os dados serão confidenciais. A participação não acarretará riscos para si. Também não haverá benefícios imediatos, embora a longo prazo possam existir benefícios indirectos resultantes de um melhor conhecimento da doença.

Termo de consentimento informado

Eu, abaixo-assinado, fui informado sobre o estudo de investigação acima mencionado. Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais. Sei que posso recusar-me a participar no estudo sem nenhum tipo de penalização por este facto. Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas. Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e autorizo a colheita de do meu sangue para a realização das análises que fazem parte deste estudo, bem como a recolha de alguns dados clínicos que são importantes para interpretar os resultados. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do participante no estudo:

Assinatura

Data

Nome do médico:

Assinatura

Data

C. PLANO FINANCEIRO

1. Orçamento

	Custo total
Reagentes e outro material de laboratório (*)	3300,00 Euros
Material administrativo e consumíveis	150,00 Euros
Subsídio de deslocação - doentes participantes (**)	150,00 Euros
Poster	50,00 Euros
Inscrição aluno em Congresso da Especialidade	200,00 Euros
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00 Euros
TOTAL	3900,00 EUROS

(*) Estimativa para 45 participantes (30 doentes e 15 controlos)

(**) Se os doentes tiverem necessidade de se deslocar ao hospital especificamente para participar no estudo de investigação serão pagas as despesas de deslocação (estimativa 5 euros / participante / cada deslocação ao hospital; 30 doentes participantes).

2. Financiamento

Este estudo será financiado pela Roche Farmacêutica: Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica – Programa Roche/ICBAS/HSA 2008/2010.

ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

- aFL, anticorpos anti-fosfolípido
- CHP, Centro Hospitalar do Porto
- DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS
- HSA, Hospitalar de Santo António
- ICBAS/UP, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica
- PTT, Púrpura Trombocitopénica Trombótica
- SAF, Síndrome anti-fosfolípido
- UMIB/ICBAS/UP, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, com sede no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

EXECUÇÃO DO PROJECTO

Resultados preliminares

Durante um período de 6 meses, 19 indivíduos foram incluídos neste estudo, segundo os critérios atrás descritos. As 13 mulheres e 6 homens apresentavam uma idade média de aproximadamente 47 anos. Dos 19 casos estudados, 10 apresentavam critérios de diagnóstico para SAF. Foram estudados 19 controlos saudáveis, contudo, após análise dos resultados, 3 destes controlos foram excluídos do estudo por terem sido classificados como *outliers*. Desses 16 controlos saudáveis, 10 eram do sexo feminino e 6 do sexo masculino, apresentavam uma idade média de aproximadamente 39 anos.

Actividade ADAMTS-13

Nos 16 controlos saudáveis, a actividade da ADAMTS-13 variou entre 39,6% e 102,0% (média $\pm$ DP = 70,76% $\pm$ 17,08%) com uma distribuição aparentemente normal. Assim, o intervalo de referência para as actividades normais foi definido como a média $\pm$ 2DP (36,60% - 104,92%).

Nos 19 casos analisados, verificou-se que a actividade da ADAMTS-13 encontrava-se acima do valor mínimo de referência em todos eles (ou seja, normal). Assim, não existia qualquer diferença na proporção de indivíduos com níveis diminuídos de actividade da ADAMTS-13 entre indivíduos com aFL e sem aFL, bem como, entre indivíduos com aFL e critérios de SAF e indivíduos apenas com aFL.

Anticorpo anti-ADAMTS-13

Nos 16 controlos saudáveis, a concentração de anticorpos anti-ADAMTS-13 variou entre 6,6AU/ml e 31,9AU/ml (média $\pm$ DP = 16,38AU/ml $\pm$ 6,76AU/ml) com uma distribuição aparentemente normal. Assim, o intervalo de referência para a concentração normal de anticorpo anti-ADAMTS-13 foi definido como a média $\pm$ 2DP (2,86AU/ml - 29,90AU/ml).

Na amostra estudada, 14 indivíduos apresentaram concentração normal de anticorpo anti-ADAMTS-13 e 5 apresentaram uma concentração aumentada. No grupo de controlo apenas se encontrou 1 indivíduo com concentração aumentada de anticorpo anti-ADAMTS-13, no entanto, esta diferença entre os dois grupos nas proporções de indivíduos com anticorpos anti-ADAMTS-13 aumentados não se revelou estatisticamente significativa ($p=0,263$). Avaliou-se se existia diferença significativa entre as proporções de indivíduos com anticorpos anti-

ADAMTS-13 aumentados entre casos com SAF e casos sem critérios para SAF, observou-se que essa proporção era maior nos casos sem SAF do que naqueles com SAF, contudo, esta diferença não é significativa ($p=0,238$).

Tabela 1. Comparação das proporções de actividades reduzidas e [anti-ADAMTS-13] aumentada entre grupos.

	Casos (n=19)	Controlos (n=16)	p*	aFL s/ SAF (n=9)	aFL c/ SAF (n=10)	p*
Actividade ADAMTS-13 reduzida	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1
[Anti- ADAMTS-13] aumentada	5 (26,3%)	1(6,3%)	0,263	4 (44%)	1 (10%)	0,238

* As comparações entre as variáveis categorias estudadas foram calculadas com o teste χ^2 .

Antigénio ADAMTS-13

Os resultados referentes a este teste encontram-se ainda indisponíveis devido a dificuldades técnicas.

Discussão

Neste estudo não se observou qualquer associação entre a presença de aFL e a existência de anticorpos anti-ADAMTS-13 ou disfunção da ADAMTS-13. De igual modo, não se verificou uma associação entre a presença de anticorpos anti-ADAMTS-13 e a ocorrência de SAF.

O ponto forte deste estudo é o seu desenho simples, colocando poucas perguntas e recorrendo a um número reduzido de procedimentos para obter as respectivas respostas. Estas características permitem reduzir o número de vieses do estudo e facilitam a análise crítica por parte do observador externo. Relativamente às suas fragilidades, pode-se apontar em primeiro lugar uma casuística relativamente reduzida (que diminui o poder estatístico). Além disso, a existência de um número relativamente elevado (3) de indivíduos saudáveis, superior ao esperado no grupo de controlo, com concentração elevada de anticorpos anti-ADAMTS-13,

posteriormente considerados outliers, pode estar associada a uma diminuição da validade interna deste estudo. Como fragilidade, não específica deste trabalho, encontra-se o facto de terem sido utilizados testes bioquímicos (actividade ADAMTS-13 e anticorpos anti-ADAMTS-13) que apresentam uma grande variabilidade inter-laboratórios e ainda pouco validados clinicamente, particularmente em contextos clínicos diferentes da PTT.

Os resultados obtidos não vão ao encontro dos apresentados no estudo realizado por Austin SK *et al* em 2008, que descreve a ocorrência aumentada de disfunção ADAMTS-13 e anticorpos anti-ADAMTS-13 em doentes com aFL e SAF. Tais diferenças podem dever-se aos factores já descritos, a reais diferenças entre as populações estudadas e/ou a outros factores presentemente não identificáveis.

Este trabalho desvaloriza, assim, a importância do papel da ADAMTS-13 na fisiopatologia do SAF. Além disso, enfatiza a necessidade de uma avaliação mais extensa da aplicabilidade e validade clínica do teste da actividade da ADAMTS-13 em quadros clínicos diferentes da PTT e a necessidade da pesquisa de factores associados ao aparecimento de anticorpos anti-ADAMTS-13.

ANEXOS

Formulário para recolha de dados

Sexo M ___ F ___

Idade ___ anos

Manifestações clínicas de SAF (assinalar com X)

- Trombose Arterial___
- Trombose Venosa___
- Trombose Microvascular___
- Morbilidade Gestacional___

Dados Laboratoriais

Anticorpo anti-ADAMTS13 Positivo___ Negativo___

- Se positivo: Título de anticorpo___

Antigénio ADAMTS13 Normal___ Reduzido___

Actividade ADAMTS13 Normal___ Reduzida___

- Valor da actividade (em percentagem do normal) ___%

PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

HSA/CHP

Carta ao Presidente do Conselho de Administração

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto

Dr. Sollari Allegro

DUARTE NUNO CUNHA REGO, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

Carta à Presidente da Comissão de Ética

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar do Porto

Dra. Luísa Bernardo

DUARTE NUNO CUNHA REGO, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

Carta ao Director do Departamento de Ensino, Formação e Investigação

Exma. Senhora Directora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do
Centro Hospitalar do Porto

Prof. Doutora Margarida Lima

DUARTE NUNO CUNHA REGO, na qualidade de Aluno da da Disciplina de Iniciação à
Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por
este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o
Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com o programa
de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

PEDIDO DE FINANCIAMENTO

Bolsa de iniciação à investigação clínica

Carta ao Presidente do Conselho Directivo

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Directivo do Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Sousa Pereira

DUARTE NUNO CUNHA REGO, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/HSA, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. a atribuição de 3900,00 € (três mil e novecentos euros) da Bolsa de Iniciação à Investigação Clínica da Roche Farmacêutica, SA, para financiamento do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, de acordo com orçamento apresentado.

Data

Assinatura

TERMOS DE RESPONSABILIDADE

Termo de Responsabilidade do Investigador Principal e Responsável no CHP

Eu, abaixo assinado, MANUEL CÉSAR ARAÚJO CAMPOS, Médico, Especialista de Hematologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Investigador Principal e Responsável no HSA/CHP, declaro assumir a liderança científica do Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados e com as normas internas da Instituição.

Data

Assinatura

DECLARAÇÕES DE ALUNOS E ORIENTADORES / SUPERVISORES

Aluno

Declaração do Aluno

Eu, abaixo assinado, DUARTE NUNO CUNHA REGO, na qualidade de Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS / CHP, declaro que durante a realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, respeitarei as normas éticas e deontológicas, que a identificação dos doentes não será revelada e que os dados necessários para a realização do trabalho serão mantidos confidenciais e não serão utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Orientadores / Supervisores

Declaração do Orientador

Eu, abaixo assinado, MANUEL CÉSAR ARAÚJO CAMPOS, Médico, Especialista de Hematologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Orientador de DUARTE REGO, Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, responsabilizando-me por supervisionar a recolha e utilização dos dados necessários para a realização, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos confidenciais e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Declaração do Co-Orientador

Eu, abaixo assinado, SARA MARIA SIMÕES MORAIS, Médica, Especialista de Imunohemoterapia do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP, na qualidade de Co-Orientadora de DUARTE REGO, Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/ CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado, bem como zelar pelo cumprimento das normas éticas

e deontológicas, nomeadamente para que os dados utilizados na realização do referido trabalho sejam mantidos confidenciais e não sejam utilizados para qualquer outro fim.

Data

Assinatura

Declaração do Supervisor / Responsável pela Disciplina

Eu, abaixo assinado, MARGARIDA MARIA DE CARVALHO LIMA, Médica, Especialista de Imunohemoterapia do HSA/CHP, na qualidade de Professora Responsável pela Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/CHP, declaro que me comprometo a acompanhar a aluna SIMÃO CRUZ, Aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica do Curso de Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/CHP nas diferentes fases da sua realização do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado.

Data

Assinatura

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Serviços

Autorização do Director do Serviço de Hematologia Clínica

MANUEL CÉSAR ARAÚJO CAMPOS, na qualidade de Director do Serviço de HEMATOLOGIA CLÍNICA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo

Departamentos

Autorização do Director do Departamento de Medicina

JOSÉ LOPES GOMES, na qualidade de Director do Departamento de MEDICINA do HSA/CHP, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação / Trabalho Académico acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura e carimbo