Expressão semiquantitativa de Interleucina-6 em paciente com Doença de von Willebrand – relato de caso

Brenda Pezzuol Silva[1], Gustavo Guedes Teixeira[1], Monique Matsuda[2], Mônica Valéria Marquezini[2], Daniel Siquieroli Vilas Boas[1]

[1]Faculdade de Ciências Biológicas – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)
[2]Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (USP)
PPSUS – FAPESP 50110-0
E-mail: daniel@unisanta.br

Resumo: A Doença de Von Willebrand é o distúrbio hemorrágico autossômico hereditário mais comum e representa uma gama de patologias quantitativas e qualitativas da glicoproteína adesiva chamada fator de Von Willebrand (FVW) ocasionada por mutação no cromossomo 12. Essa glicoproteína tem sua funcionalidade ligada a facilitação da adesão de plaquetas normais na homeostase primária e atua como um portador do fator VIII na homeostase secundária. O objetivo desse trabalho consistiu em realizar uma descrição de um caso clínico no qual a expressão do gene da Interleucina-6 foi determinada. Participou deste estudo uma paciente do gênero feminino, com 27 anos de idade e com diagnóstico de Doença de Von Willebrand. O RNA total do sangue periférico foi extraído utilizando-se o método do TRIzol e serviu de molde para a síntese de cDNA por transcrição reversa. A expressão do gene IL-6 foi semiquantificada por PCR. O teste t de Student foi utilizado para comparação das variáveis. O estudo constatou que a expressão gênica da IL-6 está aumentada 78,87% (P<0,001) na participante com a Doença de Von Willebrand. Marcadores de lesão/disfunção endotelial e inflamação estão aumentados nos indivíduos com a Doença de Von Willebrand e esta inter-relação suporta o conceito de um papel central na lesão endotelial e de anormalidades de coagulação na predisposição dos pacientes às síndromes vasculares e coronarianas agudas.
Palavras chave: expressão gênica, interleucina-6, reação em cadeia da polimerase, doença de Von Willebrand.

Semiquantitative expression of interleukin-6 in a patient with von Willebrand Disease – case report

Abstract: Von Willebrand's disease is the most common hereditary autosomal bleeding disorder and represents a range of quantitative and qualitative pathologies of the adhesive glycoprotein called Von Willebrand factor (VWF) caused by a mutation on chromosome 12. This glycoprotein's functionality is linked to facilitating adhesion of normal platelets in primary homeostasis and acts as a carrier of factor VIII in secondary homeostasis. The objective of this work was to describe a clinical case in which the expression of the Interleukin-6 gene was determined. A female patient, 27 years old and diagnosed with Von Willebrand Disease, participated in this study. Total RNA from peripheral blood was extracted using the TRIzol method and served as a template for cDNA synthesis by reverse transcription. IL-6 gene expression was semiquantified by PCR. Student's t test was used to compare variables. The study found that IL-6 gene expression is increased by 78.87% (P<0.001) in the participant with Von Willebrand Disease. Markers of endothelial injury/dysfunction and inflammation are increased in individuals with Von Willebrand Disease and this interrelationship supports the concept of a central role for endothelial injury and coagulation abnormalities in predisposing patients to acute coronary and vascular syndromes.
Keywords: gene expression, interleukin-6, polymerase chain reaction, Von Willebrand disease.

1. Introdução

Anticoagulação, coagulação, fibrinólise e fibrinogênese interagem em complexo sistema para exercer a hemostasia e manter o fluxo sanguíneo. Doenças próprias desse sistema manifestam-se tanto por hipoatividade e redução da capacidade de estancar sangramentos quanto por hiperatividade e estados protrombóticos (ROHDE et al, 2004; WEYAND e FLOOD, 2021).

É um exemplo de hipocoagulabilidade a doença de von Willebrand (VWD), o distúrbio hemorrágico autossômico hereditário mais comum. Representa uma gama de patologias quantitativas e qualitativas da glicoproteína adesiva, Fator de von Willebrand (LILLICRAP, 2013) e estima-se que sua prevalência varie entre 1 e 3 % na população (SADLER, 1996; FOGARTY et al, 2020).

O VWF é uma glicoproteína multimérica sintetizada em células endoteliais e megacariócitos. Inicialmente é sintetizado como uma proteína primária de aminoácidos que sofre um extenso processamento pós-traducional, incluindo dimerização, multimerização e glicosilação (ECHAHDI et al, 2017).

A função do fator de von Willebrand na hemostase primária é facilitar a adesão de plaquetas normais e na hemostase secundária, atua como um portador do Fator VIII (KAHLON et al, 2013).

De acordo com Lillicrap (2013) a doença não apresenta predileção geográfica ou étnica, mas embora ambos os sexos herdem alelos mutantes do VWF com igual frequência, as mulheres superam os homens por aproximadamente 2:1 na maioria das populações, presumivelmente por causa da carga de hemorragia muco cutânea excessiva em mulheres em idade reprodutiva (CASTAMAN e JAMES, 2019).

A VWD pode ser classificada, considerando seu grau de severidade, dos tipos I ao III (MS, 2005). O tipo 1 inclui leve à moderada deficiência quantitativa do fator de von Willebrand e o tipo 2 é caracterizado por anomalias qualitativas no fator e é subdividido em quatro categorias: tipos 2A e 2B demonstram a perda de ambas as formas multiméricas de elevado peso molecular do VWF. No tipo 2A isso se deve a um defeito na secreção ou na depuração do VWF e no tipo 2B por mutações de ganho-de-função levando ao aumento da ligação de plaquetas e remoção dos complexos VWF plaquetários. O tipo 2M inclui ligações de plaquetas à colágenos com defeito, com distribuição de multímeros relativamente preservada e o tipo 2N está relacionado às variações no FVIII. O tipo 3 da doença é a forma mais grave caracterizada pela ausência doVWF (FLOOD, 2014; SHARMA e FLOOD, 2017).

A expressão clínica da VWD é geralmente leve no tipo 1, com gravidade crescente nos tipos 2 e 3. Em geral, a severidade da hemorragia é correlacionada com o grau de redução do FVIII (FRANCHINI e MANNUCCI, 2020).

Sangramento muco cutâneo, epistaxe especialmente durante a infância, menorragia e ferimentos frequentes são manifestações típicas da doença e pode afetar a qualidade de vida (CASTAMAN et al, 2013; SWAMI e KAUR, 2017).

Conforme Flood (2014) o diagnóstico de defeitos quantitativos é simples, pois no tipo 1 os níveis de proteína são reduzidos e no tipo 3 é ausente. Os testes para defeitos qualitativos são mais problemáticos, pois nenhum teste pode diagnosticar o tipo 2. Como o tratamento varia de acordo com o tipo da doença, o diagnóstico preciso é fundamental para o melhor cuidado ao paciente (RANDI et al, 2018).

A VWD é herdada de forma autossômica dominante, o que significa que uma cópia alterada do gene VWF, herdada de um dos pais, é suficiente para causar a condição. Em alguns casos, a doença pode ser herdada de forma autossômica recessiva, o que significa que ambos os pais precisam contribuir com uma cópia alterada do gene para que a condição se manifeste (BOENDER et al, 2016).

Os testes genéticos podem ser realizados para identificar mutações específicas no gene VWF e ajudar no diagnóstico da doença de von Willebrand, especialmente em casos de herança atípica ou

para aconselhamento genético em famílias afetadas. O aconselhamento genético é importante para entender o risco de transmissão da doença para descendentes e para tomar decisões informadas sobre a reprodução (DE FARIA et al, 2016; SHARMA e HABERICHTER, 2019; IERA-VELAZQUEZ e JIMENEZ, 2019).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional envolvida em uma variedade de processos biológicos, incluindo regulação do sistema imunológico, resposta inflamatória e hematopoiese. Dentre suas diversas funções, um aspecto crucial de pesquisa tem sido a relação da IL-6 com processos inflamatórios vasculares. O entendimento dessa relação é essencial para elucidar os mecanismos subjacentes a distúrbios vasculares e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes (LOW et al, 2019).

A IL-6 é produzida por várias células, incluindo células T, células B, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Sua expressão é induzida em resposta a diferentes estímulos, como infecções, lesões teciduais e processos inflamatórios. Quando se trata de processos inflamatórios vasculares, a IL-6 emerge como uma molécula-chave que desempenha papéis tanto na promoção quanto na modulação da resposta inflamatória (NOONE et al, 2021).

A IL-6 pode afetar diretamente as células endoteliais, que revestem o interior dos vasos sanguíneos. Sua ligação aos receptores de IL-6 presentes nessas células desencadeia uma série de eventos intracelulares, levando à ativação endotelial. A ativação endotelial é um componente fundamental dos processos inflamatórios vasculares, contribuindo para a regulação do tônus vascular, permeabilidade e adesão de células inflamatórias (GOVOROV et al, 2019).

A IL-6 também é um mediador chave na indução da síntese de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa, que é frequentemente utilizada como marcador inflamatório. A elevação dos níveis de PCR está associada a distúrbios inflamatórios vasculares, indicando a presença de um estado inflamatório sistêmico (OIKONOMOU et al, 2020).

Além de atuar diretamente nas células endoteliais, a IL-6 promove a ativação de células inflamatórias, como os macrófagos. Essas células, quando ativadas, liberam mediadores inflamatórios adicionais, exacerbando a resposta inflamatória e contribuindo para a patogênese de doenças vasculares (HOLTE et al, 2017).

A IL-6 desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune, influenciando a diferenciação e ativação de células T. A resposta imune desregulada é frequentemente observada em distúrbios inflamatórios vasculares e a IL-6 pode ser um mediador chave nesse processo (KANG et al, 2020).

A Arterite de Células Gigantes é uma vasculite que afeta principalmente as artérias de médio e grande porte. Estudos indicam um aumento nos níveis de IL-6 em pacientes com ACG, sugerindo seu envolvimento na patogênese da doença. Do mesmo modo, a Vasculite Associada à Polimialgia Reumática, condição inflamatória que afeta frequentemente indivíduos mais idosos, muitas vezes apresentam elevação nos níveis de IL-6 (KANG et al, 2021).

A aterosclerose é uma condição em que placas de gordura, cálcio e outras substâncias se acumulam nas paredes das artérias. A IL-6 desempenha um papel na inflamação associada à aterosclerose, promovendo a ativação endotelial e contribuindo para a progressão das lesões ateroscleróticas agravando, muitas vezes, a Síndrome Coronariana Aguda, como infarto agudo do miocárdio, onde há uma liberação significativa de IL-6. Essa resposta inflamatória pode estar envolvida na remodelação vascular e na progressão da aterosclerose (TAKAGAKI et al, 2020).

Na VWD a IL-6 emerge como um componente interessante na compreensão dos mecanismos inflamatórios associados a essa condição. Embora a relação entre a IL-6 e a VWD não seja completamente elucidada, estudos indicam que a IL-6 desempenha um papel significativo na regulação da resposta inflamatória e pode influenciar a expressão e a função do VWF. Na VWD, onde há uma deficiência ou disfunção do VWF, a presença de inflamação pode modular a gravidade dos sintomas hemorrágicos (SHARMA e FLOOD, 2017; FRANCHINI e MANNUCCI, 2020).

Estudos sugerem que a IL-6 pode modular a produção e liberação de VWF pelas células endoteliais. A ativação da IL-6 pode estimular a síntese de VWF, contribuindo para a correção do defeito subjacente na VWD. No entanto, a regulação precisa desses eventos ainda está sob investigação (SWAMI e KAUR, 2017).

A IL-6 é conhecida por sua influência na resposta imune e a VWD pode ser afetada por desequilíbrios no sistema imunológico. A modulação da resposta imune pela IL-6 pode ter implicações na expressão e função do VWF, potencialmente exacerbando os sintomas hemorrágicos (RANDI et al, 2018).

A presença de inflamação aguda ou crônica em pacientes com VWD pode estar associada a níveis elevados de IL-6. Essa condição inflamatória pode desencadear respostas compensatórias no sistema hemostático, afetando a expressão e a função do FVW (SHARMA e HABERICHTER, 2019).

A associação da IL-6 com a VWD adiciona complexidade ao diagnóstico e tratamento da doença. O entendimento dessa interação pode influenciar as estratégias de tratamento, especialmente em situações onde a inflamação desempenha um papel significativo nos sintomas (GOVOROV et al, 2019).

A desmopressina e terapia de reposição com VWF/FVIII concentrado ou VWF desprovido de FVIII concentrado são as bases da terapêutica (MANNUCCI, 2019).

Dada a evidência do papel da IL-6 em distúrbios inflamatórios vasculares, inibidores de IL-6, como tocilizumabe, têm sido desenvolvidos e aplicados clinicamente. Esses medicamentos têm mostrado eficácia no controle da inflamação e na melhoria dos sintomas em várias condições associadas à IL-6 (SHEPPARD et al, 2017).

A compreensão da relação entre a IL-6 e distúrbios vasculares está pavimentando o caminho para abordagens terapêuticas mais personalizadas. Identificar pacientes com níveis elevados de IL-6 pode permitir tratamentos direcionados, otimizando a eficácia e minimizando os efeitos colaterais (MANNUCCI, 2019).

2. Objetivo

Estudar a expressão gênica do marcador interleucina – 6, associado à inflamação em paciente com a Doença de Von Willebrand, por PCR semiquantitativo (estudo de caso clínico).

3. Métodos

Casuística

Participou deste estudo uma paciente do sexo feminino com 27 anos de idade e diagnosticada por exame laboratorial com Doença de Von Willebrand. Esta participante foi testada para o marcador IL-6 através da análise de PCR a partir de sangue periférico e o resultado foi comparado com o valor de referência da população normal.

Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos ao Comitê de Ética da Universidade Santa Cecília e foi iniciado após ter ser sido aprovado pela instituição (CAAE 48467515.0.0000.5513). Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios enunciados na Resolução CNS/MS 466/12.

Material e Métodos

Os experimentos utilizaram amostras clínicas de sangue periférico, que foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta, descongeladas em gelo no momento de sua execução

e mantidas em gelo durante toda sua manipulação. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e em condições isentas de RNase.

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método do TRIzol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) conforme instruções do fabricante. As amostras foram suspensas em TRIzol na proporção de 1mL do reagente para 10mL de tecido e a mistura foi homogeneizada em politron (Ultra-Turrax T25, Ika – Labortechnik, Germany) utilizando dois pulsos por segundo a 4ºC e em sequência, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em TA.

Em seguida foi adicionado 0,1mL de clorofórmio (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de Trizol utilizado e as amostras foram agitadas por inversão durante 15 segundos e incubadas durante 2 minutos em TA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm, durante 15 minutos a 4ºC. À fase aquosa foi adicionado 0,5mL de isopropanol (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de TRIzol, sendo em seguida centrifugada a 14000rpm, durante 10 minutos a 4ºC. Ao precipitado obtido (RNA total) foi adicionado 1mL de etanol 75% (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de TRIzol e centrifugado a 7500rpm, durante 5 minutos a 4ºC.

A fase aquosa foi desprezada e o pellet seco em TA e posteriormente ressuspenso em 20µL de água destilada tratada com dietilpirocarbonato (DePC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na proporção de 1mL de DePC para cada 1L de água.

O conteúdo de RNA total foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Foi considerado que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg/mL de RNA. A relação de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm do RNA total foi calculada para certificação da ausência de contaminação proteica.

A integridade do RNA de cada amostra foi analisada eletroforeticamente em gel de agarose 1%, em tampão tris-borato-EDTA (TBE; 50mM Tris base, 50mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8). As amostras cujas bandas ribossomais 28S e 18S estiveram íntegras foram armazenadas a -80ºC até sua utilização para a síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA).

O RNA total serviu de molde para a síntese de cDNA (transcrição reversa), utilizando o kit Superscript II (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). A 1ª fita de cDNA foi preparada utilizando-se 5µg do RNA total, 1U da enzima transcriptase reversa, 1µL de oligos dT para um volume final de 20µL. Esta mistura foi incubada sequencialmente a 25ºC por 10 minutos, 42ºC por 50 minutos, 70ºC por 15 minutos e 4ºC por 1 minuto. O cDNA foi armazenado a -20ºC até sua utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com cDNA em volume de 1µL, 0,4mM do mix de desoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 0,2µM de cada primer, 1,5mM de MgCl2 e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR (kit Superscript II, GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), em volume final de 25µL. Primers para o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH, (Hodges e Chipman, 2002) foram utilizados para a padronização de expressão não-regulada.

A mistura de reação foi amplificada em termociclador de PCR PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação por 5 minutos a 94ºC; 35 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 1 minuto a 58ºC (anelamento dos primers) e 1 minuto a 72ºC (extensão do DNA); extensão final por 10 minutos a 72ºC e refrigeração a 4ºC.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE contendo brometo de etídeo (10µg/mL), utilizando padrão de DNA com 100pb (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). A visualização dos produtos de PCR no gel foi feita por meio do sistema Eagle EyeII (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), utilizando luz ultravioleta e a densitometria das bandas pelo programa Quantity One 4.1.0 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

A faixa linear de amplificação dos genes foi determinada utilizando-se um pool do cDNA das amostras. Para cada par de primers, realizamos a PCR por 18, 20, 22, 24, 27, 30, 33, 36, 38 e 40 ciclos

de amplificação. Os produtos de cada uma das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1%.

Após a densitometria das bandas, determinamos a faixa linear de amplificação para cada gene e escolhemos o número de ciclos através da banda de melhor visualização correspondente à região da curva que se situava entre 35 e 65% do valor máximo obtido. A condição assim determinada foi a utilizada nas posteriores amplificações.

Um ajuste de qualidade das curvas foi feito em relação aos pontos iniciais para se determinar a melhor função matemática capaz de estimar os valores não encontrados. O índice de correlação também foi determinado para se analisar a tendência dos dados nessas amostras e verificar o nível de significância dessa tendência.

As amostras foram então submetidas à amplificação por PCR para cada gene, nas condições padronizadas descritas acima, com quantidade fixa de cDNA (1µg), de modo a permitir comparações diretas entre as densidades das bandas amplificadas. Os produtos de PCR (bandas dos géis) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, documentados e submetidos à densitometria.

Uma área de tamanho padronizado foi definida para cada conjunto de bandas no cálculo da densitometria. A "densidade de fundo" do gel (background) foi registrada em uma área idêntica e descontada dos cálculos e as densidades das amostras amplificadas foram comparadas com a da banda do padrão de DNA de tamanho mais próximo. Os resultados expressos representaram a densidade de cada banda relativa à obtida para o GAPDH na mesma amostra. Para este gene (GAPDH) a densidade relativa foi considerada 100% uma vez que ele foi adotado como padrão interno de cada gel (padrão housekeeping).

A expressão do marcador inflamatório estudado foi testada em relação a sua normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Uma vez constatada a distribuição normal, para a comparação das variáveis, os resultados foram analisados pelo teste t de Student. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., EUA). Os valores foram expressos em média ± desvio padrão e foi fixado em 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade (nível de significância).

4. Resultados

A figura 1 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR da IL-6 do pool de amostras do caso clínico relatado. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas foi de 27. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 3º grau ($y = 0{,}0002x^3 - 0{,}0226x^2 + 0{,}7827x - 8{,}1481$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 95,27%.

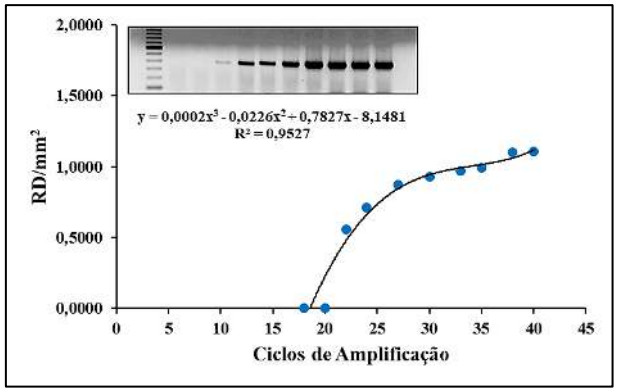

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR das amostras do caso clínico relatado.

O estudo constatou que a expressão gênica da Interleucina-6 está aumentada 78,87% ($p<0,001$) na participante com a Doença de Von Willebrand (78,49%) em relação à referência normal (43,88%) (figura 2).

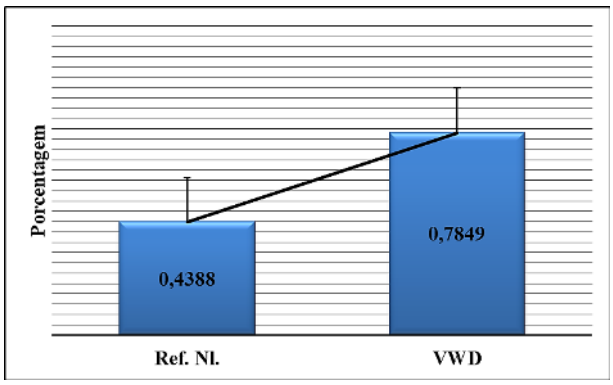

Figura 2. Expressão gênica (em %) da IL-6 na participante com VWD em comparação à referência da normalidade populacional.

5. Conclusões

O estudo constatou que a expressão gênica da IL-6 está aumentada 78,87% na participante com a Doença de Von Willebrand em relação à referência de normalidade do parâmetro.

Marcadores de lesão/disfunção endotelial e inflamação estão aumentados nos indivíduos com a Doença de Von Willebrand, como informa a literatura, e esta inter-relação suporta o conceito de um papel central na lesão endotelial e de anormalidades de coagulação na predisposição dos pacientes às síndromes vasculares e coronarianas agudas.

A busca por biomarcadores associados à atividade da IL-6 em distúrbios vasculares é uma área de pesquisa em expansão. Biomarcadores específicos podem ser fundamentais para o diagnóstico precoce, monitoramento da progressão da doença e avaliação da resposta ao tratamento.

A relação da interleucina-6 com processos inflamatórios vasculares é complexa e multifacetada. Sua influência na ativação endotelial, resposta imune e desenvolvimento de doenças vasculares destacam a IL-6 como um alvo terapêutico promissor. À medida que a pesquisa avança,

novas descobertas sobre a regulação da IL-6 e suas interações no contexto vascular podem abrir portas para intervenções mais precisas e eficazes.

6. Referências Bibliográficas

BOENDER J, KRUIP MJ, LEEBEEK FW. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. J Thromb Haemost. 2016 Aug;14(8):1507-16.

CASTAMAN G, JAMES PD. Pregnancy and delivery in women with von Willebrand disease. Eur J Haematol. 2019 Aug;103(2):73-79.

CASTAMAN, G; GOODEVE, A; EIKENBOOM, J. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. Haematologica, p.667-674, 2013.

DE FARIA FC, HENNEBERG R, DO NASCIMENTO AJ, KUBO KS, FRIGERI HR, DA SILVA PH. Von Willebrand Disease Lab Diagnosis. Indian J Hematol Blood Transfus. 2016 Jun;32(2):135-40.

ECHAHDI H, EL HASBAOUI B, EL KHORASSANI M, AGADR A, KHATTAB M. Von Willebrand's disease: case report and review of literature. Pan Afr Med J. 2017 Jun 29;27:147.

FLOOD, V. Perils, Problems, and Progress in Laboratory Diagnosis of von Willebrand disease. Semin Thromb Hemost, p.41-48, 2014.

FOGARTY H, DOHERTY D, O'DONNELL JS. New developments in von Willebrand disease. Br J Haematol. 2020 Nov;191(3):329-339.

FRANCHINI M, MANNUCCI PM. Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. Haematologica. 2020 Aug;105(8):2032-2037.

GOVOROV I, BREMME K, LARSSON A, HOLMSTRÖM M, KOMLICHENKO E, CHAIRETI R, MINTS M. Blood inflammatory and endothelial markers in women with von Willebrand disease. PLoS One. 2019 Jan 10;14(1):e0210544.

HOLTE E, KLEVELAND O, UELAND T, KUNSZT G, BRATLIE M, BROCH K, MICHELSEN AE, BENDZ B, AMUNDSEN BH, AAKHUS S, DAMÅS JK, GULLESTAD L, AUKRUST P, WISETH R. Effect of interleukin-6 inhibition on coronary microvascular and endothelial function in myocardial infarction. Heart. 2017 Oct;103(19):1521-1527.

KAHLON, A; GRABELL, J; TUTTLE, A; ENGEN, D; HOPMAN, W; LILLICRAP, D; JAMES, P. Quantification of perioperative changes in von Willebrand factor and factor VIII during eletive orthopaedic surgery in normal individuals. Haemophilia, p.758-764, 2013.

KANG S, KISHIMOTO T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. Exp Mol Med. 2021 Jul;53(7):1116-1123.

KANG S, TANAKA T, INOUE H, ONO C, HASHIMOTO S, KIOI Y, MATSUMOTO H, MATSUURA H, MATSUBARA T, SHIMIZU K, OGURA H, MATSUURA Y, KISHIMOTO T.

IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Sep 8;117(36):22351-22356.

LILLICRAP, D. Von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, p.254-60, 2013.

LOW A, MAK E, ROWE JB, MARKUS HS, O'BRIEN JT. Inflammation and cerebral small vessel disease: A systematic review. Ageing Res Rev. 2019 Aug;53:100916.

MANNUCCI PM. New therapies for von Willebrand disease. Blood Adv. 2019 Nov 12;3(21):3481-3487.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de atendimento odontológico a pacientes com coagulopatias hereditárias/MS, Secretaria de Atenção à Saúde, Depto. de Atenção Especializada. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

NOONE S, SCHUBERT R, FICHTLSCHERER S, HILBERG T, ALESCI S, MIESBACH W. Endothelial Function in Patients With Von Willebrand Disease. Clin Appl Thromb Hemost. 2021 Jan-Dec;27:1076029620984546.

OIKONOMOU E, LEOPOULOU M, THEOFILIS P, ANTONOPOULOS AS, SIASOS G, LATSIOS G, MYSTAKIDI VC, ANTONIADES C, TOUSOULIS D. A link between inflammation and thrombosis in atherosclerotic cardiovascular diseases: Clinical and therapeutic implications. Atherosclerosis. 2020 Sep;309:16-26.

PIERA-VELAZQUEZ S, JIMENEZ SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. Physiol Rev. 2019 Apr 1;99(2):1281-1324.

RANDI AM, SMITH KE, CASTAMAN G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. Blood. 2018 Jul 12;132(2):132-140.

ROHDE LE, FUCHS FD, PICON PD. Antitrombóticos. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MB, editores. Farmacologia Clinica. Fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 684-704.

SADLER, JE. A revised classification of von Willebrand disease. Thromb Haemost. 1994, 71:520-5.
SHARMA R, FLOOD VH. Advances in the diagnosis and treatment of Von Willebrand disease. Blood. 2017 Nov 30;130(22):2386-2391.

SHARMA R, HABERICHTER SL. New advances in the diagnosis of von Willebrand disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2019 Dec 6;2019(1):596-600.

SHEPPARD M, LASKOU F, STAPLETON PP, HADAVI S, DASGUPTA B. Tocilizumab (Actemra). Hum Vaccin Immunother. 2017 Sep 2;13(9):1972-1988.

SWAMI A, KAUR V. von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician. Clin Appl Thromb Hemost. 2017 Nov;23(8):900-910.

TAKAGAKI Y, LEE SM, DONGQING Z, KITADA M, KANASAKI K, KOYA D. Endothelial autophagy deficiency induces IL6 - dependent endothelial mesenchymal transition and organ fibrosis. Autophagy. 2020 Oct;16(10):1905-1914.

WEYAND AC, FLOOD VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. Hematol Oncol Clin North Am. 2021 Dec;35(6):1085-1101.