

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**Padronização das plaquetas
preparadas *in house* para atividade do
cofator da ristocetina**

Evandro Katsui Utsunomia

BOTUCATU – SP

-2013-

EVANDRO KATSUI UTSUNOMIA

**Padronização das plaquetas preparadas *in house*
para atividade do cofator da ristocetina**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de mestre em Pesquisa e
Desenvolvimento em Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Izoete Aparecida Thomazini Santos

BOTUCATU – SP

-2013-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Utsunomia, Evandro Katsui.

Padronização das plaquetas preparadas in house para atividade do cofator da ristocetina/ Evandro Katsui Utsunomia. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Izolete Aparecida Thomazini Santos

Capes: 40101053

1. Von Willebrand, Fator de - Avaliação. 2. Hematologia. 3. Hemóstase. 4. Sangue- Fatores de coagulação. 5. Formaldeído.

Palavras-chave: Atividade do cofator da ristocetina; Doença de Von Willebrand; Fator de Von Willebrand; Formaldeído; Hematologia; Hemostasia.

Dedico este trabalho...

Especialmente às minhas avós Ukiko e Fugie, que sempre me amaram e me apoiaram incondicionalmente.

Aos meus pais Francisco e Harue que acreditaram, apoiaram e me deram todo o suporte.

Aos meus irmãos, que mesmo longe sempre me apoiaram com muito carinho.

À minha namorada, pelo seu amor e compreensão nesses momentos de ausência e de dificuldade, e por acreditar em mim mais do que eu mesmo acreditei.

Agradecimentos

Agradeço muito a Deus por todas as bênçãos que ele tem me proporcionado. Por ter iluminado meu caminho até hoje, e por ter me proporcionado a uma vida cheia de oportunidades, desafios e aprendizado.

À minha orientadora Dra Izolete, por toda sua paciência em ensinar e me mostrar o caminho da ciência. Por ter acreditado na minha capacidade e por ter me ajudado tanto nesse árduo caminho.

Aos meus companheiros de laboratório Válter e Iracema, que não só me proporcionaram momentos de descontração, mas também de muitos ensinamentos. Obrigado por toda dedicação e confiança depositada em mim.

À minha namorada Camila Inohue, que foi em todo esse tempo minha amiga, companheira e principalmente confidente. Não tenho como agradecer por todo seu suporte, paciência, sabedoria e amor. Sem você dificilmente eu estaria aqui hoje. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos Marcos, Alexandre, Danilo e Bianca que me trouxeram muitas risadas e muitos conselhos, e uma amizade inabalável. Obrigado galera.

Aos meus companheiros da Equipe Executiva que me entenderam e deram todo o suporte para estar aqui.

Agradeço também à Janice e a todos os funcionários do Programa de pós-graduação não só pela paciência, mas também por toda ajuda e suporte.

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

Paulo Freire

Resumo

UTSUNOMIA E.K, **Padronização das plaquetas preparadas *in house* para atividade do cofator da ristocetina**. 2013. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

A doença de von Willebrand (DvW) é decorrente da deficiência qualitativa ou quantitativa do Fator de von Willebrand (FvW) e é considerada a coagulopatia hereditária mais comum na população com uma prevalência de 1,1% na população geral. Para o seu diagnóstico são utilizados diversos métodos como o teste do cofator da ristocetina, que é amplamente utilizado na rotina laboratorial por ser considerado padrão-ouro na avaliação da função do fator de von Willebrand e por estar diminuído em todos os casos da doença. O kit comercial de plaquetas liofilizadas é importado, de elevado custo e possui uma validade de 30 dias após sua reconstituição se conservado de 2°C a 8°C. Devido à baixa prevalência da DvW na população, muitas vezes não há uma grande quantidade de exames a serem realizados, fazendo com que os plasmas desses pacientes sejam congelados e armazenados até o momento onde apareça um número mínimo de pacientes. O estudo teve como objetivo padronizar uma técnica como alternativa na utilização de plaquetas fixadas em formalina e o seu teste em indivíduos saudáveis e com a suspeita da doença, onde foram avaliados a porcentagem de atividade expressa considerando o montante de aglutinação induzida pela ristocetina, que se relaciona proporcionalmente com a concentração do FvW e o percentual de atividade normal medido através do agregômetro. O estudo possui um caráter preliminar e apresentou-se viável à rotina laboratorial, e se faz necessário não só a coleta de um número amostral maior, mas também da análise de diversas variáveis (grupo sanguíneo, idade, hormônios, estresse, uso de medicamentos) para se estabelecer nessa população um valor de referência para essa técnica.

Palavras-chave: Atividade do cofator de ristocetina; Doença de von Willebrand; Fator de von Willebrand; Formalina; Hematologia; Hemostasia; Plaquetas.

Abstract

UTSUNOMIA E.K, **Standardization of platelets prepared in house to ristocetin cofactor activity**.2013. Thesis (master) – Faculty of Medicina of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

The von Willebrand disease (VWD) is caused by a qualitative or quantitative deficiency of von Willebrand Factor (vWF) and is considered the most common hereditary bleeding disorder in the population with a prevalence of 1.1% in the general population. For its diagnosis, several methods are used to test the ristocetin cofactor, which is widely used in laboratories because it is considered the gold standard in assessing the function of von Willebrand factor and to be decreased in all cases of the disease. The imported commercial kit of lyophilized platelets is costly and expires 30 days after reconstitution if stored from 2°C to 8°C. Due to the low prevalence of vWD in the population, usually there are not enough tests to be done, making it necessary to freeze and store the plasma of these patients until there is a minimum number of patients for testing. This study aimed to standardize a technique as an alternative to the use of formalin-fixed platelets and to test it in healthy subjects with suspected disease. Thus, the percentage of expressed activity was evaluated considering the amount of agglutination induced by ristocetin proportionally related to the concentration of vWF and the percentage of normal activity measured by an aggregometer. The study has a preliminary character and showed to be feasible for laboratory routine, and it is necessary not only to collect a larger sample size, but also to analyze several variables (blood group, age, hormones, stress, use of drugs) to establish a reference value for this technique in the population.

Key words: Ristocetin cofactor activity; von Willebrand disease; von Willebrand factor; Formalin; Hematology; Hemostasis; Platelets.

Lista de Figuras.

Figura 1: Cascata da coagulação.	17
Figura 2: Esquema das Famílias S, J e E	19
Figura 3: O fator de von Willebrand	23
Figura 4: Funções do Fator de von Willebrand	24
Figura 5: Guia para diagnóstico da Doença de von Willebrand.	33
Figura 6: Análise multimérica da molécula do Fator de von Willebrand	36

Lista de abreviaturas

AAS - Ácido acetilsalicílico

α 2-AP - α 2-antiplasmina

ACD - Ácido citrato dextrose

ADAMTS-13 - Disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs

BSA - Solução de albumina bovina

CK - Domínios C-terminal - cystine knot

CP - Fosfocreatina

CPK - Creatinina Fosfo Quinase

DDAVP-1 - Desamino-8-D-arginine vasopressin

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER - Retículo endoplasmático

FT - Fator tecidual

FVIII - Fator VIII

FvW - Fator de von Willebrand

FvW:Ag - Antígeno do Fator de von Willebrand

FvW:FVIII - Teste de ligação ao Fator VIII

FvW:RCo - Atividade do cofator da ristocetina

GPIb - Glicoproteína Ib

GpIb-IX-V - Glicoproteína Ib-IX-V

Gp IIb-IIIa - Glicoproteína IIb-IIIa

ISTH - International Society on Thrombosis and Haemostasis

PRP - Plasma rico em plaquetas

RIPA - Ristocetin induced platelet aggregation

SARP - Plasma padrão de referência

Ts - Tempo de sangramento

TTPA - Tempo de tromboplastina parcialmente ativado

t-PA - Fator tecidual do plasminogênio

u-PA - Ativador tipo uroquinase do plasminogênio

LISTA DE FIGURAS.	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 HEMOSTASIA	15
1.2 HISTÓRICO	19
1.3 FATOR DE VON WILLEBRAND	23
2.0 DOENÇA DE VON WILLEBRAND.	26
2.1 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND.	26
2.1.1 <i>Tipo 1</i>	26
2.1.2 <i>Tipo 2</i>	27
2.1.3 <i>Tipo 3</i>	29
2.1.4 <i>Síndrome de von Willebrand adquirida</i>	30
2.1.5 <i>Pseudo-DvW</i>	30
3.0 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA DOENÇA	31
3.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	34
3.1.1 <i>Tempo de Sangramento</i>	34
3.1.2 <i>FvW:Ag</i>	34
3.1.3 <i>Fator VIII</i>	35
3.1.4 <i>Agregação plaquetária induzida pela ristocetina</i>	35
3.1.5 <i>Análise multimérica</i>	36
3.1.6 <i>Atividade do cofator de ristocetina (FvW:Rco)</i>	36
4.0 TRATAMENTO	37
4.1 MEDIDAS LOCAIS	37
4.2 DESMOPRESSINA (DDAVP)	37
4.3 TRATAMENTO DE REPOSIÇÃO COM CONCENTRADO DE FATOR	38
5.0 OBJETIVO	39

6.0 MATERIAL E MÉTODOS	40
6.1 PROCEDIMENTO	41
<i>6.1.1 Obtenção da amostra</i>	41
<i>6.1.2 Realização do ensaio</i>	42
<i>6.1.3 Preparação das plaquetas fixadas em formaldeído</i>	42
7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
ANEXOS	46
REFERÊNCIAS	52

1.0 Introdução

1.1 Hemostasia

A hemostasia é o responsável pela manutenção da fluidez do sangue dentro dos vasos sanguíneos, sem extravasamento, o que caracteriza a hemorragia, e sem sua solidificação, o que caracteriza a trombose. É, portanto, um sistema de equilíbrio do organismo onde não há hemorragia e nem trombose (SILVA; HASHIMOTO, 2006). Os componentes desse processo são: endotélio vascular, plaquetas, fatores de coagulação e outras estruturas vasculares subendoteliais como colágeno, fibronectina, laminina, cininogênio de alto peso molecular, fator de von Willebrand e fator tecidual (BUTENAS; MANN, 2002).

Didaticamente divide-se a hemostasia em primária e secundária. A resposta primária da hemostasia está relacionada com o endotélio vascular e as plaquetas, pois estes resultam na formação do trombo plaquetário transitório e instável. As proteínas da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise estão relacionados com a hemostasia secundária, sendo responsáveis pela formação da fibrina (FRANCO, 2004).

A resposta do sistema hemostático à lesões vasculares inicia-se com a formação do trombo hemostático, evento que envolve tanto o endotélio vascular como as plaquetas. Quando ocorre a lesão vascular, o endotélio libera o Fator de von Willebrand (FvW) que interage tanto com o colágeno exposto quanto com as glicoproteínas Gp IIb-IIIa da membrana plaquetária, tornando-se uma ponte entre as plaquetas e o local de lesão. Esse processo foi denominado adesão plaquetária (RUGGERI, 2003).

A adesão desencadeia a ativação plaquetária, que é modulada por agonistas, promovendo uma série de eventos citoplasmáticos. Um efeito desses eventos é a mudança conformacional da Gp IIb-IIIa, que a passa ter uma afinidade ainda maior pelo FvW. Se antes o trombo formava uma adesão instável, agora já fica estabelecido um trombo mais estável na sua formação.

A agregação plaquetária ocorre pela interação da Gp IIb-IIIa ao FvW e principalmente ao fibrinogênio. Essas moléculas ligam-se aos complexos Gp IIb-IIIa de duas plaquetas, promovendo a formação de uma rede plaquetária coesa (RUGGERI, 2003).

A hemostasia primária é exatamente o conjunto destes dois mecanismos: adesão e agregação plaquetária. Dessa forma, os principais elementos desta fase são as plaquetas, os vasos e o FvW.

Simultaneamente aos processos na hemostasia primária, a lesão vascular ativa o sistema de coagulação, que através de reações em cadeia envolvendo diversos fatores de coagulação forma-se uma rede estável de fibrina. Essa rede fortalece o trombo plaquetário para que ele resista até a regeneração tecidual completa.

Em 1964, Macfarlane e Davie; Ratnoff *apud* Franco (2004, p.740) propuseram um modelo em “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea (figura 1), onde a coagulação ocorre por meio de uma ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases no plasma, o que resultaria na formação da trombina que então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. Esse esquema divide a coagulação em duas vias: uma extrínseca – envolvendo componentes sanguíneos e elementos que não estão presentes no espaço

intravascular, e também uma via intrínseca – iniciada por elementos presentes no espaço intravascular.

A coagulação é desencadeada quando ocorre a exposição do sangue a componentes que normalmente não estão presentes no interior dos vasos. Estes componentes são provenientes de lesões estruturais (lesão vascular) ou alterações químicas (citocinas). Qualquer que seja o fator desencadeante, o iniciador fisiológico da coagulação será o fator tecidual (FT), já que este será exposto no espaço intravascular (D'AMICO; VILLAÇA, 2006).

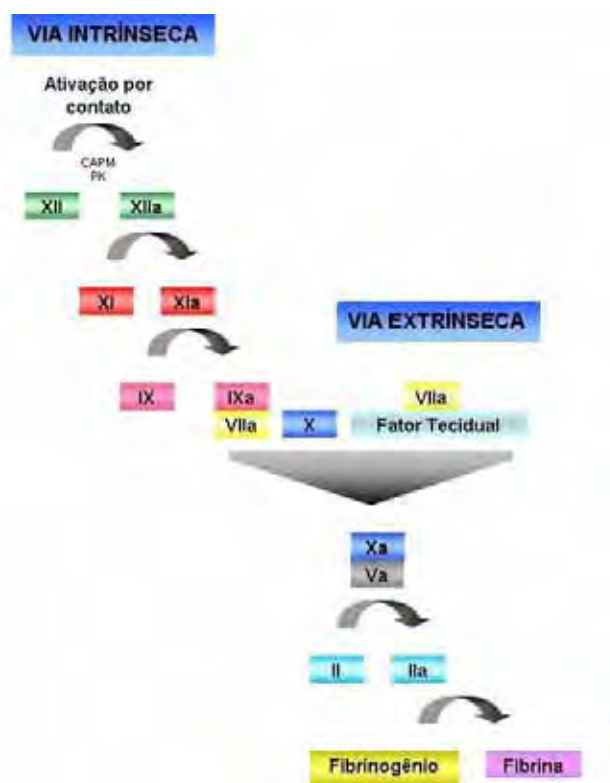


Figura 1: Esquema da cascata da coagulação. CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína.

Para que não haja uma formação exacerbada da fibrina, há sistemas de regulação na hemostasia, denominado sistema fibrinolítico. A fibrinólise é o mecanismo final que contrapõe ao processo de coagulação. É iniciada pelos ativadores do plasminogênio, os quais convertem o plasminogênio na enzima ativa, que possui atividade fibrinolítica. Os ativadores do plasminogênio são o fator tecidual

do plasminogênio (t-PA) e o ativador tipo uroquinase do plasminogênio (u-PA) (FRANCO, 2004).

Os dois ativadores promovem a ativação eficiente do plasminogênio em plasmina, esta última, cliva o fibrinogênio em fibrina, gerando produtos da degradação (FRANCO, 2004). Esses produtos gerados a partir do fibrinogênio/fibrina inibem a ação da trombina e a polimerização da fibrina (D'AMICO; VILLAÇA, 2006).

Os inibidores específicos do plasminogênio (PAI) são os responsáveis pela regulação do sistema fibrinolítico. A função inibitória realizada diretamente sobre a plasmina é exercida pela α 2-antiplasmina (α 2-AP) (FRANCO, 2004).

1.2 Histórico

Em abril de 1924, uma garota das ilhas Aland foi internada no Hospital de Deaconess em Helsink com um quadro grave de hemorragia, e por conta disso descobriram que ela pertencia a uma grande família onde tanto os membros homens quanto as mulheres apresentavam episódios de sangramentos em graus variados (VON WILLEBRAND, 1926). Esse evento levou a uma pesquisa baseada em três famílias que apresentavam os sintomas mais marcantes, denominadas Família S, Família J e E (figura 2), onde através de diversos testes laboratoriais ele concluiu que os únicos exames anormais foram o tempo de sangramento (TS) e o teste de fragilidade capilar, enquanto que a contagem de plaquetas apresentava-se normal assim como o tempo de coagulação (considerado alterado nos hemofílicos). Por conta desses achados, concluiu-se que esse distúrbio era derivado de uma disfunção plaquetária e de lesões nas paredes dos vasos sanguíneos (KASPER, 2004).

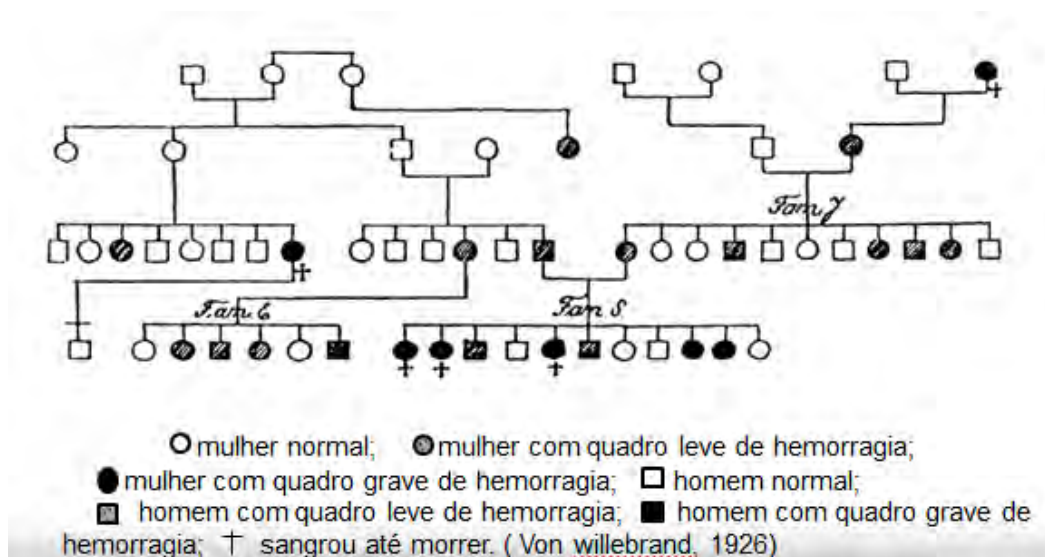


Figura 2: Esquema das Famílias S, J e E (Willebrand,1926)

Família S

A senhora Augusta S teve episódios de sangramento nasal durante toda a sua juventude, mas não mais após a fase adulta. O senhor Oscar S não possuía nenhum de seus pais com um histórico positivo, porém sua irmã Berta E, e alguns de seus filhos possuíam uma grande facilidade para o sangramento (VON WILLEBRAND, 1926).

O casal teve 11 filhos:

- Duas filhas morreram por hemorragia intestinal;
- Três filhos são considerados saudáveis;
- Três filhos possuíam episódios frequentes de epistaxe;
- Dois filhos possuíam quadros graves de sangramento;
- Um filho natimorto.

Família J

O senhor Karl J com 70 anos era saudável e não possuía pais com casos de sangramento. Porém, sua esposa Apollonia J teve um sangramento prolongado após o nascimento dos seus filhos e teve sua mãe falecida devido a uma severa hemorragia pós-parto (VON WILLEBRAND, 1926)

Eles tiveram 11 filhos:

- Cinco filhos com episódios leves de sangramento;
- Dois filhos morreram de causas não relacionadas à hemorragia;
- Quatro filhos saudáveis.

Família E

A senhora Berta E (irmã do senhor S) possuía grande tendência ao sangramento nasal e o seu marido o senhor E era considerado saudável (VON WILLEBRAND, 1926)

Eles tiveram seis filhos:

- Dois filhos saudáveis;
- Quatro filhos com episódios esporádicos de sangramento nasal.

Através da análise dessas famílias Erik von Willebrand reconheceu essa doença sendo de caráter hereditário autossômico dominante e mesmo afetando os dois sexos chamou de “pseudo-hemofilia hereditária”. Ele concluiu que na hemofilia as filhas de hemofílicos não apresentavam sinais de sangramento, mas podiam conceber filhos hemofílicos (HOLMERG, 1992). De forma semelhante, o distúrbio estudado por von Willebrand também poderia ser passado tanto de mãe assintomática quanto de sintomática, definindo dessa forma, que não haveria uma dependência com o sexo em relação a transmissão genética (NICHOLS *et. al.*, 1997).

Nilsson *et al.* (1956) trabalharam no desenvolvimento de um método de purificação do fibrinogênio humano, tratando a fração I de Cohn com uma solução de glicina. Quando se descobriu que a atividade do Fator VIII poderia ser recuperada em uma fração (denominada fração I-0), inúmeros testes foram feitos buscando a purificação em condições de esterilidade, para que dessa forma fossem realizados testes em pacientes que apresentavam tempo de sangramento alterado e deficiência na atividade do Fator VIII (NILSSON *et. al.*, 1956). Nilsson *et al.* (1959) observou que a atividade do FVIII aumentava nas primeiras vinte e quatro horas após a

infusão da fração I-0, o que não ocorreu quando administrado em hemofílicos. Além disso, foram preparadas frações I-0 de plasma de hemofílicos que não só corrigiram o tempo prolongado de sangramento como também a atividade do FVIII. Esse achado indicava que tanto o TS prolongado quanto a atividade do FVIII eram derivados de uma deficiência de fator plasmático (Fator de Von Willebrand) presente tanto em plasma de pacientes normais quanto de hemofílicos (HOLMBERG, 1992).

Porém, no começo não se imaginava como um fator plasmático poderia alterar tanto a hemostasia primária e o tempo de sangramento. Borchgrevink (1960) encontrou uma diminuição na adesão plaquetária *in vivo* em pacientes com a doença de von Willebrand e Salzman (1963) demonstrou a mesma situação *in vitro*. E foi justamente na administração de plasma normal, plasma de hemofílicos e mais um concentrado de FVIII que houve a correção na adesão plaquetária e no tempo de sangramento.

Devido a todos esses achados o próximo passo na elucidação da doença de von Willebrand com certeza seria o isolamento e caracterização desse fator plasmático. Em meados de 1970, foi possível a preparação de um FVIII altamente purificado através de cromatografia em gel de agarose, e a partir disso, concluiu-se que ela era uma grande macroglobulina. Stites *et al.*(1970) e Zimmerman *et al.* (1971) conseguiram produzir anticorpos contra essa macroglobulina e através de análises imunológicas foi demonstrado que pacientes com hemofilia A apresentavam essa proteína inativa no plasma, enquanto que a maioria dos pacientes com a doença de von Willebrand possuíam muito pouco ou quase nada dessa proteína, denominada “proteína relacionada ao Fator VIII”, que mais tarde foi confirmada como sendo o Fator de von Willebrand, que hoje sabemos que é uma molécula

distinta do Fator VIII, mas forma em conjunto com este um complexo plasmático dissociável (HOLMBERG, 1992).

1.3 Fator de von Willebrand

O gene do fator de von Willebrand está localizado no braço curto do cromossomo 12 (RUGGERI, 2003) e contém 178 kilobases. O FvW dentro da célula é composto por um peptídeo de sinalização e um propeptídeo que são codificados por 80 kilobases, e mais uma subunidade madura codificada pelo restante (figura 3) (KASPER, 2004).

O FvW é composto por uma estrutura com múltiplos domínios (figura 3) fundamental para a sua função e possui a sua biossíntese restrita às células endoteliais e aos megacariócitos. No processo de síntese a molécula inicia-se como uma pré-proteína, onde o peptídeo de sinalização é removido durante sua translocação para o retículo endoplasmático (ER). Nessa organela são formados dímeros através de ligações dissulfídicas entre os domínios C-terminal cystine knot (CK) (SPRINGER, 2011). Após o transporte da molécula para o complexo de Golgi, os dímeros ligam-se através de mais pontes dissulfídicas formando os multímeros (SADLER, 2005).

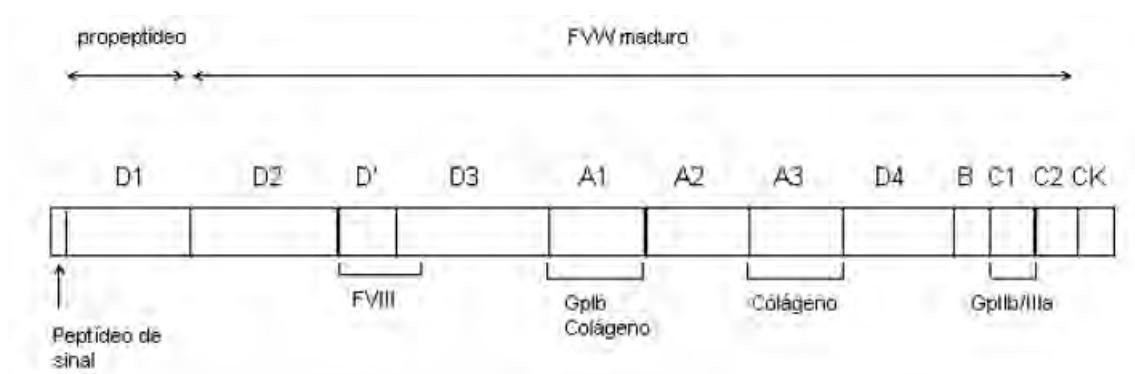


Figura 3: O fator de von Willebrand consiste de um peptídeo de sinal, um propeptídeo e sua porção madura. O colágeno se liga a dois domínios: A1 e A3. A Gplb liga-se ao domínio A1, a Gpllb/IIla liga-se ao domínio C1 e o FVIII liga-se ao domínio D' e D3.

O fator de von Willebrand maduro passou por diversos processos de glicosilação, sulfatação, multimerização e proteólise para que fosse armazenado dentro dos corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais e nos Grânulos alfa presentes nos megacariócitos e plaquetas, de onde são secretados de forma constitutiva ou regulada por hormônios, drogas (DDAVP), fibrina, trombina, cálcio iônico e fatores externos. Os níveis do fator de von Willebrand podem aumentar por influências ambientais: adrenalina liberada após exercícios intensos ou estresse, condições inflamatórias, doenças graves do fígado, altos níveis de hormônios tireoidianos, altos níveis de progesterona e estrógeno na gravidez. Da mesma forma, fatores genéticos influenciam na concentração do FvW, as pessoas do grupo sanguíneo A e B possuem níveis maiores do que os indivíduos do grupo O, assim como, as negros descendentes de africanos possuem níveis mais altos do que os caucasianos (KASPER, 2004).

O fator de von Willebrand secretado na corrente sanguínea terá duas funções: função de ligação ao Fator VIII, formando um complexo que estabiliza esse fator na circulação, prevenindo sua proteólise plasmática e adesão plaquetária na injúria vascular, formando uma ponte através do complexo plaquetário de glicoproteína Gp Ib-IX-V e o colágeno subendotelial (RUGGERI, 1993) (Figura 4).

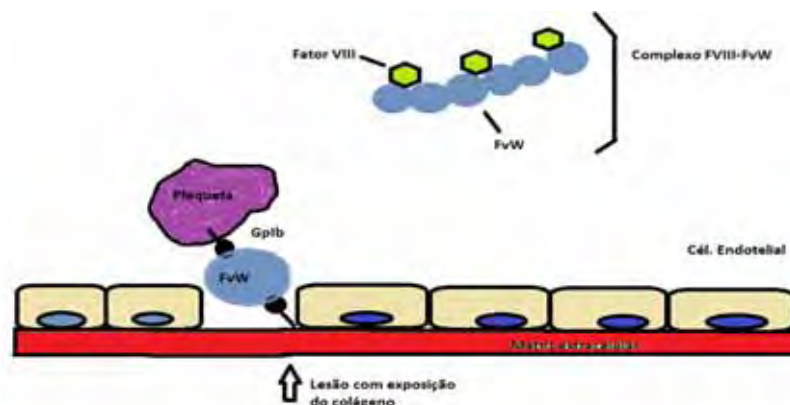


Figura 4: Funções do Fator de von Willebrand: (1) Atua como carreador do Fator VIII, protegendo-o da degradação proteolítica; (2) Essencial na ligação das plaquetas com o colágeno do subendotélio vascular através do complexo Gp-Ib-IX-V.

No plasma o FvW possui uma vida média de 12 a 20 horas (Menache, 1996) e é regulado através de uma metaloprotease ADAMTS-13 (*a disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs*) que cliva os multímeros em pedaços menores de 176 kDa e 140 kDa, que limita a formação do trombo plaquetário (SADLER, 2005).

2.0 Doença de von Willebrand.

A doença de von Willebrand é uma doença qualitativa ou quantitativa do FvW e é considerada a coagulopatia hereditária mais prevalente em humanos, sendo de 3 a 4 por 100.000, ou seja, 1,1% da população. Porém, a estimativa dessa prevalência se torna difícil devido a sua expressividade variável e a sua baixa penetrância. (TOSSETTO et. al., 2007).

2.1 Classificação da Doença de von Willebrand.

A classificação é baseada nos critérios desenvolvidos pelo subcomitê da ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*), e foi criada para ser clinicamente relevante em relação ao diagnóstico e tratamento do paciente com DvW (SADLER, 1994).

A doença de von Willebrand foi classificada em três grandes grupos: deficiência parcial (tipo 1), deficiências qualitativas (tipo 2) e total deficiência quantitativa (tipo 3). O tipo 2 ainda foi dividido em quatro variantes (2A, 2B, 2M e 2N) com base nos dados fenotípicos.

2.1.1 Tipo 1

Caracterizado por ser transmitido com traço autossômico dominante onde quase 75% de todos os pacientes sintomáticos enquadram-se nessa categoria e está relacionada a uma deficiência parcial do FvW, conservando a sua funcionalidade mas podendo afetar os multímeros de todos os tamanhos (Kasper, 2005). Os pacientes com o tipo 1 caracterizam-se por possuírem sintomas brandos da doença, níveis baixos do FvW, tempo de sangramento normal ou pouco alterado e baixos níveis de FvW:Ag (concentração da proteína FvW), FvW:RCo (testes de funcionalidade do FvW) e FVIII.

As mutações dominantes geralmente são de alta penetrância e mais severas, podendo alterar o processo de transporte intracelular dos dímeros proFvW (BODÓ, 2001) ou aumentando a taxa de proteólise do FvW da circulação (GRAVAZOVA, 2002).

A definição de um diagnóstico para o tipo 1 é considerado difícil pois um paciente pode ser assintomático e com exames laboratoriais normais enquanto que outros podem possuir sintomas leves a moderados com alguns dos exames alterados (KASPER, 2005). Para uma definição mais precisa o estudo requer a análise de alguns critérios: histórico familiar, histórico de sangramentos e níveis baixos ou normais do fator de von Willebrand (FEDERICI, 1999), obviamente devemos levar em consideração que episódios raros de sangramento são comuns na população, e que os níveis do FvW podem ser alterados por fatores ambientais e genéticos, como o tipo sanguíneo onde o grupo O possui praticamente 30% menos FvW do que os outros grupos. (KASPER, 2005).

2.1.2 Tipo 2

Este tipo é caracterizado como uma deficiência qualitativa do FvW, onde é transmitido como traço autossômico dominante ou recessivo e faz parte de quase 20 a 30% de todos os diagnósticos da doença de von Willebrand (HOLMBERG, 1985). Os seus subtipos 2A, 2B, 2M e 2N são assim classificados de acordo com o sítio funcional onde se encontra a anormalidade (figura 2).

O tipo 2A é a variante qualitativa mais comum dentre todos os diagnósticos da DvW e está relacionada a defeitos no domínio A2 e ocasionalmente em A1 do gene do FvW (KASPER, 2005). Seus defeitos qualitativos podem ser originados de mutações que impedem a montagem ou secreção do FvW ocasionando ausência dos multímeros de alto e intermediário peso molecular, ou

podem estar relacionados a montagem de multímeros deficientes que aumentam a sua proteólise plasmática pela ADAMTS13, fazendo com que somente os multímeros de baixo peso molecular circulem no plasma (O'BRIEN *et. al.*, 2005).

Por conta da redução/ausência desses multímeros o tipo 2A possui uma diminuição da capacidade de ligação com a GpIb plaquetária, isso reflete em um baixo cofator da ristocetina (FvW:RCo) e ligação ao colágeno (FvW:CB), um ausente ou diminuição no exame RIPA (*ristocetin induced platelet aggregation*) e um tempo de sangramento prolongado (TS). Em contrapartida, a mensuração do FvW:Ag está apenas levemente reduzida e a dosagem do FVIII está similar ao FvW:Ag, já que a presença de multímeros de baixo peso molecular conseguem se ligar normalmente ao fator VIII. (RUGGERI, 1980).

O tipo 2B é uma doença de herança autossômica dominante e participa de menos de 20% de todos os diagnósticos do tipo 2. É caracterizado por mutações na região A1 que contém o domínio responsável pela ligação à GpIb plaquetária, resultando em ganho de função, em outras palavras, há um aumento pela afinidade do FvW pela glicoproteína ocasionando muitas vezes em uma plaquetopenia, que pode se acentuar em momentos de exercício físico, estresse, gravidez ou idade avançada (GINSBURG, 1997).

Os exames laboratoriais se assemelham em muito ao tipo 2A, com tempo de sangramento prolongado, níveis do Fator VIII e FvW:Ag baixos ou normais, baixo FvW:Rco, porém há uma resposta exagerada no teste de agregação plaquetária com baixas doses de ristocetina, e é justamente o RIPA que é utilizado como exame diferencial entre os tipos 2A e 2B. (Brasil, ministério da saúde, 2008).

O tipo 2M é caracterizado por diminuição na função plaquetária dependente do FvW. Porém, diferente do tipo 2A onde há ausência/redução dos

multímeros de intermediário e alto peso molecular, no tipo 2M temos a presença de todos os multímeros (SADLER, 1995). Nesse caso, a perda de função está ligada a mutações na região A1, domínio de ligação da GpIb plaquetária, levando ao prejuízo no pareamento entre plaquetas e o FvW (MEYER, 2009).

O tipo 2N possui um tipo de herança autossômica recessiva e é caracterizado por níveis normais de FvW:Ag e FvW:Rco, presença de todos os multímeros e níveis plasmáticos baixos do FVIII (FEDERICI, 1999). Isso ocorre porque além do FvW promover a biossíntese e secreção do FVIII em condições normais, ele ainda previne sua degradação plasmática pela proteína C ativada (KAUFMAN, 1992) e é justamente isso que está prejudicado. Nesse subtipo, temos diversas mutações nos domínios D¹ e D3 que alteram o sítio de ligação com o FVIII, prejudicando a sua ligação ao FvW.

É muito comum que haja confusão em relação à hemofilia A, porém hoje sabemos que ela possui uma herança ligada ao cromossomo X, enquanto que o tipo 2N é autossômica recessiva. Além disso, podemos utilizar a dosagem do FvW:FVIII como exame diferencial. (EWESTEIN, 1997).

2.1.3 Tipo 3

É a forma mais grave da doença e apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, onde sua prevalência gira em torno de 0,5 a 5 casos por milhão. Quase 90 mutações distintas estão associadas ao fenótipo do tipo 3, espalhadas por todo o gene do FvW, alterando completamente a síntese dos multímeros ou a sua montagem. (MEYER, 2009).

2.1.4 Síndrome de von Willebrand adquirida

Essa síndrome está relacionada a defeitos na concentração do FvW, estrutura ou função, porém sem estarem relacionadas a uma herança genética. Assemelha-se muito com a própria doença de von Willebrand nos achados laboratoriais: valores alterados de FvW:Ag, FvW:Rco ou FVIII, mas é causada por mecanismos distintos: (1) de forma autoimune há um aumento na depuração ou inibição do FvW; (2) aumento da ligação do FvW às plaquetas ou às superfícies celulares e (3) aumento induzido na proteólise do FvW (FEDERECI, 2000).

2.1.5 Pseudo-DvW

Mutações no gene da glicoproteína GpIb resulta no aumento de afinidade com os multímeros de alto peso molecular do FvW levando a uma determinada semelhança com o tipo 2B. Nos testes laboratoriais, o pseudo-DvW se apresenta com TS prolongado, níveis normais de FvW:Ag e FVIII, níveis baixos de FvW:Rco, plaquetopenia e aumento na agregação plaquetária em presença de baixas concentrações de ristocetina (RIPA) (KASPER, 2005). Por conta disso, o diagnóstico diferencial se torna difícil de ser realizado, mas se adicionarmos o FvW purificado com um PRP do paciente com Pseudo-DvW em um agregômetro, haverá agregação plaquetária, diferente do observado em pacientes com DvW do tipo 2B (FEDERICI, 1995).

Tabela 1: Classificação da Doença de von Willebrand

Tipo	Descrição
1	Deficiência quantitativa parcial do FvW
2	Defeitos qualitativos do FvW
2 A	Ausência/Redução dos multímeros de alto peso molecular, que levam à diminuição da adesão da GpIb plaquetária ao FvW.
2B	Aumento na afinidade do FvW com a GpIb
2M	Presença de todos os multímeros, com diminuição na adesão plaquetária ao FvW.
2N	Diminuição na afinidade pelo FVIII
3	Ausência do FvW

Adaptado: Sadler et. al, 2006

3.0 Diagnóstico Clínico da Doença

O diagnóstico da doença de von Willebrand é um caminho longo a ser percorrido, pois assim como foi descrito, há pacientes assintomáticos que provavelmente nunca saberão da doença e outros nos casos mais graves que morrem sem um diagnóstico concreto. Para isso foram estabelecidos caminhos por onde o diagnóstico se torna mais preciso e rápido, basicamente ele baseia-se em três condições: (1) histórico pessoal de sangramentos cutâneos ou mucosos; (2) histórico familiar e (3) exames laboratoriais que sugerem uma deficiência qualitativa ou quantitativa do FvW (figura 5).

O primeiro passo é sem dúvida analisar o histórico pessoal de sangramento em conjunto com o histórico familiar e para isso padronizou-se diversos questionários para que dessa maneira fosse possível analisar de prontidão

a espontaneidade, a gravidade, os locais, duração, a facilidade com que o sangramento pode ser parado com intervenção e se há uso concomitante de drogas que alteram a hemostasia.

As manifestações clínicas mais comuns são equimoses aos menores traumas, epistaxes, gengivorragia e no sexo feminino, menorragia (tabela 2). Porém analisar os menores sintomas pode ser complicado, porque até pequenos e raros episódios de sangramentos são eventos considerados normais dentro da população saudável.

“De acordo com a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH), os eventos hemorrágicos que podem sugerir a presença da DvW, são:

- Epistaxe prolongada sem história de trauma prévio, que não cessa após 20 minutos de compressão ou que leva à anemia ou que requer transfusão sanguínea.
- Sangramentos cutâneos ou equimoses que surgem após traumatismo mínimo ou mesmo sem trauma aparente, ou que necessita de intervenção médica.
- Sangramento prolongado em ferimentos cortantes, com duração igual ou superior a 15 minutos, que necessitam de intervenção médica.
- Sangramento oral, como gengivorragia, que necessitam de intervenção médica.
- Hemorragia gastrointestinal, que requer avaliação médica ou que causa anemia, aguda ou crônica, não explicada por lesão local.
- Sangramento prolongado decorrente de exodontia ou cirurgia.

- Menorragia não associada a problemas uterinos; ou produz anemia, ou necessita de intervenção médica.
- Sangramento prolongado de outras superfícies cutâneas ou mucosas, que necessita de tratamento médico” (Manual..., 2008, p.17-18).

A análise de sintomas e históricos são suficientes apenas como fator de triagem inicial, no entanto, para realizar um diagnóstico completo é necessário a execução de diversos exames laboratoriais que irá complementar todo esses dados.

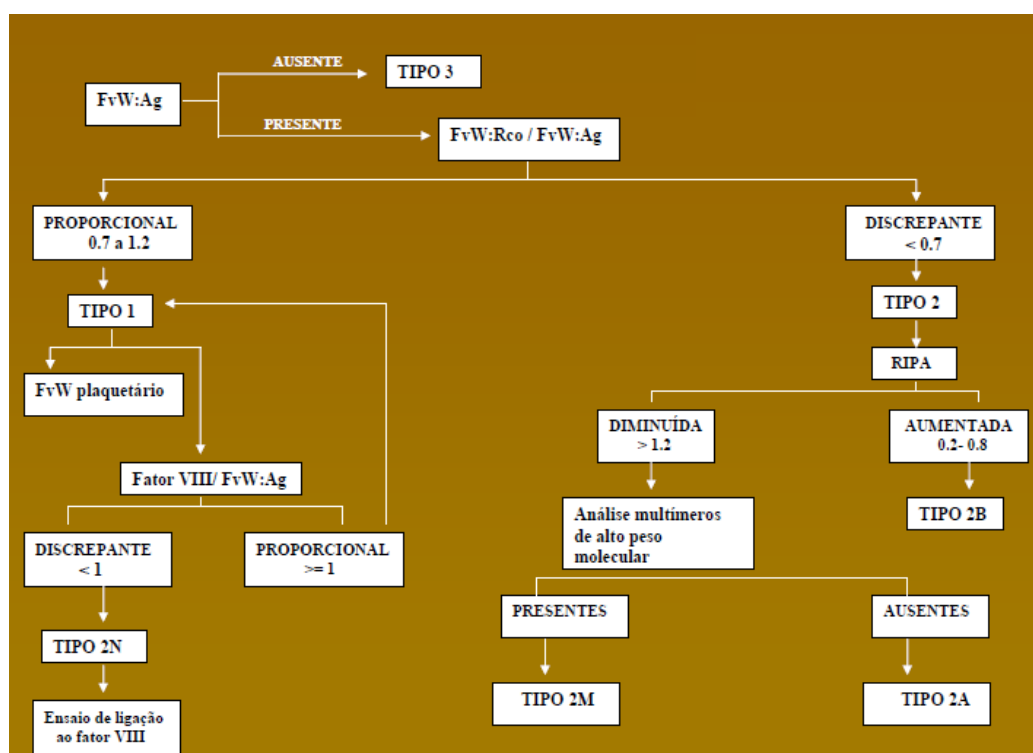


Figura 5: Guia para diagnóstico da Doença de von Willebrand. Adaptado: Federici, 1999.

3.1 Diagnóstico laboratorial

Apesar dos inúmeros exames disponíveis, dois podem ser utilizados para distinguir entre os casos leves/moderados dos casos graves da doença, o tempo de sangramento (TS) e o tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPA). No entanto, para uma investigação mais apurada dos outros tipos e subtipos a análise requer a utilização de exames confirmatórios como: a mensuração da proteína no plasma (FvW:Ag), a função do FvW na presença de ristocetina (FvW:Rco), agregação plaquetária em função de concentrações distintas de ristocetina (RIPA), análise multimérica, dosagem do FVIII, e análise da capacidade de ligação do fator VIII com o FvW (FvW:FVIII)(KASPER, 2005).

3.1.1 Tempo de Sangramento

É um exame insensível e não específico, mas que analisa bem a hemostasia primária. No caso da DVW ele pode estar normal ou alterado uma vez que o TS é dependente do FvW intra-plaquetário, mas sofre grande influência de diversos fatores como o uso de AAS (ácido acetilsalicílico) e antiinflamatórios não-hormonais (EWESTEIN, 1997).

3.1.2 FvW:Ag

É um imunoensaio que quantifica a concentração do FvW no plasma através da técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), através da aplicação de anticorpos específicos contra o FvW no plasma. (LAMME, 1985).

Os pacientes com a DVW com os tipos 1 possuem valores baixos de FvW:Ag, os do tipo 3 apresentam quase nulos, enquanto que os pacientes dos tipo 2 possuem valores normais ou limítrofes.

3.1.3 Fator VIII

O FvW desempenha papel fundamental na regulação da biossíntese, secreção, transporte e proteção dos agentes de proteólise plasmática. Por conta disso, os níveis do FVIII geralmente andam em paralelo com os encontrados para o FvW:Ag. Somente no caso 2N percebemos que a relação FVIII/FvW:Ag está diminuída devido aos defeitos na ligação com o FVIII.(EWESTEIN, 1997).

3.1.4 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina

Esse exame vai avaliar a afinidade do FvW pelas plaquetas e para a sua realização são necessários dois componentes básicos: plasma rico em plaquetas (PRP) e ristocetina em concentrações distintas. A diluição que possui a maior concentração de ristocetina é aquela que sempre irá causar agregação plaquetária em uma amostra normal de plasma rico em plaquetas, e a de menor concentração é aquela que geralmente não causa agregação, com exceção do subtipo 2B que possui uma resposta exagerada à ristocetina. (KASPER, 2005)

Uma outra forma de utilizar esse teste é a utilização de concentrações distintas de ristocetina a fim de localizar a menor concentração que causa alguma agregação plaquetária.

A RIPA apresenta-se normal ou discretamente reduzida no tipo1, mas no 2A a RIPA está diminuída (hipoagregante), ou seja, é necessário concentrações maiores de ristocetina para induzir uma agregação plaquetária. No entanto, no subtipo 2B e no pseudo-DvW há aumento na agregação plaquetária mesmo em baixas concentrações de ristocetina, justamente por estar relacionada ao ganho de função (EWESTEIN, 1997).

3.1.5 Análise multimérica

A análise da estrutura do FvW, através da eletroforese em gel de agarose, permite com que visualizemos a migração dos diversos multímeros de acordo com seu peso molecular. Esse exame dá uma clara noção entre os tipos e subtipos da doença (figura 6).

- Tipo 1: presença de todos os multímeros, porém em quantidades reduzidas.
- Tipo 2: ausência dos grande multímeros, exceto no subtipo 2M, que apresenta um padrão semelhante ao tipo 1.
- Tipo 3: redução importante ou ausência dos multímeros do FvW.

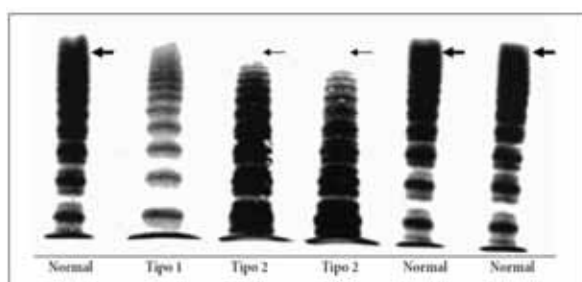


Figura 6: Os multímeros de alto peso molecular são visualizados na parte superior do gel (setas largas). Estes se encontram ausentes nos dois casos da DvW do tipo 2 (setas finas) e no tipo há uma diminuição de todos os multímeros.

3.1.6 Atividade do cofator de ristocetina (FvW:Rco)

A determinação do FvW:Rco é utilizada basicamente para se determinar a habilidade de interação do FvW com a glicoproteína GPIb de plaquetas normais, e ainda é o padrão ouro utilizado para mensurar a função do FvW, estando diminuído em todos os casos da Dvw. Esse método baseia-se no princípio de que a ristocetina causa agregação plaquetária na presença do FvW e utiliza-se de plaquetas fixadas em formalina, diluições do plasma do paciente presença do FvW (FEDERICI, 1999).

4.0 Tratamento

O tratamento da DvW tem como objetivo aumentar as concentrações plasmáticas do FvW quando estiver ocorrendo manifestações hemorrágicas ou antes de procedimentos invasivos. Dessa forma, aumentamos não só a adesão e agregação plaquetária que dependem dos multímeros de alto peso molecular, mas também os baixos níveis do FVIII, que necessita da proteína de von Willebrand como transportadora (RODEGHIERO et. al., 2009)

4.1 Medidas locais

A compressão prolongada (5-10min) pode ser muito útil em casos de pequenas lesões.

4.2 Desmopressina (DDAVP)

A desmopressina (1-deamino-8-D-arginina vasopressina ou DDAVP) é um análogo sintético da vasopressina (hormônio antidiurético) que estimula a secreção do FvW das células endoteliais e leva ao aumento concomitante do FVIII (Holmberg, 1992).

Essa alternativa de tratamento geralmente é utilizada para pacientes com o tipo 1 da doença e se torna muito efetiva porque, há moléculas intactas do FvW dentro das células endoteliais e o DDAVP vai estimular exatamente essa secreção. Nos subtipo 2 A há aumento do FVIII, porém sem alterar o TS, no subtipo 2M a resposta é variável e no subtipo 2N há um incremento na concentração do FVIII. O subtipo 2B e o tipo 3 são os únicos casos onde esse tratamento não é utilizado, no primeiro porque o DDAVP pode causar uma plaquetopenia transitória e no segundo caso porque não há resposta ao tratamento (MEYER, 2009).

4.3 Tratamento de reposição com concentrado de fator.

Esse tipo de tratamento somente é indicado nos casos onde não há resposta ao tratamento do DDAVP ou quando os níveis de FvW não atingem uma concentração satisfatória.

Normalmente pacientes com o tipo 2 e o tipo 3 são os que necessitam mais desse tipo de tratamento, e acabam recebendo o pool com concentrados dos FvW e FVIII, com correção nos níveis plasmáticos do FVIII, normalização do tempo de sangramento e diminuição do sangramento derivado da DvW (FEDERICI, 1999).

Assim a doença de von Willebrand é, das doenças hemorrágicas hereditárias, a mais prevalente, chegando até a um caso para cada 100 habitantes. Não obstante, ainda é bastante sub-diagnosticada em nosso meio, devido a vários fatores, tais como: desconhecimento da doença e das suas apresentações clínicas pelos profissionais da saúde, indisponibilidade de testes laboratoriais diagnósticos e dificuldades técnicas para a realização destes testes.

5.0 Objetivo

- Desenvolver a técnica de fixação de plaquetas em formalina para a realização do teste de cofator de ristocetina.
- Testes da metodologia *in house* em plasma de indivíduos normais e indivíduos com suspeita da DwW.

6.0 Materiais e Métodos

A atividade do cofator de ristocetina é o exame padrão ouro na avaliação da função do Fator de von Willebrand, e por conta disso é amplamente utilizado na rotina laboratorial na investigação da Doença de von Willebrand, uma vez que, o FvW:Rco sempre estará diminuído nos casos da doença.

A rotina laboratorial utiliza o agregômetro Aggram da Helena laboratories e o kit específico para análise da atividade do cofator da ristocetina. O kit mede a capacidade do plasma do paciente em aglutinar plaquetas fixadas em formalina na presença da ristocetina. O montante de aglutinação induzida pela ristocetina relaciona-se com a concentração do FvW e do percentual de atividade normal que pode ser medido através do agregômetro (BUDDE, 2002).

Nesse método utilizamos:

- Plaquetas liofilizadas;
- Plasma referência;
- Salina tris-tamponada
- Cofator ristocetina plasma controle anormal
- Ristocetina 10 mg/ml

6.1 Procedimento

6.1.1 Obtenção da amostra

Tudo de polipropileno com tampa rosqueável e graduado contendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante (citrato de sódio, 3,8%).

Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos, para obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o sobrenadante com pipeta plástica Pasteur, aspirando apenas $\frac{3}{4}$ do sobrenadante. Pode ser utilizado plasma congelado.

Na realização de uma curva padrão (referência) o aparelho solicita alguns dados, como: nome da curva, número do lote, no valor de referência colocar o estipulado na bula para o SARP (plasma padrão de referência) para o kit Helena.

Preparo da curva padrão:

Diluir o plasma de referência em tampão tris salina, como segue:

Tubo	Diluição	Plasma referência (µl)	Tampão (µl)	tris	Atividade atual %
1	1:2	100	100		50
2	1:4	100	300		25
3	1:8	100	700		12,5

Diluir o plasma teste e o plasma controle como segue:

Tubo	Diluição	Plasma referência (µl)	Tampão (µl)	tris	Atividade atual %
1	1:2	100	100		50
2	1:4	100	300		25

Preparo do blank de agregação:

Pipetar 250 µl de tampão tris-salina em uma cubeta de ensaio com agitador magnético. Este branco serve para ajustar em 100% a transmissão do agregômetro.

6.1.2 Realização do ensaio

Ajustar o agregômetro em 100% com o blank de agregação.

Pipetar 400 µl de suspensão de plaquetas e 50 µl de ristocetina em uma cubeta de ensaio.

Incubar por 3 minutos.

Colocar um agitador magnético na cubeta incubada e coloque no canal apropriado do agregômetro. Adicionar 50 µl da amostra de plasma diluída como indicado acima e deixe agregar por 5 minutos.

Repetir os passos de 1 a 5 com cada diluição de plasma.

As determinações dos valores de SLOPE máximo de aglutinação são realizadas automaticamente pelo agregômetro, baseados no traçado de uma curva referência obrigatória.

Os resultados são dados em porcentagem e o valor de referência para o kit é de 58-160%.

6.1.3 Preparação das plaquetas fixadas em formaldeído (técnica in house) (DIAGNOSIS..., 2010, p.59-62)

- Coletar o sangue em ACD ou utilizar 1 a 2 bolsas de concentrado de plaquetas (dentro do prazo de validade).
- Centrifugar o concentrado de plaquetas a 1500 g por um minuto à temperatura ambiente para retirada de hemácias contaminantes da bolsa.
- Centrifugar o concentrado durante 15 minutos, 1500g à temperatura ambiente.

- Durante o tempo de centrifugação, preparar os tampões de lavagem I e II.
- Descartar o sobrenadante utilizando bomba de vácuo e ressuspender as plaquetas (sem formação de bolhas) no tampão de **lavagem do tipo I** (30 ml) e manter a 37°C por 10 minutos.
- Centrifugar as plaquetas incubadas no tampão de **lavagem do tipo I** por 15 minutos a 1500 g a 37°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o botão plaquetário no tampão de **lavagem do tipo II** (20 ml).

Obs.: Caso o botão plaquetário ainda estiver contaminado com hemácias tentar retirá-las.

- Incubar por 10 minutos a 37°C.
- Enquanto as plaquetas estiverem incubadas, preparar a solução de formaldeído a 2% em tampão Plain Tyrode.
- Adicionar 20 ml de formaldeído 2% após os 10 minutos de incubação das plaquetas ressuspensas **no tampão de lavagem do tipo II**.
- Incubar a mistura por 60 minutos a 37°C (Obs.: Certificar-se se o nível de água do banho-maria cobre todo o volume da mistura).
- Após o tempo de incubação, deixar em geladeira até o dia seguinte.
- O conteúdo é transferido para dois tubos de 20 ml e se após o dia seguinte houver sedimentação de hemácias, tentar desprezá-las com o auxílio de ponteira plástica.
- Completar com Tampão Plain Tyrode até 50 ml.

- Centrifugar por 15 minutos a 1500 g à temperatura ambiente.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 50 ml de Tampão **Plain Tyrode (PT)**.
- Centrifugar a 1500 g por 15 minutos à temperatura ambiente.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender as plaquetas em 50 ml de **PT**.
- Centrifugar a 1500 g por 15 minutos à temperatura ambiente.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 10 ml de **PT** (1 bolsa) ou 20 ml (2 bolsas).
- Homogeneizar e fazer contagem de plaquetas (2 bolsas devem conter entre 2.500.000 a 3.000.000/mm³).
- Adicionar **azida sódica 10%** na proporção de 10 µl para cada mililitro de suspensão de plaquetas.
- Essa preparação é estável por 2 meses a 4°C e quando utilizada deve ser lavada com PT a fim de remover a azida sódica. As plaquetas devem ser diluídas a 280.000/mm³ para a execução do teste.

7.0 Resultados e Discussão

Os resultados do teste de cofator de ristocetina foram avaliados considerando o resultado como a porcentagem de atividade expressa para cada indivíduo, que foi lida contra uma curva-padrão realizada para a leitura dos testes.

Foram avaliados indivíduos considerados saudáveis e que não utilizavam medicamentos no momento da avaliação:

Tabela 2: FvW:Rco em indivíduos saudáveis

Indivíduos	Atividade Fvw:Rco %
Pool	86,135
1	90,730
2	67,405
3	52,010
4	48,990
5	62,540
Média	67,968
Desvio-padrão	19,088

E indivíduos com suspeita da Doença de von Willebrand:

Tabela 3: FvW:Rco em indivíduos com suspeita da DvW.

Pacientes	Atividade Fvw:Rco %
1	65,500
2	73,900
3	53,900
4	59,100
Média	63,100
Desvio-padrão	8,622

O teste do cofator da ristocetina é o exame considerado padrão-ouro na análise da função do Fator de von Willebrand e está diminuído em todos os tipos da doença. Por conta disso, é amplamente utilizado na rotina laboratorial apesar de muitas vezes ser de difícil avaliação, devido a diversos fatores que alteram a concentração plasmática do FvW.

O kit comercial de plaquetas liofilizadas é importado, de elevado custo e possui uma validade de 30 dias após sua reconstituição se conservado de 2°C a 8°C. Devido à baixa prevalência da DvW na população, muitas vezes não há uma grande quantidade de exames a serem realizados, fazendo com que os plasmas desses pacientes sejam congelados e armazenados até o momento onde apareça um número mínimo de pacientes.

O presente estudo pretende criar uma alternativa na utilização de plaquetas fixadas em formalina para a execução do teste da atividade do cofator da ristocetina. Isso levaria primeiramente a dois benefícios: à rotina, pois não seria necessário o acúmulo de plasma de pacientes, e às pessoas, levando agilidade no diagnóstico e início do tratamento.

Os testes do FvW:Rco com plaquetas fixadas em formalina foram inicialmente realizados com o objetivo de descrever a eficiência do método *in house* em comparação com kit comercial e apresentou-se em resultados abaixo do esperado verificando como valor de referência do kit comercial (58% - 160%), no entanto devemos considerar alguns itens:

- Não podemos comparar os resultados das plaquetas *in house* com o kit comercial. Para isso, é necessário que façamos um estudo de população para determinar o nosso valor de referência;

- Devemos avaliar em um segundo momento fatores que podem interferir na concentração do FvW plasmático, como: grupo ABO (pacientes do grupo O possuem uma concentração 30% menor de FvW do que os outros grupos sanguíneos), etnia, idade, uso de medicamentos, estresse e período menstrual nas mulheres (KASPER, 2004).

- Devido a baixa prevalência, nosso estudo não obteve o número necessário de pacientes para uma avaliação mais detalhada.

A doença de von Willebrand é o transtorno hemorrágico mais frequente, com uma prevalência estimada em torno de 1,1% da população geral (TOSSETTO et. al., 2007).

No Brasil, de acordo com dados do Registro Nacional de Pacientes com coagulopatias hereditárias até o final do ano de 2007 havia 2270 casos de DvW diagnosticados (Brasil, ministério da saúde, 2008). Esses dados justificam o pequeno número de pacientes que fizeram parte desse estudo, pois o período de realização do teste foi curto.

8.0 Conclusões

Os resultados do presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- A metodologia é viável para a utilização na rotina laboratorial, pois com ela o paciente poderia realizar o exame no mesmo dia da coleta, recebendo o resultado em até dois dias.

- Novos estudos aplicando essa metodologia serão necessários para que se obter um valor de normalidade da nossa população, viabilizando sua utilização na execução dos testes e permitindo eventual diminuição nos custos dos reagentes.

Anexos

Soluções e reagentes

Solução ACD pH 4.5

Citrato de sódio dihidratado -----10 g

Ácido cítrico monohidratado ----- 6 g

Dextrose ----- 8 g

H₂O q.s.p. ----- 400 ml

Soluções estoques de Tyrode (se mantidas à 4°C, podem ser conservadas por 2 meses)

Estoque I

NaCl -----16 g

KCl ----- 0.4 g

NaHCO₃----- 2 g

NaH₂PO₄ ----- 0.1 g

H₂O q.s.p. ----- 100 ml

Estoque II

MgCl₂.6H₂O ----- 2.033 g (0.1M)

H₂O q.s.p. ----- 100 ml

Estoque III

CaCl₂.6H₂O ----- 2.191 g (0.1M)

H₂O q.s.p. ----- 100 ml

Tampão Plain Tyrode pH 7.35

solução estoque I ----- 5 ml

H₂O q.s.p. ----- 100 ml

Solução de albumina bovina (BSA)

Albumina bovina ----- 17.5 g

Solução fisiológica (NaCl 0.9%) -----100 ml

Obs: estocar à - 80°C em alíquotas de 1ml

Creatinina Fosfo Quinase (CPK) tipo I de músculo de coelho frasco de 500U (liofilizado).

Fosfocreatina (CP) 500 mM

Preparar em Tyrode Plain, aliquotar vários tubos com 500µl e manter a -20°C

Mistura de CP + CPK (imediatamente antes do uso)

500 U CPK + 500 µl CP

Heparina 5000 U (manter alíquotas a - 20°C)

Formaldeído 37%

Tampão de lavagem das plaquetas pH 7.35 (solução A)

Estoque I ----- 2.5 ml

Estoque II ----- 0.5 ml

Estoque III ----- 1.0 ml

Dextrose ----- 0.05 g

BSA 17.5% ----- 1.0 ml

H₂O q.s.p. ----- 50 ml

HCl 0.5N para o acerto do pH

Tampão de lavagem tipo I

Solução A ----- 30 ml

Heparina ----- 0.3 ml

CP/CPK ----- 0.3 ml

Preparar na hora do uso e manter a 37°C

Tampão de lavagem tipo II

Solução A ----- 20 ml

CP/CPK -----0.2 ml

Preparar na hora do uso e manter a 37°C

Referências

BLOMBACK, M., Von Willebrand disease biology, *Haemophilia*, 2012, v.18, p.141-147.

BORCHGREVINC, K.F. A method for measuring platelet adhesiveness *in vivo*. *Acta Med. Scand.*, 1960, v.168, p.157-164.

BODÓ I. et al., Type 1 von Willebrand Disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers: a possible general mechanism for dominant mutations of oligomeric proteins., *Blood*, 2001, v.98, p.2973–2979.

BUTENAS S.; MANN K.G., Blood coagulation, *Biochemistry*, 2002, v.67,p.3-12.

BROWN S.A. et. al., Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process?, *J. Thromb Haemost*, 2003, v.8, p.1714–1717.

CASONATO A. et. al., Reduced von Willebrand factor survival in type 1 von Willebrand disease., *Blood*, 2002, v.99, p.180–184.

D'AMICO E.A.; VILLAÇA P.R., Fisiologia da hemostasia. In: Lorenzi FH, coordenadora. *Atlas de Hematologia: clínica hematológica ilustrada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.139-63.

DOBRKOVSKA A.; KRZENSK U.; CHEDIAK J.R; Pharmacokinetics, efficacy and safety of Humate-P in von Willebrand disease. Haemophilia,[s.l], 1998; v.4, p.33–9.

EWESTEIN, M.B Von Willebrand`s disease. Annu. Ver. Med, Boston, 1997, v.48, p. 525-42.

FEDERICI, A. B.; MANNUCCI, P. M., Diagnosis and management of von Willebrand disease., Haemophilia, Milan, 1999, v. 5, p. 28-37.

FEDERECI A.B.; CASTAMAN G.; MANNUCCI P.M., Guidelines for the Diagnosis and Management of von Willebrand Disease, Haemophilia, Italy, 2002; v.8, p.607-621.

FRANCO R.F., Fisiologia da coagulação do sangue e fibrinólise, Hematologia: fundamentos e prática, São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p.739-48.

FRANCO R.F., Trombofilias Hereditárias. Medicina, Ribeirão Preto 2001; v.34,p.248-257.

GINSBURG D.; NICHOLS C.W., von Willebrand Disease., Review in Molecular Disease, United States, 1997, v.76, p.1-15.

GINSBURG D., BOWIE E.J.W. Molecular genetics of von Willebrand disease., Blood, [s.l], 1992; v.79, p.2507-19.

GRALNICK H.R et al. Platelet von Willebrand factor: an important determinant of the bleeding time in type 1 von Willebrand's disease, Blood., [s.l], 1986; v68, p.58-61.

GAVAZOVA S. et. al., A mutation in the D4 domain of von Willebrand factor (VWF) results in a variant of type 1 von Willebrand disease with accelerated in vivo VWF clearance, Blood 2002,v.100, p.476:128.

HOLMBERG L.; NILSSON, I.M., von Willebrand's disease, Eur J Haematol, 1992, v.48, p.127-141

HOLMBERG L., Platelet - von Willebrand factor interactions in type IIB von Willebrand's disease, Scand J Haematol, 1985, v.35, p.305 - 314.

HOWARD M.A., HENDRIX L., FIRKIN B.C., Further studies on the factor VIII of a patient with a variant form of von Willebrand's disease. Thromb Res.,[s.l], 1979; v.14, p.609-19.

INGERSLEV J., GURSEL T., Diagnosis of von Willebrand Disease. Haemophilia,[s.l], 1999; 5(2): p. 50-56.

KASPER, C. K. Von Willebrand disease: an introductory discussion for young physicians. [S.l.: s.n.], 2004.

KAUFMAN R.J., Biological regulation of factor VIII activity. Annu. Rev. Med, 1992, v.43, p.325–99.

KRAEMER, M.R., Analysis os Von Willebrand factor structure by multimer analysis, American Journal of Haematology, 2010, v.85, p.510-514.

LAMME S., et al., The use of monoclonal antibodies in measuring factor VIII/von Willebrand factor. Scand. J. Clin. Lab. Invest.,Sweden, 1986, v.15, p.17–26.

LYONS S.E. et. al., Impaired intracellular transport produced by a subset of type II A vWD mutations, J. Biol Chem, Michigan,1992; v.267,p.4424-4454.

MAMENN E.F., Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease. Semin Thromb Hemost. 2002; v.28, p.109-110.

MENACHEME D. et.al., Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIIIc in patients with severe vonWillebrand disease (type 3 VWD): estimation of the rate of factor VIIIc synthesis., Br J. Haematol, 1996; v.94, p.740–5.

MEYER, F.D.; DECKMIN H.; VANHOORELBEKE K., von Willebrand factor to the rescue, Blood, 2009, v.113, p.5049- 5057

MILLER C.H, et al. Genetics of Classic von Willebrand Disease., Blood,[s.l],1979; v.54, p.117-136.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de diagnóstico e tratamento da Doença de von Willebrand, Brasília, 2008.

MURRAY E.W.; LILICRAP D., von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management., Transfus Med Rev., 1996, v.10, p. 93-110.

NICHOLS W.C.; GINSBURG D., Von Willebrand disease, Medicine, 1997, v.76, p.1-20.

NILSSON I.M., Kvinnlig hamofili och dess behandling med humant antihemofilglobulin.Nord Med 1956, v.56, p.1654-1656.

NILSSON M, BLOMBACK M , BLOMBACK B . von Willebrand's disease in Sweden, Its pathogenesis and treatment, Acta Med Scand, 1959, v.164, p.263-278.

NILSSON I.M., The History of von Willebrand Disease., Haemophilia., 1999, v.5, p.7-11.

NILSSON I.M.; HOLMBERG L., Genetic variants of Von Willebrand's disease, British medical journal, [s.l], 1972, v.3, p.317-320.

O'BRIEN L.A. et. al., Theoretical structural explanation for Group I, Group II, type 2A von Willebrand disease mutations, J Thromb Haemost, Canadá, 2005, v.3, p.796-797.

RUGGERI Z.M., Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J Thromb Haemost., 2003, v.7, p.1335-42.

RUGGERI Z.M.; ZIMMERMAN T.S., Variant von Willebrand.s disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets, J Clin Invest, 1980, v.65, p.1318-1325.

RUGGERI Z.M.; WARE J.L.; GINSBURG D., von Willebrand factor, Thrombosis and Hemorrhage, New York,1993, p.305-29.

SADLER J.E., von Willebrand factor: two sides of a coin, J. Thromb Haemost, St. Louis, 2005; v.3 p.1702–9.

SADLER J.E., A revised classification of vonWillebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Thromb Haemost., 1994, v.71, p.520–525.

SALZMAN E.W., Measurement of platelet adhesiveness: A simple in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease., J Lab Clin Med, Boston, 1963, v.62, p.724-735.

SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y., Coagulação: visão laboratorial da hemostasia primária e secundária. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter; 2006.

SPORN, L.A., Biosynthesis of von willebrand protein by human megakaryocytes, Journal clin. Invest, [s.l], 1985, v.76. p.1102-1106.

SPRINGER T.A., Biology and physics of von Willebrand factor concatamers, J Thromb Haemost, 2011, v.9, p.130–143.

STITES D.P. et. al., Factor VIII detection by hemagglutination inhibition: hemophilia A and von Willebrand's disease, Science, 1971, p.196-197

TOSETTO, A., CASTAMAN, G., RODEGHIERO, F., Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score., Blood, 2007, v.21, p.89-97.

VEREYRADIER A. et. al., Acquired von Willebrand syndrome: from pathophysiology to management, Thromb Haemost, 2000, v.84, p.175–182.

VON WILLEBRAND E.A., Hereditary pseudohemofilia. Finska Lakarsdlskapets Handlingar 1926, v.67, p.7-12.

WAGNER, D.D., Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells, Journal Biolo. Chem, 1983, v.258, p.2065-2067.

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA. Diagnosis of Hemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual. Canada.2010

ZIMMERMAN T.S.; RATNOFF O.D.; POWELLA E., Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease, J Clin Invest, 1971, v.50, p. 244-254.