

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DETERMINAÇÃO DO TESTE PADRÃO PARA DIAGNÓSTICO DE
CÃES COM DOENÇA DE VON WILLEBRAND**

CLÁUDIO ROBERTO SCABELO MATTOSO

**Botucatu - SP
Fevereiro 2007**

DADOS CURRICULARES

Cláudio Roberto Scabelo Mattoso

NASCIMENTO:	22.01.1976 - Campinas / SP
FILIAÇÃO:	Roberto Costa Mattoso Emília Helena Scabelo
1997/2001	Curso de Graduação em Medicina Veterinária Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu
2002/2003	Residência em Medicina Veterinária Área de Laboratório Clínico Veterinário Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu
2004/2007	Curso de Pós-Graduação Área de Clínica Veterinária Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu pai

Onde quer que você esteja sei

que estará orgulhoso

A minha mãe

pelo amor, carinho e

preocupação...sinto muito a sua falta

A minha Princesa

Pelo carinho, amor, companheirismo,

e apoio, sem você eu não conseguiria...

Agradecimentos

A minha orientadora Regina pelo apoio, incentivo e confiança

Ao meu co-orientador, não oficial,

mas com certeza contribuiu como se fosse,

João Pessoa, pelo apoio, confiança, orientação nos testes imunológicos e

por abrir as portas de seu laboratório

Muito obrigado!

A todos do Laboratório Clínico Veterinário, pelo apoio, auxílio e confiança;

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Provet Moema – São Paulo/SP, pela ajuda e apoio, sem vocês esse trabalho não se concluiria;

Ao Prof. James L. Catalfamo, PhD da Universidade de Cornell – Ithaca/NY que gentilmente cedeu os plasmas controle e pela orientação no desenvolvimento do projeto;

A Pós Graduada Andressa pelo auxílio na padronização do teste ELISA;

Ao Professor José Eduardo, pela orientação estatística e análise dos resultados;

A meus cães Hannah, Lannah, Thor, Brenda, PA e Tucaninha por me agüentarem, e por estarem sempre bem dispostos;

A FAPESP pelo auxílio pesquisa cedido;

A Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Doença de von Willebrand.....	26
2.2 Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO).....	37
2.3 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA).....	41
2.4 Antígeno do Fator von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA.....	42
3. OBJETIVO.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO).....	44
4.2 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA).....	46
4.3 Antígeno do Fator von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA.....	48
4.4 Análise Estatística.....	62
5. RESULTADOS	
5.1 Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO).....	63
5.2 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA).....	69
5.3 Antígeno do Fator von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA.....	73
6. DISCUSSÃO.....	100
7. CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

MATTOSO, C. R. S. **Determinação do teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand.** Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus Botucatu.

RESUMO

O fator de von Willebrand (FvW) realiza sua função promovendo a adesão plaquetária ao local de injúria vascular e funcionando como um estabilizador funcional para o fator VIII. As células endoteliais são o maior local de síntese e armazenamento do FvW. Também existe produção pelos megacariócitos, porém, as plaquetas caninas praticamente não armazenam o FvW. A doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum em homens e cães. Estudos mostram uma prevalência de 1 a 2% em humanos, sendo o tipo 1 o mais freqüente (60-80%), seguido pelo tipo 2 (15-30%) e pelo tipo 3 (5-10%). Em cães, a DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças, sendo encontrada com alta prevalência em Dobermanns. Os sinais clínicos mais comuns da DvW são sinais de alteração em hemostasia primária. Em cães, a DvW pode ser dividida em três tipos, de acordo com a fisiopatologia. A doença do tipo 1 é definida como uma deficiência parcial quantitativa do FvW. O tipo 2 consiste em perda desproporcional das formas multiméricas de alto peso molecular e o tipo 3 resulta de uma deficiência quantitativa grave do FvW. Os testes diagnósticos mais utilizados para a DvW são tempo de sangria, dosagem do antígeno do FvW, atividade de cofator da ristocetina, agregação plaquetária induzida pela ristocetina e análise multimérica do FvW. O objetivo deste estudo foi determinar e padronizar o teste padrão para diagnóstico de

cães com Doença de von Willebrand. Os testes estudados foram: Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO), Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA) e Antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA. Para análise do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) foi realizada a análise de variância segundo um delineamento em blocos, ao acaso, seguida pelo teste de Tukey utilizando o programa SAS versão 9.2. Para as variáveis Densidade Óptica (DO), Índice ELISA, Concentração FvW (%) e Log_{10} Concentração FvW foi realizada uma análise de regressão linear utilizando o programa Statística 6.0, tendo-se a reta ajustada com intervalo de confiança de 95%. Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%. O teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand foi o FvW:Ag.

PALAVRAS-CHAVES: Doença de von Willebrand, Hematologia, Cão, Hemostasia.

MATTOSO, C. R. S. **Gold standard screening test for von Willebrand disease in dogs.** Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus Botucatu.

ABSTRACT

von Willebrand factor (vWF) perform its function promoting platelet adhesion to the local of vascular injury and is important for the maintenance of FVIII stability and function. Endothelial cells are the major synthesis and storage site. Megakariocytes may also produce vWF, but canine platelets practically don't store vWF. Clinical signs more commonly seen in vWD are associated to primary hemostatic alterations. von Willebrand disease (vWD) is the most common inherited hemostatic disease in human and dogs. Studies had demonstrated a prevalence of 1 to 2% in human beings, being the type I the most common (60-80%), followed by type 2 (15-30%) and type 3 (5-10%). In dogs, vWD had already been diagnosed in more than 54 breeds, with a high prevalence in Dobermann Pinchers. In dogs, vWD may be divided in three types, according to the pathophysiology. Type 1 is defined as a quantitative partial deficiency of vWF. Type 2 consists of a disproportional loss of high molecular weight multimeric forms and type 3 results from a severe quantitative deficiency of vWF. The most used test for the diagnosis of vWD are the buccal mucosa bleeding time, measurement of vWF antigen, ristocetin cofactor activity test, platelet aggregation induced by ristocetin and multimeric analysis of vWF. The purpose of this work was to establish and standardize the gold standard test for screening test of dogs with von Willebrand disease. The following tests were studied: Buccal mucosa bleeding time (BMBT), Ristocetin induced platelet aggregation

(RIPA) and von Willebrand factor Antigen (FvW:Ag) – ELISA. For the BMBT an analysis of variance (ANOVA) with a randomized blocks design, followed by the Tukey test, performed with SAS statistics software version 9 was used. For the optical density (DO), ELISA index, FvW concentration (%) and Log_{10} vWF concentration, a linear regression test performed with Statistica 6.0 software, adjusting the line to a 95% confidence interval was used. In all analysis, the level of significance was considered 5%. The gold standard for screening test of dogs with von Willebrand disease was FvW:Ag.

KEY-WORDS: von Willebrand disease, Hematology, Dog, Hemostasis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	74
Figura 2. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	75
Figura 3. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800 e 1/1600) do plasma de referência (Animal 2), equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	76
Figura 4. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800 e 1/1600) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	77

Figura 5.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	80
Figura 6.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	81
Figura 7.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	85
Figura 8.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	86

Figura 9.	Diagrama de dispersão (valores Tabela 41) entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	88
Figura 10.	Diagrama de dispersão (valores Tabela 41) entre os valores de Índice ELISA (IE) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	89
Figura 11.	Diagrama de dispersão (valores Tabela 42) entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	90
Figura 12.	Diagrama de dispersão (valores Tabela 42) entre os valores de Índice ELISA (IE) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	91

Figura 13.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 6ª placa ELISA (10 e 11/dezembro/2006).....	93
Figura 14.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 7ª placa ELISA (11 e 12/dezembro/2006).....	94
Figura 15.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 8ª placa ELISA (12 e 13/dezembro/2006).....	95
Figura 16.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 9ª placa ELISA (13 e 14/dezembro/2006).....	96
Figura 17.	Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).....	97

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Esquema da microplaca (meia placa) mostrando como foram dispostas as amostras.....	54
Tabela 2. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=57.....	63
Tabela 3. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos, somente machos; n=26.....	65
Tabela 4. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos, somente fêmeas; n=31.....	66
Tabela 5. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de 7 animais (tabela 2) escolhidos ao acaso, para se realizar a análise estatística, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos.....	67
Tabela 6. Valores individuais da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais com histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=7.....	67
Tabela 7. Valores individuais da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais da raça Dobermann, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.....	67

Tabela 8.	Valores individuais do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) e do FvW:Ag (ELISA) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.....	68
Tabela 9.	Valores individuais do FvW:Ag (ELISA) dos Animais 2 e 3.....	69
Tabela 10.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 1,5 mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	69
Tabela 11.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 1,0mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	69
Tabela 12.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,5mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.....	70
Tabela 13.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,25mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.....	70
Tabela 14.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,125mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	70

Tabela 15.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,0625mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	71
Tabela 16.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,03125mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	71
Tabela 17.	Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 0,015625mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.....	71
Tabela 18.	Valores individuais, média e desvio padrão da Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de 1,5mg/mL (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária do homem; n=3.....	72
Tabela 19.	Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	73
Tabela 20.	Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos Animais 7, 8 e 9 – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	73
Tabela 21.	Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (Antígeno + substrato, Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato, Anticorpo de captura + substrato, Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	73

Tabela 22.	Valores da Densidade Óptica (DO) dos controles negativos (Soro e Criopobre) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	73
Tabela 23.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	74
Tabela 24.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos Animais 7, 8 e 9 . Substituição nas equações das Figuras 2 (Log_{10} %Concentração de FvW = $0,2952 + 1,1116x$) e 4 (Log_{10} %Concentração de FvW = $0,4176 + 1,0122x$) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	77
Tabela 25.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos controles negativos (Soro e Criopobre). Substituição nas equações das Figuras 2 (Log_{10} %Concentração de FvW = $0,2952 + 1,1116x$) e 4 (Log_{10} %Concentração de FvW = $0,4176 + 1,0122x$) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).....	78
Tabela 26.	Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	78
Tabela 27.	Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos Animais 4 e 5 – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	78
Tabela 28.	Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	78
Tabela 29.	Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	79

Tabela 30.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	79
Tabela 31.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos Animais 4 e 5 . Substituição nas equações das Figuras 5 (Log_{10} %Concentração de FvW = $-0,1549 + 1,2249x$) e 6 (Log_{10} %Concentração de FvW = $-0,0798 + 1,133x$) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	81
Tabela 32.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) . Substituição nas equações das Figuras 5 (Log_{10} %Concentração de FvW = $-0,1549 + 1,2249x$) e 6 (Log_{10} %Concentração de FvW = $-0,0798 + 1,133x$) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).....	82
Tabela 33.	Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) e dos testes de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato) utilizando microplaca MAXISORP e tampões de bloqueio PBS- leite em pó 10% e PBS-BSA2,5% – 3ª placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).....	82
Tabela 34.	Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) e dos testes de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato) utilizando microplaca MEDSORP e tampões de bloqueio PBS- leite em pó 10% e PBS-BSA 2,5%– 3ª placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).....	83
Tabela 35.	Valores da Relação da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) sobre a Densidade Óptica (DO) do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) utilizando microplacas MAXISORP (PBS-BSA 2,5%) e MEDSORP (PBS- leite em pó 10%) – 3ª placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).....	83

Tabela 36.	Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	84
Tabela 37.	Valores da Densidade Óptica (DO) de uma diluição (1/100) dos Animais 4, 5 e 6 – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	84
Tabela 38.	Valores da Densidade Óptica (DO) de uma diluição (1/100) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	84
Tabela 39.	Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	84
Tabela 40.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log ₁₀ %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	85
Tabela 41.	Valores do FvW:Ag dos Animais 4, 5 e 6 . Substituição na equação das Figuras 7 (Concentração (%) = -5,4557+221,5238*x) e 8 (Log₁₀ %Concentração FvW = 2,5096+1,3654*log10(x)) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006). – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	86
Tabela 42.	Valores do FvW:Ag dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) . Substituição na equação das Figuras 7 (Concentração (%) = -5,4557+221,5238*x) e 8 (Log₁₀ %Concentração FvW = 2,5096+1,3654*log10(x)) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).....	87
Tabela 43.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%), Log ₁₀ %Concentração FvW e Índice ELISA (IE) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2). Subtraído o valor da DO do branco (Substrato) - 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	87

Tabela 44.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%), Log_{10} %Concentração FvW e Índice ELISA (IE) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2). Subtraído o valor da DO do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) - 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	87
Tabela 45.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos Animais 4 e 5 . Substituição nas equações das Figuras 9 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$), 10 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$), 11 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$) e 12 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	92
Tabela 46.	Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm\text{IC}_{95\%}$) dos plasmas Controle (C1, C2 e C3) . Substituição nas equações das Figuras 9 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$), 10 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$), 11 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$) e 12 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).....	92
Tabela 47.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 6ª placa ELISA (10 e 11/dezembro/2006).....	93
Tabela 48.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 7ª placa ELISA (11 e 12/dezembro/2006).....	94
Tabela 49.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 8ª placa ELISA (12 e 13/dezembro/2006).....	95

Tabela 50.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log ₁₀ %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 9ª placa ELISA (13 e 14/dezembro/2006).....	96
Tabela 51.	Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log ₁₀ %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (Animal 2) - 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).....	97
Tabela 52.	Intra-teste. Média, Desvio-padrão e Coeficiente de variação (%) (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) - 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).....	98
Tabela 53.	Inter-teste. Média, Desvio-padrão e Coeficiente de variação (%) (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) - 6º teste ELISA-10 e 11/dezembro/2006; 7º teste ELISA-11 e 12/dezembro/2006; 8º teste ELISA-12 e 13/dezembro/2006; 9º teste ELISA-13 e 14/dezembro/2006 e 10º teste ELISA-14 e 15/dezembro/2006.....	98
Tabela 54.	Valores de absorbância, média, desvio padrão e duas vezes desvio padrão do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) observado em 8 dias diferentes - 1º, 3º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º teste ELISA.....	98
Tabela 55.	Limite de detecção do método. Valor médio e individual da substituição do valor de duas vezes desvio padrão do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) observado em 8 dias diferentes e substituído em diferentes equações (Figuras 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16 e 17).....	99
Tabela 56.	Valores individuais, média e desvio padrão do Coeficiente de determinação (R ²) e do Coeficiente de correlação observado em 8 dias diferentes - 1º, 2º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º teste ELISA.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ag + D + S	=	Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato
Ag + S	=	Antígeno + substrato
BSA	=	Albumina Sérica Bovina
C1	=	Plasma Controle tipo 1 DvW
C2	=	Plasma Controle tipo 2 DvW
C3	=	Plasma Controle tipo 3 DvW
Cap + D + S	=	Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato
Cap + S	=	Anticorpo de captura + substrato
CT	=	Tempo de fechamento
DO	=	Densidade Óptica
D + S	=	Anticorpo de detecção + substrato
DvW	=	Doença de Von Willebrand
FVIII	=	Fator oito coagulação
FvW	=	Fator de von Willebrand
FvW:CB	=	Atividade FvW baseada na ligação ao colágeno
FvW:Rco	=	Cofator da Ristocetina
GP	=	Glicoproteína
IE	=	Índice ELISA
p	=	nível de significância
PPP	=	Plasma pobre em plaquetas
PRP	=	Plasma rico em plaquetas
RIPA	=	Agregação plaquetária induzida pela ristocetina
TMB	=	3,3',5,5' tetrametilbenzidine
TS	=	Tempo de sangria
TSMO	=	Tempo de sangria da mucosa oral
mg/mL	=	Miligrama por mililitro
µg	=	micrograma

1. INTRODUÇÃO

A Doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos cães e também nos homens (Murray, & Lillicrap, 1996; Johnson, et. al., 1988).

Esta doença já foi diagnosticada em diversas raças de cães (Doods, 1989; Kraus & Johnson, 1989).

A doença resulta em uma deficiência ou anormalidade no Fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína necessária para a adesão plaquetária ao subendotélio vascular exposto e também muito importante na estabilização do fator VIII (Sadler, et. al., 1995).

O fenótipo da DvW é classificado com base na concentração e na estrutura multimérica do FvW (Johnson, et. al., 1988; Sadler, et. al., 1995). O tipo 1 da DvW é caracterizado por uma baixa concentração do FvW, porém com estrutura normal, já no tipo 2 existe uma baixa concentração e estrutura multimérica anormal do FvW. O tipo 3 se caracteriza pela ausência do FvW (Brooks, et. al., 2001).

Os sinais clínicos são compatíveis aos encontrados no ser humano, ou seja, alteração na hemostasia primária (Doods, 1984).

Em cães o diagnóstico é realizado pela mensuração da concentração do FvW plasmático (FvW:Ag) (Brooks, 1992). O tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) pode ser usado para detecção da expressão clínica da DvW (Doods, 1989) e como teste pré-cirúrgico (Stokol & Parry, 1993). A agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) pode estar diminuída, pois muitos tipos da DvW são caracterizados por hiporesponsividade a ristocetina (Federici et al., 2002).

O diagnóstico da DvW já está bem definido, existindo relatos e estudos sobre a doença em vários países (Estados Unidos, Austrália, Inglaterra, África do Sul, entre outros), porém não existe ainda nenhum relato no Brasil. Provavelmente está ocorrendo um sub-diagnóstico da doença pelo fato da não realização de testes diagnósticos de rotina.

A utilização de um teste de triagem é de suma importância para identificação dos animais doentes, sendo que posteriormente pode se realizar a caracterização completa da doença com identificação do subtipo envolvido.

Na Clínica Médica de Pequenos Animais os sinais clínicos de diátese hemorrágica são muito freqüentes, podendo ter diversas causas. Tais alterações na hemostasia se tornam um sério problema para os clínicos veterinários. O diagnóstico de alterações hemostáticas nem sempre é simples e direto, pois os animais portadores podem não demonstrar sinais clínicos de sangramento e com isso a evidenciação da doença pode ocorrer somente num ato cirúrgico ou traumático. A falta de um diagnóstico pode estar subestimando a importância da doença no Brasil, além do fato de que nem todos os subtipos descritos em humanos foram identificados em cães.

Apenas com o diagnóstico correto, poderemos diminuir a prevalência da doença com base numa seleção antes da reprodução. Por estes motivos a determinação do teste padrão para diagnóstico de cães com DvW é de vital importância para a diminuição da incidência e também para a melhor caracterização da doença, sendo então possível a realização de testes específicos para a posterior identificação do subtipo da DvW.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de von Willebrand

A doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos cães (Dodds, 1984; Johnson et al., 1988; Brooks, 1992; Brooks, 2000) e também nos homens (Cooler, 1987; Bithell, 1993; Chen et al., 1998; Schwarz et al., 1998; Triplet, 2000; White & Montgomery, 2000; Sadler & Blinder, 2001; Federici et al., 2002; Mammen, 2002).

O primeiro relato da DvW foi feito em 1926, pelo Professor Erik von Willebrand, que observou alterações hemorrágicas em muitos membros de uma mesma família. A partir destas observações, o Prof. von Willebrand começou a estudar esta alteração hemorrágica e neste relato caracterizou os sinais mais freqüentes como sendo sangramento nasal e por ocasião da troca dentária. O tempo de sangria se mostrava aumentado, porém com concentração de plaquetas normal, sendo este, segundo Prof. Von Willebrand, a característica mais importante da enfermidade. Acreditava-se que a herança da doença era autossômica dominante, com vários graus de penetrância ou mesmo recessiva (Nilsson, 1999).

A prevalência da DvW nos homens é de 0,82-1,6%, embora exista uma suspeita de subestimação desta prevalência devido a dificuldades no diagnóstico laboratorial desta doença (White & Montgomery, 2000). Num estudo epidemiológico em crianças na Itália, encontrou-se prevalência de 0,82% (Rodeguiero et al., 1987). Estudos recentes mostram uma prevalência da doença de 1 a 2%, sendo o tipo 1 o mais freqüente (60-80%), seguido pelo tipo 2 (15-30%) e pelo tipo 3 (5-10%) (Federici et al., 2002).

A DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos EUA, sendo encontrada com alta prevalência em Dobermanns (maior que 50%), Airedale Terrier e Scottish Terrier (Doods, 1989; Kraus & Johnson, 1989). A DvW já foi diagnosticada em inúmeras raças, entre elas, Airedale Terrier, Dobermann, Schnauzer gigante, Golden Retriever, Greyhound, Wolfhound irlandês, Pembroke Welsh Corgi, Scottish Terrier e Dachshund (Stokol et al., 1995a). A DvW tem uma alta prevalência em Dobermanns e Scottish Terriers nos EUA e na Austrália (Littlewood, 1991; Stokol & Parry, 1993). O modelo canino da DvW existe em muitas raças (Bouma et al., 1976; Brinkhous et al., 1985; Kraus & Johnson, 1989; Stokol et al., 1995b; Schwarz et al., 1998; Schwarz et al., 2002).

A herança da DvW é complexa e depende do tipo da doença. Esquemáticamente o tipo 3 é considerado recessivo, ao passo que muitas formas do tipo 2 são dominantes. O tipo 1 é usualmente considerado como dominante, embora existam diversas exceções pela heterogenicidade (Miller et al., 1979).

A DvW é causada por um defeito quantitativo e/ou qualitativo do fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular (Ginsburg & Bowie, 1992; Sadler & Gralnick, 1994; Mannucci, 1995; Sadler et al., 1995; Mazurier & Meyer, 1996; Murray & Lillicrap, 1996; Mohri et al., 1998; Budde & Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002). Em seres humanos um achado importante na DvW é que a falta do FvW funcional irá causar alteração na hemostasia primária e aumento do tempo de sangria “in vivo” (Brooks, 2000).

O FvW exerce sua função de duas maneiras, iniciando e suportando a adesão plaquetária ao local de injúria vascular (Wagner, 1990; Ginsburg & Bowie, 1992; Mannucci, 1995; Murray & Lillicrap, 1996; Mohri et al., 1998) e estabilizando funcionalmente o fator VIII plasmático (Wagner, 1990; Ginsburg & Bowie, 1992;

Mannucci, 1995; Murray & Lillicrap, 1996; Mohri et. al., 1998; Schwarz et al., 1998; Budde & Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002; Schwarz et al., 2002).

O gene que codifica a proteína do FvW, em humanos, está localizado no cromossomo 12 e possui 180 kilobases, sendo composto por 52 exons (Schwarz et al., 1998; Budde & Schneppenheim, 2001). O gene do FvW canino está localizado num autossomo, sendo que o cariótipo ainda não foi estabelecido (Brooks, 2000).

As células endoteliais são o maior local de síntese e armazenamento do FvW, sendo que também existe produção pelos megacariócitos (Budde & Schneppenheim, 2001). As plaquetas caninas praticamente não armazenam o FvW (Brooks, 2000).

O processamento intracelular do FvW se dá por uma série de eventos complexos. Os dímeros são formados no retículo endoplasmático por dimerização C-terminal das subunidades, seguido pela multimerização amino-terminal no complexo de golgi. O FvW sintetizado nas células endoteliais é armazenado em organelas intracelulares, chamadas de corpúsculos de Weibel Palade, podendo ser secretado constantemente. (Rosenberg et. al., 1998). Durante a biosíntese nas células endoteliais, o pré-pró-FvW sofre várias modificações sequenciais pós-tradução. Estes passos consistem na clivagem do peptídeo, glicosilação, dimerização C terminal do pró-FvW, sulfatação, processamento dos carboidratos, multimerização amino terminal e clivagem do pró-peptídeo vindo do local amino terminal da molécula do pró-FvW. O pró-peptídeo media a formação dos multímeros do FvW (Schwarz et al., 2002)

O FvW contém 2050 aminoácidos, sendo que a dimerização ocorre por pontes dissulfeto, da mesma maneira que a multimerização. A menor subunidade do FvW é o dímero com massa molecular de aproximadamente 540KDa, sendo que o

maior multímero excede 10000KDa (Budde & Schneppenheim, 2001). A proteína do FvW é uma das maiores proteínas encontradas no plasma (2mm), sendo possível sua visualização por técnicas de microscopia eletrônica (Schwarz et al., 2002).

Quando ocorre exposição do subendotélio, o FvW liga-se ao colágeno e apresenta uma conformação que facilita sua interação com as plaquetas (glicoproteína Ib da superfície plaquetária), sendo que a ponte intraplaquetária também é mediada pelo FvW (Brooks, 2000; Schwarz et al., 2002.). Esta função do FvW é essencial para a formação do tampão plaquetário no local onde a integridade vascular foi perdida (Schwarz et al., 2002). O receptor plaquetário GP Ib é o principal receptor para o FvW, sendo que o FvW também pode se ligar ao receptor GPIIb-IIIa, que é expressado quando as plaquetas estão ativadas (Triplet, 2000).

Em seres humanos, os sinais clínicos mais comuns da DvW são sinais de alteração em hemostasia primária. Podem ocorrer episódios de sangramento em pequenas injúrias, epistaxe prolongada, sangramento após extração dentária ou após cirurgias na cavidade oral, sangramentos em membranas mucosas e perda de sangue gastrointestinal, sendo que em mulheres a menorragia pode ser um achado predominante (Ingerslev & Gursel, 1999; Vischer & Moerloose, 1999; Triplet, 2000; Budde & Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002).

Em cães, os sinais clínicos são similares aos encontrados nos humanos (Schwarz et al., 1998), como as hemorragias em mucosa, sangramento prolongado em ferimentos cirúrgicos e em erupções dentárias, sendo também sinais típicos de alteração na hemostasia primária (Schwarz et al., 1998; Brooks, 2000; Budde & Schneppenheim, 2001; Schwarz et al., 2002). Nos tipos 2 e 3 da DvW ocorre uma severa tendência ao sangramento, ao passo que no tipo 1 o sangramento ocorre de uma maneira induzida (Brooks, 2000).

A DvW hereditária pode ser dividida em três tipos, de acordo com a fisiopatologia (Federici et al., 2002). O tipo 1, a forma mais freqüente da DvW, tem uma característica autossômica dominante em muitos casos, mas pode apresentar também uma transmissão recessiva devido a defeitos ocorridos. Os casos clínicos do tipo 1 são caracterizados por um sangramento leve a moderado, tempo de sangria normal ou prolongado, e baixos níveis de antígeno do FvW (FvW:Ag) e de atividade do cofator da ristocetina (FvW:Rco), além da estrutura multimérica normal.

O tipo 1 da DvW pode ser subdividido em 3 subtipos, o tipo 1 “plaquetas normais” que possui um conteúdo normal de FvW funcionalmente normal, o tipo 1 “plaquetas baixas” com baixa concentração de FvW funcionalmente normal e o tipo 1 “plaquetas discordantes” com concentração normal de FvW disfuncional.

Os pacientes do tipo 1 são muito heterogêneos, sabe-se que pacientes com baixos níveis de FvW plaquetário tem o tempo de sangria mais prolongado e normalmente sintomas mais graves, quando comparados aos pacientes com FvW plaquetário normal. Isto ocorre devido ao fato de que os pacientes que têm diminuição do FvW plaquetário, normalmente também têm baixos níveis de FvW armazenado nas células endoteliais. Existem algumas dificuldades no diagnóstico, visto que diversos fatores, como o diabetes, níveis hormonais (estrógeno e hormônios da tireóide) e exercícios leves podem levar a uma variação nos níveis do FvW. O tipo 1 dominante da DvW tem sido identificado como uma mutação no domínio D3 do FvW (Federici et al., 2002).

O tipo 2a, que é o subtipo mais freqüente do tipo 2 da DvW, tem padrão autossômico dominante, mas pode ter também um padrão recessivo. Os pacientes com o tipo 2a, têm o FvW:Ag normal ou levemente reduzido e FvW:RCo marcadamente diminuído, além de um padrão multimérico anormal caracterizado por

perda de multímeros de alto peso molecular e diminuição da concentração dos multímeros de baixo peso molecular. (Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002)

Este tipo da DvW tem mutações localizadas dentro do domínio A2 da subunidade do FvW. Existem dois tipos de mutação responsáveis pelo tipo 2A da DvW. Uma leva ao transporte defeituoso do FvW intracelular prejudicando a produção, armazenamento e secreção de grandes multímeros do FvW e a outra predispõe à formação de multímeros mais sensíveis a proteólise plasmática. Outra causa da deficiência de multímeros de alto peso molecular na DvW do tipo 2A é um defeito no processamento pós tradução, incluindo defeitos na dimerização C terminal e na polimerização N terminal. (Federici et al., 2002).

O tipo 2b pode ser identificado devido a uma resposta aumentada a ristocetina. A estrutura multimérica do FvW, tanto plaquetário, quanto endotelial, está normal. (Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002) O padrão é autossômico dominante, mas já existem relatos de um padrão aparentemente recessivo.

Os achados típicos da DvW 2b são, trombocitopenia leve, com aumento do volume médio plaquetário (MPV), tempo de sangria prolongado, FvW:Ag e FVIII de diminuídos a normal, baixo FvW:RCo, aumento da agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA). Existem mais de 20 mutações diferentes neste tipo da DvW. Uma inserção pequena já foi identificada, sempre localizada dentro do domínio A1 da subunidade do FvW. A ligação anormal à glicoproteína plaquetária já foi confirmada por estudos de expressão na maioria destes mutantes (Federici et al., 2002).

O tipo 2M (M de multímero) inclui variantes em que a ligação às plaquetas está dificultada, mas a distribuição multimérica do FvW está normal. (Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002) Este fenótipo pode ser produzido por

mutações que inativam os locais específicos para ligação, seja das plaquetas ou do colágeno. Os resultados laboratoriais são similares aos encontrados no tipo 2A, porém existem formas multiméricas de alto peso molecular. As mutações do tipo 2M têm sido localizadas dentro do domínio A1 da subunidade do FvW e mostram ligação reduzida à GPIb plaquetária. Os pacientes com o tipo 2M Vicenza têm baixos níveis do FvW:Ag, porém possuem grandes multímeros acima da quantidade normal, similarmente ao observado no plasma após infusão de desmopressina. A mutação do tipo 2M Vicenza foi identificada no domínio D3 (Federici et. al., 2002).

O tipo 2N (N de Normandia) foi caracterizado por níveis normais do FvW:Ag e do FvW:RCo, além de estrutura multimérica normal, porém, existem baixos níveis plasmáticos de FVIII. (Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002) Isto seria compatível com a hemofilia A, porém o padrão de herança não está ligado ao cromossomo X, mas sim a um autossomo recessivo. Ocorre uma diminuição da meia vida plasmática do FVIII por não se ligar ao FvW devido a anormalidades intrínsecas de tal fator. O tipo 2N pode ser causado por várias mutações, todas localizada no domínio D' e no D3 da subunidade do FvW. A co-herança da mutação do tipo 2N com os alelos do tipo 1 da DvW pode levar a um aumento da expressão do tipo 1 da DvW (Federici et. al., 2002).

O tipo 3 (grave) da DvW é causado por diminuição da biossíntese do FvW, sendo caracterizado por níveis indetectáveis do FvW no plasma e nas plaquetas (Vischer & Moerlose, 1999; Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002). O FvW é também o carreador do FVIII, com isso os níveis plasmáticos do FVIII estarão muito diminuídos. (Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002) Em consequência os pacientes com o tipo 3 da DvW têm uma tendência grave ao sangramento, caracterizada não apenas por sangramentos mucocutâneos, mas também por

hemoartrose e hematomas. O padrão de herança do tipo 3 da DvW é autossômico recessivo. As deleções gênicas predispõe a formação de aloanticorpos. A presença destes anticorpos tem sido demonstrada “in vitro” pela capacidade do plasma do paciente de inibir a RIPA de um plasma rico em plaquetas normal. Esses anticorpos são responsáveis pela grave resposta clínica quando se realiza o tratamento com concentrado de FVIII-FvW, podendo ocorrer até uma resposta anafilática (Federici et al., 2002). As mutações mais comuns do tipo 3 são a deleção total ou parcial, inversão e transposição. (Ginsburg & Sadler, 1993; Zhang et. al., 1993; Mohlke et al., 1996; Federici et al., 2002).

O tipo plaquetário ou pseudo DvW é uma doença plaquetária primária, caracterizada por uma diminuição da afinidade do complexo GPIb/IX/V plaquetário ao FvW normal. Esses pacientes têm achados clínicos e laboratoriais similares aos encontrados no tipo 2b da DvW, o tempo de sangria está prolongado, os níveis de FVIII e FvW estão variavelmente reduzidos, a RIPA está aumentada, a análise multimérica revela uma deficiência dos multímeros de alto peso molecular. A falta de multímeros de alto peso molecular é provavelmente devida à diminuição da utilização “in vivo”, secundariamente à diminuição da interação entre o FvW (anormal no 2B e normal no tipo plaquetário da DvW) e seu receptor (normal no 2B e anormal no tipo plaquetário da DvW) (Federici et al., 2002).

A DvW adquirida (DvWA) é similar à doença congênita com relação aos achados laboratoriais, sendo caracterizada por tempo de sangria prolongado e diminuição dos níveis plasmáticos de FVIII-FvW. (Federici et al., 2002). O tempo de sangria varia de normal a prolongado e o FvW:RCo está diminuído ou ausente, ao passo que o FvW:Ag varia de diminuído a normal (Mohri et. al., 1998) Esta condição aparece associada a doenças linfó e mielo proliferativas, doenças imunológicas ou

neoplasias. A caracterização dos casos reportados mostra que o FvW está sendo normalmente sintetizado, porém está sendo rapidamente removido por 4 possíveis mecanismos patogênicos: autoanticorpos específicos, anticorpos não específicos que formam imunocomplexos circulantes e favorecem a eliminação do FvW, absorção por clones de células malignas, aumento da degradação proteolítica (Federici et al., 2002).

A classificação da DvW em cães se dá com base na severidade clínica, na concentração plasmática do FvW e nas estruturas multiméricas do FvW (Brooks, 2000). A classificação da DvW em cães é dividida em 3 tipos, sem subdivisões (Sato & Parry, 1998; Brooks, 2000).

A doença do tipo 1 é definida como uma deficiência parcial quantitativa do FvW, sendo que a concentração plasmática do FvW está diminuída (menor que 50%), porém o fator que está presente tem uma estrutura multimérica normal e normalmente suporta a interação plaquetária “in vitro”, sendo também a forma mais comum (Brooks, 2000).

A doença do tipo 2, em cães, consiste em uma perda desproporcional das formas multiméricas de alto peso molecular e uma redução significativa da aglutinação plaquetária “in vitro”, sendo uma forma análoga da classificação 2A para humanos. Diferentemente do que ocorre nos homens, este tipo da doença é infrequente em cães (Brooks, 2000)

O tipo 3 da DvW é uma deficiência quantitativa grave do FvW (menos que 0,1%). Nos cães, a correlação entre a hemofilia A e a DvW é menor que em humanos (Schwarz et. al., 1998).

Alguns testes de triagem podem ser utilizados na DvW. A contagem de plaquetas esta usualmente normal, porém pode ocorrer uma leve trombocitopenia em pacientes com o tipo 2b ou o tipo plaquetário da DvW (Federici et al., 2002).

A avaliação da DvW geralmente inclui o tempo de sangria (TS) (Werner et. al., 1992). O TS normalmente está aumentado, mas pode estar normal em pacientes com uma forma branda da DvW (tipo 1) (Federici et al., 2002). Segundo Werner et. al. (1992) o TS pode estar normal em metade dos pacientes com o tipo 1 da DvW. O TS pode ser realizado por um único observador, utilizando-se a técnica de Ivy modificada. Deve-se realizar uma incisão longitudinal, com o mínimo de pressão, sendo que o sangue deve ser sugado com um papel até que pare de extravasar, com um intervalo de tempo de 15 segundos (Frith & Warlow, 1988). O TS é muito utilizado como estimativa da hemostasia primária, porém pode não ser específico e sensível em muitos casos. O TS pode ser afetado pela idade, sexo, exposição ao sol, hematócrito e massa plaquetária. O TS normal varia de 4 a 8 minutos (Mohri et al, 1998), ou de 2,5 a 9,5 minutos (Kerényi et. al., 1999).

O TS realizado na pele não é indicado em Medicina Veterinária devido à dificuldade de padronização da técnica. (Forsythe & Willis, 1989) Outra técnica que pode ser utilizada é o tempo de sangria da mucosa bucal (TSMB), que irá avaliar somente a hemostasia primária, pelo fato de envolver somente a microcirculação. O TSMB é a melhor maneira de se testar a função da hemostasia primária. O aumento do TSMB foi relatado em cães com doenças associadas com alteração da hemostasia primária, como trombocitopenia, terapia com aspirina e DvW (Brassard & Meyers, 1991). Forsythe & Willis (1989) relataram o TSMB usando o Simplate II e obtiveram uma média de 163 ± 46 segundos, enquanto Jergens et. al. (1987) também utilizando o Simplate II, obtiveram uma média de 157 ± 29 segundos, sendo que os

valores de referência para o TSMB variam de 1,7 a 4,2 minutos. O TSMB pode ser realizado pela técnica descrita por Stokol & Parry, 1993.

O FvW:Ag pode ser mensurado no plasma por muitos métodos imunológicos (imunoeletroforese, ELISA e radioimunoensaio), sendo que estes métodos irão quantificar a concentração total plasmática do FvW (Federici et al., 2002; Vischer & Moerloose, 1999). O nível plasmático do FvW:Ag foi estimado em 10mg/ml (Ingerslev, 1987). Os valores para o FvW:Ag são indetectáveis no tipo 3, podendo estar diminuídos no tipo 1 e de normal a diminuído no tipo 2 da DvW (Federici et al., 2002). A diminuição dos parâmetros funcionais corresponde à redução do FvW (Schneppenhein, 2001). Em cães, o ELISA é o método mais utilizado para a quantificação do FvW:Ag (Benson et. al., 1991; Brooks, 1992; Johnson et. al., 1988). Segundo Stokol et. al. (1995a) 61% dos Dobermanns testados em seu estudo foram considerados portadores para o gene da DvW, mostrando uma alta prevalência da doença nesta raça de cães.

O método para atividade do cofator da ristocetina (FvW:RCo) explora a ligação do FvW com o complexo GP Ib plaquetário, sendo um teste funcional para atividade do FvW (Brooks, 2000; Schneppenhein, 2001; Federici et al., 2002).

O FvW pode ser analisado por eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose de baixa resolução separa os multímeros do FvW que são convencionalmente separados em multímeros de baixo, intermediário e alto peso molecular. No tipo 1 da DvW todos os multímeros estão presentes, ao passo que no tipo 2 os multímeros de alto e intermediário peso molecular são perdidos (Federici et al., 2002).

A agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) é mensurada pela mistura de diferentes concentrações de ristocetina no plasma rico em plaquetas

(PRP) do paciente num agregômetro (Schneppenhein, 2001; Federici et al., 2002). Os resultados são expressos em concentração de ristocetina (mg/mL) capaz de induzir 30% de aglutinação. Muitos tipos e subtipos da DvW são caracterizados por hiporesponsividade a ristocetina (Federici et al., 2002).

Alguns testes adicionais podem ser utilizados no diagnóstico da DvW, entre eles o tempo de fechamento (closure time-CT) e métodos de atividade do FvW baseados na ligação ao colágeno (FvW:CB). A avaliação do CT com o uso do PFA 100 (analisador de função plaquetária) permite uma rápida e simples determinação do FvW dependente da função plaquetária. Esse sistema se apresentou sensível e reprodutível na avaliação do FvW. (Federici et al., 2002). Recentemente, o analisador de função plaquetária (PFA 100) foi recomendado como triagem de disfunção plaquetária em testes “in vitro”. Neste aparelho, a complexidade da função plaquetária é testada em alto fluxo (5000 a 6000 segundos⁻¹), o que corresponde às condições apresentadas nas pequenas artérias (Kerényi et. al., 1999). O CT pode servir como triagem para pacientes com a DvW (Fressinaud et. al., 1998). Em pacientes com DvW e que apresentaram TS maior que 10 minutos, observou-se que o CT estava uniformemente aumentado (Kerényi et. al., 1999). O FvW:CB monitora a diminuição dos multímeros de alto peso molecular (Schneppenhein, 2001).

2.2 Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO)

O tempo de sangria (TS) é considerado um indicador confiável da capacidade hemostática “in vivo” (Harker & Slichter, 1972; Bowie & Owen, 1979; Steiner et. al., 1979; Lind, 1984), sendo utilizado para identificar pacientes com tendência a sangramentos clinicamente relevantes. Segundo Zimmerman & Ruggeri (1982) o TS

é também sensível para deficiências ou anormalidades no Fator de von Willebrand (FvW).

O TS alterado não é um indicador específico para disfunção plaquetária. Existem diversos fatores que podem alterar o TS, entre eles contagem de plaquetas, hematócrito, administração recente de medicamento, desordens metabólicas, tipo sanguíneo e técnicas utilizadas no TS (Bowie & Owen, 1980; Roper-Drewinko et. al., 1981; Mielke, 1984; Caekebeke-Peerlink et. al., 1989; Koster et. al., 1989).

Em medicina humana o TS da pele tem sido utilizado para avaliação da hemostasia primária (Forsythe & Willis, 1989). Várias técnicas de TS da pele foram utilizadas em Medicina humana, entre elas o TS de Duke (incisão com auxílio de lanceta no lóbulo da orelha) (Duke, 1910) e o TS de Ivy (incisão no braço após aplicação de manguito de pressão) (Ivy et. al., 1935). O TS de Ivy foi melhorado posteriormente utilizando-se um aparelho para padronização da incisão (Mielke et. al., 1969).

As técnicas de TS desenvolvidas para Medicina humana necessitam de modificações para o uso em modelos caninos, devido a diferenças na espessura da pele, comprimento do pêlo e cooperação do paciente (Thomas et. al., 1979; Kingdon & Hassell, 1981; Giles et. al., 1982; Dodds, 1982; Chabbat et. al., 1989; Forsythe & Willis, 1989; Brassard & Meyers, 1991). O aumento do TS em cães pode estar associado com DvW (Dodds, 1970; Myers & Pierce, 1972; Dodds, 1975; Bouma et. al., 1976; Brinkhous et. al., 1985), uremia (Dodds, 1982), tratamento com aspirina (Thomas et. al., 1979; Dodds, 1982), ibuprofeno (Dodds, 1982), dextran (Thomas et. al., 1979) e hipotermia (Thomas et. al., 1979).

O TS da pele é menos efetivo na avaliação da hemostasia primária em animais. A profundidade da incisão (1mm) é inadequada para produzir hemorragia

na pele dos animais, necessitando-se utilizar incisões mais profundas (Thomas et. al., 1979) e utilizar outros locais para se realizar a incisão (Hayashi et. al., 1984; Kopp et. al., 1985). Nas incisões mais profundas ocorre a formação de coágulo, prejudicando a observação do TS (Dodds, 1982).

Existem várias técnicas descritas para o TS em cães:

- Tempo de sangria microscópico direto – isolamento e transecção de um vaso subcuticular (face medial da coxa) ou de um vaso mesentérico e determinação do TS por exame microscópico direto (Hovig et. al., 1967; Hovig et. al., 1968; Dodds, 1975);
- Tempo de sangria dermal – com o animal anestesiado, o membro posterior é tricotomizado, sendo que o TS é realizado na pele após a aplicação de um manguito de pressão. Como existe uma variação considerável da espessura da pele, dependendo do local da incisão e também da raça do animal, são necessárias múltiplas incisões para determinar a média do TS dermal, sendo então uma técnica de difícil padronização (Johnson et. al., 1978; Thomas et. al., 1979; Forsythe & Willis, 1989).
- Tempo de sangria gengival (Template) – ressecção de parte da gengiva com o animal anestesiado (Kingdon & Hassell, 1981);
- Tempo de sangria da cutícula – corte da cutícula da unha (cortador de unha) com o animal anestesiado (Giles et. al., 1982). O TS da cutícula pode estar aumentado tanto em alterações de hemostasia primária, quanto em alterações de hemostasia secundária e não tem uma boa repetibilidade (Forsythe & Willis, 1989);
- Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) – o animal é posicionado em decúbito lateral, sendo realizada uma incisão superficial e pequena na

mucosa oral com auxílio de um aparelho (padronização de profundidade, extensão e pressão da incisão) (Jergens et. al., 1987; Forsythe & Willis, 1989).

O TSMO tem diversas vantagens, quando comparado às outras técnicas utilizadas em cães. A técnica é menos dolorosa, pouco invasiva, não necessita de anestesia, utiliza poucos equipamentos e os resultados são consistentes. O TSMO tem sido avaliado em cães com alteração de hemostasia primária, como trombocitopenia, DvW, azotemia e terapia com aspirina (Jergens et. al., 1987; Brassard & Meyers, 1991). O TSMO é a melhor maneira de se avaliar a hemostasia primária “in vivo” (Brassard & Meyers, 1991).

A incisão realizada no TSMO é superficial e por isso envolve apenas os vasos sanguíneos microscópicos, acessando apenas a hemostasia primária (Sato et. al., 2000). O TSMO envolve uma incisão que evita injúrias a vasos sanguíneos macroscópicos, fazendo com que exista uma maximização da especificidade para avaliação de defeitos na hemostasia primária (Jergens et. al., 1987).

O TSMO foi realizado por diversos autores em cães aparentemente saudáveis (sem uso de sedação ou anestesia). Forsythe & Willis (1989) relataram o TSMO usando o Simplate II[®] em 19 cães obtendo o resultado médio de 163 ± 46 segundos (109 a 285 segundos). Jergens et. al. (1987) relataram o TSMO usando o Simplate II[®] em 34 cães obtendo o resultado médio de 157 ± 29 segundos (100 a 249 segundos).

O TSMO torna-se aumentado com a utilização de xilazina (sedação) ou halotano (anestesia), porém esse aumento não é significativo (Jergens et. al., 1987; Sato et. al., 2000).

Os valores de referência para o TSMB variam de 1,7 a 4,2 minutos (Stokol & Parry, 1993).

2.3 Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA)

O FvW causa a aglutinação plaquetária “in vitro” sob várias condições (Johnson et. al., 1981).

A antibiótico ristocetina tem a capacidade de agregar plaquetas humanas na presença do FvW, sendo que esta capacidade é deficiente em seres humanos que apresentam a DvW (Howard & Firkin, 1971; Olson et. al., 1975; Howard et. al., 1979).

O FvW humano tem habilidade de sustentar a aglutinação induzida pela ristocetina em plaquetas homólogas frescas (Weiss et. al., 1973) ou lavadas e fixadas (Allain et. al., 1975; MacFarlane et. al., 1975), sendo que esta característica é a base para a utilização de vários métodos similares que são utilizados no diagnóstico e estudo da DvW.

Existem outras substâncias que podem induzir aglutinação plaquetária de maneira dependente do FvW, entre elas destacam-se o Polybrene (Rosborough & Swaim, 1978; Coller, 1980; Rosborough et. al., 1980), outros polímeros sintéticos (Rosborough, 1980) e coagulinina ou botrocetina (Read et. al., 1978).

Existe uma especificidade relacionada a espécie na aglutinação plaquetária sustentada pelo FvW. O FvW canino purificado sustenta a aglutinação induzida pela ristocetina em plaquetas (caninas e humanas) frescas e lavadas, entretanto o FvW humanos purificado só sustenta a aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina em plaquetas humanas frescas e lavadas, não conseguindo sustentar a aglutinação em plaquetas caninas frescas e lavadas (Leis et. al., 1980).

2.4 Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) - ELISA

O ELISA é um dos testes mais utilizados em pesquisa biomédica (Frey et. al., 2000).

Em 1971 foi descrito um teste imunológico que quantificava o FvW em pacientes humanos com DvW pelo uso de um anticorpo de precipitação preparado em coelhos (Zimmerman et. al., 1971). Este desenvolvimento iniciou diversos estudos sobre FvW e DvW (Sakariassen et. al., 1979; Hoyer, 1981; Tuddenhan, 1989).

A quantificação do FvW:Ag plasmático é essencial para o diagnóstico da DvW (Johnstone & Norris, 1984).

Antigamente se usava a Imunoelectroforese de Laurell (EIA) para determinação do FvW:Ag, porém esta técnica requeria pessoas qualificadas para a realização da eletroforese e um trabalho intensivo para sua realização. A sensibilidade do EIA é baixa (Hoyer, 1972; Rudzki et. al., 1979; Yoder et. al., 1981).

O ELISA requer equipamentos mais comuns que o EIA e oferece uma maneira prática de se quantificar o FvW:Ag (Bartlett et. al., 1976; Ingerslev, 1987).

O FvW pode ser precipitado com a utilização de anticorpo específico (Slappendel et. al., 1992).

A mensuração e identificação do FvW:Ag requer a utilização de anticorpos espécie específicos (Benson et. al., 1992), porém pode ocorrer identificações parciais entre o anticorpo anti FvW de determinada espécie e plasmas de diferentes outras espécies (Bennett & Ratnoff, 1973; Bouma et. al., 1976; Cotter et. al., 1978; Shaw et. al., 1979; Coppola et. al., 1980; Rotblat et. al., 1982; Winocour et. al., 1983; Johnson et. al., 1986; Benson et. al., 1992).

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi determinar e padronizar o teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Seguiu-se a seguinte ordem para determinação e padronização do teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand:

- Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO)**
- Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA)**
- Antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) - ELISA**

4.1. Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO)

O tempo de sangria da mucosa oral foi realizado conforme Marks, 2000 modificado. Com o animal em decúbito lateral ou esternal, o lábio superior era evertido. Uma incisão padronizada era realizada de maneira vertical (perpendicular a margem do lábio) diretamente abaixo do dente canino maxilar com o auxílio de uma lanceta¹, sendo que neste momento começava-se a marcar o tempo (cronômetro) e com um papel filtro circular absorvia-se o sangue, sempre 1 a 2 mm abaixo da incisão. Parava-se o cronômetro assim que o sangramento cessava.

Realizou-se coleta de sangue em tubo a vácuo² com anticoagulante sal disódico do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 10%, na proporção de 0,1 mL para cada 5 mL de sangue, para a contagem de plaquetas. A contagem de plaquetas foi realizada em contador eletrônico de células³. A morfologia celular plaquetária foi observada através de esfregaços sangüíneos, corados pelo método Romanowski (Jain, 1993).

¹ Lancelett® Implant

² Vacutainer®, Becton-Dickinson, Ind, Cirúrgicas Ltda, Brasil,

³ CELL – DYN 3500 R, Abbott Diagnostic®, USA,

O TSMO foi realizado em:

- 54 animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos. Foi realizado um sorteio de 7 animais desse grupo para que fosse realizada a análise estatística com um n próximo entre grupos;
- 7 animais com histórico de sangramento prévio durante procedimento cirúrgico e sem sinais de distúrbios hemostáticos;
- 5 animais da raça Dobermann, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos;
- 1 animal com concentração conhecida do FvW:Ag (dosado na Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY), cujo valor foi gentilmente cedido pelo Laboratório Clínico Veterinário do Instituto Brasileiro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias – Provet Moema – **Animal 1:** macho, 4 anos, Dobermann – FvW:Ag = 48%;
- 4 animais com concentração conhecida do FvW:Ag (dosado na Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY) – **Animal 2:** fêmea, adulta, sem raça definida, sem sinais de distúrbios hemostáticos – FvW:Ag = 129%; **Animal 3:** fêmea, adulta, sem raça definida, com aumento de sangramento em ferida cirúrgica após ovariosalpingohisterectomia – FvW:Ag = 96%; **Animal 4:** fêmea, 6 anos, Dobermann – FvW:Ag = 62% e **Animal 5:** fêmea, 3 anos, sem raça definida – FvW:Ag = 195%;

Os testes de TSMO foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ UNESP Botucatu e no Laboratório Clínico Veterinário do Instituto Brasileiro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias – Provet Moema.

4.2. Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA)

Foram escolhidos dois animais para se realizar a padronização da RIPA, sendo que os mesmos já haviam sido utilizados anteriormente:

- **Animal 2:** fêmea, adulta, sem raça definida, sem sinais de distúrbios hemostáticos;
- **Animal 3:** fêmea, adulta, sem raça definida, com aumento de sangramento em ferida cirúrgica após ovariosalpingohisterectomia;

Ambos os animais eram provenientes do canil da Pós Graduação da FMVZ UNESP Botucatu.

Primeiramente colheu-se sangue da veia jugular em tubo de plástico fundo cônico⁴ com citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante, na proporção de 1 parte para 9 partes de sangue, em banho de gelo para determinação do FvW:Ag (Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY), para comprovação de que se tratavam de animais livres da DvW. A amostra de sangue foi imediatamente centrifugada a 1500 rpm por 15 minutos, para a obtenção do plasma, que foi transferido para tubo tipo eppendorf⁵, congelado rapidamente em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C até o envio.

Para a padronização da RIPA foram colhidas amostras de sangue da veia jugular em:

- tubos de plástico fundo cônico⁶ com citrato de sódio a 3,8%, como anticoagulante, na proporção de 1 parte para 9 partes de sangue, para a realização

⁴ Tubos de plástico fundo cônico c/ tampa- 15mL – Alfa[®]

⁵ Tubos eppendorffs graduados- Kima[®]

⁶ Tubos de plástico fundo cônico c/ tampa- 15mL – Alfa[®]

da agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA). Primeiramente contava-se o número de plaquetas do sangue total para saber se o animal tinha número normal de plaquetas (150.000 a 500.000 plaquetas por microlitro de sangue). A separação do plasma rico em plaquetas (PRP) foi realizada imediatamente após a colheita por centrifugação a 500 rpm por 20 minutos, sendo que a contagem plaquetária do PRP sempre se encontrava no intervalo de 100.000 a 300.000 plaquetas por microlitro de PRP. Após separação do PRP, o restante do sangue foi novamente centrifugado, agora a 1.500 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

A agregação plaquetária induzida pela Ristocetina foi realizada observando-se a agregação plaquetária⁷ do plasma rico em plaquetas em contato com a Ristocetina⁸, segundo Ruggeri et. al. (1980). O PRP e o PPP (450uL) foram colocados na cubeta do agregômetro, ficando em repouso em aquecimento por pelo menos 20 minutos. Primeiramente utilizava-se o PPP para zerar o aparelho e depois o PRP para se iniciar a agregação. Utilizou-se ristocetina (50uL) nas seguintes concentrações: 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,015625 mg/mL. O tempo de agregação variou de 5 a 10 minutos.

Também se coletou sangue de 2 seres humanos, sadios (alunos da Pós-Graduação) em tubos de plástico fundo cônico com citrato de sódio a 3,8%, como anticoagulante, na proporção de 1 parte para 9 partes de sangue, para a realização da agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA). A separação do plasma rico em plaquetas (PRP) foi realizada imediatamente após a colheita por centrifugação a 800 rpm por 10 minutos, sendo que a contagem plaquetária do PRP sempre se encontrava no intervalo de 100.000 a 300.000 plaquetas por uL de PRP.

⁷ Agregômetro de plaquetas NETLAB 2000 – ZÊNITE®

⁸ Ristocetin reagent – Helena diagnostics®

Após separação do PRP, o restante do sangue foi novamente centrifugado, agora a 1.500 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A agregação plaquetária induzida pela ristocetina foi realizada da mesma forma como descrita acima, porém utilizou-se ristocetina apenas na concentração de 1,5mg/mL.

Os testes de RIPA foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ UNESP Botucatu.

4.3. Antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) - ELISA

A dosagem do antígeno do fator de von Willebrand foi realizada pelo método de ELISA direto (teste semi quantitativo comparativo), com anticorpo anti-FvW canino⁹, conforme a técnica preconizada pelo fabricante com algumas alterações.

Os anticorpos fornecidos foram:

- **Anticorpo de captura** – 0,5mL de anticorpo policlonal purificado anti FvW canino para realização da adsorção da placa;
- **Anticorpo de detecção** – 0,5mL de anticorpo policlonal conjugado com peroxidase anti FvW canino para detecção do FvW que sofreu captura.

As seguintes soluções foram necessárias para utilização durante o teste ELISA:

- **Tampão de adsorção (Tampão Carbonato Bicarbonato):** 1,59g de Na_2CO_3 e 2,93g de NaHCO_3 , completado para 1 litro de solução. O pH foi ajustado para 9,6. A solução foi armazenada por até 1 mês (2-8°C);
- **PBS (base para tampão de lavagem e tampão de bloqueio):** 8,0g de NaCl, 1,15g de Na_2HPO_4 , 0,2g de KH_2PO_4 e 0,2g de KCl, completado para 1 litro de

⁹ Sheep anti-canine VWF-Research Diagnostics Inc®

solução. Se necessário o pH era ajustado para 7,4. A solução foi armazenada por até 1 mês (2-8°C);

- **Tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%)**: Foi adicionado 0,5mL de Tween-20¹⁰ em 1 litro de PBS. A solução foi armazenada por até 1 mês (2-8°C);

- **Tampão de bloqueio (PBS-BSA1%, PBS-leite em pó 10% e PBS-BSA 2,5%)**: Foram testadas as três soluções de bloqueio.

-**PBS-BSA1%**: Foi dissolvido 1% de BSA¹¹ em PBS numa quantidade suficiente para o bloqueio dos poços utilizados. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

-**PBS-leite em pó 10%**: Foram dissolvidos 10% de leite em pó¹² em PBS numa quantidade suficiente para o bloqueio dos poços utilizados. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

-**PBS-BSA 2,5%**: Foram dissolvidos 2,5% de BSA¹¹ ou BSA¹³ em PBS numa quantidade suficiente para o bloqueio dos poços utilizados. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

- **Diluyente das amostras e anticorpo de detecção (HBS-BSA 1%-T20, HBS-leite em pó 10%-T20 e HBS-BSA 2,5%-T20)**: Foram testados os três tipos de diluyente de amostras.

- **HBS-T20**: Foram dissolvidos 5,95g de HEPES e 1,46g de NaCl em 200mL de água Milli-Q¹⁴ (18,2MQ), posteriormente foi adicionado 0,25mL de Tween-20. O pH foi acertado para 7,2 e o volume final foi completado para 250mL, com água Milli-Q. A solução foi alíquotada e armazenada a -20°C.

¹⁰ Pharmacia Biotech® code nº17-1316-01

¹¹ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

¹² Leite em pó Molico® Desnatado

¹³ BSA Sigma® – B4287 lote 87H1144 25g

¹⁴ Milli-Q Plus

- **HBS-BSA 1%-T20:** Foi dissolvido 1% de BSA¹⁵ na solução HBS-T20 numa quantidade suficiente para a diluição das amostras e do anticorpo de detecção. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

- **HBS-leite em pó 10%-T20:** Foram dissolvidos 10% de leite em pó¹⁶ na solução HBS-T20 numa quantidade suficiente para a diluição das amostras e do anticorpo de detecção. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

- **HBS-BSA 2,5%-T20:** Foram dissolvidos 2,5% de BSA¹⁵ ou BSA¹⁷ na solução HBS-T20 numa quantidade suficiente para a diluição das amostras e do anticorpo de detecção. A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

- **Tampão do cromógeno-substrato (Tampão Citrato Acetato):** 4,1g de acetato de sódio diluído com 500mL de água Milli-Q (0,1mol/L); 2,1g de ácido acético diluído com 100mL de água Milli-Q (0,1mol/L). Utilizou-se 300 mL da solução de acetato de sódio e solução de ácido acético em quantidade suficiente para se ajustar o pH da solução final para 6,0.

- **Cromógeno (3,3',5,5' tetrametilbenzidine - TMB):** 10mg TMB¹⁸ em 1mL de DMSO¹⁹, acondicionados em tubo tipo eppendorf e mantidos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

- **Solução cromógeno + substrato:** Em um tubo de ensaio foi adicionado 12mL do tampão Citrato Acetato, 120uL do cromógeno (TMB 10mg/mL) e 2,5uL do substrato (H₂O₂ 30%). A solução foi preparada imediatamente antes da utilização;

- **Solução de fim de reação:** HCl 2M.

- **Microplacas:** Foram utilizados 2 tipos de Microplacas – MaxiSorp²⁰ e MedSorp²⁰, com certificado de uniformidade.

¹⁵ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

¹⁶ Leite em pó Molico® Desnatado

¹⁷ BSA Sigma® – B4287 lote 87H1144 25g

¹⁸ Sigma®T2885 lote 084K0614 1g

¹⁹ Sigma® D5879 lote 27H0411

PLASMAS UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DO TESTE ELISA

Para realização do teste ELISA (teste semiquantitativo comparativo) foi necessária à utilização de um plasma de referência e optou-se por utilizar o mesmo animal que já havia sido utilizado na padronização da RIPA, por já se conhecer o valor (%) do FvW:Ag (ELISA) – realizado na Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY.

- **Plasma referência - Animal 2:** fêmea, adulta, sem raça definida, sem sinais de distúrbios hemostáticos.

O Prof. James L. Catalfamo, PhD, diretor da Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY gentilmente cedeu plasmas controle dos três tipos da doença (1mL de plasma canino congelado).

- **Plasma Controle tipo 1 DvW (C1):** FvW:Ag = $11 \pm 0,25\%$;

- **Plasma Controle tipo 2 DvW (C2):** FvW:Ag = $9 \pm 0,2\%$;

- **Plasma Controle tipo 3 DvW (C3):** FvW:Ag = 0%;

O Laboratório Clínico Veterinário do Instituto Brasileiro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias – Provet Moema – São Paulo/SP gentilmente cedeu amostras de plasma canino de dois animais (animais 4 e 5) com concentração conhecida do FvW:Ag (dosado na Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY).

- **Animal 4:** fêmea, 6 anos, Dobermann – FvW:Ag = 62%

- **Animal 5:** fêmea, 3 anos, sem raça definida – FvW:Ag = 195%

Além dos animais já citados foram testados mais quatro animais sem concentração conhecida do FvW:Ag.

- **Animal 6:** macho, 4 anos, Dobermann, sem sinais de distúrbios hemostáticos.
- **Animal 7:** fêmea, adulta, Pastor Alemão, sem sinais de distúrbios hemostáticos.
- **Animal 8:** macho, adulto, Australian Cattle Dog, sem sinais de distúrbios hemostáticos.
- **Animal 9:** fêmea, adulta, sem raça definida, sem sinais de distúrbios hemostáticos.

O animal 6 foi proveniente do Canil do Sr. José de Souza Jr, da cidade de Valinhos/SP e os animais 7, 8 e 9 foram provenientes do canil da Pós Graduação da FMVZ UNESP Botucatu.

PROCEDIMENTO DO TESTE ELISA

- **Adsorção das placas:** Foi realizada uma diluição 1/100 do anticorpo de captura no tampão Carbonato Bicarbonato imediatamente antes da utilização. Foram aplicados 50uL por poço e após a aplicação a placa permaneceu por 12 a 15 horas a 2-8°C (temperatura de geladeira).
- **Bloqueio:** As placas foram esvaziadas e 100uL do tampão de bloqueio foram aplicados a cada poço. O bloqueio foi realizado a temperatura ambiente por um período de 120 minutos.
- **Lavagem:** Foram realizadas 5 lavagens²¹ com Tampão de lavagem.
- **Preparação e aplicação das amostras:** Foram realizadas diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (animal 2) no Diluente das amostras e anticorpo de detecção para confecção da curva de regressão que serviu para cálculo das demais concentrações do FvW:Ag.

²¹ Lavadora de placa ELx50 Biotek®

As amostras de plasma dos controles (C1, C2 e C3) e dos animais teste (animais 4, 5, 6, 7, 8 e 9) sofreram diluição de 1/100 e 1/200 no Diluente das amostras e anticorpo de detecção. Foram aplicados 50uL de cada diluição a cada poço, sendo que após a aplicação a placa permaneceu a temperatura ambiente por 90 minutos.

- **Lavagem:** Foram realizadas 5 lavagens com Tampão de lavagem.
- **Aplicação do anticorpo de detecção:** Foi realizada uma diluição 1/100 do anticorpo de detecção no Diluente das amostras e anticorpo de detecção imediatamente antes da utilização. Foram aplicados 50uL por poço, sendo que após a aplicação a placa permaneceu a temperatura ambiente por 120 minutos.
- **Lavagem:** Foram realizadas 5 lavagens com Tampão de lavagem.
- **Aplicação da Solução cromógeno + substrato:** Foram aplicados 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço, sendo que após a aplicação a placa permaneceu a temperatura ambiente e sob agitação²² por 15 minutos.
- **Aplicação da Solução de fim de reação:** Foram aplicados 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.
- **Leitura:** A leitura²³ da placa foi realizada utilizando-se um programa de computador²⁴ (comprimento de onda 450nm).

²² Agitador Kline®

²³ Leitora ELISA Multiskan EX Original – Labsystems®

²⁴ Programa Genesis Lite versão 3,03 – Life Sciences® (UK) Ltda

Tabela 1. Esquema da microplaca (meia placa) mostrando como foram dispostas as amostras.

	1	2	3	4	5	6
A	ref1/100	ref1/100	1 100	C1 100	Cap+S	Cap+S
B	ref1/200	ref1/200	1 200	C1 200	Cap+D+S	Cap+D+S
C	ref1/400	ref1/400	2 100	C2 100	D+S	D+S
D	ref1/800	ref1/800	2 200	C2 200	S	S
E	ref1/1600	ref1/1600	3 100	C3 100	S	S
F	ref1/3200	ref1/3200	3 200	C3 200	S	S
G	Ag+S	Ag+S	soro	soro	S	S
H	Ag+D+S	Ag+D+S	c pobre	c pobre	S	S

Legenda: Ref: Plasma referência; 1, 2 e 3: numeração dos animais testados; C1, C2 e C3: Plasmas controle (tipo1, 2

e 3 DvW); c pobre: crioprecipitado pobre; Ag: Antígeno; S: Substrato; D: Anticorpo de Detecção; Cap: Anticorpo de captura.

As diluições do plasma de referência (ref1/100; ref1/200; ref1/400; ref1/800; ref1/1600 e ref1/3200), os testes de ligação inespecífica (Ag+S, Ag+D+S, Cap+S, Cap+D+S e D+S) e os controles negativos (soro e c pobre) foram feitos sempre em duplicata, as diluições das amostras testadas (1/100; 1/200) e dos controles (C1 100; C1 200; C2 100; C2 200; C3 100; C3 200) foram feitas em amostra única.

Em alguns poços se aplicava somente a Solução cromógeno + substrato (S) e a Solução de fim de reação. Realizava-se a média das densidades ópticas (DO) desses poços e considerava-se esse valor como branco.

Sempre após a leitura realizava-se a subtração do valor da DO do branco das DOs dos demais poços.

Ao plasma de referência foi sempre atribuído o valor de 100% de FvW:Ag, sendo que por substituição na curva de regressão chegava-se aos demais valores de FvW:Ag (teste semi quantitativo comparativo). Sempre se realizava a transformação dos valores da %Concentração do FvW do plasma controle para $\text{Log}_{10}\%$ Concentração, para que a curva de regressão se comportasse de maneira linear e não exponencial.

Foram realizados os seguintes testes para observação de possíveis ligações inespecíficas:

- Antígeno + substrato (Ag + S):

- Não se aplicava anticorpo de captura;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do plasma do animal 2 no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/90 minutos;
- não se aplicava anticorpo de detecção;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

- Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato (Ag + D + S):

- Não se aplicava anticorpo de captura;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do plasma do animal 2 no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/90 minutos;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de detecção no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

- Anticorpo de captura + substrato (Cap + S):

- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de captura no tampão Carbonato Bicarbonato – 12 às 15h/2-8°C;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;

- não se aplicava diluição do plasma do animal;
- não se aplicava anticorpo de detecção;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

- Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato (Cap + D + S):

- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de captura no tampão Carbonato Bicarbonato - 12 às 15h/2-8°C;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;
- não se aplicava diluição do plasma do animal;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de detecção no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

- Anticorpo de detecção + substrato (D + S):

- Não se aplicava anticorpo de captura;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;
- não se aplicava diluição do plasma do animal;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de detecção no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

Foram realizados os seguintes testes como controles negativos (Soro e Crioprecipitado pobre):

- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de captura no tampão Carbonato Bicarbonato - 12 às 15h/2-8°C;
- realizava-se o bloqueio da placa - 100uL/temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 de SORO no Diluente das amostras e anticorpo de detecção e aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 de CRIOPOBRE no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/90 minutos;
- aplicava-se 50uL de uma diluição 1/100 do anticorpo de detecção no Diluente das amostras e anticorpo de detecção - temperatura ambiente/120 minutos;
- aplicava-se 50uL da Solução cromógeno + substrato por poço - temperatura ambiente/sob agitação/15 minutos;
- aplicava-se 25uL da Solução de fim de reação (HCl 2M) por poço.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o intuito de se estabelecer o melhor protocolo para as reações de ELISA, foram realizadas as seguintes variações: quanto ao tipo da placa (MaxiSorp ou MedSorp); o tampão de bloqueio (PBS-BSA1%, PBS-leite em pó 10% e PBS-BSA 2,5%) e o Diluente das amostras e anticorpo de detecção (HBS-BSA 1%-T20, HBS-leite em pó 10%-T20 e HBS-BSA 2,5%-T20). O restante do procedimento foi realizado como descrito acima.

O 1º teste ELISA foi realizado nos dias 01 e 02/agosto/2006. Não se dispunha ainda dos plasmas controle. As disposições gerais do teste foram as seguintes:

- A microplaca utilizada foi a **MaxiSorp**²⁵;
- O tampão de bloqueio utilizado foi o **PBS-BSA**²⁶ 1%;
- O Diluente das amostras e anticorpo de detecção utilizado foi o **HBS-BSA**²⁶ 1%-T20;
- Foram realizadas as diluições seriadas do plasma controle para confecção da curva de regressão;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Ag+S, Ag+D+S, Cap+S, Cap+D+S e D+S) e os controles negativos (soro e criopobre);
- Foram testados os Animais 7, 8 e 9.

O 2º teste ELISA foi realizado nos dias 07 e 08/novembro/2006. As disposições gerais do teste foram as seguintes:

- A microplaca utilizada foi a **MaxiSorp**;
- O tampão de bloqueio utilizado foi o **PBS-BSA**²⁶ 1%;
- O Diluente das amostras e anticorpo de detecção utilizado foi o **HBS-BSA**²⁶ 1%-T20;
- Foram realizadas as diluições seriadas do plasma controle para confecção da curva de regressão;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Cap+D+S e D+S);
- Foram utilizados os plasmas Controle (C1, C2 e C3);
- Foram testados os Animais 4 e 5;

²⁵ Nunc®-Immuno Plates

²⁶ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

O 3º teste ELISA foi realizado nos dias 20 e 21/novembro/2006.

As disposições gerais destes testes foram as seguintes:

- Foram utilizadas duas microplacas – **MaxiSorp e MedSorp**²⁷;
- Para cada microplaca foram utilizados dois tampões de bloqueio – **PBS-BSA**²⁸**2,5% e PBS- leite em pó**²⁹**10%**;
- Quando se utilizou o tampão de bloqueio **PBS-BSA**²⁸**2,5%** utilizou-se o Diluente das amostras e anticorpo de detecção **HBS-BSA**²⁸**2,5%-T20**;
- Quando se utilizou o tampão de bloqueio **PBS- leite em pó**²⁹**10%** utilizou-se o Diluente das amostras e anticorpo de detecção **HBS- leite em pó**²⁹**10%-T20**;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Cap+D+S e D+S);
- Foram utilizados os plasmas Controle (C1, C2 e C3);
- Foi calculada a relação da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** sobre a Densidade Óptica (DO) do teste de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato**) utilizando microplacas **MAXISORP (PBS-BSA**²⁸**2,5%) e MEDSORP (PBS- leite em pó**²⁹**10%).**

O 4º teste ELISA foi realizado nos dias 27 e 28/novembro/2006. As disposições gerais do teste foram as seguintes:

- A microplaca utilizada foi a **MedSorp**;
- O tampão de bloqueio utilizado foi o **PBS- leite em pó**³⁰**10%**;
- O Diluente das amostras e anticorpo de detecção utilizado foi o **HBS- leite em pó**³⁰**10%-T20**;

²⁷ Nunc®-Immuno Plates

²⁸ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

²⁹ Leite em pó Molico® Desnatado

³⁰ Leite em pó Molico® Desnatado

- Foram realizadas as diluições seriadas do plasma controle para confecção da curva de regressão;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Cap+D+S e D+S);
- Foram utilizados os plasmas Controle (C1, C2 e C3);
- Foram testados os Animais 4, 5 e 6.

O 5º teste ELISA foi realizado nos dias 29 e 30/novembro/2006. As disposições gerais do teste foram as seguintes:

- A microplaca utilizada foi a **MaxiSorp**;
- O tampão de bloqueio utilizado foi o **PBS- BSA³¹ 2,5%**;
- O Diluente das amostras e anticorpo de detecção utilizado foi o **HBS- BSA³¹ 2,5%-T20**;
- Foram realizadas as diluições seriadas do plasma controle para confecção da curva de regressão;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Cap+D+S e D+S);
- Foram utilizados os plasmas Controle (C1, C2 e C3);
- Foram testados os Animais 4 e 5;
- Foi calculado o Índice ELISA (IE).
$$IE = \frac{DO \text{ teste} - DO \text{ negativo}}{DO \text{ positivo} - DO \text{ negativo}}$$

Onde DO negativo = DO testes de ligação inespecífica (Cap+D+S) e DO positivo = DO da diluição 1/100 do plasma de referência **Animal 2**.

O 6º teste ELISA foi realizado nos dias 10 e 11/dezembro/2006.

As disposições gerais destes testes foram as seguintes:

- A microplaca utilizada foi a **MaxiSorp**;

³¹ BSA Sigma® – B4287 lote 87H1144 25g

- O tampão de bloqueio utilizado foi o **PBS- BSA³² 2,5%**;
- Foram realizadas as diluições seriadas do plasma controle para confecção da curva de regressão;
- O Diluente das amostras e anticorpo de detecção utilizado foi o **HBS- BSA³² 2,5%-T20**;
- Foram realizados os testes de ligação inespecífica (Cap+D+S e D+S);
- Foram utilizados os plasmas Controle (C1, C2 e C3);
- Foram testados os Animais 4, 5 e 6.

O 7º teste ELISA foi realizado nos dias 11 e 12/dezembro/2006, o 8º teste ELISA foi realizado nos dias 12 e 13/dezembro/2006, o 9º teste ELISA foi realizado nos dias 13 e 14/dezembro/2006, o 10º teste ELISA foi realizado nos dias 14 e 15/dezembro/2006. Todos os testes seguiram as mesmas disposições do 6º teste ELISA.

Foi calculado o Intra-teste: 6 amostras (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) foram aplicadas em quadruplicata na mesma microplaca (10º teste ELISA – 14 e 15/dezembro/2006). Foram calculadas médias, desvios padrão e coeficientes de variação.

Foi calculado o Inter-teste: 6 amostras (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) foram aplicadas em duplicata durante 5 dias (6º teste ELISA-10 e 11/dezembro/2006; 7º teste ELISA-11 e 12/dezembro/2006; 8º teste ELISA-12 e 13/dezembro/2006; 9º teste ELISA-13 e 14/dezembro/2006 e 10º teste ELISA-14 e 15/dezembro/2006). Foram calculadas médias, desvios padrão e coeficientes de variação.

³² BSA Sigma® – B4287 lote 87H1144 25g

Foi calculado o Limite de detecção do método: duas vezes o desvio padrão da absorbância média do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) observado em 8 dias diferentes e substituído em diferentes equações (Figuras 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16 e 17).

Os valores de referência (Universidade de Cornell) foram:

- Animais normais: 70 a 180%
- Animais suspeitos: 50 a 69%
- Animais doentes: 1 a 49%

Os testes de Antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) - ELISA foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências UNESP Botucatu.

4.4. Análise estatística

Para análise do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) foi realizada a análise de variância segundo um delineamento em blocos, ao acaso, seguida pelo teste de Tukey utilizando o programa SAS versão 9.2.

Para as variáveis Densidade Óptica (DO), Índice ELISA, Concentração FvW (%) e Log_{10} Concentração FvW foi realizada uma análise de regressão linear utilizando o programa Statistica 6.0, tendo-se a reta ajustada com intervalo de confiança de 95%.

Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO)

Tabela 2. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=57.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/ul sangue	TS (seg)
Beagle	F	500.000	58
Bernese	F	290.000	170
Bernese	F	235.000	195
Bichon Frise	M	296.000	40
Boxer	F	321.000	48
Boxer	M	156.000	141
Boxer	F	420.000	95
Boxer	F	321.000	53
Cocker Spaniel	F	321.000	60
Cocker Spaniel	F	153.000	59
Cocker Spaniel	F	262.000	92
Cocker Spaniel	M	89.000	70
Cocker Spaniel	M	253.000	68
Dobermann	M	326.000	122
Golden Retriever	M	304.000	69
Golden Retriever	F	359.000	150
Labrador	F	531.000	155
Labrador	M	741.000	36
Labrador	F	441.000	40
Lhasa Apso	M	236.000	68
Maltês	M	81.000	50
Maltês	F	435.000	30
Pastor Alemão	M	383.000	45
Pastor Alemão	F	232.000	81
Pastor Alemão	F	291.000	150
Pastor Belga	M	334.000	56
Pit Bull	M	451.000	108
Pit Bull	M	181.000	95

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/ul sangue	TS (seg)
Poodle	F	542.000	88
Poodle	F	326.000	55
Poodle	F	303.000	84
Poodle	M	480.000	38
Poodle	M	355.000	47
Poodle	F	398.000	70
Pug	F	525.000	61
Rottweiler	F	293.000	63
Scott Terrier	M	336.000	140
Schnauzer	M	235.000	40
Schnauzer	F	360.000	54
Shih Tzu	F	463.000	76
SRD	M	225.000	122
SRD	F	202.000	44
SRD	M	225.000	107
SRD Animal 2	F	243.000	70
SRD Animal 3	F	120.000	60
SRD Animal 5	F	148.000	195
SRD	F	223.000	45
Teckel	F	360.000	91
Teckel	F	526.000	84
West Highland White Terrier	M	424.000	54
Welsh Corgi Pembroke	M	309.000	154
Yorkshire	F	320.000	40
Yorkshire	M	656.000	93
Yorkshire	M	310.000	63
Yorkshire	M	331.000	135
Yorkshire	M	259.000	42
Yorkshire	M	548.000	45
MÉDIA	#	333.122,81	81,82
DESVIO PADRÃO	#	134.803,44	42,33

Tabela 3. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos, somente machos; n=26.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/uL sangue	TS (seg)
Bichon Frise	M	296.000	40
Boxer	M	156.000	141
Cocker Spaniel	M	89.000	70
Cocker Spaniel	M	253.000	68
Dobermann	M	326.000	122
Golden Retriever	M	304.000	69
Labrador	M	741.000	36
Lhasa Apso	M	236.000	68
Maltês	M	81.000	50
Pastor Alemão	M	383.000	45
Pastor Belga	M	334.000	56
Pit Bull	M	451.000	108
Pit Bull	M	181.000	95
Poodle	M	480.000	38
Poodle	M	355.000	47
Scott Terrier	M	336.000	140
Schnauzer	M	235.000	40
SRD	M	225.000	122
SRD	M	225.000	107
West Highland White Terrier	M	424.000	54
Welsh Corgi Pembroke	M	309.000	154
Yorkshire	M	656.000	93
Yorkshire	M	310.000	63
Yorkshire	M	331.000	135
Yorkshire	M	259.000	42
Yorkshire	M	548.000	45
MÉDIA	#	327.846,15	78,77
DESVIO PADRÃO	#	154.685,92	37,97

Tabela 4. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos, somente fêmeas; n=31.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/ul sangue	TS (seg)
Beagle	F	500.000	58
Bernese	F	290.000	170
Bernese	F	235.000	195
Boxer	F	321.000	48
Boxer	F	420.000	95
Boxer	F	321.000	53
Cocker Spaniel	F	321.000	60
Cocker Spaniel	F	153.000	59
Cocker Spaniel	F	262.000	92
Golden Retriever	F	359.000	150
Labrador	F	531.000	155
Labrador	F	441.000	40
Maltês	F	435.000	30
Pastor Alemão	F	232.000	81
Pastor Alemão	F	291.000	150
Poodle	F	542.000	88
Poodle	F	326.000	55
Poodle	F	303.000	84
Poodle	F	398.000	70
Pug	F	525.000	61
Rottweiler	F	293.000	63
Schnauzer	F	360.000	54
Shih Tzu	F	463.000	76
SRD	F	202.000	44
SRD	F	223.000	45
SRD Animal 2	F	243.000	70
SRD Animal 3	F	120.000	60
SRD Animal 5	F	148.000	195
Teckel	F	360.000	91
Teckel	F	526.000	84
Yorkshire	F	320.000	40
MÉDIA	#	337.548,39	84,39
DESVIO PADRÃO	#	118.054,46	46,13

Tabela 5. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de 7 animais (tabela 2) escolhidos ao acaso, para se realizar a análise estatística, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/uL sangue	TS (seg)
Bichon Frise	M	296.000	40
Labrador	F	531.000	155
Lhasa Apso	M	236.000	68
Pit Bull	M	451.000	108
Poodle	F	303.000	84
Schnauzer	M	235.000	40
Shih Tzu	F	463.000	76
MÉDIA	#	359.285,71	81,57
DESVIO PADRÃO	#	120.050,98	40,35

Tabela 6. Valores individuais da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais com histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=7.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/uL sangue	TS (seg)
Cocker Spaniel	F	78.000	150
Labrador	F	250.000	80
Labrador	F	176.000	75
Pastor Alemão	F	165.000	53
Pastor Alemão	M	173.000	88
Setter Irlandês	F	275.000	66
SRD	F	170.000	50
MÉDIA	#	183.857,14	80,29
DESVIO PADRÃO	#	64.050,58	33,70

Tabela 7. Valores individuais da contagem de plaquetas e do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) de animais da raça Dobermann, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.

RAÇA	SEXO	PLAQUETAS/ul sangue	TS (seg)
Dobermann Animal 1	M	258.000	142
Dobermann Animal 4	F	302.000	119
Dobermann Animal 6	M	138.000	187
Dobermann	F	370.000	65
Dobermann	M	370.000	67
Dobermann	F	226.000	83
Dobermann	F	223.000	97
MÉDIA	#	265.400,00	108,57
DESVIO PADRÃO	#	101.812,57	50,45

Tabela 8. Valores individuais do Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO) e do FvW:Ag (ELISA) de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.

RAÇA	SEXO	TS (seg)	FvW:Ag (%)
Animal 1 - Dobermann	M	142	48
Animal 2 - SRD	F	70	129
Animal 3 - SRD	F	60	96
Animal 4 - Dobermann	F	119	62
Animal 5 - SRD	F	195	195
MÉDIA	#	117.20	#
DESVIO PADRÃO	#	55.16	#

5.2. Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA)

Tabela 9. Valores individuais do FvW:Ag (ELISA) dos Animais 2 e 3.

	SEXO	FvW:Ag (%)
Animal 2	F	129
Animal 3	F	96

Tabela 10. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **1,5mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	254.000	232.000	1	6
Animal 3	185.000	202.000	1	6
MÉDIA	219.500	217.000	1,00	6,00
DP	48.790,37	21.213,20	0,00	0,00

Tabela 11. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **1,0mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	322.000	302.000	7	8
Animal 3	203.000	225.000	1	10
MÉDIA	262.500	263.500	4,00	9,00
DP	84.145,71	54.447,22	4,24	1,41

Tabela 12. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,5mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	354.000	269.000	16	10
Animal 2	354.000	269.000	11	9
Animal 2	354.000	269.000	18	10
Animal 3	192.000	206.000	3	10
Animal 3	192.000	206.000	2	10
MÉDIA	289.200	243.800	10,00	9,80
DP	88.731,05	34.506,52	7,31	0,45

Tabela 13. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,25mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=5.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	371.000	300.000	23	10
Animal 2	322.000	295.000	15	10
Animal 2	302.000	277.000	19	6
Animal 3	195.000	229.000	9	10
Animal 3	201.000	257.000	7	10
MÉDIA	278.200	271.600	14,60	9,20
DP	77.425,45	29.202,74	6,69	1,79

Tabela 14. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,125mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	322.000	300.000	18	6
Animal 2	287.000	247.000	15	8
MÉDIA	304.500	273.500	16,50	7,00
DP	24.748,74	37.476,66	2,12	1,41

Tabela 15. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,0625mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	299.000	285.000	16	6
Animal 2	267.000	254.000	10	5
MÉDIA	283.000	269.500	13,00	5,50
DP	22.627,42	21.920,31	4,24	0,71

Tabela 16. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,03125mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	309.000	250.000	16	7
Animal 2	352.000	206.000	20	9
MÉDIA	330.500	228.000	18,00	8,00
DP	30.405,59	31.112,70	2,83	1,41

Tabela 17. Valores individuais, média e desvio padrão da contagem de plaquetas (sanguínea e PRP), Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **0,015625mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária de animais sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos; n=2.

	PLAQUETAS/uL sangue	PLAQUETAS/uL PRP	RIPA (%)	tempo (min)
Animal 2	366.000	300.000	12	7
Animal 2	303.000	300.000	15	7
MÉDIA	334.500	300.000	13,50	7,00
DP	44.547,73	0,00	2,12	0,00

Tabela 18. Valores individuais, média e desvio padrão da Agregação plaquetária induzida pela ristocetina em concentração de **1,5mg/mL** (RIPA) e do tempo de agregação plaquetária do homem; n=3.

	RIPA (%)	tempo (min)
Paciente 1	83	5
Paciente 1	72	5
Paciente 2	87	5
MÉDIA	80,67	5,00
DP	7,77	0,00

5.3. Antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) - ELISA

Tabela 19. Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)
	1/100	1,5643
	1/200	1,2753
	1/400	0,9638
	1/800	0,6438
	1/1600	0,3953
	1/3200	0,2973

Tabela 20. Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **Animais 7, 8 e 9** – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Animal 7	1/100	1,5288
Animal 7	1/200	1,2118
Animal 8	1/100	1,5913
Animal 8	1/200	1,3228
Animal 9	1/100	1,6823
Animal 9	1/200	1,4728

Tabela 21. Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (**Antígeno + substrato, Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato, Anticorpo de captura + substrato, Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato**) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Ag+Sub	1/100	0,0023
Ag+D+Sub	1/100	0,0453
Cap+Sub	sem dil.	0,0028
Cap+D+Sub	sem dil.	0,1658
D+Sub	sem dil.	0,0288

Tabela 22. Valores da Densidade Óptica (DO) dos controles negativos (**Soro e Criopobre**) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Soro	1/100	0,5763
Criopobre	1/100	1,6213

Tabela 23. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)	Conc. FvW (%)	Log_{10} %Conc. FvW
	1/100	1,5643	100	2,0000
	1/200	1,2753	50	1,6990
	1/400	0,9638	25	1,3979
	1/800	0,6438	12,5	1,0969
	1/1600	0,3953	6,25	0,7959
	1/3200	0,2973	3,125	0,4949

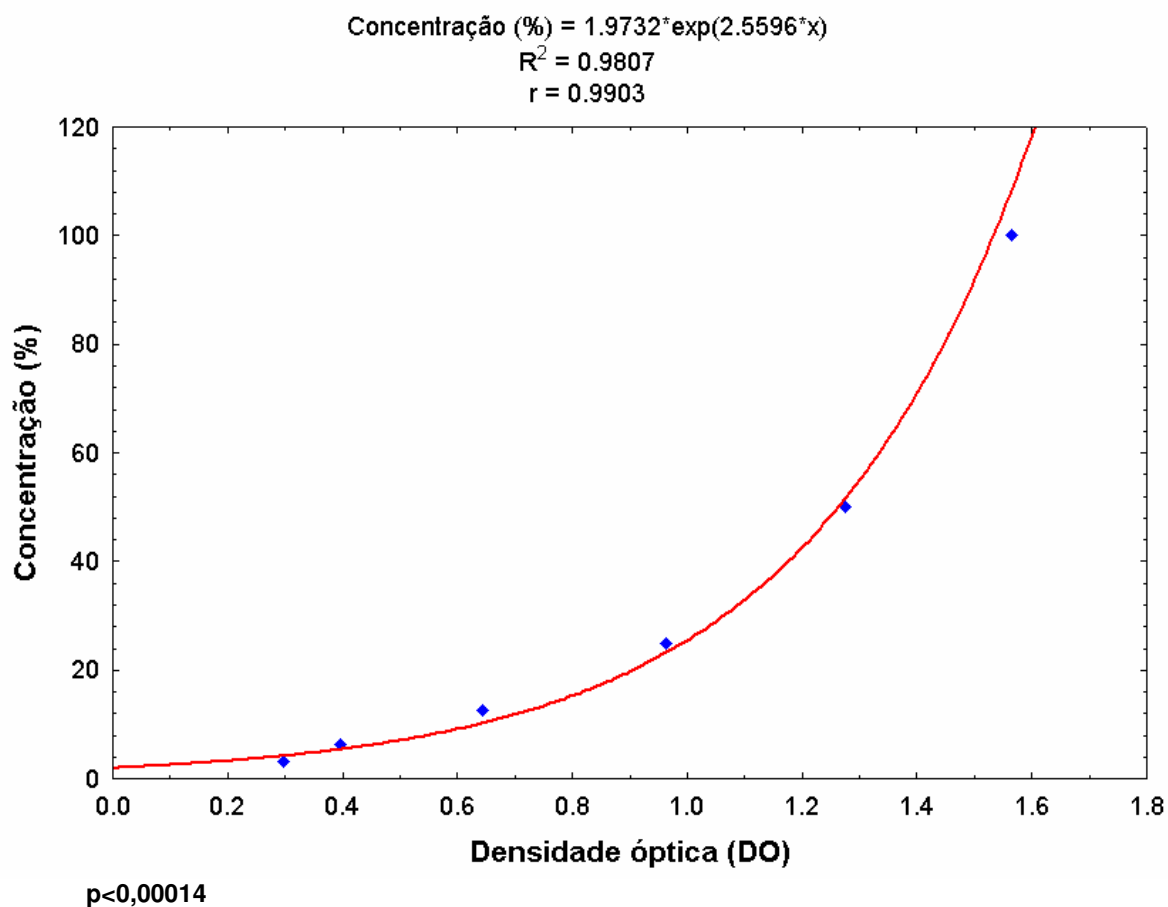


Figura 1. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

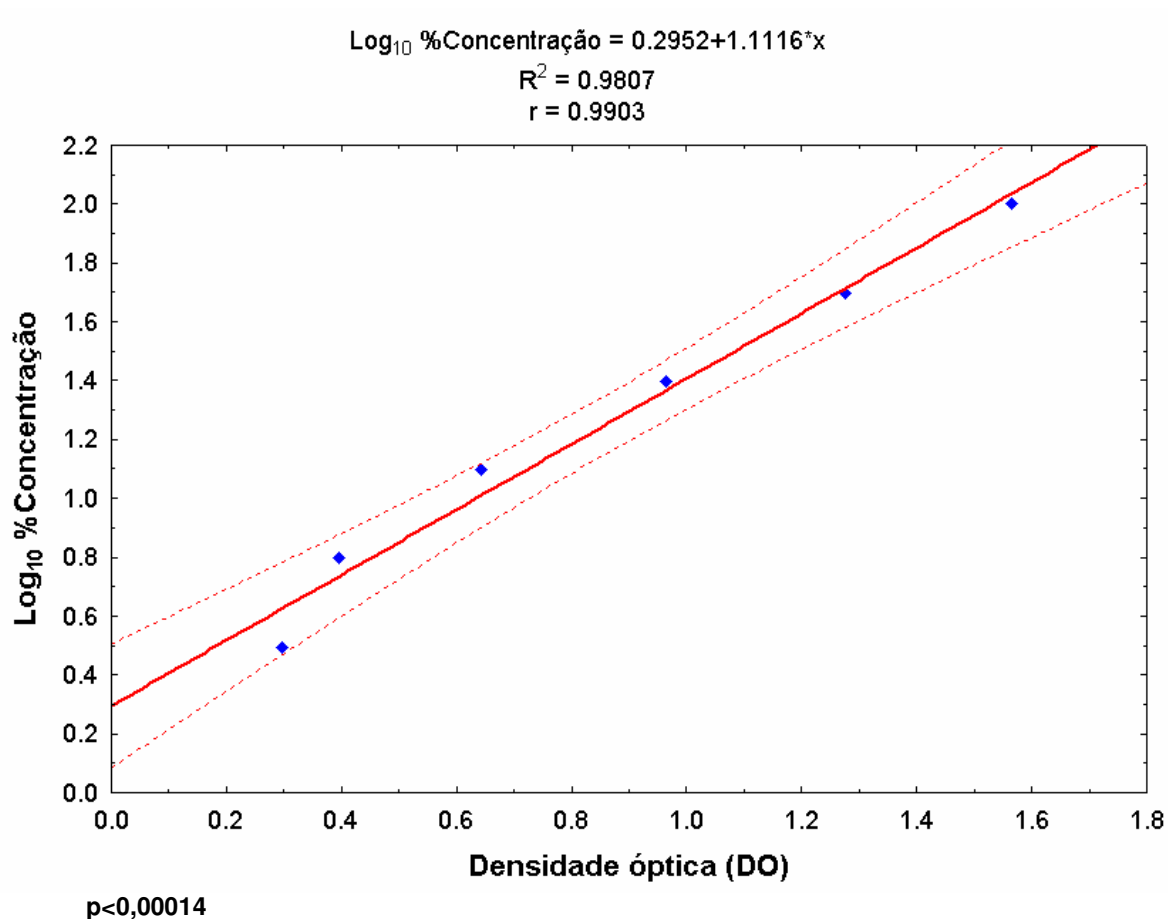


Figura 2. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log₁₀ %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

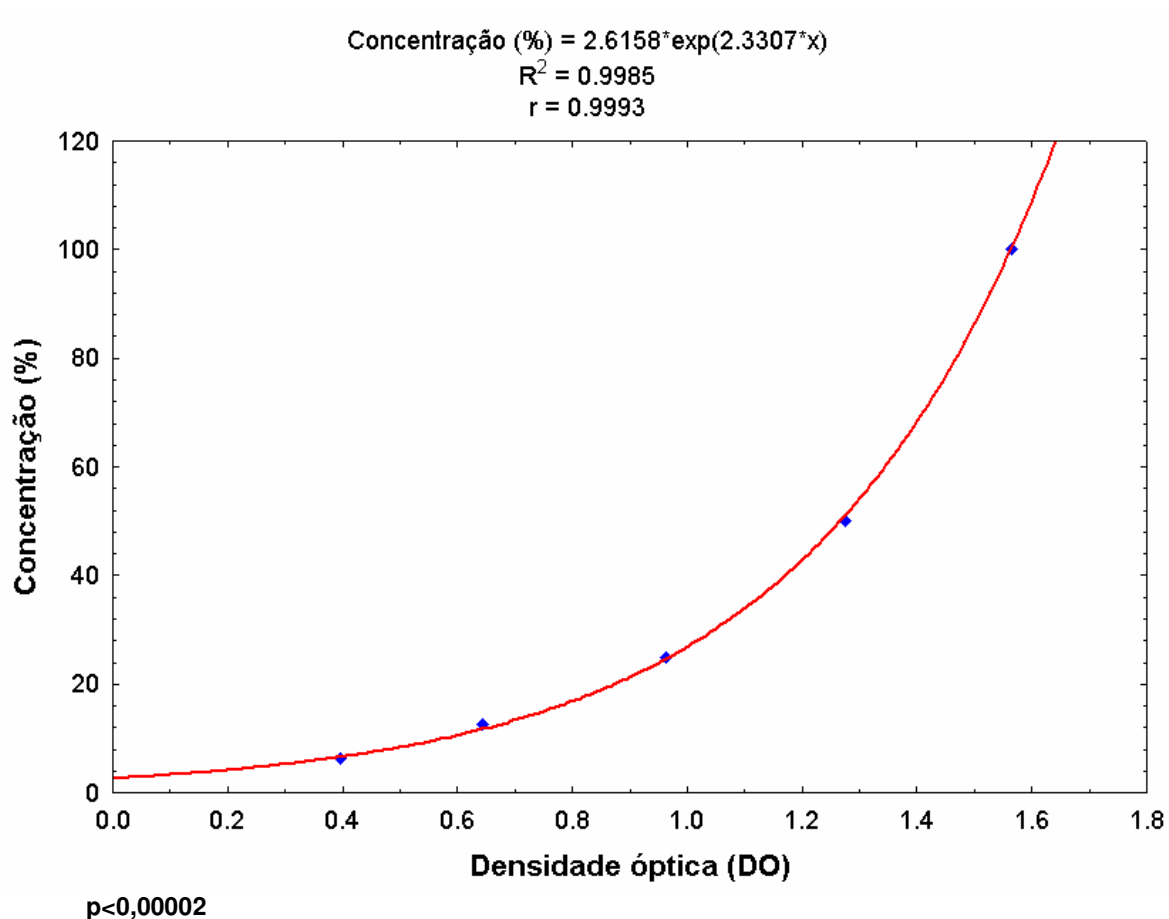


Figura 3. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800 e 1/1600) do plasma de referência (**Animal 2**), equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

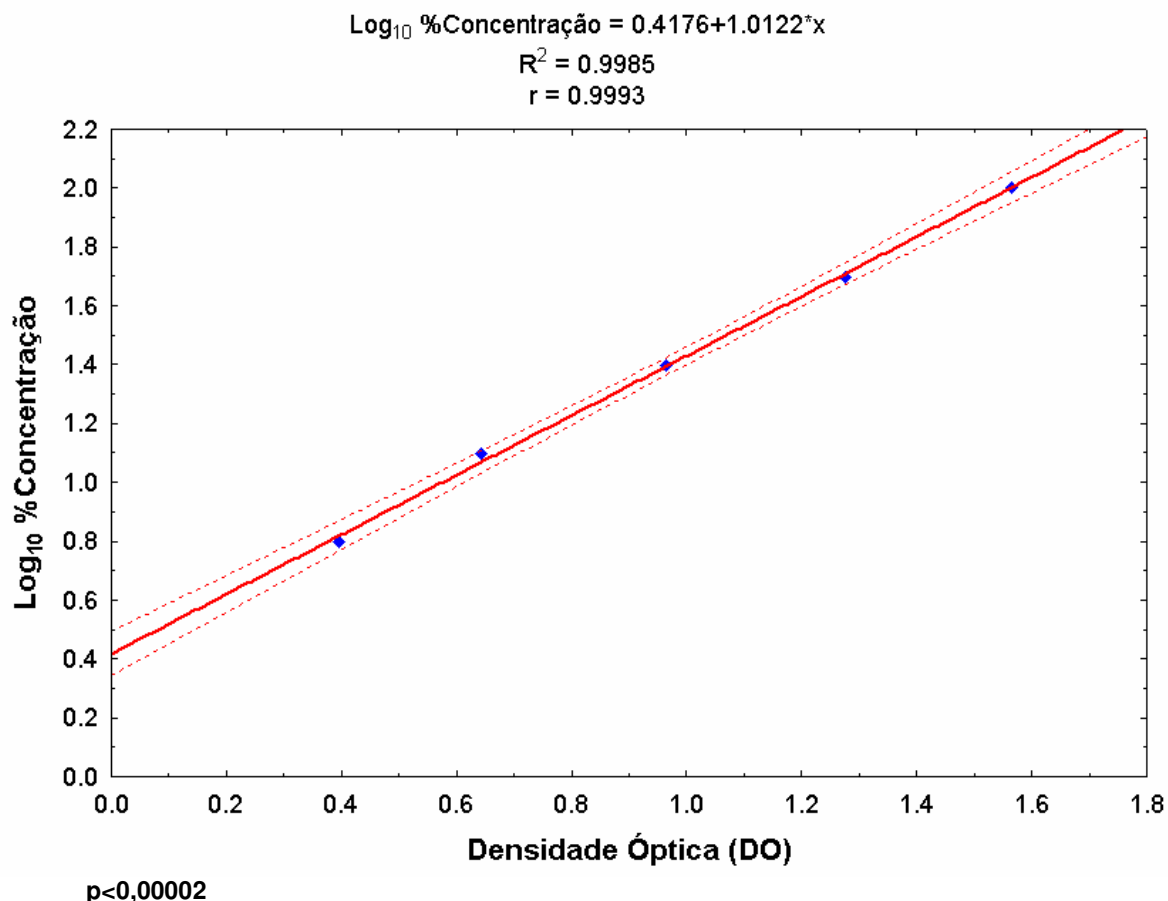


Figura 4. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração}$ de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800 e 1/1600) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

Tabela 24. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm \text{IC95\%}$) dos **Animais 7, 8 e 9**. Substituição nas equações das **Figuras 2** ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração de FvW} = 0,2952 + 1,1116x$) e **4** ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração de FvW} = 0,4176 + 1,0122x$) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

	Animal 7	Animal 8	Animal 9
	FvW:Ag (%)		
Figura 2	93,26 (65,79-	116,25 (79,72-	158,73 (104,05-
($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,2952 + 1,1116x$)	132,66)	169,98)	242,62)
Figura 4	90,22 (81,75-	110,46 (99,24-	146,97 (130,15-
($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4176 + 1,0122x$)	99,59)	122,99)	165,99)

Tabela 25. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm$ IC95%) dos controles negativos (**Soro e Criopobre**). Substituição nas equações das **Figuras 2** ($\text{Log}_{10} \text{\%Concentração de FvW} = 0,2952 + 1,1116x$) e **4** ($\text{Log}_{10} \text{\%Concentração de FvW} = 0,4176 + 1,0122x$) – 1ª placa ELISA (01 e 02/agosto/2006).

	Soro	Criopobre
	FvW:Ag (%)	
Figura 2 ($\text{Log}_{10} \text{\%Conc.FvW} = 0,2952 + 1,1116x$)	8,63 (6,60-11,27)	125,16 (80,25-195,18)
Figura 4 ($\text{Log}_{10} \text{\%Conc. FvW} = 0,4176 + 1,0122x$)	10,02 (9,11-11,02)	114,48 (100,65-130,20)

Tabela 26. Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)
	1/100	1,6763
	1/200	1,5808
	1/400	1,3063
	1/800	1,0150
	1/1600	0,7670
	1/3200	0,5238

Tabela 27. Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **Animais 4 e 5** – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Animal 4	1/100	1,6348
Animal 4	1/200	1,4298
Animal 5	1/100	1,6750
Animal 5	1/200	1,5740

Tabela 28. Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Controle (C1)	1/100	0,7570
Controle (C1)	1/200	0,6495
Controle (C2)	1/100	0,5753
Controle (C2)	1/200	0,4755
Controle (C3)	1/100	0,4338
Controle (C3)	1/200	0,3520

Tabela 29. Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato**) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Cap+D+Sub	sem dil.	0,4310
D+Sub	sem dil.	0,2795

Tabela 30. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log₁₀ %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)	Conc. FvW (%)	Log10 %Conc. FvW
	1/100	1,6763	100	2,0000
	1/200	1,5808	50	1,6990
	1/400	1,3063	25	1,3979
	1/800	1,0150	12,5	1,0969
	1/1600	0,7670	6,25	0,7959
	1/3200	0,5238	3,125	0,4949

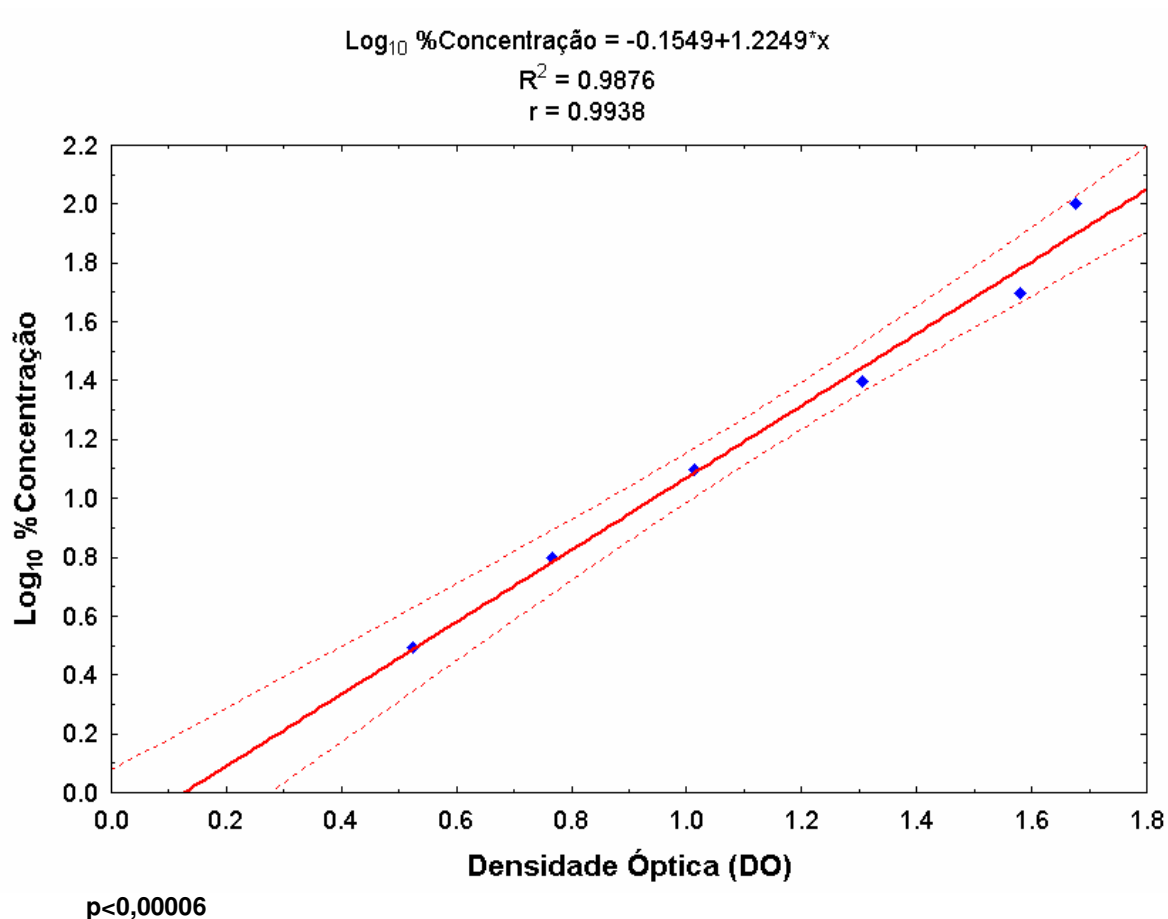


Figura 5. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração}$ de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

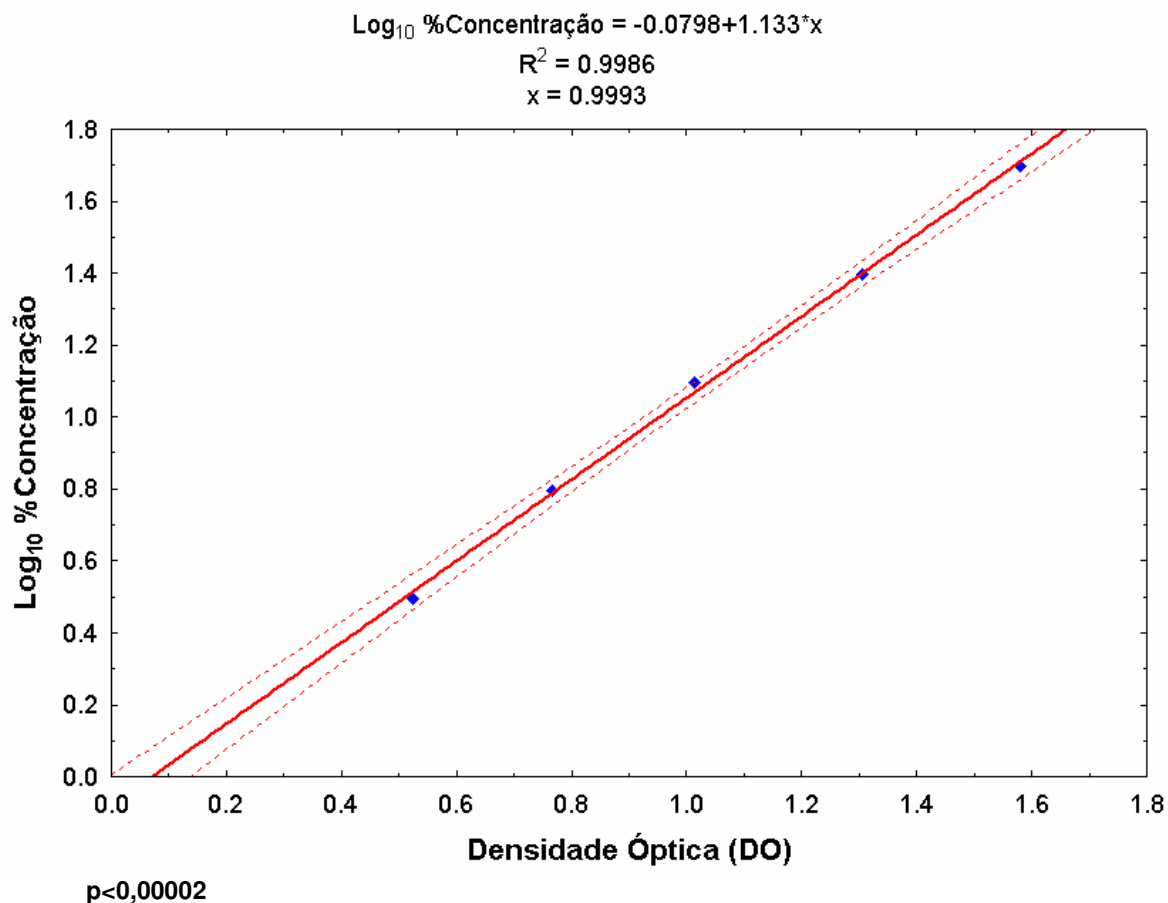


Figura 6. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração}$ de FvW de diversas diluições (1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

Tabela 31. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm \text{IC95\%}$) dos **Animais 4 e 5**. Substituição nas equações das **Figuras 5** ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração de FvW} = -0,1549 + 1,2249x$) e **6** ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração de FvW} = -0,0798 + 1,133x$) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

	Animal 4	Animal 5
	FvW:Ag (%)	
Figura 5 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = -0,1549 + 1,2249x$)	74,69 (58,20-95,94)	98,74 (74,97-130,08)
Figura 6 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = -0,0798 + 1,133x$)	64,30 (57,57-71,82)	83,42 (73,75-94,35)

Tabela 32. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm$ IC95%) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)**. Substituição nas equações das **Figuras 5** ($\text{Log}_{10} \text{\%Concentração de FvW} = -0,1549 + 1,2249x$) e **6** ($\text{Log}_{10} \text{\%Concentração de FvW} = -0,0798 + 1,133x$) – 2ª placa ELISA (07 e 08/novembro/2006).

	Controle (C1)	Controle (C2)	Controle (C3)
	FvW:Ag (%)		
Figura 5 ($\text{Log}_{10} \text{\%Conc.FvW} = -0,1549 + 1,2249x$)	7,33 (5,60- 9,61)	4,45 (3,20- 6,20)	3,08 (2,10- 4,50)
Figura 6 ($\text{Log}_{10} \text{\%Conc. FvW} = -0,0798 + 1,133x$)	7,53 (6,87- 8,25)	4,74 (4,23- 5,33)	3,38 (2,95- 3,86)

Tabela 33. Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** e dos testes de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato**) utilizando microplaca **MAXISORP** e tampões de bloqueio **PBS- leite em pó³³ 10% e PBS-BSA³⁴ 2,5%** – 3ª placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).

	Diluições	Leite pó 10%	BSA 2,5%
C1	100	0,1798	0,2268
C1	200	0,1938	0,1598
C2	100	0,1938	0,1628
C2	200	0,1688	0,1168
C3	100	0,1268	0,0838
C3	200	0,2338	0,0928
C+D+S	#	0,4233	0,0953
D+S	#	0,2493	0,0573

³³ Leite em pó Molico® Desnatado

³⁴ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

Tabela 34. Valores da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** e dos testes de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato**) utilizando microplaca **MEDSORP** e tampões de bloqueio **PBS- leite em pó³⁵ 10% e PBS-BSA³⁶2,5%– 3ª** placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).

	Diluições	Leite pó 10%	BSA 2.5%
C1	100	0.2170	0.3900
C1	200	0.1370	0.2890
C2	100	0.1620	0.2240
C2	200	0.0790	0.1940
C3	100	0.0580	0.1410
C3	200	0.0480	0.1370
C+D+S	#	0.0730	0.2070
D+S	#	0.0680	0.1030

Tabela 35. Valores da Relação da Densidade Óptica (DO) de duas diluições (1/100 e 1/200) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** sobre a Densidade Óptica (DO) do teste de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato**) utilizando microplacas **MAXISORP (PBS-BSA³⁷2,5%) e MEDSORP (PBS- leite em pó³⁸10%) – 3ª** placa ELISA (20 e 21/novembro/2006).

	Diluição	MaxiSorp (PBS-BSA 2,5%)	MedSorp (PBS- leite em pó 10%)
C1/C+D+S	1/100	2,3806	2,9726
C1/C+D+S	1/200	1,6772	1,8767
C2/C+D+S	1/100	1,7087	2,2192
C2/C+D+S	1/200	1,2257	1,0822
C3/C+D+S	1/100	0,8793	0,7945
C3/C+D+S	1/200	0,9738	0,6575

³⁵ Leite em pó Molico® Desnatado

³⁶ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

³⁷ BSA Sigma® - A345 lote 99F00191 100g

³⁸ Leite em pó Molico® Desnatado

Tabela 36. Valores da Densidade Óptica (DO) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)
	1/100	0,4765
	1/200	0,2525
	1/400	0,1260
	1/800	0,0870
	1/1600	0,0560
	1/3200	0,0385

Tabela 37. Valores da Densidade Óptica (DO) de uma diluição (1/100) dos **Animais 4, 5 e 6** – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Animal 4	1/100	0,1550
Animal 5	1/100	0,3005
Animal 6	1/100	0,1420

Tabela 38. Valores da Densidade Óptica (DO) de uma diluição (1/100) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)** – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Controle (C1)	1/100	0,0543
Controle (C2)	1/100	0,0473
Controle (C3)	1/100	0,0405

Tabela 39. Valores da Densidade Óptica (DO) dos testes de ligação inespecífica (**Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato**) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

	Diluições	Densidade Óptica (DO)
Cap+D+Sub	sem dil.	0,0463
D+Sub	sem dil.	0,0240

Tabela 40. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Densidade Óptica (DO)	Conc. FvW (%)	Log10 %Conc. FvW
	1/100	0,4765	100	2,0000
	1/200	0,2525	50	1,6990
	1/400	0,1260	25	1,3979
	1/800	0,0870	12,5	1,0969
	1/1600	0,0560	6,25	0,7959
	1/3200	0,0385	3,125	0,4949

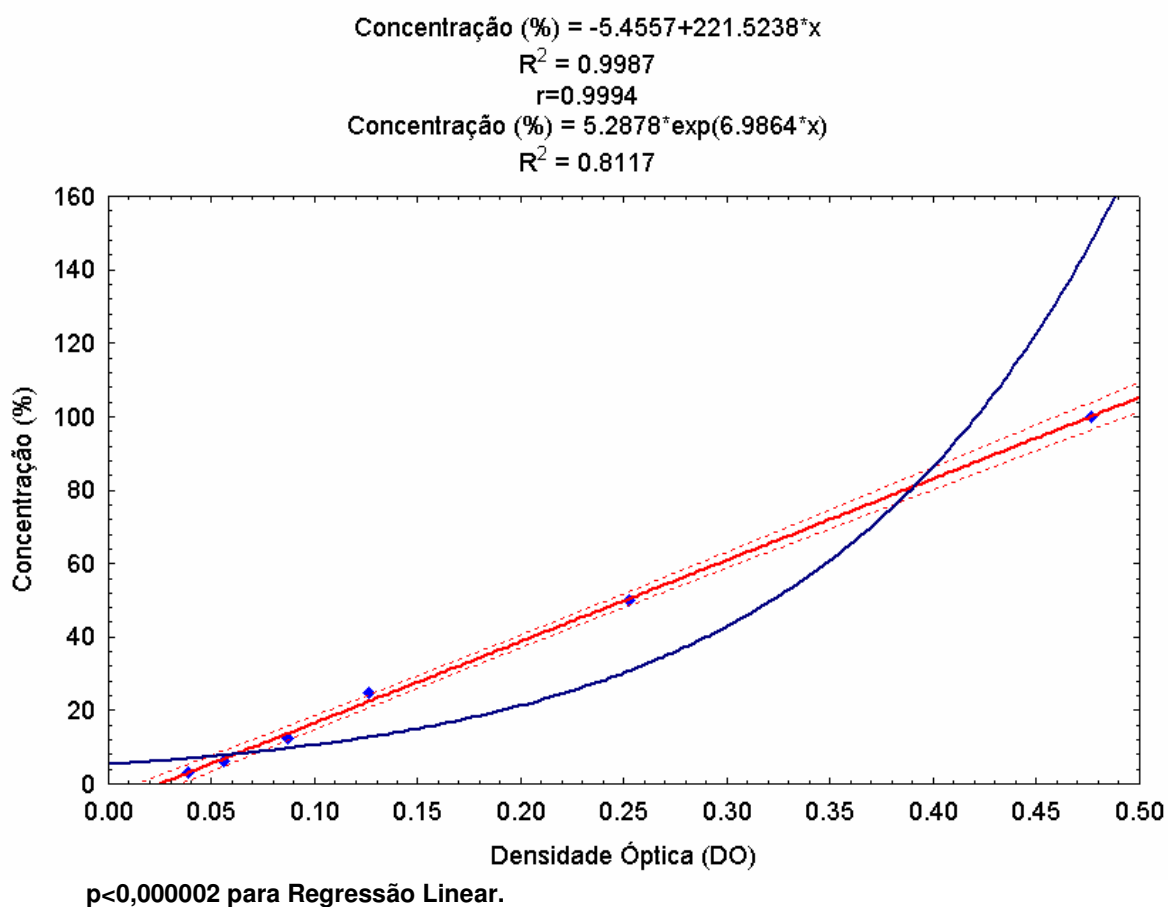
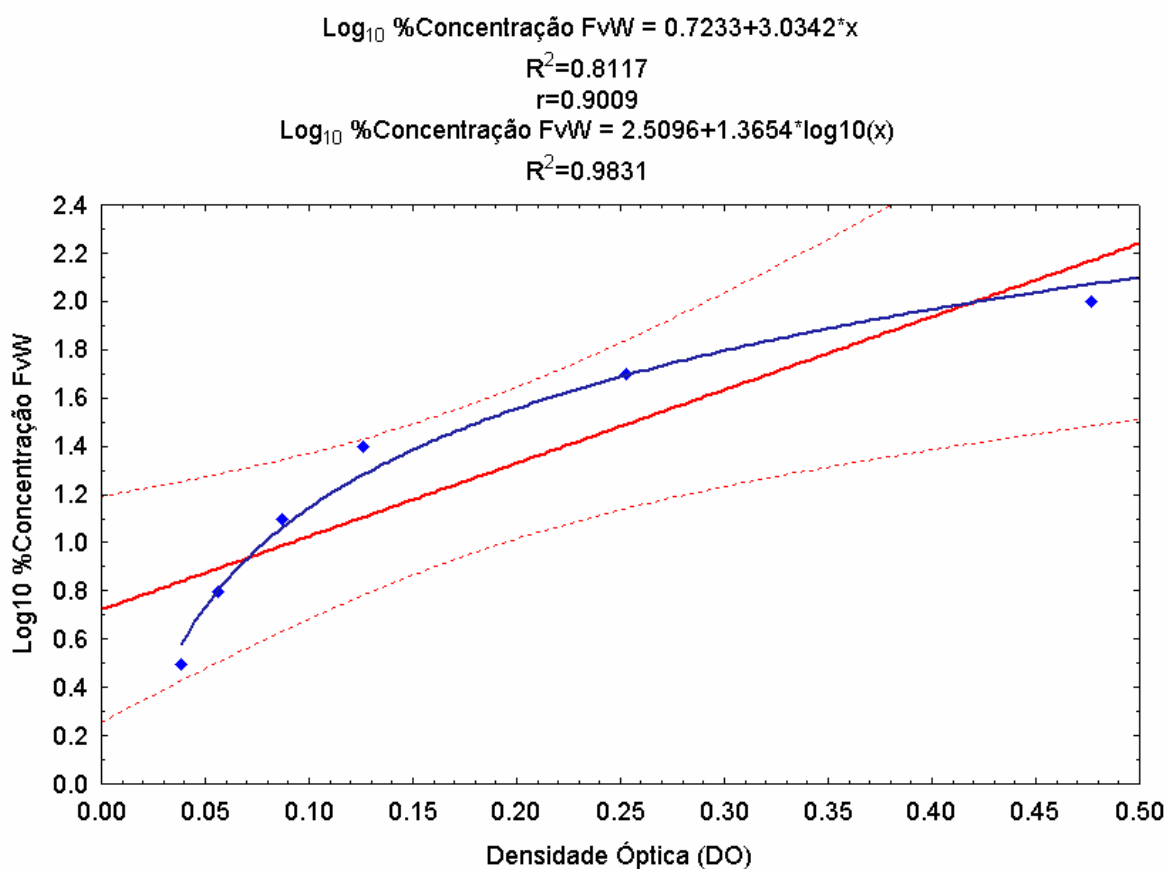


Figura 7. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r). A linha de identidade é a linha sólida – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).



$p < 0,01424$ para Regressão Linear.

Figura 8. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração}$ de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

Tabela 41. Valores do FvW:Ag dos **Animais 4, 5 e 6**. Substituição na equação das **Figuras 7** ($\text{Concentração } (\%) = -5,4557 + 221,5238 \cdot x$) e **8** ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW} = 2,5096 + 1,3654 \cdot \log_{10}(x)$) – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

	Animal 4	Animal 5	Animal 6
	FvW:Ag (%)		
Figura 7 (Concentração (%) = $-5,4557 + 221,5238 \cdot x$)	28.88	61.11	26.00
Figura 8 ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW} = 2,5096 + 1,3654 \cdot \log_{10}(x)$)	25.36	62.61	22.50

Tabela 42. Valores do FvW:Ag dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)**. Substituição na equação das **Figuras 7 (Concentração (%) = $-5,4557+221,5238 \cdot x$)** e **8 ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW} = 2,5096+1,3654 \cdot \text{log}_{10}(x)$)** – 4ª placa ELISA (27 e 28/novembro/2006).

	Controle (C1)	Controle (C2)	Controle (C3)
	FvW:Ag (%)		
Figura 7 (Concentração (%) = $-5,4557+221,5238 \cdot x$)	6.56	5.01	3.52
Figura 8 ($\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW} = 2,5096+1,3654 \cdot \text{log}_{10}(x)$)	6.05	5.01	4.06

Tabela 43. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%), $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW}$ e Índice ELISA (IE) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**). Subtraído o valor da DO do branco (Substrato) - 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW}$	IE
	1/100	100	1,7240	2,0000	1,0000
	1/200	50	1,4810	1,6990	0,8389
	1/400	25	1,1330	1,3979	0,6083
	1/800	12,5	0,7820	1,0969	0,3756
	1/1600	6,25	0,5485	0,7959	0,2209
	1/3200	3,125	0,3790	0,4949	0,1085

Tabela 44. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%), $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração FvW}$ e Índice ELISA (IE) de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**). Subtraído o valor da DO do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) - 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW}$	IE
	1/100	100	1,5568	2,0000	1,0000
	1/200	50	1,3138	1,6990	0,8189
	1/400	25	0,9658	1,3979	0,5594
	1/800	12,5	0,6148	1,0969	0,2978
	1/1600	6,25	0,3813	0,7959	0,1237
	1/3200	3,125	0,2118	0,4949	-0,0026

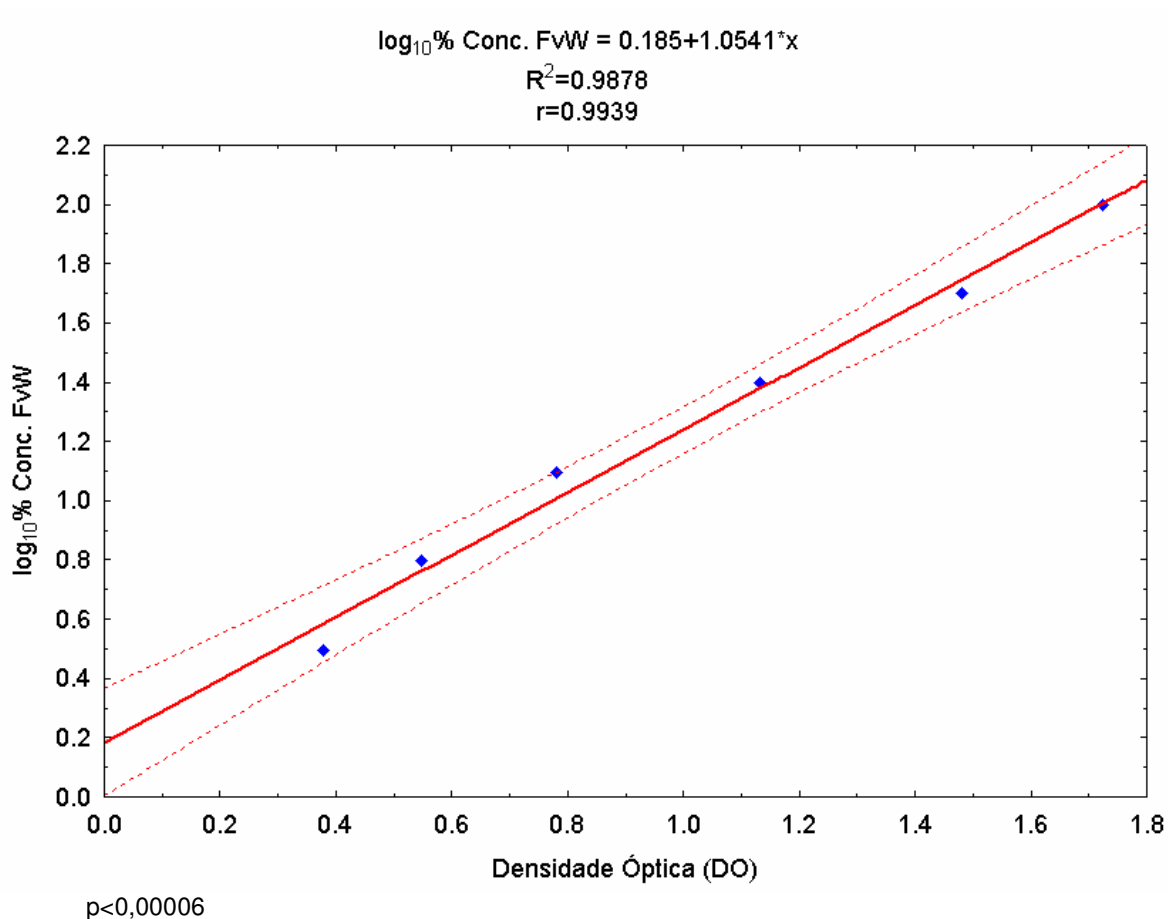


Figura 9. Diagrama de dispersão (valores Tabela 43) entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\text{Log}_{10} \% \text{Concentração de FvW}$ de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

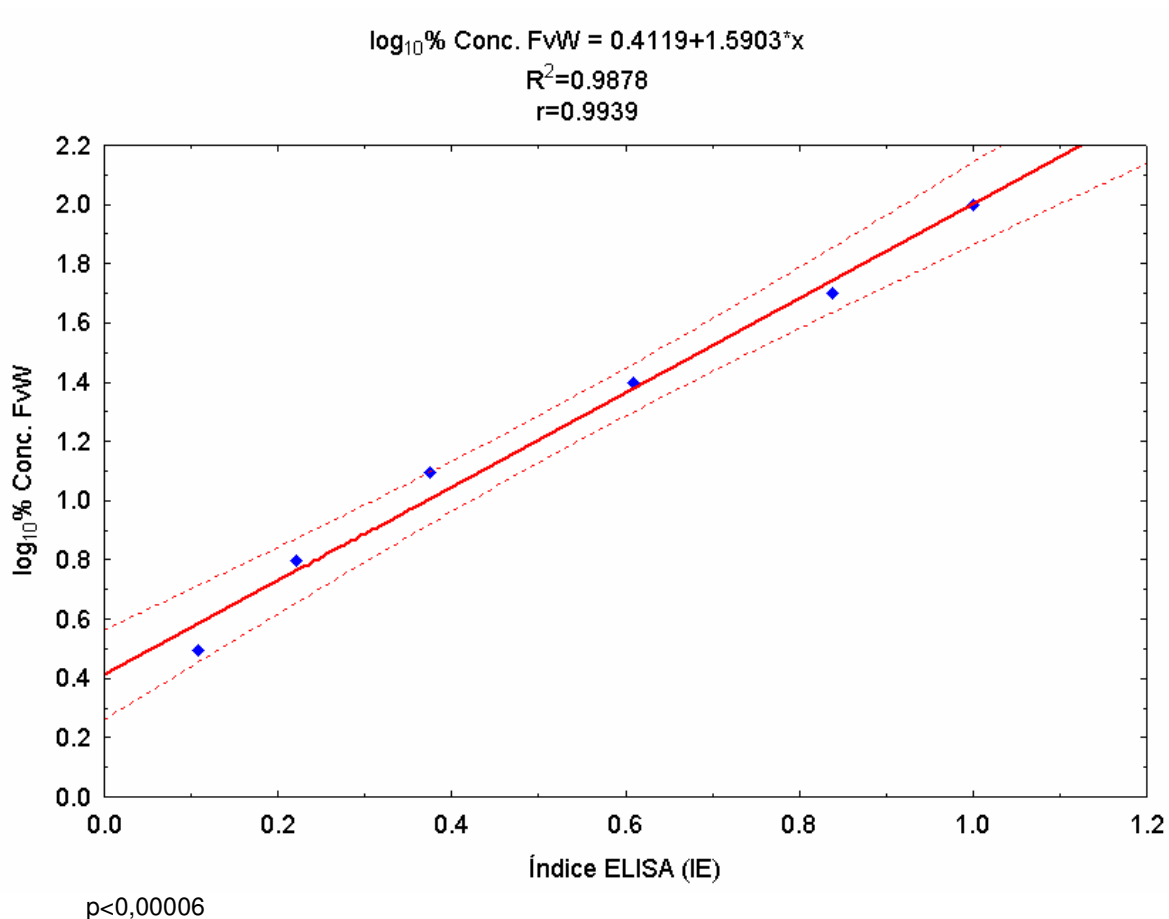


Figura 10. Diagrama de dispersão (valores Tabela 43) entre os valores de Índice ELISA (IE) e $\log_{10}$ %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

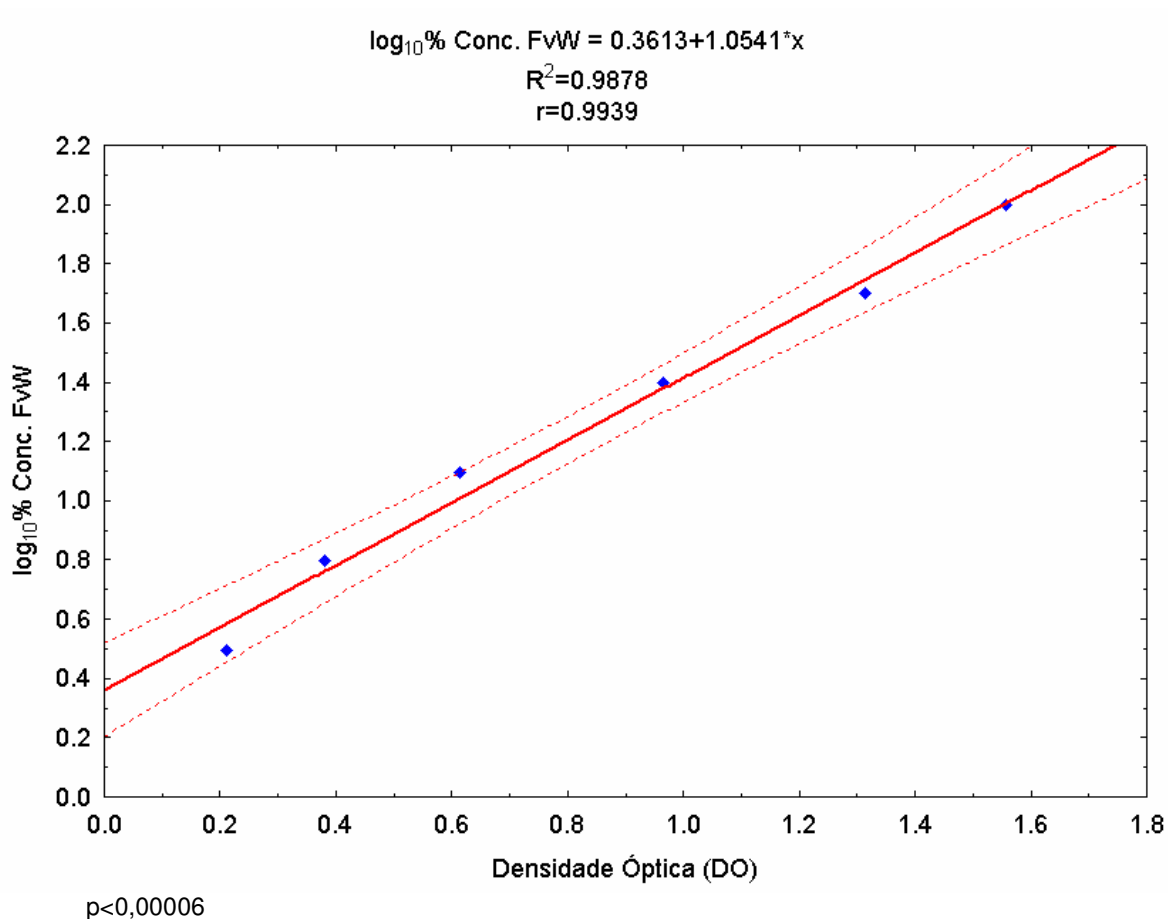


Figura 11. Diagrama de dispersão (valores Tabela 44) entre os valores de Densidade Óptica (DO) e $\log_{10} \% \text{Concentração}$ de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

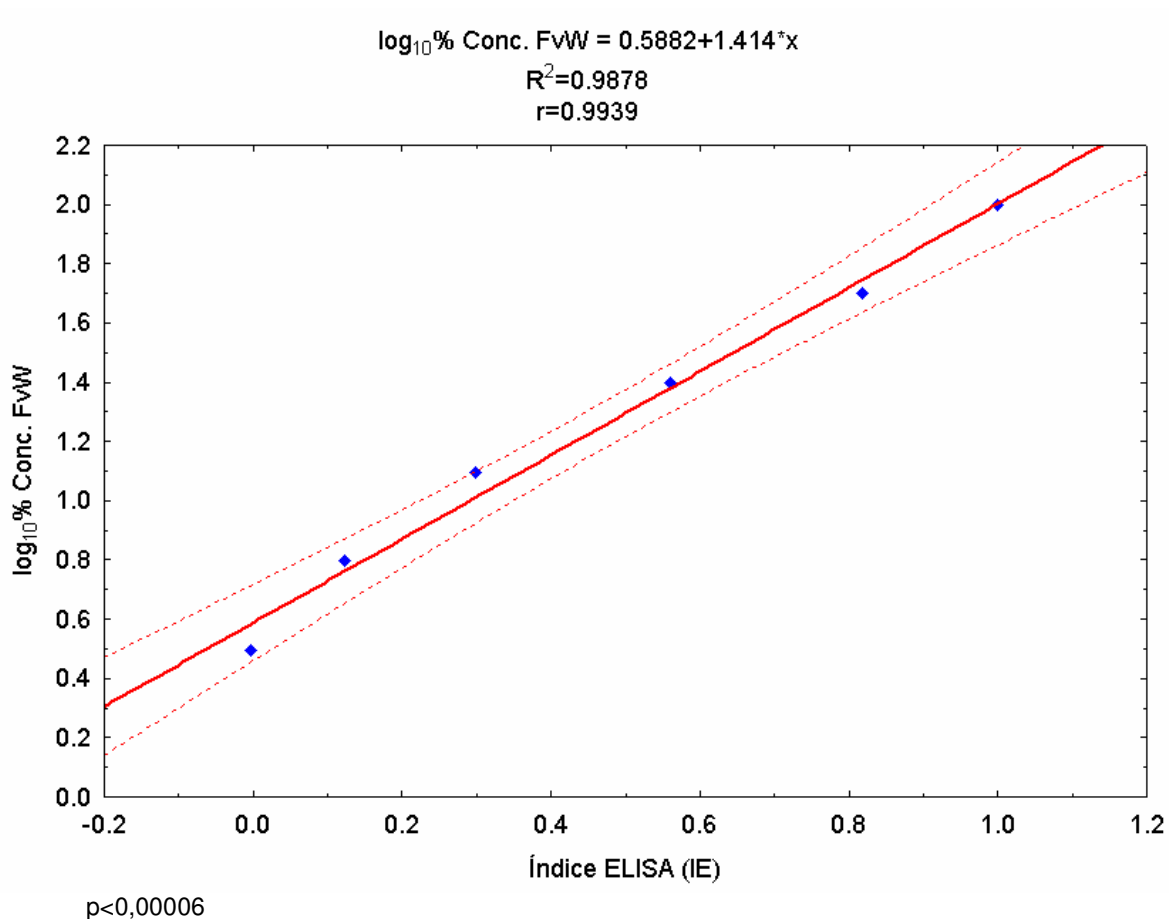


Figura 12. Diagrama de dispersão (valores Tabela 44) entre os valores de Índice ELISA (IE) e $\log_{10}$ %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

Tabela 45. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm$ IC95%) dos **Animais 4 e 5**. Substituição nas equações das **Figuras 9** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$), **10** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$), **11** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$) e **12** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

	Animal 4	Animal 5
	FvW:Ag (%)	
Figura 9 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$)	44,85 (35,95-56,00)	104,40 (78,81-138,38)
Figura 10 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$)	44,85 (35,95-56,00)	104,40 (78,81-138,38)
Figura 11 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$)	39,32 (32,22-49,49)	92,93 (71,09-121,53)
Figura 12 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$)	39,32 (32,22-49,49)	92,93 (71,09-121,53)

Tabela 46. Valores do FvW:Ag e Intervalo de Confiança 95% ($\pm$ IC95%) dos **plasmas Controle (C1, C2 e C3)**. Substituição nas equações das **Figuras 9** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$), **10** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$), **11** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$) e **12** ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$) – 5ª placa ELISA (29 e 30/novembro/2006).

	Controle (C1)	Controle (C2)	Controle (C3)
	FvW:Ag (%)		
Figura 9 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,185 + 1,0541x$)	7,42 (5,70-9,67)	4,58 (3,31-6,34)	3,39 (2,36-4,89)
Figura 10 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,4119 + 1,5903x$)	7,42 (5,70-9,67)	4,58 (3,31-6,34)	3,39 (2,36-4,89)
Figura 11 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,3613 + 1,0541x$)	6,60 (5,00-8,72)	4,07 (2,90-5,73)	3,02 (2,06-4,42)
Figura 12 ($\text{Log}_{10} \% \text{Conc. FvW} = 0,5882 + 1,414x$)	6,60 (5,00-8,72)	4,07 (2,90-5,73)	3,02 (2,06-4,42)

Tabela 47. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 6ª placa ELISA (10 e 11/dezembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10}\%$ Conc. FvW
	1/100	100	1,7518	2,0000
	1/200	50	1,5128	1,6990
	1/400	25	1,2323	1,3979
	1/800	12,5	0,9593	1,0969
	1/1600	6,25	0,7230	0,7959
	1/3200	3,125	0,3998	0,4949

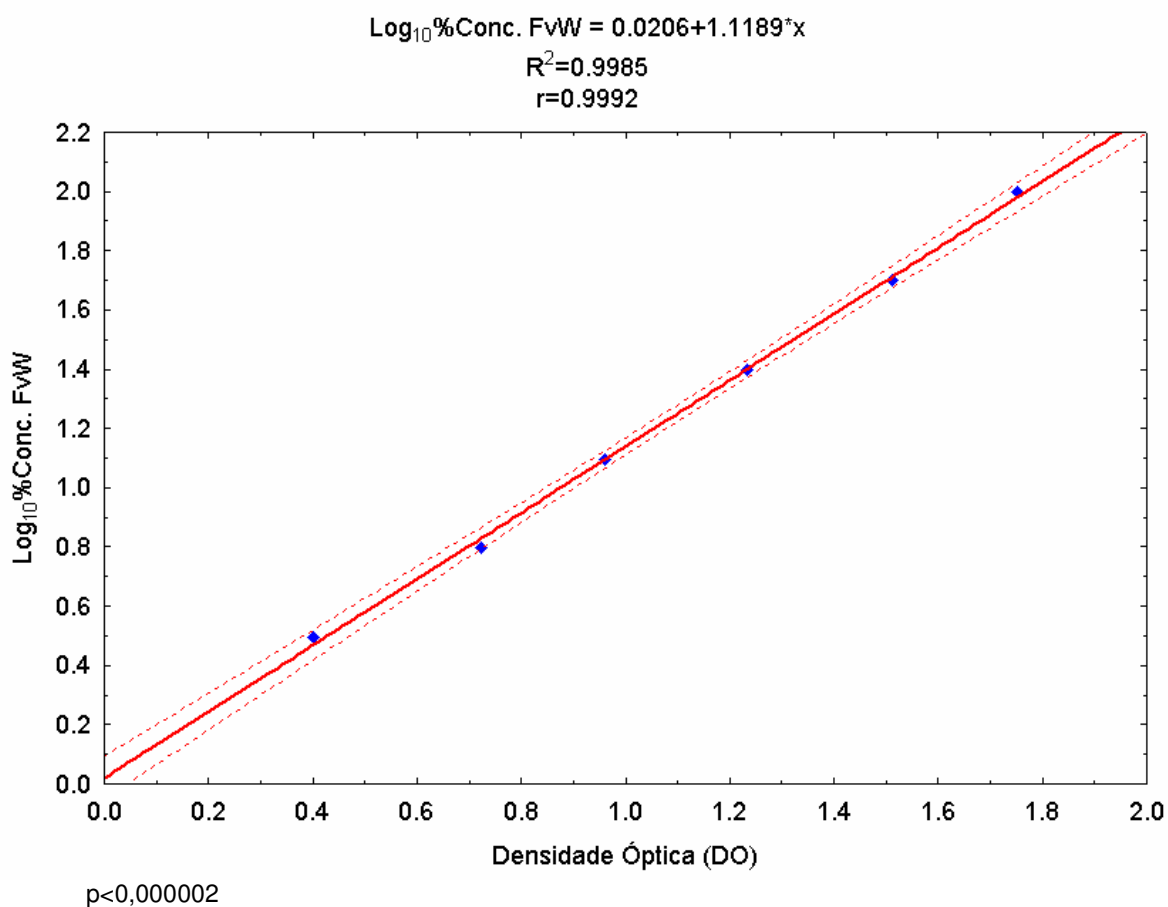


Figura 13. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 6ª placa ELISA (10 e 11/dezembro/2006).

Tabela 48. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 7ª placa ELISA (11 e 12/dezembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10}\%$ Conc. FvW
	1/100	100	1,7128	2,0000
	1/200	50	1,5793	1,6990
	1/400	25	1,2775	1,3979
	1/800	12,5	0,9413	1,0969
	1/1600	6,25	0,6988	0,7959
	1/3200	3,125	0,4151	0,4949

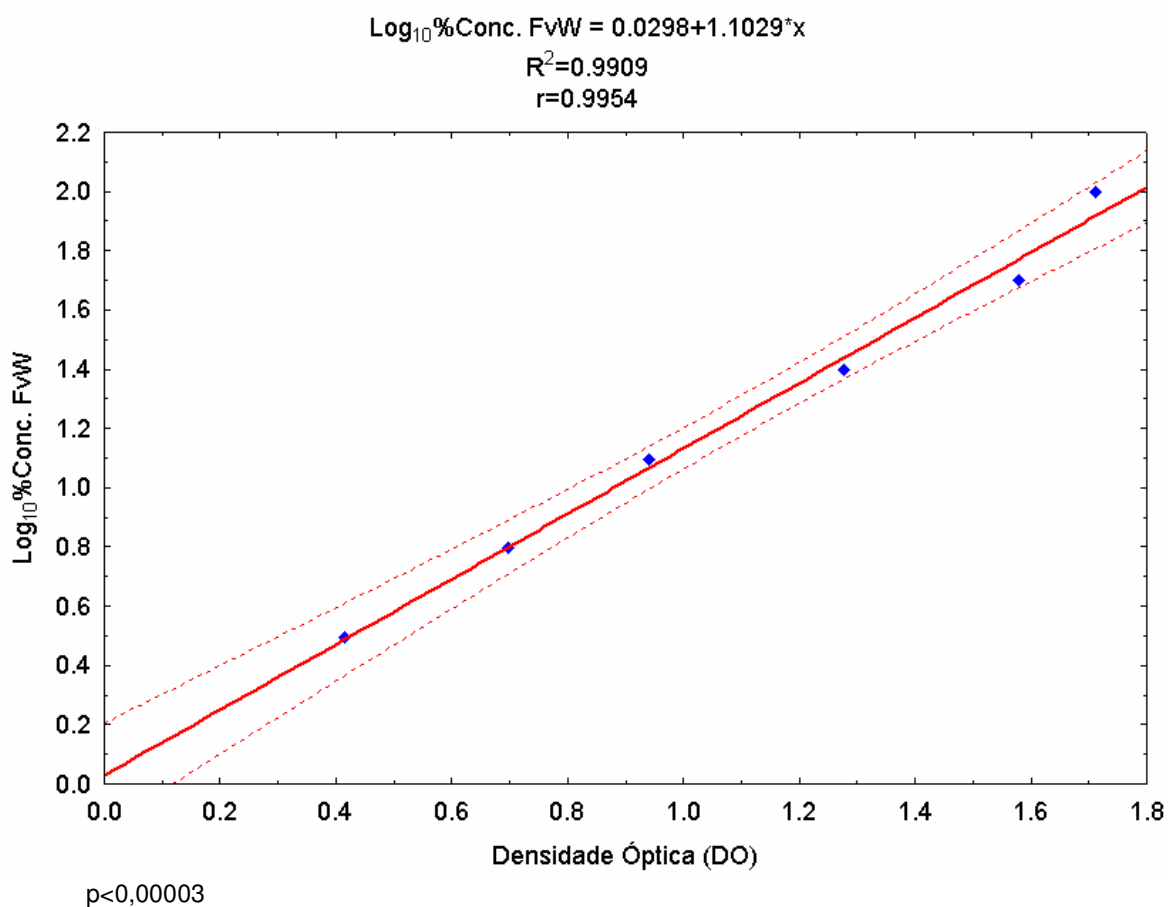


Figura 14. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 7ª placa ELISA (11 e 12/dezembro/2006).

Tabela 49. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 8ª placa ELISA (12 e 13/dezembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10}\%$ Conc. FvW
	1/100	100	1,7530	2,0000
	1/200	50	1,6100	1,6990
	1/400	25	1,3120	1,3979
	1/800	12,5	0,9960	1,0969
	1/1600	6,25	0,7100	0,7959
	1/3200	3,125	0,4520	0,4949

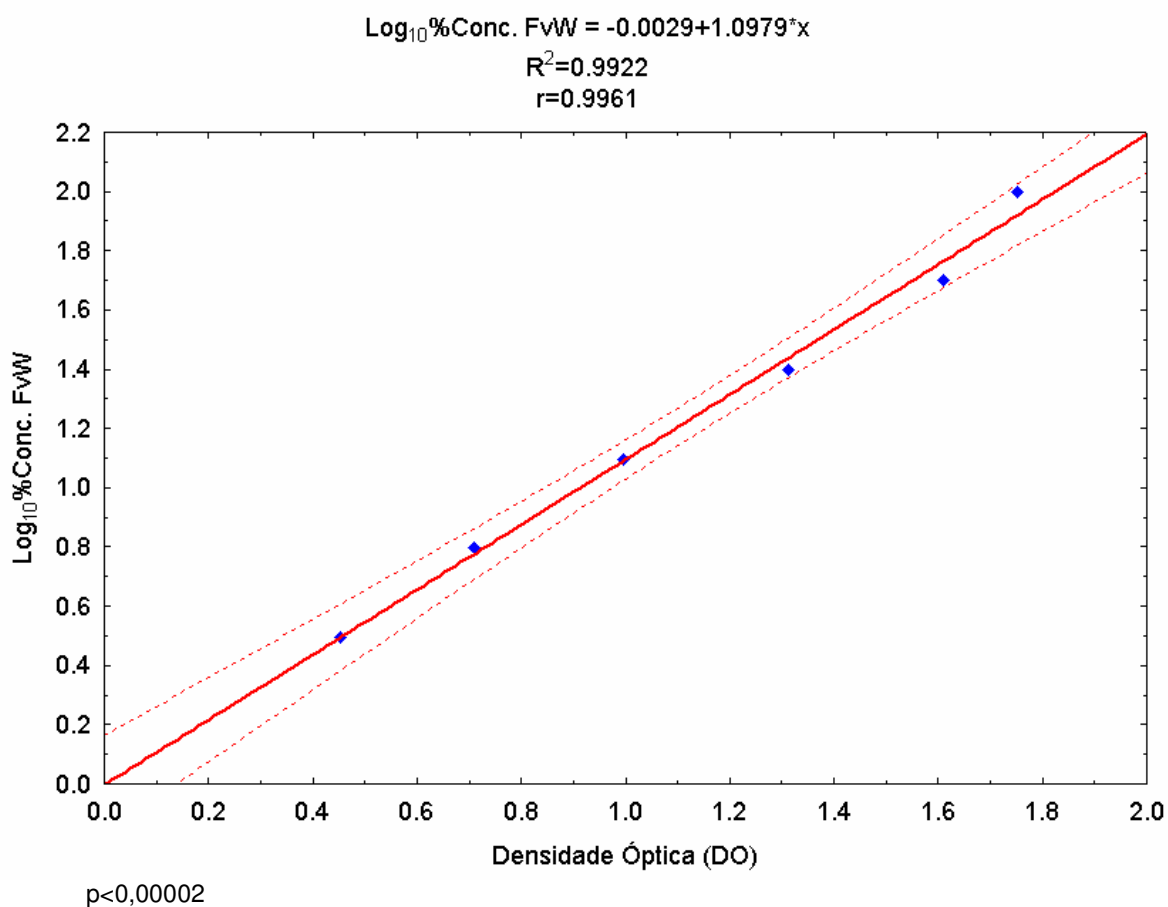


Figura 15. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 8ª placa ELISA (12 e 13/dezembro/2006).

Tabela 50. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 9ª placa ELISA (13 e 14/dezembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10}\%$ Conc. FvW
	1/100	100	1,7540	2,0000
	1/200	50	1,5625	1,6990
	1/400	25	1,2626	1,3979
	1/800	12,5	1,0041	1,0969
	1/1600	6,25	0,6849	0,7959
	1/3200	3,125	0,3850	0,4949

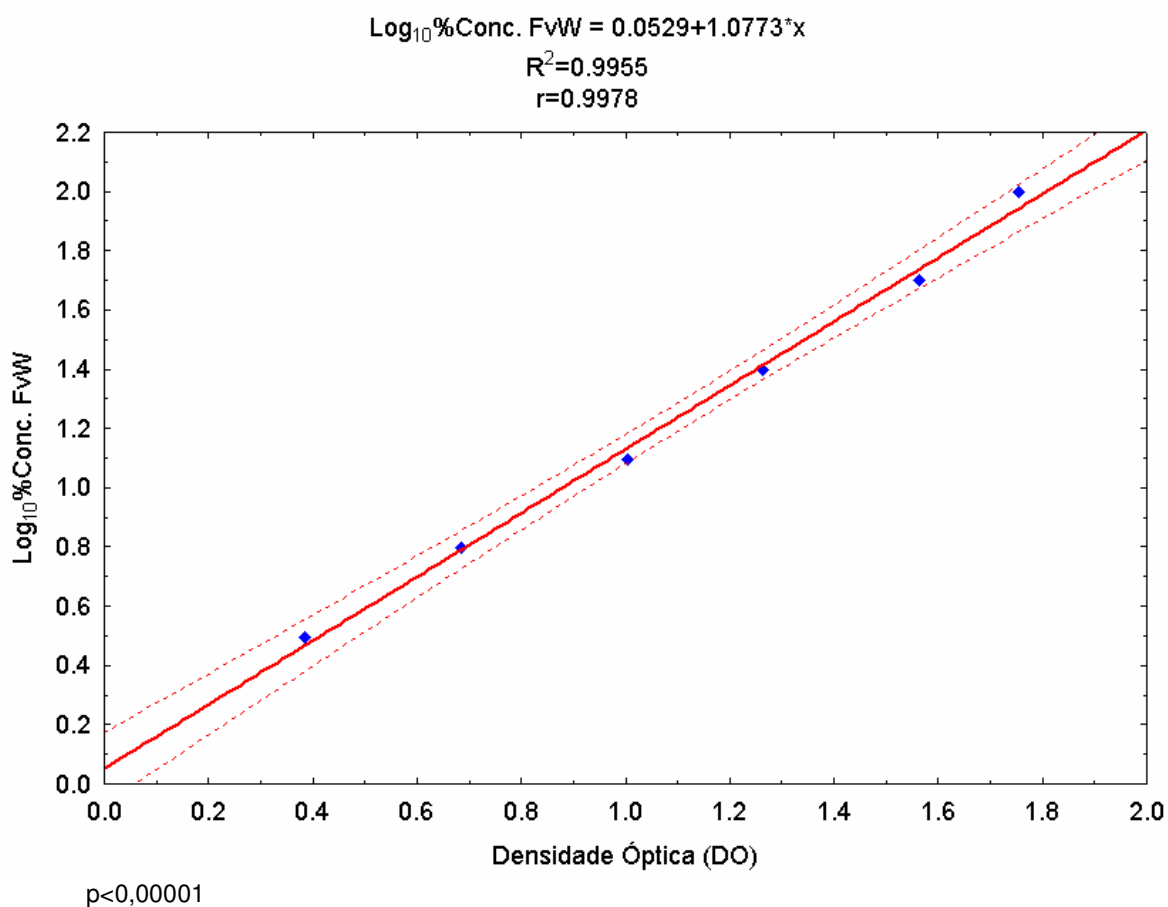
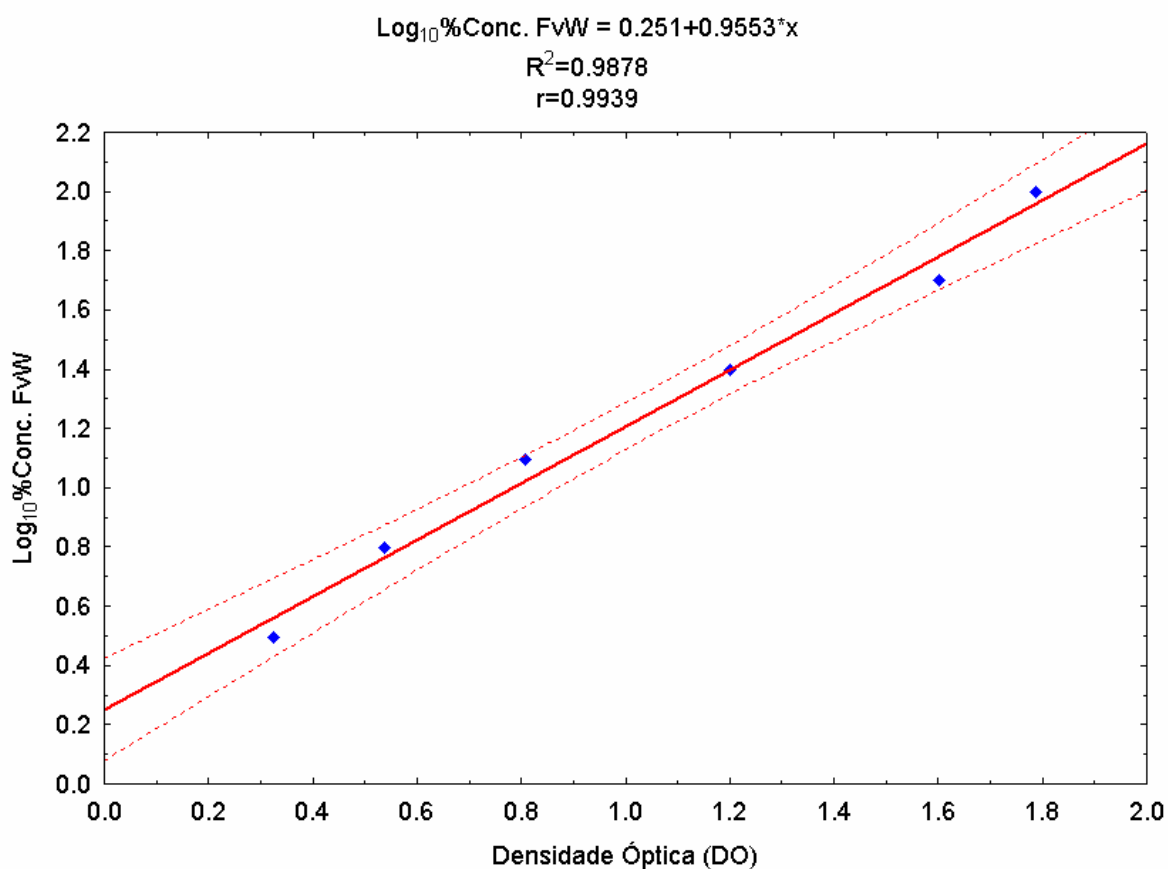


Figura 16. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 9ª placa ELISA (13 e 14/dezembro/2006).

Tabela 51. Valores da Densidade Óptica (DO), Concentração FvW (%) e Log_{10} %Concentração FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**) - 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).

Animal 2	Diluições	Concentração (%)	DO	$\text{Log}_{10}\% \text{Conc. FvW}$
	1/100	100	1,7860	2,0000
	1/200	50	1,6020	1,6990
	1/400	25	1,2000	1,3979
	1/800	12,5	0,8080	1,0969
	1/1600	6,25	0,5380	0,7959
	1/3200	3,125	0,3240	0,4949



$p < 0,00006$

Figura 17. Diagrama de dispersão entre os valores de Densidade Óptica (DO) e Log_{10} %Concentração de FvW de diversas diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e 1/3200) do plasma de referência (**Animal 2**), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e equação da reta. A linha de identidade é a linha sólida e as linhas pontilhadas são o Intervalo de Confiança 95% (IC95) – 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).

Tabela 52. Intra- teste. Média, Desvio-padrão e Coeficiente de variação (%) (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) - 10ª placa ELISA (14 e 15/dezembro/2006).

	C1	C2	C3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
A	5,94	4,69	2,43	37,76	108,43	18,12
B	6,31	4,84	2,61	33,30	98,27	20,34
C	6,16	4,71	2,50	34,59	108,38	17,85
D	6,16	4,79	2,58	37,91	103,28	20,12
Média	6,14	4,76	2,53	35,89	104,59	19,11
DP	0,15	0,07	0,08	2,31	4,86	1,30
CV	2,45	1,44	3,28	6,43	4,64	6,83

Tabela 53. Inter-teste. Média, Desvio-padrão e Coeficiente de variação (%) (Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6) - 6º teste ELISA-10 e 11/dezembro/2006; 7º teste ELISA-11 e 12/dezembro/2006; 8º teste ELISA-12 e 13/dezembro/2006; 9º teste ELISA-13 e 14/dezembro/2006 e 10º teste ELISA-14 e 15/dezembro/2006.

	C1	C2	C3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
6º teste	5,33	3,73	2,81	38,46	111,34	21,47
7º teste	5,75	4,06	2,59	39,79	102,44	21,93
8º teste	5,94	4,13	2,69	34,72	117,67	20,36
9º teste	6,13	4,34	2,91	36,46	105,13	20,68
10º teste	6,20	4,69	2,50	31,69	108,45	19,69
Média	5,87	4,19	2,70	36,22	109,01	20,83
DP	0,35	0,36	0,16	3,19	5,89	0,89
CV	5,93	8,48	6,09	8,79	5,41	4,27

Tabela 54. Valores de absorbância, média, desvio padrão e duas vezes desvio padrão do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) observado em 8 dias diferentes - 1º, 3º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º teste ELISA.

Teste	Densidade Óptica (DO)
1º teste	0,1658
3º teste	0,0953
5º teste	0,2153
6º teste	0,1780
7º teste	0,2180
8º teste	0,1565
9º teste	0,2330
10º teste	0,1080
Média	0,1712
DP	0,0507
2xDP	0,1014

Tabela 55. Limite de detecção do método. Valor médio e individual da substituição do valor de duas vezes desvio padrão do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) observado em 8 dias diferentes e substituído em diferentes equações (Figuras 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 14, 15, 16 e 17).

Substituição	FvW:Ag (%)
Figura 2	2,56
Figura 4	3,31
Figura 5	0,93
Figura 6	1,08
Figura 9	1,96
Figura 11	2,94
Figura 13	1,36
Figura 14	1,39
Figura 15	1,28
Figura 16	1,45
Figura 17	2,23
Média	1,86

Tabela 56. Valores individuais, média e desvio padrão do Coeficiente de determinação (R^2) e do Coeficiente de correlação observado em 8 dias diferentes - 1º, 2º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º teste ELISA.

Teste	R^2	r
1º teste	0.9807	0.9903
2º teste	0.9876	0.9938
5º teste	0.9878	0.9939
6º teste	0.9985	0.9992
7º teste	0.9909	0.9954
8º teste	0.9922	0.9961
9º teste	0.9955	0.9978
10º teste	0.9878	0.9939
Média	0.9901	0.9951
DP	0.0055	0.0027

6. DISCUSSÃO

6.1 Tempo de sangria da mucosa oral (TSMO)

Para a realização do TSMO os animais foram posicionados em decúbito lateral ou esternal. Primeiramente tentou-se realizar o teste com o animal em decúbito lateral e os animais que não aceitavam esta posição passavam para o decúbito esternal. O lábio foi evertido manualmente e uma incisão (perpendicular à margem do lábio) foi realizada com auxílio de uma lanceta. O sangue era absorvido com um papel filtro, sempre abaixo da localização da incisão. Segundo outros autores o delineamento do TSMO foi realizado da seguinte forma: os animais sempre eram posicionados em decúbito lateral, e quando não aceitavam esta posição eram sedados ou anestesiados; era colocada uma gaze sobre a maxila ou mandíbula fixando o lábio evertido; sempre se usava um aparelho (padronização de profundidade, extensão e pressão da incisão) para realização da incisão (Simplat II® ou Surgicutt®) (Jergens et. al., 1987; Brassard & Meyers, 1991; Brooks & Catalfamo, 1993; Sato et. al., 2000).

A incisão realizada para obtenção do TSMO foi perpendicular a margem do lábio. Segundo Brassard & Meyers (1991) incisões paralelas a linha do lábio tendem a ficar abertas, com isso ocorre um acúmulo de sangue que dificulta que o sangue flua livremente. Nestas circunstâncias fica dificultada a avaliação do fim do TSMO.

O TSMO foi realizado em todos os cães sem sedação ou anestesia e os animais não demonstraram desconforto ou dor na realização da incisão, sendo que as mesmas observações foram realizadas por Sato et. al. (2000). Existe um pequeno aumento não significativo no valor do TSMO quando os animais são sedados ou anestesiados, isto pode ocorrer por um efeito anti-plaquetário dos

agentes anestésicos (Ueda, 1971; McKenzie et. al., 1972) ou por efeitos dos medicamentos pré-anestésicos na função vascular ou plaquetária (Packham & Mustard, 1980). Segundo Jergens et. al. (1987) em 85% dos animais de seu experimento o TSMO foi realizado em decúbito lateral sem a necessidade de sedação ou anestesia, sendo que os animais aceitaram a posição e não mostraram sinais de desconforto ou dor e com isso chegou-se a conclusão de que a contenção química pode não ser necessária para a avaliação do TSMO.

O valor médio do número de plaquetas para cães aparentemente saudáveis, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos foi de $333.122,81 \pm 134.803,44$ plaquetas por microlitro de sangue. Segundo Jergens et. al. (1987) o TSMO pode estar aumentado em cães com marcada trombocitopenia (≤ 20.000 plaquetas/uL sangue).

Relatos anteriores de diversos autores mostram valores entre 72 e 294 segundos para TS da pele, realizados em vários locais, em cães saudáveis (Myers & Pierce, 1972; Dodds, 1975; Bouma et. al., 1976; Thomas et. al., 1979; Hayashi et. al., 1984).

O valor médio do TSMO para cães aparentemente saudáveis, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos encontrado neste estudo foi de $81,82 \pm 42,33$ segundos (30 a 195 segundos), sendo que outros autores encontraram valores levemente maiores, 84 a 216 segundos (Brooks & Catalfamo, 1993); 70 a 258 segundos (Forsythe & Willis, 1989); 114 ± 30 segundos – 54 a 156 segundos (Brassard & Meyers, 1991); $157,2 \pm 29,4$ segundos – 101 a 249 segundos (Jergens et. al., 1987); $129,5 \pm 44,2$ segundos – 53 a 247 segundos (Sato et. al., 2000).

O valor médio do TSMO para cães machos e fêmeas, aparentemente saudáveis, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos encontrado neste estudo foi respectivamente $78,77 \pm 37,97$ segundos (38 a 154 segundos) e $84,39 \pm 46,13$ segundos (30 a 195 segundos), sem diferenças significativas entre valores de TSMO de machos e fêmeas. Jergens et. al. (1987) em seu estudo encontrou valores similares entre machos ($160,2 \pm 25,2$ segundos) e fêmeas ($156,6 \pm 30,6$ segundos), porém com valores maiores quando comparados aos deste estudo.

Animais com doenças não comumente associadas à hemostasia primária tiveram $196,8 \pm 94,8$ segundos de TSMO (Jergens et. al., 1987).

O valor médio do TSMO para cães aparentemente saudáveis, com histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos encontrado neste estudo foi $80,29 \pm 33,7$ segundos (50 a 150 segundos), sem diferença significativa quando comparado com o grupo de cães aparentemente saudáveis, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos. Jergens et. al. (1987) encontrou um valor de TSMO de 180 ± 72 segundos para um grupo de cães sem histórico de sangramento exagerado durante a cirurgia e um valor maior, com diferença estatisticamente significativa, de $553,2 \pm 381,6$ para outro grupo com histórico de sangramento leve e marcadamente maior que o esperado durante a cirurgia.

O valor médio do TSMO para cães aparentemente saudáveis, da raça Dobermann, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos encontrado neste estudo foi $108,57 \pm 44,33$ segundos (65 a 187 segundos), sem diferença significativa quando comparado com o grupo de cães

aparentemente saudáveis, sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos.

Os animais 1 e 4 tiveram 48% e 62% respectivamente de FvW:Ag. Embora esses valores estejam abaixo dos valores de referência (70 a 180% de FvW:Ag - Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell – Ithaca/NY), caracterizando estes animais como portadores da DvW, não se encontrou um aumento no TSMO. Eles apresentaram 142 e 119 segundos respectivamente para o TSMO. Segundo Jergens et. al. (1987) os sete Dobermanns utilizados em seu estudo tinham DvW (9 a 18% FvW:Ag), sendo que estes animais apresentaram um prolongamento do TSMO acima dos valores de referência ($643,8 \pm 220,8$ segundos – 369 a 1087 segundos) com aumento significativo quando comparado aos cães sem DvW.

Segundo Brooks & Catalfamo (1993) os cinco Dobermanns com tipo 1 da DvW tiveram um aumento significativo do TSMO (330 a 720 segundos) quando comparados aos cães controle e os animais com tipo 2 ou 3 da DvW tiveram sangramento persistente (>15 minutos). Este autor afirma ainda que existiu uma correlação negativa ($r = -0,7$) entre FvW:Ag e o TSMO dos animais com o tipo 1 da DvW. Isto não ocorreu no presente estudo, uma vez que os dois animais com diminuição dos valores do FvW:Ag não tiveram um aumento acima dos valores de referência no TSMO.

A relação entre TSMO e FvW:Ag em 61 Greyhounds foi considerada não estatisticamente significativa ($p = 0,17$ e $r = -0,18$), ou seja, não se encontrou correlação entre TSMO e FvW:Ag. Em 5 cães com FvW:Ag<50% tiveram TSMO médio menor que 234 segundos e o cão com menor FvW:Ag (29%) teve um TSMO de 218 segundos. Segundo o autor esta disparidade entre Greyhounds e

Dobermanns pode ocorrer por uma diferença na estrutura multimérica do FvW dos Greyhounds, ou seja, Greyhounds com uma baixa concentração plasmática do FvW podem ter uma concentração maior de multímeros de alto peso molecular quando comparados aos Dobermanns (Sato et. al., 2000).

Segundo Brassard & Meyers (1991) o TSMO médio em cães com DvW está mais de três vezes acima dos valores encontrados para cães livres da DvW, sendo que este achado também foi encontrado para o TS em cães (Dodds, 1975; Bouma et. al., 1976; Jergens et. al. 1987) e em humanos (Zimmerman & Ruggeri, 1982).

Segundo Brassard & Meyers (1991) e Brooks & Catalfamo (1993) quando ocorre um prolongamento do TSMO acima de dois desvios padrão da média dos cães controle, esse aumento pode ser considerado sensível e específico para defeitos de hemostasia primária e também na redução da adesão plaquetária como consequência da deficiência do FvW, sendo que isto também não ocorreu no presente estudo, pois a DvW é uma alteração de hemostasia primária e os dois animais com DvW não apresentaram aumento do TSMO, mostrando que a sensibilidade do teste não foi muito alta.

O TSMO foi realizado em momento único durante este experimento. Segundo Sato et. al. (2000) a repetibilidade é um dos aspectos mais importante na confiabilidade de um teste, sendo que em seu estudo, quando se avaliou TSMO, encontrou-se uma repetibilidade intra-observador (mesmo observador) de ± 113 segundos e uma repetibilidade inter-observador (dois observadores diferentes) de ± 126 segundos. Sato et. al. (2000) afirma ainda que em 95% das ocasiões quaisquer duas observações do TSMO em um mesmo cão podem diferir em ± 2 minutos, seja com um único observador ou com dois observadores diferentes. Se apenas uma leitura for realizada, a acurácia obtida é de ± 80 segundos.

A não utilização de uma gaze para fixar o lábio evertido pode ter interferido com a não obtenção de valores aumentados de TSMO para os dois cães com diminuição do FvW:Ag ($< 70\%$). Segundo Jergens et. al. (1987) e Sato et. al. (2000) a tira de gaze que mantinha o lábio evertido servia também para causar um retardo no retorno venoso, levando a um engurgitamento moderado dos vasos sanguíneos superficiais da mucosa.

A falta de um aparelho (padronização de profundidade, extensão e pressão da incisão) para realização da incisão (Simplat II[®] ou Surgicutt[®]) pode ter influenciado a não obtenção de valores aumentados de TSMO para os dois cães com FvW:Ag $< 70\%$, apesar de Polzin et. al., 1984 terem usado uma lanceta para determinação do TSMO em cães aparentemente saudáveis e encontraram valores de 132 ± 30 segundos, os quais são similares aos encontrados pelos demais autores e levemente maiores quando comparados aos encontrados neste estudo.

O TSMO não se mostrou um teste com alta sensibilidade para detecção de animais com DvW. Segundo Sato et. al. (2000) o TSMO pode não ser sensível o suficiente para detectar leves reduções na atividade do FvW plasmático, principalmente quando a função plaquetária é adequada. Um estudo realizado em Medicina humana com pacientes aparentemente saudáveis mostrou que o TS foi significativamente influenciado pela concentração do FvW plaquetário, mas não pela concentração do FvW plasmático (Rodeghiero et. al., 1992).

Os multímeros de ultra alto peso molecular do FvW foram encontrados somente em plaquetas na espécie humana (Gralnick et. al., 1986) e em cães (Parker et. al., 1991). Os multímeros de ultra alto peso molecular do FvW encontrados nas plaquetas são mais ativos que os multímeros do FvW encontrados no plasma. Estas observações indicam que o FvW plaquetário em seres humanos realiza uma melhor

função na determinação do TS em pacientes aparentemente saudáveis e em pacientes com o tipo 1 da DvW, quando comparado ao FvW plasmático (Sato et. al., 2000), sendo que é improvável que o FvW plaquetário canino realize uma melhor função na determinação do TS, pois o FvW plaquetário canino corresponde a apenas 3% do FvW total circulante (Parker et. al., 1991).

Por todos estes motivos o TSMO realizado conforme Marks, 2000 modificado não pode ser considerado como teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand.

6.2 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA)

O primeiro passo para a realização da Agregação plaquetária induzida pela Ristocetina (RIPA) foi a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Realizaram-se diversos testes de velocidades e tempos de centrifugação, sendo que a velocidade de 500rpm pelo tempo de 20 minutos foi a melhor escolha para obtenção do PRP, pois nesta velocidade e por este período de tempo, conseguia-se a obtenção do PRP na maioria dos animais.

Foram testadas várias concentrações de ristocetina (1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625mg/mL), sendo que os melhores resultados médios obtidos foram com concentrações de 0,03125; 0,125; 0,25, 0,5mg/mL de ristocetina respectivamente, contrariando Dodds (1970) que observou que são necessárias altas concentrações de ristocetina para induzir agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas (PRP) canino, sendo que estas altas concentrações também produzem precipitação de proteínas plasmáticas, mascarando a agregação plaquetária.

As possíveis interferências técnicas decorrentes da manipulação das amostras, dos equipamentos e/ou dos reagentes foi descartada pela efetividade na agregação de amostras de PRPs humanos, cujos resultados ultrapassaram os 85% de agregação.

Observando-se as cubetas após o término do teste constatou-se que ocorria agregação, porém de maneira diferente da agregação ocorrida no PRP humano. No PRP humano o plasma ficava límpido após a agregação e notava-se um pequeno grumo no fundo da cubeta (plaquetas agregadas, que com o peso afundavam), já no PRP canino formavam-se vários grumos de tamanho inferior ao formado no PRP humano, sendo que esses grumos ficavam em suspensão não tendo peso suficiente para afundar. Este fato pode ter contribuído para os baixos valores de agregação encontrados em animais livres da DvW.

Diversos autores relatam a resistência a agregação com a utilização da ristocetina em várias espécies animais (De Gaetano et. al., 1975; Brinkhous et. al., 1977; Johnson et. al., 1979; Rosborough et. al., 1980; Leis et. al., 1980). Em condições experimentais o FvW bovino, suíno e canino (Olson et. al., 1975), além do FvW murino (De Gaetano et. al., 1975) não sustentam a agregação plaquetária induzida pela ristocetina em plaquetas homólogas frescas; o FvW eqüino e canino falham em sustentar a aglutinação plaquetária em plaquetas homólogas lavadas e fixadas (Brinkhous et. al., 1977). Porém, outros experimentos afirmam que o FvW suíno (Bowie et. al. 1975), bovino (Kalogjera & Owen, 1978) e canino (Leis et. al., 1980) podem sustentar agregação plaquetária induzida pela ristocetina em plaquetas homólogas frescas.

As proteínas plasmáticas tem um efeito inibitório muito grande sobre o FvW canino (Johnson et. al., 1979; Leis et. al., 1980). Segundo Leis et. al. (1980) a

extensão da inibição da agregação pelas proteínas plasmáticas é maior no agregômetro do que no sistema do tubo inclinado (observação macroscópica), pois ocorre formação de agregados plaquetários marcadamente menores.

Neste estudo a concentração de 1,5mg/mL de ristocetina não promoveu qualquer agregação plaquetária. Segundo Johnson et. al. (1981) a ristocetina, na concentração de 1,5mg/mL, causou agregação no PRP humano, porém falhou na agregação de PRP de cães normais e de cães com DwW. Já o polibrene e a botrocetina realizaram agregações tanto no PRP humano, quanto no PRP de cães normais, falhando apenas na agregação do PRP de cães com DwW.

Segundo Johnson et. al. (1981) a ristocetina na concentração de 1mg/mL induziu aglutinação de plaquetas humanas lavadas e fixadas na presença de FvW (plasma) humano e canino, já as plaquetas caninas lavadas e fixadas, para a mesma concentração de ristocetina, não aglutinaram para nenhum dos dois tipos de FvW (humano e canino), sendo que esta aglutinação só ocorreu quando se aumentou a concentração de ristocetina para 2mg/mL e usou-se FvW canino. Isto mostra que, segundo Johnson et. al. (1981), concentrações mais altas de ristocetina foram capazes de aglutinar plaquetas caninas, na presença de FvW canino, contrariando o que foi encontrado neste estudo, pois com menores concentrações de ristocetina conseguiu-se melhores resultados de agregação. O mesmo acontece com o PRP de ratos que tem se mostrado refratário a altas concentrações de ristocetina (De Gaetano et. al., 1975).

A ausência de agregação induzida pela ristocetina no PRP canino corrobora com os achados de Brinkhous et. al. (1977); Johnson et. al. (1979) que observaram que o plasma canino não sustenta a aglutinação induzida pela ristocetina em plaquetas caninas lavadas e fixadas, e também com os achados de Mischke &

Schulze (2004), que não observaram agregação quantitativa no PRP de cães normais utilizando diversas concentrações de ristocetina (10; 5,0; 2,5 e 1,0mg/mL). Os testes de agregação conduzidos por Leis et. al. (1980) foram realizados em 2 sistemas: mensuração turbidimétrica da agregação plaquetária (Agregômetro) e mensuração da agregação plaquetária por avaliação macroscópica do tubo inclinado. Leis et. al. (1980) não observaram agregação com a utilização de PRP de 8 cães normais, na presença de ristocetina (1,2mg/mL), porém quando se testou PRP humano e plaquetas filtradas por gel (humanas ou caninas), na presença de igual concentração de ristocetina, obteve-se forte agregação. Isto ocorre provavelmente devido a inibição causada pelas proteínas plasmáticas (Baugh et. al., 1975; Stibbe & Kirby, 1976), as quais são separadas das plaquetas pela filtração por gel (Leis et. al., 1980). A albumina é a maior, porém não necessariamente a única, contribuidora para este efeito inibitório das proteínas plasmáticas e quando se encontra em concentrações menores que as fisiológicas (Barsanti et. al., 1977) têm a característica de inibir a agregação das plaquetas caninas filtradas por gel induzida pela ristocetina. A agregação das plaquetas humanas filtradas por gel não sofre inibição por quantidades equivalentes de albumina (Leis et. al., 1980).

As plaquetas frescas e lavadas se comportam como as plaquetas filtradas por gel (Leis et. al., 1980). Segundo Johnson et. al. (1981) plaquetas humanas frescas e lavadas sofreram agregação induzida pela ristocetina na presença de FvW humano e canino, enquanto plaquetas caninas frescas e lavadas só sofrem agregação induzida pela ristocetina na presença de FvW canino.

Os resultados deste estudo variaram quando se testou dois cães livres da DvW (Animal 2 e Animal 3), sendo que o Animal 2 teve sempre melhores resultados de RIPA quando comparado ao Animal 3. O melhor resultado individual (Animal 2)

foi conseguido com a concentração de 0,25mg/mL de ristocetina (23%). Não se conseguiu uma repetibilidade quando se testou o mesmo animal diversas vezes. Segundo Mischke & Schulze (2004) a ristocetina não é uma substância adequada para o estudo “in vitro” da agregação das plaquetas caninas (PRP). As plaquetas caninas são menos responsivas a ristocetina quando comparadas as plaquetas humanas (Leis et. al., 1980; Soloviev et. al., 1999).

As diferentes respostas para agregação plaquetária de 4 espécies animais a diversos tipos de agonistas podem ocorrer devido a diferenças estruturais (incluindo composição da membrana plaquetária e presença de receptores específicos para os agonistas) ou ativação por distintas vias sinalizadoras pelo agonista (Pelagalli, et. al., 2002).

A botrocetina exibe bons resultados na aglutinação plaquetária quando é testada em plasmas humanos (sensíveis a ristocetina) e também em plasmas caninos (resistentes a ristocetina) (Read et. al., 1983).

Existe uma especificidade da botrocetina para o FvW, sendo que existe falta de reatividade com plasmas de pacientes com DvW (humanos e caninos) (Read et. al., 1978; Brinkhous et. al., 1981; Johnson et. al., 1981).

A partir de 1980, com a introdução do agregômetro por impedância, já se pode realizar o estudo da função plaquetária no sangue total, sem a necessidade de centrifugação ou contagens celulares. Por esta técnica a população total de plaquetas é avaliada, sendo preferível à avaliação da população plaquetária menos densa (PRP) (Reis et. al., 1986; Baliakina et. al., 1994; Heath et. al., 1994; Anfossi et. al., 1995; Wallen et. al., 1997). Segundo Soloiev et. al. (1999) 36,8% da população canina testada, em seu estudo, sofreu agregação plaquetária induzida pela ristocetina (1mg/mL).

Apesar de diversos autores afirmarem que não é possível a realização da RIPA em PRPs caninos, optou-se por tentar esta técnica e obteve-se resultados melhores do que os esperados, o que mostra que ainda se necessitam de estudos com relação à RIPA em cães, além de se tentar a agregação com o uso da botrocetina e também a agregação do sangue total. Apesar desses resultados melhores que o esperado, a RIPA não pode ser considerada como teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand.

6.3 Antígeno do Fator von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA

As vantagens do ELISA são: simplicidade técnica na realização do teste, baixo custo, sensibilidade satisfatória, acurácia e possibilidade de se testar grandes quantidades de plasma de uma só vez (Slappendel et. al., 1992).

Para a realização do teste utilizou-se anticorpo espécie específico, concordando com Slappendel et. al. (1992). O uso de anticorpos espécie específico é obrigatório para uma identificação acurada, especialmente em baixas concentrações de FvW:Ag (Benson et. al., 1983), porém Johnstone & Crane (1991) comprovaram que anticorpos anti FvW humano são eficazes na determinação do FvW:Ag canino.

Os volumes aplicados na placa, o tempo e a temperatura de incubação variaram, quando comparados aos demais autores, porém se seguiu as recomendações do fabricante do anticorpo com algumas alterações.

O cromógeno utilizado foi o TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidine). Segundo Porstmann & Kiessig (1992) a utilização do o-phenylenediamine (OPD) como cromógeno tem mostrado baixo limite de detecção em métodos colorimétricos. O TMB não é mutagênico, nem carcinogênico (Bos et. al., 1981; Goka & Farthing,

1987) e mais sensível que o OPD na detecção do HRP (Horseradish peroxidase) (Porstmann & Kiessig, 1992; Goka & Farthing, 1987), entretanto ele é pouco solúvel e se decompõe rapidamente em solução aquosa (Frey et. al., 2000), sendo estável por poucas semanas (Gallati & Pracht, 1985) devido à mudança de cor e perda do princípio ativo (Goka & Farthing, 1987). Segundo Bos et. al. (1981) o rendimento de cor proporcionado pelo TMB é superior ao obtido pelo OPD. O OPD é fotossensível (Voller et. al., 1979).

O pH da solução cromógeno e substrato foi de 6,0 devido ao Tampão Citrato Acetato. O pH ótimo para ocorrer a reação de oxidação do TMB varia de 5,5 a 6,0 (Bos et. al., 1981)

6.3.1 Primeiro ELISA

O primeiro teste ELISA foi realizado nos dias 1º e 2 de agosto de 2006. Utilizou-se a microplaca MaxiSorp®, o bloqueio da placa foi realizado com PBS-BSA 1% e o diluente da amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS-BSA 1% T20.

Neste teste ocorreu identificação do FvW pelos anticorpos envolvidos, isto pode ser demonstrado pelo fato da Densidade Óptica (DO) do plasma de referência ter variado de maneira proporcional a diluição utilizada (Tabela 19).

A curva padrão para determinação do FvW:Ag foi construída por diluições seriais do plasma de referência (Animal 2). Foi confeccionado um diagrama de dispersão entre DO e Concentração do FvW (%), que se comportou de maneira exponencial (Figura 1). Após a transformação da Concentração do FvW em Log_{10} %Concentração do FvW a curva de regressão se comportou de maneira linear (Figura 2). Esses achados concordam com os encontrados por Johnstone & Crane (1991) e Slappendel et. al. (1992).

A variação dos valores foi bem explicada pelo modelo linear ($R^2 = 0,9807$). A correlação entre DO e Log_{10} %Concentração do FvW foi fortíssima ($r = 0,9903$) e todos os pontos se encontraram dentro do Intervalo de Confiança 95% (IC95), mostrando que o teste se comportou de maneira confiável para detecção do FvW:Ag em cães.

Quando o diagrama de dispersão entre DO e Log_{10} %Concentração do FvW foi construído sem a diluição 1/3200 do plasma de referência, conseguiu-se melhorar o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de variação (r), para 0,9985 e 0,9993 respectivamente (Figura 4).

Foram testados 3 animais (Animal 7, Animal 8 e Animal 9), todos sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos, os quais tiveram FvW:Ag dentro do intervalo de normalidade (Tabela 24). Os valores de FvW:Ag encontrados para esses animais não mostraram variação quando se utilizaram os dois modelos de regressão linear (Figuras 2 e 4). Este fato pode ser demonstrado pelo $\pm\text{IC95}$. Os intervalos de $\pm\text{IC95}$ conseguidos através da equação da Figura 4 estão sempre contidos nos intervalos de $\pm\text{IC95}$ conseguidos pela equação da Figura 2 (Tabela 24). Com isso pode-se afirmar que não existiu diferença significativa entre os dois modelos de regressão linear.

Os valores encontrados para os controles negativos (Tabela 25) mostraram que mesmo soro ou crioprecipitado pobre contém FvW. O soro possui menores quantidades de FvW quando comparado ao criopobre, sendo que os valores encontrados para o criopobre (acima de 100%) se devem ao fato do teste ser comparativo e também de que o doador do criopobre era outro animal, que provavelmente possuía valores de FvW:Ag bem maiores do que os do plasma de referência (Animal 2).

Os testes de ligação inespecífica foram realizados para se certificar de que o método era realmente seguro para o diagnóstico da DvW em cães. O valor médio encontrado para a DO do substrato (branco) foi 0,0502. O valor da DO do branco foi inferior as DOs encontradas para Antígeno + substrato, Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato, Anticorpo de captura + substrato e Anticorpo de detecção + substrato, sendo superior apenas a DO do Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato (Tabela 21).

Os testes de Antígeno + substrato e Anticorpo de captura + substrato são realizados para detectar a presença de alguma peroxidase endógena que pode estar alterando o valor da DO.

Os testes de Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato são realizados para testar se o bloqueio da placa foi realizado de maneira consistente.

O teste de Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato é realizado para se descartar alguma ligação inespecífica entre anticorpo de captura e anticorpo de detecção.

Pode ter ocorrido algum tipo de ligação inespecífica (valor levemente aumentado do teste de anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) e talvez o bloqueio não esteja apropriado, pois os valores encontrados para Antígeno + Anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato estão mais próximos do branco do que os outros testes (Antígeno + substrato e Anticorpo de captura + substrato). Devido aos valores encontrados, ainda existe a necessidade de se testar o bloqueio da placa e também a possível ligação inespecífica que pode estar ocorrendo.

6.3.2 Segundo ELISA

O segundo teste ELISA foi realizado nos dias 7 e 8 de novembro de 2006. Utilizou-se a microplaca MaxiSorp[®], o bloqueio da placa foi realizado com PBS-BSA 1% e o diluente das amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS-BSA 1% T20.

Como no primeiro teste ELISA, encontraram-se ótimos valores para coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9876$) e o coeficiente de variação ($r = 0,9938$) (Figura 5).

Quando o diagrama de dispersão entre DO e Log_{10} %Concentração do FvW foi construído sem a diluição 1/100, conseguiu-se melhorar o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de variação (r), para 0,9986 e 0,9993 respectivamente (Figura 6).

Foram testados 2 animais (Animal 4 e Animal 5), ambos sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos. Os dois animais testados já possuíam valores para FvW:Ag (62 e 195%, respectivamente) realizados na Universidade de Cornell. Os valores são mostrados na Tabela 31. Foram testados também 3 plasmas controle (C1=tipo 1 da DvW; C2=tipo 2 DvW; C3=tipo 3 DvW) com concentração conhecida do FvW:Ag ($11 \pm 0,25$, $9 \pm 0,2$ e 0%, respectivamente). Os valores obtidos para FvW:Ag no presente estudo são mostrados na Tabela 32.

Nos dois modelos de regressão linear utilizados (Figuras 5 e 6) não ocorreram variações para os valores encontrados para os animais 4 e 5 (Tabela 31), e também para os plasmas controle (C1, C2 e C3) (Tabela 32).

A diferença observada entre os valores do FvW:Ag encontrados na Universidade de Cornell e os encontrados no presente estudo podem ser explicados pela diferença no plasma de referência, sendo que em Cornell se utiliza um pool de

plasmas de animais aparentemente saudáveis e no presente estudo se optou por utilizar apenas 1 animal (Animal 2). A opção de escolher apenas 1 animal foi preferida, pois já se conhecia previamente a concentração do FvW:Ag do Animal 2, sendo que se um pool fosse realizado não se poderia afirmar, com certeza, que todos os animais envolvidos apresentariam valores normais de FvW:Ag. Essa diferença observada não alterou o diagnóstico final.

Foram realizados 2 testes de ligação inespecífica Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato para testar a ligação inespecífica anticorpo de captura-anticorpo de detecção e o bloqueio da placa respectivamente (Tabela 29). Encontraram-se valores relativamente altos para estes testes e por este motivo optou-se por testar outro tipo de microplaca (MedSorp®) e também outros bloqueadores (PBS-BSA 2,5% e PBS-Leite em pó 10%). Nas soluções bloqueadoras a concentração de BSA foi aumentada para 2,5% para tentar aumentar a saturação de proteína estranha ao sistema e testou-se o leite em pó como outra fonte protéica. Segundo Slappendel et. al. (1992) existe uma imunoreatividade heteróloga específica de amostras caninas contra albumina e outras proteínas séricas de muitas espécies.

6.3.3 Terceiro ELISA

O terceiro teste ELISA foi realizado nos dias 20 e 21 de novembro de 2006. Utilizaram-se dois tipos de microplaca (MaxiSorp e MedSorp), em cada uma testaram-se dois tipos de bloqueadores PBS-BSA 2,5% e PBS-Leite em pó 10%. Quando se utilizou o PBS-BSA 2,5% como bloqueador o diluente da amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS-BSA 2,5% T20, já quando se utilizou PBS-Leite em pó 10% como bloqueador o diluente da amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS- Leite em pó 10% T20.

Foram testados os plasmas controle (C1; C2; C3) e testes de ligação inespecífica Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato e Anticorpo de detecção + substrato. Esses valores são mostrados na Tabela 33 para MaxiSorp e na Tabela 34 para MedSorp

Os menores valores para DO dos testes de ligação inespecífica foram encontrados na placa MaxiSorp, quando se utilizou PBS-BSA 2,5% como bloqueador e na placa MedSorp, quando se utilizou PBS- leite em pó 10% como bloqueador (Tabela 33 e 34).

Foi realizada uma relação entre as DOs dos plasmas controle (C1; C2; C3) e a DO do teste de ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) para a placa MaxiSorp (PBS-BSA 2,5%) e MedSorp (PBS- leite em pó 10%) (Tabela 35). Com a relação puderam-se comparar as duas placas e chegar àquela que apresentava a menor interferência da ligação inespecífica, ou seja, os maiores valores dessa relação mostram os menores valores da DO do Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato, a não ser que a DO do numerador seja maior que a DO do denominador. A menor interferência foi identificada na placa MedSorp com a utilização de PBS- leite em pó 10% como bloqueador.

6.3.4 Quarto ELISA

O quarto teste ELISA foi realizado nos dias 27 e 28 de novembro de 2006. Utilizou-se a microplaca MedSorp®, o bloqueio da placa foi realizado com PBS- leite em pó 10% e o diluente das amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS- leite em pó 10% T20.

Os valores de DO dos testes de ligação inespecífica foram baixos, não causando interferência (Tabela 39).

Este ELISA se comportou de maneira totalmente diferente da esperada. Quando foi confeccionado um diagrama de dispersão entre DO e Concentração do FvW (%), se esperava uma tendência exponencial, porém esta foi linear (Figura 7). Após a transformação da Concentração do FvW em $\text{Log}_{10} \text{ \%Concentração do FvW}$ a curva de regressão se comportou de maneira logarítmica, e não linear (Figura 8).

Foram testados 3 animais (Animal 4, Animal 5 e Animal 6), todos sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos. Os valores do FvW:Ag são mostrados na Tabela 41. Foram testados também 3 plasmas controle (C1; C2; C3). Esses valores são mostrados na Tabela 42.

Ocorreu uma diferença entre os valores do FvW:Ag (Animal 4 e Animal 5) encontrados na Universidade de Cornell e os encontrados no presente estudo. Essa diferença alteraria o diagnóstico final, principalmente no Animal 5, que passaria de normal pelos valores encontrados na Universidade de Cornell (195%) para suspeito ou doente pelos valores encontrados neste estudo (61,11 a 62,61%). Por todos estes motivos a placa MedSorp com PBS- leite em pó 10% não foi confiável para o diagnóstico da DvW.

6.3.5 Quinto ELISA

O quinto teste ELISA foi realizado nos dias 29 e 30 de novembro de 2006. Utilizou-se a microplaca MaxiSorp[®], o bloqueio da placa foi realizado com PBS-BSA 2,5% e o diluente das amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS- BSA 2,5% T20.

Encontraram-se ótimos valores para coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9878$) e o coeficiente de variação ($r = 0,9939$) (Figura 9, 10, 11 e 12).

Foram realizados dois diagramas de dispersão, por subtração do valor médio encontrado para a DO do substrato (branco) (Figura 9) ou do valor do teste de

ligação inespecífica (Anticorpo de captura + anticorpo de detecção + substrato) (Figura 11) dos valores das DOs das diluições do plasma referência. O Índice ELISA foi calculado e plotado contra o Log_{10} %Concentração FvW (Figuras 10 e 12). Não existiram diferenças significativas entre os modelos de regressão linear.

Foram testados 2 animais (Animal 4 e Animal 5), ambos sem histórico de sangramento prévio e sem sinais de distúrbios hemostáticos (Tabela 45). Foram testados também 3 plasmas controle (C1; C2; C3) (Tabela 46).

Nos quatro modelos de regressão linear utilizados (Figuras 9, 10, 11 e 12) não ocorreram variações entre os valores encontrados para os animais 4 e 5, e também entre os plasmas controle.

A diferença observada entre os valores do FvW:Ag encontrados na Universidade de Cornell e os encontrados no presente estudo não alterou o diagnóstico final.

6.3.6 Sexto, Sétimo, Oitavo, Nono e Décimo ELISA

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização da placa MaxiSorp e com o bloqueador PBS-BSA 2,5%, sendo que o teste ELISA realizado nestes moldes pode ser considerado o teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand, concordando com Brooks et. al. (1992); Clark & Parry (1995); Moser et. al. (1996) que afirmaram que o FvW:Ag é usado como um teste de triagem para detecção de portadores da DvW.

O sexto teste ELISA realizado nos dias 10 e 11 de dezembro de 2006, o sétimo teste ELISA realizado nos dias 11 e 12 de dezembro de 2006, o oitavo teste ELISA realizado nos dias 12 e 13 de dezembro de 2006, o nono teste ELISA realizado nos dias 13 e 14 de dezembro de 2006 e o décimo teste ELISA realizado

nos dias 14 e 15 de dezembro de 2006 foram realizados para se calcular o intra-teste, o inter-teste e o limite de detecção do método. Em todos os testes se utilizou a microplaca MaxiSorp[®], o bloqueio da placa foi realizado com PBS-BSA 2,5% e o diluente das amostras e do anticorpo de detecção foi o HBS- BSA 2,5% T20.

O coeficiente de variação do Intra-teste foi de 2,45; 1,44; 3,28; 6,43; 4,64 e 6,83% para o Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6 respectivamente (Tabela 52). Estes valores são considerados bons, sendo superiores aos encontrados por Slappendel et. al. (1992) e similares aos encontrados por Johnstone & Crane (1991).

O coeficiente de variação do Inter-teste foi de 5,93; 8,48; 6,09; 8,79; 5,41 e 4,27% para o Controle C1, Controle C2, Controle C3, Animal 4, Animal 5 e Animal 6 respectivamente (Tabela 53). Estes valores são considerados bons, sendo similares aos encontrados por Slappendel et. al. (1992) e superiores aos encontrados por Johnstone & Crane (1991).

Os valores encontrados para o intra e o inter-teste nos mostra uma boa precisão para teste ELISA.

O Limite de detecção do método (sensibilidade) foi de 1,86% (Tabela 55), concordando com o valor encontrado por Slappendel et. al. (1992).

O coeficiente de determinação teve valor médio de 0,9901 (0,9807 a 0,9985) e o coeficiente de correlação teve valor médio de 0,9951 (0,9903 a 0,9992) (Figura 56). O coeficiente de determinação médio encontrado por Slappendel et. al. (1992).foi 0,990 (0,980 a 0,997).

A validação de um método representa um processo onde a adequação do procedimento analítico é demonstrada pela aplicação pretendida (Tuomela et. al., 2005).

A validação consiste em análises ou verificações de 8 ou 9 parâmetros, descritos no guia da ICH (International Conference of Harmonisation) (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit, 1994 e 1996; Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Center for Veterinary Medicine, 2001). Esses parâmetros fornecem uma informação sobre a possibilidade de erros, a probabilidade de sua ocorrência e sua quantificação dentro do método (Tuomela et. al., 2005).

Os parâmetros utilizados para a validação são (Tuomela et. al., 2005; Geng et. al., 2005):

- Especificidade ou seletividade: habilidade do método de mensurar um analito em uma amostra na presença de outros componentes. O presente teste se mostrou específico, pois identificou o FvW na presença de diversos componentes plasmáticos;
- Lineariedade: habilidade de fornecer resultados proporcionais a concentração do analito na amostra. A lineariedade deste estudo pode ser comprovada pelos altos valores obtidos de coeficiente de determinação (R^2), mostrando que os resultados fornecidos condizem com a concentração do FvW plasmático;
- Limite: consiste na área entre o limite inferior e superior de quantificação do teste, seria o intervalo no qual o teste se mostra acurado e preciso. O ELISA para detectar FvW:Ag tem um intervalo de 1,86 a 100%, sendo que valores superiores a 100% ainda podem ser confiáveis;

- **Acurácia:** mensuração de exatidão do método analítico ou de proximidade de aceitação entre o valor mensurado e o valor de referência aceito. Para todas as mensurações dos plasmas controle (C1, C2 e C3) o teste se mostrou acurado, determinando a diminuição do FvW:Ag;
- **Precisão:** proximidade de aceitação (grau de dispersão) entre uma série de mensurações obtidas em múltiplos testes de uma amostra homogênea, sendo expressa como Coeficiente de variação (CV). A precisão pode ser dividida em 3 níveis: repetibilidade (precisão do Intra-teste), precisão intermediária (precisão do Inter-teste) e reprodutibilidade (precisão entre laboratórios). O presente estudo mostrou excelentes valores de CV para o intra e inter-teste. A reprodutibilidade também foi conseguida de certa forma com a Seção de Coagulação Comparada – Laboratório de Diagnóstico do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell;
- **Sensibilidade:** quantidade do analito necessária para produzir uma alteração significativa no sinal que é obtido na ausência do analito. Existem duas mensurações de sensibilidade (Limite de detecção e Limite de quantificação). O Limite de detecção é a menor quantidade de um analito que pode ser diferenciado do valor do branco, porém não necessariamente quantificado em valor exato. O limite de detecção do ELISA para FvW canino foi de 1,86%. O Limite de quantificação é a menor quantidade de um analito que pode ser diferenciado com acurácia e precisão. Em métodos quantitativos (linearidade é testada) é recomendado que se use o Limite de Detecção e/ou Limite de quantificação
- **Robustez:** mensura a capacidade do método de permanecer inalterado por pequenas alterações no protocolo, mostrando uma confiabilidade do teste.

Em um dos testes realizados (6º a 10º teste) a adsorção da placa com o anticorpo de captura que deveria ser realizada em temperatura de geladeira foi realizada em temperatura ambiente, sem maiores alterações.

Segundo FDA (2001); DeSilva et. al. (2003) os critérios para validação de um método são:

- Concentração individual dos plasmas controle deve ter ao menos uma acurácia de 20% das concentrações reais (FvW:Ag conseguido na Universidade de Cornell), com coeficiente de variação menor que 20%. Neste ELISA não se conseguiu essa acurácia, porém é importante frisar que se trata de um método comparativo e a amostra de referência não foi a mesma que foi utilizada na Universidade de Cornell, porém o coeficiente de variação sempre foi menor que 20%;
- Valores de coeficiente de variação (CV) menores que 20% para o intra e inter-teste. Para determinação do Inter-teste deve-se realizar ao menos 6 testes independentes e para determinação do Intra-teste deve-se realizar 6 replicatas para cada amostra em uma mesma placa. Os CV encontrados no presente estudo foram sempre inferiores a 20% (inter e intra-teste), porém para o Inter-teste se realizou apenas 5 testes independentes e para o Intra-teste somente 4 replicatas para cada amostra;

Pelos motivos acima o Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA foi padronizado e validado.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos três métodos testados (Tempo de sangria da mucosa oral, Agregação plaquetária induzida pela ristocetina e Antígeno do Fator de von Willebrand) concluiu-se que o teste padrão para diagnóstico de cães com Doença de von Willebrand foi o Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) – ELISA. Este teste foi padronizado e validado para diagnóstico da DvW.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Allain JP, Cooper HA, Wagner RH, Brinkhous KM. Platelets fixed with paraformaldehyde: an new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregation factor. *J Lab Clin Med.* 1975; 85: 318-28.

Anfossi G, Parisi S, Russo S, Mularoni EM, Massuco P, Cavalot F, Mattiello L, Trovati M. Studies on in vitro effect of picotamide on human platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood. *Thromb Res.* 1995; 77: 399.

Baliakina EV, Atakhanov SE, Popov EG, Gabbasov ZA, Gavrilov IY, Iurenev AP. The functional characteristics of the trombocytes in patients with hypertension and silent myocardial ischemia. *Ter Arkh.* 1994; 11: 72.

Barsanti JA, Kristensen F, Drumheller FB. Analysis of serum proteins using agarose electrophoresis in normal dogs and in dogs naturally infected with *dirofilaria immitis*. *Am J Vet Res.* 1977; 38: 1055-58.

Bartlett A, Dormandy KM, Hawkey CM, Stableforth P, Voller A. Factor VIII-related antigen: Measurement of enzyme immunoassay. *Br Med J.* 1976; 1: 994-96.

Baugh RF, Brown JE, Hougie C. Plasma components which interfere with ristocetin-induced platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh.* 1975; 33: 540-46.

Bennet B, Ratnoff WD. Immunologic relationships of anti-hemophilic factor of different species detected by specific human and rabbit antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973; 143: 701-06.

Benson RE, Catalfamo JL, Doods WJ. A multispecies enzyme-linked immunosorbent assay for von Willebrand's factor. *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 420-27.

Benson RE, Catalfamo JL, Brooks M, Doods WJ. A sensitive immunoassay for von Willebrand factor. *J Immunoassay.* 1991; 12: 371-90.

Benson RE, Douglas WJ, Doods WJ. Efficiency and precision of electroimmunoassay for canine factor VIII-related antigen. *Am J Vet Res.* 1983; 44: 399-403.

Bithell TC. Hereditary coagulation disorders. In: Wintrobe's Clinical Hematology, 9th ed. Ed by Lee GR, Bithell TC, Foester J, Athens JWEL. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993: 1422-1472.

Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, Schuurs AHWM. 3,3',5,5' tetrametilbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. *J Immunoassay.* 1981; 2: 187-204.

Bouma BN, Doods WJ, Van Mourik JA, Sixma JJ, Webster WP. Infusion of Human and Canine Factor VIII in Dogs with von Willebrand's Disease: Studies of the von Willebrand and Factor VIII synthesis stimulating factors. *Scand J Haematol.* 1976; 17:263-275.

Bowie EJW, Fass DN, Olson JD, Owen CA. Comparison of abnormalities of platelet function in human and porcine von Willebrand's disease. In: *Platelet. N Ulutin*; 1975: 420-23.

Bowie EJW, Owen CA. The bleeding time. *Prog Hemostas Thromb.* 1979; 2: 249-71.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. (Homepage on internet). Bethesda: U. S. National Library of Medicine, 2003 (last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01). Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.
National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

- Bowie EJW, Owen CA. Standardization of the bleeding time. *Scand J Haematol*. 1980; 25: 87-94.
- Brassard JA, Meyers KM. Evaluation of the Buccal Bleeding Time and Platelet Glass Bead Retention as Assays of Hemostasis in the Dog: the Effects of Acetylsalicylic Acid, Warfarin and von Willebrand Factor Deficiency. *Thromb Haemost*. 1991; 65: 191-195.
- Brinkhous KM, Read MS, Reddick RL, Griggs TR. Pathophysiology of platelet-aggregating von Willebrand factor: applications of the venom coagglutinin vWF assay. *Ann NY Acad Sci*. 1981; 370: 191.
- Brinkhous KM, Sandberg H, Garriss JB, Mattsson C, Palm M, Griggs T, Read MS. Purified Human Factor VIII Procoagulant Protein: Comparative Hemostatic Response after Infusions into Hemophilic and von Willebrand Disease Dogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 8752-8756.
- Brinkhous KM, Thomas BD, Ibrahim SA, Read MS. Plasma levels of platelet aggregating factor/von Willebrand factor in various species. *Thromb Res*. 1977; 11: 345-55.
- Brooks M. *Prob Vet Med*. Management of canine von Willebrand's disease. 1992; 4: 636-46.
- Brooks M. von Willebrand Disease. In: Schalm's Veterinary Hematology 5th ed. Ed by Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, ed Philadelphia, Lea & Febiger, 2000: 509-515.
- Brooks M, Castillo-Juarez H, Oltenacu P. Heritability of plasma von Willebrand factor antigen concentration in German Wirehaired Pointers. *Vet Q*. 2001; 23: 126-28.
- Brooks M, Catalfamo J. Buccal Mucosa bleeding time is prolonged in canine models of primary hemostatic disorders. *Thromb Haemost*. 1993; 70(5): 777-80
- Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL. Epidemiologic features of von Willebrand disease in Doberman pinscher, Scottish Terrier and Shetland sheepdogs: 260 cases (1984-1988). *J Am Vet Med Assoc*. 1992; 200: 1123-127.
- Budde U, Schnepfenheim R. von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001; 5(4): 335-368.
- Caekebeke-Peerlink MJ, Koster T, Briet E. Bleeding time, blood groups and von Willebrand factor. *Br J Haematol*. 1989; 73: 217-20.
- Chabbat J, Hampikian-Lenin S, Touilly V, Gaillandre A, Pejaudier L, Steinbuch M. A human factor VIIIa concentrate and its effect in the hemophilic dog. *Thromb Res*. 1989; 54: 603-12.
- Chen CI, Federici AB, Cramer EM, Canciani MT, Harrison P, Zheng S, Massé JM, Manucci PM, Hayward CPM. Studies of Multimerin in Patients with von Willebrand Disease and Platelet von Willebrand Factor Deficiency. *Br J Haematol*. 1998; 103(1):20.
- Clark P, Parry BW. Survey of Irish Wolfhounds in Australia for von Willebrand disease. *Aust Vet J*. 1995; 72: 393.
- Cooler BS. Polybrene-induced platelet agglutination and reduction in electrophoretic mobility: enhancement by von Willebrand factor and inhibition by vancomycin. *Blood*. 1980; 55: 276-81.
- Cooler BS. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Eds Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. 2nd ed. Lippincott, Philadelphia. 1987; p. 60.
- Copola R, Lombardi R, Hawkey C, Ruggeri ZM, Mannucci PM. Varied immunological reactivity of factor VIII from animal plasmas. *Thromb Res*. 1980; 17: 473-80.
- Cotter SM, Brenner RM, Dodds WJ. Hemophilia A in three unrelated cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1978; 172: 166-68.

- DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, Khan M, Tacey R, Hill H, Celniker A. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetics assessment of macromolecules. *Pharm Res*. 2003; 20: 1885.
- De Gaetano GM, Donati MB, D. Innocenti IR, Roncaglioni MC. Defective ristocetin and bovine factor VIII-induced platelet aggregation in normal rats. *Experientia*. 1975; 31: 500-502.
- Dodds WJ. Canine von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med*. 1970; 76: 713-21.
- Doods WJ. Further studien of canine von Willebrand's disease. *Blood*. 1975; 45: 221-30.
- Doods WJ. Joint report of the subcommittees on animal models of hemorrhagic and thrombotic diseases and on platelets. *Thromb Haemost*. 1982; 48: 106-107.
- Doods WJ. Von Willebrand's disease in dog. *Mod. Vet. Pract*. 1984; 65:681-686.
- Doods WJ. Hemostasis. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th ed. Ed by Kaneko JJ. San Diego Academic Press. 1989: 274-315.
- Duke WW. The relationship of blood platelets to hemorrhagic disease. *J Am Med Assoc*. 1910; 55: 1185-192.
- Federici AB, Castaman G, Mannucci PM. Guidelines for the Diagnosis and Management of von Willebrand Disease in Italy. *Haemophilia*. 2002; 8(5): 607-621.
- Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation. 2001.
- Forsythe LT, Willis SE. Evaluating Oral Mucosa Bleeding Time in Healthy Dogs Using a Spring-Loaded Device. *Can Vet J*. 1989; 30: 344-345.
- Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. Screening for von Willebrand Disease with a New Analyser Using High Shear Stress: A Study of 60 Cases. *Blood*. 1998; 91: 1325-1331.
- Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable highly sensitive 3,3',5,5' tetrametilbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 2000; 233: 47-56.
- Frith PA, Warlow CP. A Study of a Bleeding Time in 120 Long-Term Aspirin Trial Patients. *Thromb Res*. 1988; 49: 463-470.
- Gallati H, Pracht I. Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mi den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5' tetrametilbenzidin. *J Clin Biochem*. 1985; 23: 453.
- Geng D, Shankar G, Schantz A, Rajadhyaksha M, Davis H, Wagner C. Validation of immunoassays used to assess immunogenicity to therapeutic monoclonal antibodies. *J Pharm Biomed Anal*. 2005; 39: 364-75.
- Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. *Blood*. 1982; 60: 727-30.
- Goka AKJ, Farthing MJG. The use of 3,3',5,5' tetrametilbenzidine as a peroxidase substrate in microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay*. 1987; 8: 29-41.
- Ginsburg D, Bowie EJW. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Blood*. 1992; 79: 2507-19.
- Ginsburg D, Sadler JE. von Willebrand Disease: a Database of Point Mutations, Insertions and Deletions, For the Consortium on von Willebrand Factor Mutations and Polymorphisms and the

Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1993; 69: 177-184.

Gralnick HR, Rick ME, McKeown LP, Williams SB, Parker RL, Maisonneuve P, Jenneau C, Sultan Y. Platelet von Willebrand factor: an important determinant of the bleeding time in type 1 von Willebrand's disease. *Blood.* 1986; 68: 58-61.

Harker LA, Slichter SJ. The bleeding time as screening test for evaluation of platelets function. *N Engl J Med.* 1972; 287: 155-9.

Hayashi T, Kitou K, Sako S, et al. Evaluation of the simplate for bleeding time determination in dogs. *J Japan Vet Med Assoc.* 1984; 37: 366-69.

Heath MF, Evans RJ, Poole AW, Hayes LJ, McEvoy RJ, Littler RM. The effect of aspirin and paracetamol on the aggregation of equine. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994; 17: 374.

Hovig T, Dodds WJ, Rowsell HC, Mustard JF. The transformation of hemostatic plugs in normal and factor IX deficient dogs. *Am J Pathol.* 1968; 53: 355-74.

Hovig T, Rowsell HC, Dodds WJ, Jorgensen L, Mustard JF. Experimental hemostasis in normal dogs and dogs with congenital disorders of blood coagulation. *Blood.* 1967; 30: 636-68.

Howard MA, Firkin BC. Ristocetin – a new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh.* 1971; 26: 362-69.

Howard MA, Hendrix L, Firkin BC. Further studies on the factor VIII of a patient with a variant form of von Willebrand's disease. *Thromb Res.* 1979; 14: 609-19.

Hoyer LW. Immunological studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII), Radioimmunoassay of AHF antigen. *J Lab Clin Med.* 1972; 80: 822-33.

Hoyer LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood.* 1981; 58: 1-13.

Ingerslev JA sensitive ELISA for von Willebrand Factor (vWF:Ag). *Scand J Clin Lab Invest.* 1987; 47: 143-149.

Ingerslev J, Gursel T. Diagnosis of von Willebrand Disease. *Haemophilia.* 1999; 5(2): 50-56.

Ivy AC, Shapiro PF, Melnick P. The bleeding tendency in jaundice. *Surg Gynecol Obstet.* 1935; 60: 781-84.

Jain NC. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS. Buccal Mucosa Bleeding Times of Healthy Dogs and of Dogs in Various Pathologic States, Including Thrombocytopenia, Uremia and von Willebrand's Disease. *Am J Vet Res.* 1987; 48: 1337-42.

Johnson GS, Benson RE, Dodds WJ. Ristocetin cofactor activity of canine factor VIII: inhibition by plasma proteins. *Thromb Res.* 1979; 15: 835-46.

Johnson GS, Dodds WJ, Rosborough TK. Species specificity in von Willebrand factor-supported platelet agglutination. *Ann N Y Acad Sci.* 1981; 370: 227-35.

Johnson GS, Rao GHR, White JG. Platelet dysfunction induced by parenteral carbencillin and ticarcillin. *Am J Pathol.* 1978; 91: 85-106.

Johnson GS, Turrentine MA, Kraus KH. Canine von Willebrand's Disease. *Vet Clin North Am Small Pract.* 1988; 18: 195-229.

- Johnson GS, Turrentine MA, Sculley PW. Factor VIII coagulant activity and von Willebrand factor in post-exercise plasma from standardbred horses. *Thromb Res.* 1986; 42: 419-23.
- Johnstone IB, Crane S. Quantitation of canine plasma von Willebrand Factor Antigen using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res.* 1991; 55: 11-14.
- Johnstone IB, Norris AM. A moderately severe expression of classical hemophilia in a family of German shepherd dogs. *Can Vet J.* 1984; 25: 191-94.
- Kalogjera V, Owen WG. Identity of bovine platelet aggregating factor and ristocetin-Willebrand factor. *Thromb Res.* 1978; 13: 857-64.
- Kerényi A, Schlammadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of PFA-100 Closure Time and Template Bleeding Time with Inherited Disorders Causing Defective Platelet Function. *Thromb Res.* 1999; 96: 487-492.
- Kingdon HS, Hassel TM. Hemophilic dog model for evaluating therapeutic effectiveness of plasma protein fractions. *Blood.* 1981; 58: 868-72.
- Kopp KJ, Moore JN, Byars TD, et al. Template bleeding time and thromboxane regeneration in the horse: effects of three non-steroid anti-inflammatory drugs. *Equine Vet J.* 1985; 17: 322-24.
- Koster T, Caekebeke-Peerlink MJ, Briet E. A randomized and blinded comparison of the sensitivity and the reproducibility of the Ivy and Simplate II bleeding time techniques. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92: 315-20.
- Kraus KH, Johnson GS. von Willebrand Disease in Dogs. In: *Current Veterinary Therapy vol X*, Ed by Kirk RW, Bonagura JD. Philadelphia: WB Saunders Com. 1989: 445-451.
- Leis LA, Rosborough TK, Johnson GS, Johnson GJ. Ristocetin-induced aggregation of canine platelets. *Thromb Res.* 1980; 19: 309-16.
- Lind SE. Prolonged bleeding time. *Am J Med.* 1984; 77: 305-12.
- Littlewood JD. von Willebrand's Disease in the dog. *Vet Annu.* 1991; 31: 163-172.
- Mammen EF. Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost.* 2002; 28(2): 109-110.
- Mannucci PM. Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 2428-2432.
- Macfarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, Zucker M, Grant RA, Mcpherson J. A method for assaying von Willebrand factor (Ristocetin Cofactor). *Thromb Diathes Haemorr.* 1975; 34: 306-307.
- Marks SL. The Buccal Mucosal Bleeding Time. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000; 36: 289-290.
- Mazurier C, Meyer D. Molecular basis of von Willebrand disease. *Bailliere's Clin Haematol.* 1996; 9: 229-241.
- McKenzie FN, Svensjo E, Arfors KE. Effect of sodium pentobarbital anesthesia on platelet behavior in vitro and in vivo. *Microvasc Res.* 1972; 4: 42-50.
- Mielke CH, Kaneshiro MM, Maher IA, et al. The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. *Blood.* 1969; 34: 204-15.
- Mielke CH. International Committee Communications: Measurements of the bleeding time. *Thromb Haemostas.* 1984; 52: 210-11.

- Miller CH, Graham JB, Goldin LR, Elston RS. Genetics of Classic von Willebrand Disease. *Blood*. 1979; 54: 117-136.
- Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet J*. 2004; 168: 270-75.
- Mohlke KL, Nichols WC, Rehemtulla AA Common Frameshift Mutation in von Willebrand Factor does not alter mRNA Stability but Interferes with Normal Propeptide Processing. *Br J Haematol*. 1996; 95: 184-191.
- Mohri H, Motomura S, Kanamori H, Matsuzaki M, Watanabe S, Maruta A, Kodama F, Okubo T. Clinical Significance of Inhibitors in Acquired von Willebrand Syndrome. *Blood*. 1998; 91(10): 3623-3629.
- Moser J, Meyers KM, Russon RH. Inheritance of von Willebrand factor deficiency in Doberman pinscher. *J Am Vet Med Assoc*. 1996; 209: 1103-106.
- Murray EW, Lillicrap D. von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management. *Transfus Med Rev*. 1996; 10: 93-110.
- Myers LJ, Pierce KR. Hemorrhagic diathesis resembling pseudohemophilia in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 1972; 161: 1028-29.
- Nilsson IM. The History of von Willebrand Disease. *Haemophilia*. 1999; 5(2): 7-11.
- Olson JD, Brockway WJ, Fass DN, Magnuson MA, Bowie EJW. Evaluation of ristocetin-Willebrand factor assay and ristocetin-induced platelet aggregation. *Am J Clin Pathol*. 1975; 63: 210-18.
- Olson JD, Fass DN, Bowie EJW, Mann KG. Ristocetin-induced aggregation of gel filtered platelets: a study of von Willebrand's disease and the effect of aspirin. *Thromb Res*. 1975; 3: 501-14.
- Packham MA, Mustard JF. Pharmacology of platelets-affecting drugs. *Circulation (suppl)*. 1980; 62: 26-41.
- Parker M, Turrentine MA, Johnson GS. Von Willebrand factor in lysates of washed canine platelets. *Am J Vet Res*. 1991; 52: 119-25.
- Pelagalli A, Lombardi P, d'Angelo D, Della Morte R, Avallone L, Staiano N. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol*. 2002; 127: 126-32.
- Polzin DJ, Osborne CA, Hayden DW, et al. Influence of reduced protein diets on morbidity, mortality, and renal function in dogs with induced chronic renal failure. *Am J Vet Res*. 1984; 45: 506-17.
- Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. *J Immunol Methods*. 1992; 150: 5.
- Read MS, Potter, JY, Brinkhous KM. Venom coagglutinin for detection of von Willebrand factor activity in animals plasmas. *J Lab Clin Med*. 1983; 101: 74-82.
- Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc Nat Acad Sci*. 1978; 75: 4514-18.
- Reiss H, Braun G, Brehm G, Hiller E. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *J Clin Pathol*. 1986; 85: 50.
- Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand disease. *Blood*. 1987; 69: 454-9.
- Rodeghiero F, Castaman G, Ruggeri M, Tosi A. The bleeding time in normal subjects is mainly determined by platelet von Willebrand factor and is independent from blood group. *Thromb Res*. 1992; 65: 605-15.

- Roper-Drewinko PR, Drewinko B, Corrigan G, Johnston D, McCredie KB, Freirich EJ. Standardization of platelet function tests. *Am J Hematol*. 1981; 11: 183-203.
- Rosborough TK. Von Willebrand factor, polycations, and platelet agglutination. *Thromb Res*. 1980; 17: 481-90.
- Rosborough TK, Johnson GS, Benson RE, Swain WR, Dodds WJ. Measurement of canine von Willebrand factor using ristocetin and polybrene: diagnosis of canine von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med*. 1980; 96: 47-56.
- Rosborough TK, Swain WR. Abnormal Polybrene-induced platelet agglutination in von Willebrand's Disease. *Thromb Res*. 1978; 12: 937-42.
- Rosenberg JB, Foster PA, Kaufman RJ. Intracellular Trafficking of Factor VIII to von Willebrand Factor Storage Granules. *J Clin Invest*. 1998; 101: 613-624.
- Rotblat F, Hawkey C, O'Brien DP, Tuddenham EGD. Immunologic studies of factor VIII coagulant activity (VIII:C) to Factor VIII in selected vertebrates. *Thromb Res*. 1982; 25: 423-31.
- Rudzki Z, Tunbridge LJ, Lloyd JV. A new simple assay for factor VIII related antigen. *Thromb Res*. 1979; 16: 577-586.
- Ruggeri ZM, Paretti FI, Mannucci PM. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand Factor in new subtype of von Willebrand disease. *N Engl J Med*. 1980; 302: 1047-1051.
- Sadler JE, Gralnick HR. A new classification for von Willebrand disease. *Blood*. 1994; 84: 676-679.
- Sadler JE. Von Willebrand disease. In: *The Metabolic and Molecule Bases of Inherited Disease*, Vol. 3, 7th ed. Ed by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle. New York, McGraw Hill. 1995: 3269-3287.
- Sadler JE, Matsushita T, Dong Z, Tuley EA, Westfield LA. Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 1995; 74: 161-166.
- Sadler JE, Blinder M. von Willebrand Disease: Diagnosis, Classification, and Treatment. In: *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles & Clinical Practice*, 4th ed. Ed by Colman R, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 825-835.
- Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*. 1979; 279: 636-38.
- Sato I, Parry BW. Effect of Desmopressin on plasma Factor VIII and von Willebrand Factor Concentrations in Greyhounds. *Aust Vet J*. 1998; 76(12): 809-812.
- Sato I, Anderson GA, Parry BW. An interobserver and intraobserver study of buccal mucosal bleeding time in Greyhounds. *Res Vet Sci*. 2000; 68: 41-45.
- Schneppenheim RA. Molecular Approach to the Classification of von Willebrand Disease. *Best Practice & Research. Clin Haematol*. 2001; 14(2): 281-298.
- Schwarz HP, Dorner F, Mitterer A, Mundt W, Schlokot U, Pichler L, Turecek PL. Evaluation of Recombinant von Willebrand Factor in a Canine Model of von Willebrand Disease. *Haemophilia*. 1998; 4(3): 53-62.
- Schwarz HP, Schlokot U, Mitterer A, Váradi K, Gritsch H, Muchitsch EM, Auer W, Pichler L, Dorner F, Turecek PL. Recombinant von Willebrand Factor – Insight into Structure and Function through Infusion Studies in Animals with Severe von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost*. 2002; 28(2): 215-225.

- Shaw E, Giddings JC, Peake IR, Bloom AL. Synthesis of pro-coagulant factor VIII, factor VIII related antigen and other coagulation factors by the isolated perfused rat liver. *Br J Haematol.* 1979; 41: 585-96.
- Slappendel RJ, Frielink RAJ, Mol JA, Noordzij A, Hamer R. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for von Willebrand factor antigen (vWF-Ag) in canine plasma. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 33: 145-154.
- Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J Surg Res.* 1999; 82: 180-87.
- Steiner RW, Coggins C, Carvalho ACA. Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Hematol.* 1979; 7: 107-17.
- Stibbe J, Kirby EP. The influence of hamacel, fibrinogen and albumin on ristocetin-induced platelet aggregation. Relevance to the quantitative measurement of the ristocetin cofactor. *Thromb Res.* 1976; 8: 151-65.
- Stokol T, Parry BW. Canine von Willebrand Disease: A Review. *Aust Vet Prac.* 1993; 23: 94-103.
- Stokol T, Parry BW, Mansell PD. von Willebrand Disease in Doberman dogs in Australia. *Aust Vet J.* 1995a; 72(7): 257-262.
- Stokol T, Parry BW, Mansell PD. Factor VIII Activity in Canine von Willebrand Disease. *Vet Clin Pathol.* 1995b; 24: 81-90.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit. Note for guidance on validation of analytical methods: Methodology. London; 1994. CPMP/ICH: 381-95.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit. Note for guidance on validation of analytical procedures: Definitions and Terminology. London; 1996. CPMP/ICH: 281-95.
- Thomas R, Hessel EA, Dillard DH, Harker LA. Standardized template bleeding time in dogs. *J Surg Res.* 1979; 27: 244-49.
- Triplet DA. Coagulation and Bleeding Disorders. Review and Update, *Clin Chem.* 2000; 46: 1260-1269.
- Tuddenham EGD. von Willebrand factor and its disorders: an overview of recent molecular studies. *Blood Rev.* 1989; 3: 251-62.
- Tuomela M, Stanescu I, Krohn K. Validation overview of bio-analytical methods. *Gene Ther.* 2005; 12: s131-s138.
- Ueda I. The effects of volatile general anesthetics on adenosine diphosphate-induced platelet aggregation. *Anesthesiology.* 1971; 34: 405-408.
- Vischer UM, Moerlose P. von Willebrand Factor: from Cell Biology to the Clinical Management of von Willebrand Disease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999; 30: 93-109.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: A guide with abstracts of microplate applications. Alexandria Virginia: Dynatech Lab Inc; 1979. p. 125.
- Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6: 217-246.
- Wallen NH, Ladjevardi M, Albert J, Broijersen A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood: a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb Res.* 1997. 87: 151.

Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, Varma A, Rogers J. Quantitative assay of plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1973; 52: 2708-16.

Werner EJ, Abshire TC, Giroux DS, Tucker EL, Broxson EH. Relative Values of Diagnostic Studies for von Willebrand Disease. *J Pediatr.* 1992; 211: 24-38.

White li GC, Montgomery RR. Clinical Aspects of and Therapy for von Willebrand Disease. In: *Hematology Basic Principles and Practice*, 3th ed. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. ed. Churchill Livingstone; 2000: 1946-1956.

Winocour PD, Lopes-Virella M, Laimins M, Colwell JA. Time course of changes in in vitro function and plasma von Willebrand factor activity (VIII:WF) and factor VIII-related antigen (VIII:Ag) in the diabetic rat. *J Lab Clin Med.* 1983; 102: 795-804.

Yoder JM, Schick LA, Moore RP. A convenient, rapid fluoroimmunoassay for factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1981; 24: 51-59.

Zhang ZP, Blomback M, Nyman D, Anvret M. Mutations of von Willebrand Factor gene in Families with von Willebrand Disease in the Aland Islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7937-40.

Zimmerman TS, Ratnoff, OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proacclerin (factor V) and on acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest.* 1971; 50: 244-45.

Zimmerman TS, Ruggeri, ZM. Von Willebrand's disease. *Prog Hemostas Thromb.* 1982; 6: 203-36.