

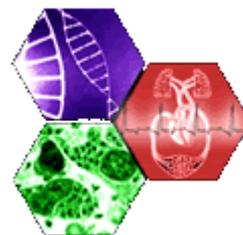
MARINA DE OLIVEIRA PARO

**PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS INDUTORES DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE MAIOR PREVALÊNCIA DO
SUBTIPO 2B DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND E DO FATOR DE VON
WILLEBRAND NORMAL**

Ouro Preto – MG, agosto de 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS INDUTORES DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE MAIOR PREVALÊNCIA DO
SUBTIPO 2B DA DOENÇA DE VON WILLEBRAND E DO FATOR DE VON
WILLEBRAND NORMAL**

Autora: Marina de Oliveira Paro

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

Coorientadora: Cibele Velloso Rodrigues

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação do núcleo de pesquisa em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia, área de concentração: Genômica e Proteômica.

Ouro Preto – MG, julho de 2012

P257p

Paro, Marina de Oliveira.

Peptídeos antigênicos indutores de anticorpos específicos para identificação de alterações de maior prevalência do subtipo 2B da doença de vonWillebrand e do fator de von Willebrand normal [manuscrito] / Marina de Oliveira Paro. - 2012.

xi, 58f.: il., color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade.

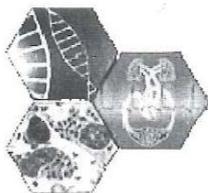
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Genômica e Proteômica.

1. Von Willebrand, fator de - Teses. 2. Peptídeos - Teses. 3. Anticorpos -
Teses. 4. Antígenos - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 577.112.6:616-005

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

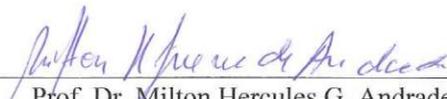


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Peptídeos antigênicos indutores de anticorpos específicos para identificação de alterações de maior prevalência do subtipo 2B da doença de Von Willebrand e do fator normal”

Aos seis dias do mês de agosto de 2012, às 14:00 h., na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno Marina Oliveira Paro. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

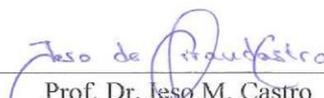
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Milton Hercules G. Andrade
Presidente



Prof. Dr. Ronaldo A. Pinto Nagem
Examinador (UFMG)



Prof. Dr. Iesô M. Castro
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 06/08/2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Proteômica (ICEB/NUPEB/UFOP), com auxílio da Coordenadoria de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Fundação Hemoninas e Programa de Pesquisa para o SUS.

Dedico esse trabalho àqueles que fizeram dos meus erros, acertos; que nunca me deixaram desistir; guiaram meus passos; iluminaram meu caminho; mostraram-me que os desafios são oportunidades para crescer e amadurecer; e me ensinaram que o amor move o mundo. Ao meu pai, Marriél, e à minha mãe, Rosa, o meu mundo é o melhor lugar porque vocês fazem parte dele.

Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante é dar o primeiro passo.

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Marriel, pelo apoio, incentivo, carinho e amor. Obrigada por fazerem seus os meus sonhos, por toda dedicação e apoio que tornaram possível essa conquista.

Aos meus irmãos Marcela e Henrique, meus cunhados Gilberto e Sandra, e meus sobrinhos Alexandre e Rodrigo pela amizade, apoio, força e torcida, mesmo estando distantes.

Ao Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade, pela orientação, oportunidade, confiança, amizade, paciência e aprendizado. Obrigada por acreditar em mim e tornar a conclusão deste trabalho uma realidade.

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges, pela presteza, disponibilidade e aprendizado. Obrigada por compartilhar os problemas, alegrias e dificuldades encontradas.

À Dra. Cibele, pelo aprendizado, coorientação e disponibilidade dedicada a este trabalho.

Ao Técnico José Henrique Braga Fortes, obrigada pelas ajudas, conselhos, atenção, amizade, conversas e risadas durante a realização desse trabalho.

A todos os membros do LEP (Karina, Micheline, Igor, Jonathan, Gustavo, Lorrann, Simone, Leandro, Priscila, André, Fernanda,

Cíntia, Raiane, Alessandra e Sonaly) obrigada pelo convívio e participação direta ou indireta neste trabalho.

À família de Dona Wilma e Sr. Arlindo, que me acolheram e me proporcionaram um lar durante três anos em Ouro Preto, obrigada pela amizade verdadeira, pelo carinho e amor que me receberam.

Ao Lobinho por toda ajuda, espera, incentivo, torcida, apoio e confiança.

Ao Zezé (Chicão), Rick e Adélia (in memoriam) pelo apoio e pela torcida.

Aos laboratórios do NUPEB e Laboratório de caracterização molecular da UFOP por permitirem o uso de equipamentos e dependências para realização de parte deste trabalho.

Aos secretários do NUPEB, Cida, Josino e Matheus pela presteza.

Aos professores do NUPEB pelos ensinamentos.

Aos funcionários do CCA por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agradeço a todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doença de von Willebrand.....	1
1.2 Classificação dos subtipos da doença de von Willebrand.....	3
1.3 Doença de von Willebrand ou Pseudo-von Willebrand.....	5
1.4 Fator de von Willebrand.....	5
1.5 Diagnóstico da Doença de von Willebrand.....	10
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Enriquecimento do FvW plasmático e preparação de amostras para espectrometria de massas.....	18
4.1.1 Precipitação por etanol.....	18
4.1.1.1 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
4.1.1.2 <i>Western Blot</i>	19
4.1.1.3 Identificação por espectrometria de massas.....	20

4.1.2 Tratamento das amostras em colunas de afinidade de gelatina utilizando matriz de agarose.....	20
4.1.2.1 Imobilização da gelatina na matriz de ϵ -amino-caproic Acid- agarose (Sigma Chemical Company).....	20
4.1.2.2 Cromatografia de afinidade em coluna de gelatina.....	21
4.2 Obtenção de anticorpos específicos para FVW normal e alterado.....	21
4.2.1 Predição dos peptídios a serem sintetizados pela análise da estrutura cristalográfica do FVW e das alterações citadas pelo banco de dados ISTH-SSC VWF online data base.....	21
4.2.2 Síntese de peptídeos, confirmação da estrutura por espectrometria de massas e purificação.....	22
4.2.2.1 Síntese de peptídeos.....	22
4.2.2.2 Ativação da resina.....	23
4.2.2.3 Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados..	23
4.2.2.4 Clivagem do peptídeo.....	24
4.2.3 Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	24
4.2.4 Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF <i>electrospray</i>	25
4.2.5 Imunização de camundongos com peptídeos conjugados com KLH, análise e purificação dos antissoros em colunas de peptídeos.....	25
4.2.5.1 Conjugação de peptídeos com KLH e imunização de camundongos.....	25
4.2.6 Colunas de afinidade individuais para purificação dos antissoros.....	26
4.2.6.1 Imobilização dos Peptídeos sintéticos à sepharose 4B.....	26
4.2.7 Purificação do antissoro	27
4.2.7.1 Acoplamento de peptídeos sintético alterados à albumina.....	30
4.2.7.2 <i>Western Blot</i> para comprovação da presença de anticorpos purificados.....	30

4.2.7.2.1	Detecção da presença de anticorpo nas frações retidas nas colunas de purificação.....	30
4.2.7.2.2	Teste de reconhecimento da fração retida na coluna de peptídeos alterados empregando a amostra de peptídeo conjugada à albumina.....	31
4.2.7.2.3	Verificação do reconhecimento do FVW plasmático de um indivíduo normal pela fração retida na coluna contendo peptídeos normais imobilizados.....	32
4.2.7.2.4	Teste para verificar a exclusão de todo anticorpo anti-Peptídeo normal da fração não retida proveniente da purificação em colunas de peptídeos normais.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Enriquecimento FVW plasmático e preparação de amostras para espectrometria de massas.....	33
5.1.1	Precipitação por etanol.....	33
5.1.2	Tratamento das amostras em colunas de afinidade de Gelatina.....	36
5.2	Obtenção de Anticorpos Específicos para o FVW Normal e Alterado.....	38
5.2.1	Predição de pela Análise da Estrutura Cristalográfica do FVW e das alterações citadas pelo banco de dados ISTH-SSC VWF Online Database.....	38
5.2.2	Síntese de Peptídeos, Confirmação da Estrutura por Espectrometria de Massas e Purificação.....	40
5.2.3	Análise e Purificação dos Anti-soros em Colunas de Peptídeos.....	45
6	CONCLUSÃO.....	49
7	PERSPECTIVAS.....	50
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
9	APÊNDICE.....	56
9.1	Análise densitométrica das bandas de 250 kDa apresentadas no SDS-PAGE 5%.....	56
9.2	Caracterização de peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF <i>electrospray</i>	57

RESUMO

A doença de Von Willebrand (DVW) é um distúrbio hemorrágico hereditário de caráter autossômico dominante ou recessivo, ocasionado por defeitos quantitativos ou qualitativos do fator de Von Willebrand (FVW). Trata-se da coagulopatia hereditária mais comum na população humana, com prevalência de 1,3% da população. Os defeitos qualitativos são divididos em quatro subtipos (2A, 2B, 2M e 2N) de acordo com a alteração da função do FVW. A classificação dos diversos tipos de DVW se apóia em vários métodos de avaliação da função e da quantidade do FVW, o que dificulta esse diagnóstico tornando-o passível de erros. Diante das dificuldades atuais para o diagnóstico da DVW relacionadas às alterações qualitativas do FVW, esse trabalho apresenta como proposta o emprego de estratégias bioquímicas para a identificação de alterações na estrutura do FVW. Para se desenvolver métodos de isolamento do FvW que utilizem pequenos volumes de amostras de sangue para preparação de amostras para espectrometria de massas, alíquotas de plasma humano passaram por processo de precipitação por etanol e foram tratadas em colunas de gelatina para remover a fibronectina do FVW para isolá-lo como único componente em uma banda de 250 KDa, visando reduzir a possibilidade de supressão provocada por impurezas na espectrometria de massas. Mediante a análise da estrutura cristalográfica, com auxílio de ferramenta computacional, foram definidos 22 peptídeos correspondentes a sequência de aminoácidos encontradas no FVW normal e alterado presentes na DVW tipo 2A, 2B e 2M. Esses peptídeos foram utilizados na obtenção de anticorpos a partir da imunização de camundongos e na purificação dos mesmos em colunas de afinidade. Obtiveram-se quatro preparações anticorpos purificadas para alterações do tipo 2B com prevalência de 90%, além de três preparações de anticorpos purificados para o FVW normal. A obtenção desses anticorpos específicos para o FVW permitirá o uso dos mesmos em análises de múltimeros no teste de diagnóstico, atualmente empregado na classificação de DVW, ensaios de capacidade de ligação ao fator VIII e produção de anticorpos monoclonais específicos.

ABSTRACT

Von Willebrand disease (vWD) is an inherited hemorrhagic disorder promoted by quantitative as well as qualitative defects of the Von Willebrand factor (vWf). The disease represents the most common human coagulopathy afflicting 1.3% of the population. Qualitative defects are subdivided into four subtypes (2A, 2B, 2M and 2N) and classified according to the molecular dysfunction of the vWf. The differential diagnosis of the vWD is a difficult task, as it relies on methods aimed to assess the function and abundance of the vWf in plasma; being often prone to misinterpretation. In the present work, we propose biochemical approaches for the identification of structural variants of the vWf. Our first strategy involved enrichment of the vWf from small plasma sample volumes using ethanol precipitation, followed by affinity chromatography on a gelatine-sepharose column to remove vWf-bound fibronectin. This procedure resulted in the recovery of vWf as a single band component in SDS-PAGE, at the M_r ~250 kDa. In a second approach, we used a bioinformatic analysis to design 22 peptides among which 8 were representatives of specific amino acid sequences belonging to normal vWf while 14 encompassed sequences found in the most common disease subtypes 2A, 2B and 2M. These peptides were then used to immunize mice, after which, peptide-specific immunoglobulins were purified through affinity-chromatography. This resulted in a panel of four Ig preparations capable of detecting alterations in the vWD subtype 2B (90% prevalence) plus additional three antibody fractions targeting the normal vWf. We anticipate the obtained panel of antibodies could serve a variety of applications among them (1) vWf multimer analysis, currently employed in the classification of the disease, (2) evaluation of vWf-factor VIII interaction and (3) production of specific monoclonal antibodies.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - Ácido acetilsalicílico

ACN – Acetonitrila

ADAMTS-13 - a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13

BSA – Bovine serum albumin

CEUA – Comissão Ética no uso de animais

DCC – Diciclohexilcarbodimida

DIPC - Diisopropilcarbodimida

DMF - Dimetilformamida

DVW – Doença de von Willebrand

DTT - Ditioneitol

ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

FVIII – Fator VIII

FVIII:C – Atividade do FVIII

FVIIIr – FVIII recombinante

FVW – Fator de von Willebrand

FVW:Ag – Antígeno do FVW

FVW:AgII – propeptídeo do FVW

FVW:CB – Capacidade de ligação do FVW ao colágeno

FVW:FVIIIb – capacidade de ligação ao FVIII

FVW:RCo – Atividade de Cofator de ristocetina

g - Gramas

GPIb – Glicoproteína Ib

IgG – Imunoglobulina G

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ISTH – International Society on Thrombosis and Haemostasis

Kb – Kilobase

kDa - Kilodaltons

KLH – Leyhole Limpet Hemocyanin

Log - Logarítimo

µg – microgramas

µmol - micromols

M – Molar

mA – Mile amper

mmol - milemol

MAPM – Multímeros de alto peso molecular

mg – miligrama

mL - mililitros

mM – Mile molar

NBT/BCIP – Nitro Blue tetrazolium 5-bromo-4-cloro-3-indolil Fosfato

NHS – N-hidroxisuccinimida

PBS – Tampão fosfato salino

PDBj – Protein data bank Japão

PPT - Peptídeo

PVDF – Polyvinylidene Fluoride

RE – Retículo endoplasmático

RIPA – Aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina

rpm – Rotações por minuto

SUS – Sistema único de saúde

TFA – Ácido trifloroacético

TS – Tempo de sangria

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da doença de von Willebrand.....	4
Tabela 2. Lista das alterações no FvW nos subtipos 2A, 2B, 2M e 2N da DVW de acordo com o domínio afetado.....	9
Tabela 3. Testes laboratoriais para diagnóstico da DVW.	10
Tabela 4. Incidência das manifestações hemorrágicas em porcentagem em pacientes da Itália com DVW.	11
Tabela 5. Resultados dos testes laboratoriais em vários tipos de DVW.....	15
Tabela 6. Alinhamento ClustalW2 dos peptídeos sintéticos humanos às sequências correspondente do FvW de camundongos.....	40
Tabela 7. Peptídeos sintetizados e suas respectivas sequências de aminoácidos e massas calculadas pelo ExPasy Peptide Mass.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos pacientes com doença de von Willebrand por estado federal, Brasil, 2007.....	3
Figura 2. Representação esquemática do fator de von Willebrand, dos seus domínios funcionais e da sua correlação com os subtipos da doença.....	7
Figura 3. Representação esquemática das etapas de processamento na biossíntese do Fator de von Willebrand e a localização subcelular proposta de cada etapa.....	8
Figura 4. Análise multimérica do Fator de von Willebrand.....	13
Figura 5. Fluxograma do método de tratamento do soro dos camundogos imunizados para exclusão de anticorpos anti-PPT normal.....	28
Figura 6. Fluxograma do método de purificação dos anticorpos anti-PPT alterados em colunas de PPT's alterados após o tratamento de exclusão dos anticorpos anti-PPT normal.....	29
Figura 7. SDS-PAGE de amostras de plasma precipitado com etanol 20, 30 e 40%.	33
Figura 8. SDS-PAGE do plasma precipitado com 20% etanol na presença de citrato de sódio na concentração final de 0,6M, pH 5,8. e <i>Western Blot</i> utilizando anti-FvW.....	34
Figura 9. Espectro referente à banda 250Da marcada pelo anticorpo anti-FvW humano.....	35
Figura 10. Cromatogramas do tratamento da amostra enriquecida FvW em coluna de afinidade de gelatina.....	36
Figura 11. Depleção da fibronectina do plasma precipitado com etanol 20% na presença de citrato de sódio pH5,8.....	37
Figura 12 Domínios cristalográficos do FvW visualizados no programa PDBViewer...39	
Figura 13. Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna C18 (250 mm x 4,6mm).....	42

Figura 14. Identificação das massas dos peptídeos PPTN1, PPTR1306W, PPTR1308C, PPTN2, V1316M, PPTN3, R1341Q por espectrometria de massa em LCMS-ITTOF do tipo <i>electrospray</i>	43
Figura 15. <i>Western Blot</i> referente ao SDS-Page utilizando antissoros dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos do FvW.....	46
Figura 16. Etapas de esgotamento das amostras de antissoros de PPT's alterados nas colunas de PPT's normais.....	47
Figura 17. <i>Western Blot</i> mostrando a presença de IgG nas frações retidas nas colunas de afinidade de PPT's alterados.....	48
Figura 18. SDS-PAGE 5% plasma precipitado com etanol 20% na presença de citrato de sódio concentrado pH 5,8 e <i>Western Blot</i> utilizando os antissoros dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos do FvW.....	48
Figura 19. Análise densitométrica das bandas de 250 kDa de amostras plasmáticas precipitadas por etanol.....	56
Figura 20. Identificação das massas dos peptídeos por espectrometria de massa em LCMS-ITTOF do tipo <i>electrospray</i>	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de von Willebrand

O professor finlandês Eric Adolf von Willebrand, em 1926, descreveu uma doença hemorrágica em uma família do Floglo, no arquipélago das ilhas Aland, entre a Suécia e a Finlândia. Vários indivíduos desta família morreram em decorrência de sangramentos incontroláveis (Ingram 1976; Schneppenheim 1996). Ao contrário da hemofilia, esse distúrbio hemorrágico afetava igualmente ambos os sexos (Castaman, Federici *et al.* 2003), então, Von Willebrand chamou essa doença de “pseudo hemofilia” (Ingram 1976; Schneppenheim 1996).

Em 1957, Nilsson *et al* detectaram sintomas idênticos aos descritos por von Willebrand como tempo de sangramento prolongado associado à redução do fator VIII (FVIII) circulante em pacientes afetados pela doença em uma família das ilhas Aland. Esses achados indicaram que este distúrbio de sangramento era devido à deficiência de um fator plasmático que estava presente em indivíduos normais e hemofílicos (Holmberg *and* Nilsson 1992; Castaman, Federici *et al.* 2003).

Inicialmente, não se soube explicar o mecanismo pelo qual um fator plasmático influenciava na hemostasia primária. Então, em 1960, percebeu-se que na Doença de Von Willebrand (DVW) ocorria uma diminuição da adesividade plaquetária *in vivo* (Holmberg *and* Nilsson 1992).

Um marco na história da DVW foi o isolamento do FVW. Em 1970, purificou-se o FVIII através do gel de agarose, acreditando-se que se tratava de uma macroglobulina. Mas em 1971 foram criados anticorpos contra essa proteína. As análises imunológicas mostraram que pacientes com hemofilia A apresentavam resultados positivos enquanto que a maioria dos pacientes com DVW apresentava resultados negativos a este anticorpo. Esta proteína purificada era capaz de diminuir o tempo de sangria e normalizar a adesividade plaquetária na DVW, então foi demonstrado que esta proteína e o FVW previamente descrito eram a mesma proteína (Stites, Hershgold *et al.* 1971 e

Zimmerman, Ratnoff *et al.* 1971). Atualmente sabe-se que o FVW e o FVIII são moléculas distintas que circulam no sangue em forma de um complexo dissociável.

A DVW é um distúrbio hemorrágico hereditário de caráter autossômico dominante ou recessivo (James 2009), ocasionado por defeitos quantitativos ou qualitativos do FVW. As alterações na concentração ocasionam o tipo 1 e 3 da doença e as alterações funcionais resultam no tipo 2 (Rodeghiero, Castaman *et al.* 1987). Vários fenótipos da DVW foram identificados, uma vez que as funções do FVW na hemostasia primária e secundária estão associadas a domínios funcionais que podem ser alterados por mutações de ponto de forma independente (Schneppenheim 1996). Os principais sintomas são sangramentos em mucosas como epistaxe, sangramento gengival após extração dentária e sangramento no trato genital feminino (Nilson, Blomback *et al.* 1957).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), a concentração do FVW pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais. Além disso, a provável combinação desses fatores torna o diagnóstico mais complicado em algumas situações. Os níveis plasmáticos do FVW variam de acordo com o grupo sanguíneo ABO, indivíduos do grupo O apresentam níveis inferiores em relação aos outros grupos. Além disso, a concentração plasmática do fator varia com a idade. Recém-nascidos apresentam níveis mais elevados, o que dificulta o diagnóstico antes dos seis meses de idade.

Trata-se da coagulopatia hereditária mais comum na população humana (Werner, Broxson *et al.* 1993). Segundo o Ministério da Saúde (2008), em um levantamento realizado em 2007, no Brasil há 2333 casos de pacientes com diagnóstico de DVW. O número mais expressivo de casos está em São Paulo (565 casos), Rio de Janeiro (495 casos) e Minas Gerais (422, dados atualizados Fundação Hemominas 2012) (Figura 1). Apenas 133 casos (5,7%) de DVW no Brasil apresentam diagnóstico completo do subtipo da doença. Os subtipos 1, 2A, 2B, 2N e 3 têm prevalência de 52,3%; 18%; 10,5%; 1,5% e 17,3%; respectivamente.

Para ilustrar a situação da DvW no Brasil, construímos um gráfico com dados compilados do Ministério da Saúde representando o número de casos diagnosticados por habitante dos estados brasileiros. Observa-se claramente (figura 1) que há grande heterogeneidade na distribuição deste diagnóstico. Destacando-se o Distrito Federal com maior número de casos diagnosticados por habitante, contrastando com São Paulo

que apresenta reduzido número de casos diagnosticados por habitante embora seja um estado de alto poder econômico. Outro contraste é observado no estado do Ceará que não é tão rico mas que possui número de caso diagnosticados maior do que São Paulo.

Tentamos analisar esse quadro levando em consideração três aspectos: falta de interesse dos pacientes em procurar diagnóstico devido aos episódios hemorrágicos esporádicos não os preocupar; a falta de interesse do poder público em resolver a situação, que não envolve apenas aspectos técnicos dos hemocentros mas também a falta de divulgação a respeito da importância da doença e a necessidade de diagnóstico; e as dificuldades inerentes ao diagnóstico.

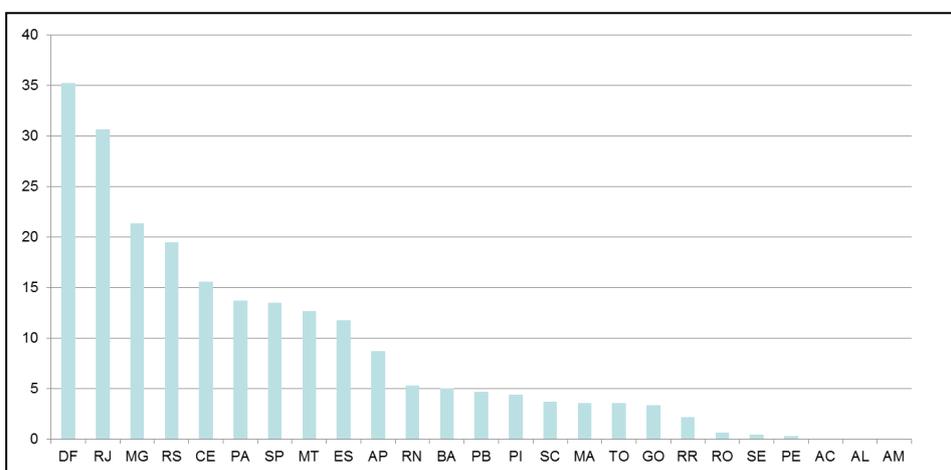


Figura 1. Distribuição dos pacientes com doença de von Willebrand por estado federal, Brasil, 2007. **Fonte:** Ministério da Saúde. Perfil da coagulopatias hereditárias.

1.2 Classificação dos subtipos da doença de von Willebrand

A atual classificação da DVW aceita pela *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) consiste em três tipos distintos: 1, 2 e 3. Os defeitos quantitativos são divididos em deficiência parcial (DVW tipo 1) e deficiência grave (DVW tipo 3). Os defeitos qualitativos são divididos em quatro subtipos (2A, 2B, 2M e 2N) de acordo com a função do FVW alterada. A tabela 1 resume as características de cada tipo da DVW.

Classificação	Descrição
Tipo 1	Deficiência quantitativa parcial.
Tipo 2^a	Deficiência quantitativa resultante da diminuição da função dependente das plaquetas. Está associada à ausência dos multímeros de alto peso molecular do FVW.
Tipo 2B	Deficiência qualitativa com aumento da afinidade pela glicoproteína Ib das plaquetas.
Tipo 2M	Deficiência qualitativa com diminuição da função dependente das plaquetas. Não há ausência de multímeros de alto peso molecular do FVW.
Tipo 2N	Deficiência qualitativa com perda de afinidade pelo FVIII.
Tipo 3	Deficiência quantitativa, clinicamente grave. Decréscimo na atividade do FVIII e na concentração de plaquetas. O FVW pode estar bastante diminuído ou ausente no plasma.

Tabela 1. Classificação da doença de von Willebrand.

O tipo 1 da DVW apresenta uma deficiência parcial do FVW circulante. Não ocorre diminuição seletiva de grandes multímeros hemostaticamente ativos. Os multímeros circulantes podem ou não apresentar algum tipo de anormalidade estrutural. Nesse tipo da doença, a secreção pode estar prejudicada, como ocorre, por exemplo, quando na alteração C1149R os fatores mutantes e selvagens são coexpressos, os mutantes são retidos no retículo endoplasmático e degradados juntamente com o selvagem diminuindo o transporte de FVW normal através da via secretora. Outra forma ocorre quando a mutação afeta a expressão do gene que pode prejudicar a secreção do FVW (Sadler, Budde *et al.* 2006).

O tipo 2 apresenta quatro subtipos que refletem diferentes mecanismos patofisiológicos (Castaman, Federici *et al.* 2003):

- O tipo 2A tem prejuízo da ligação às plaquetas, além de ter uma deficiência de multímeros de alto peso molecular que pode ocorrer por alterações no pro-fator que prejudica a multimerização no aparelho de golgi ou alterações na região C-terminal que impedem a dimerização no retículo endoplasmático. Outro mecanismo que também diminui os multímeros de alto peso molecular circulante nesse subtipo da doença é o aumento da sensibilidade à clivagem pela metaloprotease ADAMTS-13 (Sadler, Budde *et al.* 2006).

- No tipo 2B o FVW tem sua afinidade aumentada pelo receptor GPIb das plaquetas (Castaman, Federici *et al.* 2003), trata-se de um defeito com “ganho de função” já que o FVW normal não apresenta tanta afinidade pelas plaquetas (Lilicrap 2007). Pacientes com tipo 2B de DVW muitas vezes podem ter trombocitopenia

agravadas em situações de estresse ou uso de desmopressina. As mutações presentes no tipo 2B não interferem na multimerização do fator, mas após a secreção, os multímeros se ligam de forma espontânea às plaquetas e dessa forma são clivados pela ADAMTS-13 resultando em multímeros pequenos incapazes de promoverem a adesão plaquetária (Sadler, Budde *et al.* 2006).

- No tipo 2M há um defeito na ligação do FVW ao receptor GPIb das plaquetas, mas ao contrário do tipo 2A, há conservação dos multímeros de alto peso molecular (Lillicrap 2007). A multimerização e secreção do fator são normais. Acredita-se que a diminuição da afinidade pelas plaquetas faz com que o FVW esteja menos exposto a enzima ADAMTS-13 o que preserva a distribuição dos grandes multímeros (Sadler, Budde *et al.* 2006).

- O tipo 2N possui marcada diminuição de afinidade pelo FVIII. É um tipo causado por mutações recessivas que ocasionam alterações nos domínios D' e D3 que possuem sítios de ligação ao FVIII. O nível plasmático do FVIII está diminuído nesse tipo da doença (Sadler, Budde *et al.* 2006).

O tipo 3 da doença apresenta uma completa deficiência do FVW circulante. Trata-se de uma herança recessiva (Sadler, Budde *et al.* 2006). É acompanhado por uma diminuição do FVIII (Lillicrap 2007). Os sintomas clínicos são mais severos como, por exemplo, hematomas, hematose, epistaxe, sangramento gastrointestinal, menorragia e sangramento pós-operatório (Mannucci, Capoferri *et al.* 2004). Segundo o Ministério da Saúde (2008), no Brasil o relato do tipo 3 da DVW é maior do que os outros tipos, acredita-se que isso ocorra devido ao subdiagnóstico das formas mais leves da doença, uma vez que a prevalência esperada para esse tipo seja de apenas 1 a 5% dos casos.

1.3 Doença de von Willebrand tipo plaquetário ou Pseudo-von Willebrand

O tipo plaquetário ou pseudo-DVW foi descrito por Weiss *et al* (1982) e Miller and Castella (1982), se caracteriza similarmente ao tipo 2B da DVW, porém pode ser atribuída a uma anormalidade das plaquetas.

Segundo o Ministério da Saúde (2008), não se trata de um tipo de DVW, uma vez que a estrutura e função do FVW estão preservadas. Decorre de mutação com

“ganho de função” no receptor GPIb das plaquetas, que aumenta sua afinidade pelos multímeros de alto peso molecular do FVW.

1.4 Fator de von Willebrand

O FVW possui funções importantes na hemostasia primária. Ele é essencial na adesão plaquetária ao subendotélio e na agregação plaquetária no local de injúria vascular, além de ser um carreador do FVIII no plasma sanguíneo, protegendo-o da degradação proteolítica que aumenta o tempo de meia vida dessa proteína e localizando-o corretamente no local de lesão vascular (Castaman, Federici *et al.* 2003).

O gene do FVW se localiza no braço curto do cromossomo 12, corresponde a 178 kb do DNA genômico e constitui-se de 52 éxons, sendo o maior deles o éxon 28 (com 1,4 kb) (Verweij, de Vries *et al.* 1985; Ginsburg, Handin *et al.* 1985). O pre-pro-FVW possui o peptídeo de sinal com 22 aminoácidos, o pro-peptídeo com 741 aminoácidos e o fator maduro possui 2050 aminoácidos (Verweij, Diergaarde *et al.* 1986).

O FVW é uma glicoproteína encontrada no plasma sanguíneo, nos grânulos alfa das plaquetas e no tecido conjuntivo subendotelial (Sadler 1998). É sintetizado pelos megacariócitos, precursores das plaquetas (Nachman, Levine *et al.* 1977), e pelas células endoteliais (Jaffe, Nachman *et al.* 1973).

Em um perfil eletroforético do FVW plasmático, com suas pontes dissulfeto reduzidas, espera-se uma banda com peso molecular de aproximadamente 270 kDa, calculada a partir de sua composição química (Ruggeri 2001). Embora, Zimmerman *et al.* (1986) tenha obtido bandas do FVW correspondentes a 140, 176 e 189 kDa devido a uma degradação proteolítica *in vivo* que ocorre normalmente; além de uma banda predominante de 225 kDa que, segundo Ruggeri (2001), trata-se de uma mobilidade anormal do fator uma vez que o esperado é uma banda predominante com peso molecular maior.

O pro-fator e o fator maduro possuem quatro tipos de domínios que se repetem, nomeados em ordem do N-terminal para o C-terminal D1-D2-D³-D3-A1-A2-A3-D4-

B1-B2-B3-C1-C2 (Shelton-Inloes, Titani *et al.* 1986; Mendolicchio *and* Ruggeri 2005). Os domínios D1, D2, D' e D3 participam do processo de multimerização. Além disso, o domínio D' e D3 possuem regiões de ligação ao FVIII. Os domínios A1 e A3 possuem sítios para ligação ao colágeno. O domínio A1 possui ainda, sítios de ligação às plaquetas, assim como o domínio C1 que também se ligam às plaquetas (Mendolicchio *and* Ruggeri 2005; Lillicrap 2007). A figura 2 mostra o FVW maduro, o propeptídeo com seus domínios e o peptídeo de sinal, bem como as estruturas que sofrem interação com o fator e a indicação dos domínios alterados em determinados subtipos da DVW.

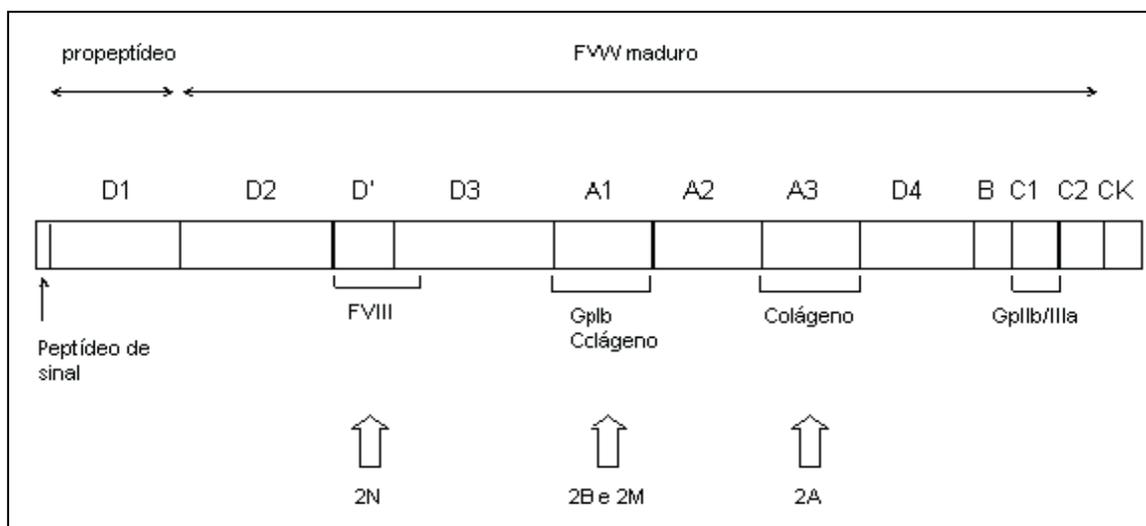


Figura 2. Representação esquemática do Pre-pro-FVW, dos seus domínios funcionais e da sua correlação com os subtipos da doença. O fator de von Willebrand apresenta um peptídeo de sinal, um propeptídeo e uma porção madura. O colágeno se liga a dois domínios: A1 e A3. A GpIb das plaquetas liga-se ao domínio A1, a GpIIb/IIIa também das plaquetas liga-se ao domínio C1 e o FVIII liga-se ao domínio D' e D3. Abreviações: FVIII, fator VIII; Gp Ib, glicoproteína Ib; Gp IIb/IIIa, glicoproteína IIb/IIIa; 2N, DVW tipo 2N; 2B, DVW tipo 2B; 2M, DVW tipo 2M; 2A, DVW tipo 2A. **Fonte:**Ministério da Saúde, 2008 (modificado).

O pre-pro-FVW sofre uma série de modificações intracelulares, como mostra a figura 3, antes de ser secretado para circulação sanguínea, incluindo a clivagem do peptídeo de sinal, dimerização na porção C-terminal, sulfatação, glicosilação e multimerização na região N-terminal (Wagner 1990).

O peptídeo de sinal é clivado no retículo endoplasmático (RE) e sofre dimerização através da formação de pontes dissulfeto na região C-terminal. Ainda no

RE inicia-se o processo de glicosilação do fator. Dessa forma, o pro-FVW dimérico é transportado para o aparato de Golgi onde ele vai ser multimerizado a partir da formação de ligações dissulfeto na porção N-terminal livre de cada unidade do dímero, neste local ocorre também clivagem do pro-peptídeo, glicosilação e sulfatação (Wagner 1990; Handin *and* Wagner 1989).

A secreção do FVW pode ocorrer de duas formas: secreção constitutiva e secreção por uma via regulada que ocorre a partir dos corpos de Weibel Palade das células endoteliais (Loesberg, Gonsalves *et al.* 1983). As plaquetas não possuem síntese ativa de peptídeos, logo, secreta o FVW através da via regulada (Sporn, Marder *et al.* 1986), mas os megacariócitos, que possuem grânulos- α , liberam FVW constitutivamente (Sporn, Cahvin *et al.* 1985). O fator circula na corrente sanguínea em uma concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Souza 2004).

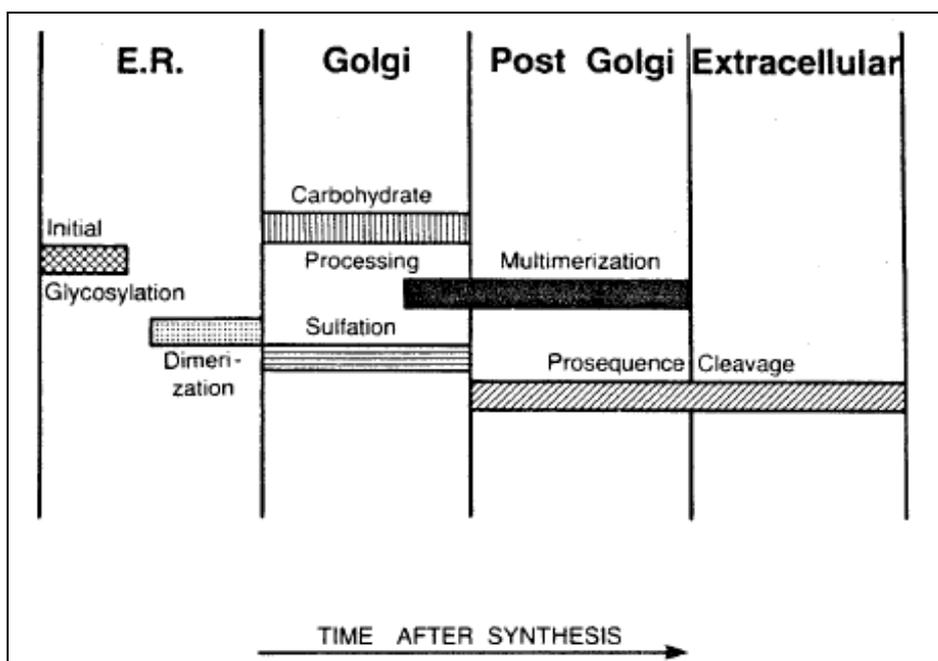


Figura 3. Representação esquemática das etapas de processamento na biossíntese do Fator de von Willebrand e a localização subcelular proposta de cada etapa.
Fonte: Handin *and* Wagner 1989.

A ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*, <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html>) possui cadastradas 223 alterações distintas na sequência de aminoácidos do FVW que acarretam na DVW. Além disso, possui 290 casos de DVW classificadas com as suas respectivas alterações na sequência de aminoácidos identificadas e 32 alterações identificadas sem a classificação do subtipo

da doença. A maior parte das alterações do tipo 2B da DVW ocorre no domínio A1 e 90% dos casos são devido às alterações R1306W, R1308C, V1316M e R1341Q (Castaman, Federici *et al.* 2003). A tabela 2 mostra as alterações mais frequentes nos subtipos 2A, 2B, 2M e 2N bem como os domínios afetados.

Domínio afetado	Tipo de DVW	Alterações na sequência de aminoácidos do FVW
Domínio D2	Tipo 2A	F404insNP R436del6 N528S G550R C623W A625insG
Domínio D' – D3	Tipo 2N	R782W G785E E787K C788R C788Y T791M Y795C M800V R816W R816Q H817Q R854Q R854W C858F D879N Q1053H C1060R C1225G
Domínio D3	Tipo 2M	R1205H Y1146C
	Tipo 2A	C1143Y C1173R
Domínio A1	Tipo 2B	P1266L H1268D C1272G C1272R M1304insM R1306Q R1306L R1306W R1308C R1308P I1309V S1310F W1313C V1314F V1314L V1316M P1337L R1341L R1341Q R1341W L1460V A1461V
	Tipo 2M	G1324S G1324A E1359K F1369I I1425F Q1191delI K1408delK
	Tipo 2M/2A	L1276P R1374C R1374H C1458Y R1374R
Domínio A2	Tipo 2A	G1505E G1505R S1506L F1514C K1518E L1540P S1543F Q1556R L1562P R1597G R1597Q R1597W V1604F V1607D V1609R P1627H I1628T G1629R V1630F E1638K L1639P P1648S L1657I V1665E G1672R
Domínio CK	Tipo 2A	C2773R

Tabela 2. Lista das alterações no FVW nos subtipos 2A, 2B, 2M e 2N da DVW de acordo com o domínio afetado. Abreviações: INS, inserção; DEL, deleção. Adaptado de Castaman, Federici *et al.* 2003.

1.5 Diagnóstico da Doença de von Willebrand

De acordo com o Ministério da Saúde (2008), o diagnóstico da DVW muitas vezes é difícil e trabalhoso, o que exige paciência e persistência do médico e do paciente. Dependendo da alteração, apenas alguns testes podem estar alterados, o que leva a investigação laboratorial a exigir um conjunto de avaliações quantitativas e funcionais o FVW e o FVIII. Os exames são subdivididos em testes de triagem, confirmatórios e especiais. O Sistema único de Saúde (SUS) dá cobertura apenas de alguns destes testes que estão sinalizados com asterisco* na Tabela 3.

Testes de triagem	Testes confirmatórios	Testes especiais
<ul style="list-style-type: none">• Tempo de sangramento (TS)*• Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)*• Contagem plaquetária*	<ul style="list-style-type: none">• Atividade do fator VIII (FVIII:C)*• Antígeno do fator von Willebrand (FVW:Ag)*• Atividade de co-fator de ristocetina (FVW:RCo)*• Capacidade de ligação do FVW ao colágeno (FVW:CB)	<ul style="list-style-type: none">• Aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA)*• Padrão multimérico do FVW• Capacidade de ligação ao FVIII (FVW:FVIII B)• FVW intraplaquetário• Propeptídeo do FVW (FVW:AgII)• Subunidades do FVW

Tabela 3. Testes laboratoriais para diagnóstico da DVW. Adaptado de Ministério da saúde, 2008.

A DVW é sub-diagnosticada no Brasil devido a vários fatores, como: desconhecimento a respeito da doença e suas apresentações clínicas pelos profissionais de saúde, indisponibilidade de testes laboratoriais para diagnósticos e dificuldades técnicas para a realização destes testes (Ministério da Saúde 2008).

Três condições devem estar presentes, segundo o Ministério da saúde (2008), para que se tenha o diagnóstico da DVW:

- Histórico de sangramentos cutâneos e mucosos.
- Histórico familiar de episódios hemorrágicos.

- Exames laboratoriais que sugiram defeito quantitativo e/ou qualitativo do FVW.

As manifestações hemorrágicas podem ocorrer em diferentes frequências de acordo com o tipo de DVW, conforme a tabela 4 (Federici *and* Mannucci 1999).

Sintoma hemorrágico	DVW Tipo 1 (n=944)	DVW tipo 2 (n=268)	DVW tipo 3 (n=74)
Epistaxe	56,3	62,6	74,3
Menorragia	30,7	31,8	32,4
Sangramento pós-exodontia	31,1	38,9	52,7
Hematomas	14,4	18,6	31,1
Sangramento em ferimentos	35,9	39,7	50,0
Gengivorragia	30,2	36,7	48,4
Sangramento pós-operatório	20,3	23,5	40,6
Sangramento pós-parto	16,6	18,5	26,1
Sangramento Gastrointestinal	5,1	10,9	17,6
Hemartrose	2,4	4,7	41,9
Hematúria	2,1	3,9	10,9
Sangramento no sistema nervoso central	0,5	2,3	8,1

Tabela 4. Incidência das manifestações hemorrágicas em porcentagem em pacientes da Itália com DVW. Adaptado de Federici *and* Mannucci, 1999.

O teste Tempo de Sangria (TS) avalia a integridade da função plaquetária e da parede vascular. A técnica recomendada possui valor de referência entre 1-9 minutos em adultos. Esse teste mede o tempo de cessação do sangramento após uma pequena incisão realizada na face anterior do antebraço realizada através de um dispositivo descartável que produz uma incisão de comprimento e profundidade padronizados. O tempo de sangramento pode estar alterado em doenças vasculares primárias, doenças plaquetárias quantitativas e qualitativas, em condições que interferem na adesão

plaquetária como a DVW, após o uso de medicamentos como ácido acetilsalicílico (AAS) e antiinflamatórios não-hormonais (Ministério da saúde 2008).

A contagem de plaquetas geralmente é normal em pacientes com DVW. No entanto, pode ocorrer discreta plaquetopenia em pacientes com o subtipo 2B da doença. O TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) está normal ou prolongado em todos os tipos da doença. Entretanto, este teste pode variar de acordo com a dosagem de FVIII (Ministério da saúde 2008).

A determinação do FVW:Ag é feita por meio da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), que utiliza anticorpos contra a proteína para medir a quantidade total presente no plasma. Este método não avalia a função do fator (Ministério da saúde 2008). O nível do FVW não é mensurável no tipo 3 da DVW, está baixo no tipo 1 e pode estar baixo ou normal no tipo 2 (Federici *and* Mannucci 1999).

Atividade de cofator da ristocetina avalia a interação entre o FVW e as plaquetas, trata-se também de um método padrão para avaliar a função do FVW. A ristocetina é um antibiótico capaz de induzir a aglutinação das plaquetas na presença do FVW (Federici *and* Mannucci 1999). A determinação do FVW:RCo é realizada em um agregômetro e para sua realização utiliza-se o plasma pobre em plaquetas diluído em diferentes concentrações e quantidades padronizadas de ristocetina e plaquetas. A quantidade de ristocetina utilizada é elevada em relação ao FVW para se obter uma boa estimulação. É feita uma curva padrão com plasma de referência, em seguida relaciona-se a diluição com a amplitude de agregação, o que permite uma comparação com os resultados do paciente para quantificar a atividade do FVW, ou seja, o FVW:RCo. O FVW:RCo tem resultados baixos em todos os tipos de DVW (Federici *and* Mannucci 1999; Ministério da saúde 2008).

Segundo o Ministério da Saúde (2008), quando a relação FVW:RCo/FVW:Ag é igual ou superior a 0,7 há uma proporcionalidade entre a função e a quantidade sugerindo um diagnóstico de DVW do tipo 1. Quando esta relação é menor que 0,7 mostra desproporcionalidade entre a quantidade do FVW e a sua função, indicando menor atividade sugerindo o diagnóstico de DVW tipo 2.

A agregação plaquetária induzida pela ristocetina é realizada em um agregômetro onde se mistura diferentes concentrações de ristocetina e o plasma rico em

plaquetas do paciente. O resultado é dado em concentração (mg.mL^{-1}) de ristocetina capaz de induzir a agregação plaquetária (Federici *and* Mannucci, 1999). A RIPA é normal ou pouco reduzida no tipo 1 da DVW. No subtipo 2A está baixa (hipoagregante), há necessidade de concentrações mais elevadas de ristocetina para induzir a agregação plaquetária. No subtipo 2B a RIPA está aumentada, ou seja, concentrações mais baixas de ristocetina são capazes de induzir a agregação plaquetária, chamada hiperagregação (Ministério da Saúde 2008). Apesar de o teste RIPA ser decisivo para o diagnóstico do tipo 2B ainda existe a possibilidade de haver dúvidas na diferenciação desse diagnóstico com as evidências de doença pseudo-Von Willebrand. Ao se analisar a tabela 5 pode-se observar que os parâmetros empregados nessa classificação podem apresentar resultados idênticos.

Análise multimérica do FVW é feita através da eletroforese em gel de agarose. Neste método é feita uma avaliação eletroforética pelo *Western Blot* dos perfis multiméricos do fator que apresentam alterações características nos diferentes tipos da doença conforme pode ser visto na figura 4 (Ministério da Saúde 2008). De acordo com informações do Hemocento de Belo Horizonte o sucesso dessa análise depende muito da especificidade do anticorpo utilizado. Nesse sentido, torna-se necessário a obtenção de anticorpos com reconhecimento exclusivo dos multímeros de FVW para uma análise fiel da avaliação da composição desses agregados.

Figura 4. Análise multimérica do Fator de von Willebrand.

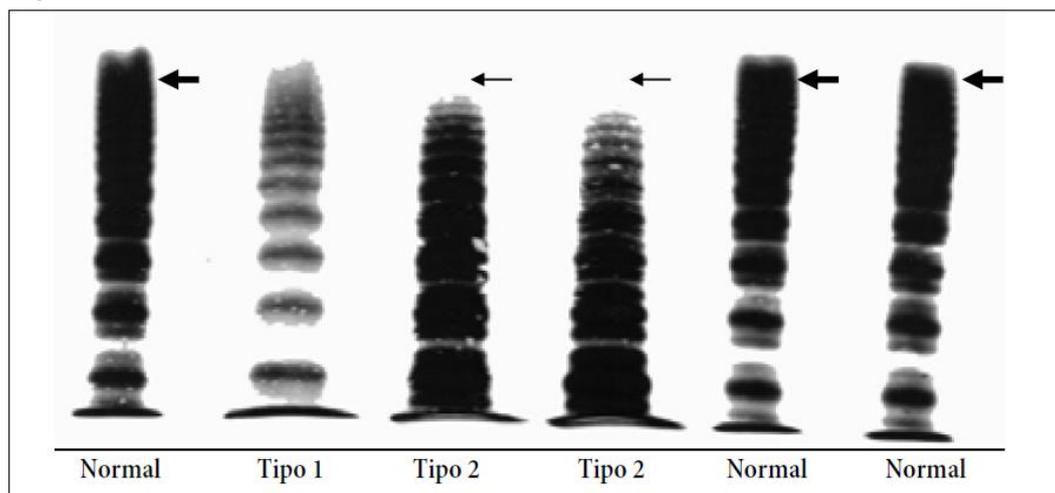


Figura 4. Análise multimérica do Fator de von Willebrand. **Fonte:** Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von willebrand. Ministério da Saúde, 2008.

O teste de ligação ao Fator VIII é realizado em placas de microtitulação onde se pipeta anticorpo anti-FVW e em seguida adiciona-se o plasma do paciente. O complexo FVW-FVIII se liga aos anticorpos. Um tampão de alta força iônica remove o FVIII. Utiliza-se FVIII recombinante (FVIIIr) em excesso para se ligar ao FVW que permaneceu ligado ao anticorpo plaqueado. Após a remoção do FVIIIr não ligado, o complexo FVW-FVIIIr é retirado para testes. O FVW é dosado por FVW:Ag e o FVIII dosado por ensaio cromogênico (Federici *and* Mannucci 1999). No subtipo 2N da DVW a ligação é praticamente ausente (Ministério da Saúde 2008).

Na Europa e na Austrália, é comum a utilização do ensaio que mede a ligação do FVW ao colágeno. No Brasil e nos Estados Unidos, porém, não é um teste muito difundido. O teste de ligação ao colágeno tem resultados reduzidos em todos os tipos da DVW, porém há casos de subtipo 2M com valores normais.

A tabela 5 mostra os resultados encontrados em testes laboratoriais para diagnóstico da DVW. A classificação dos diversos tipos de DVW se apoia em vários métodos de avaliação da função e da quantidade do FVW, o que dificulta esse diagnóstico tornando-o passível de erros.

Exames	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N	Tipo Plaquetário	Tipo 3
TS	N ou ↑	N ou ↑	↑	N ou ↑	N	↑	↑
F VIII:C	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	↓↓	N	↓↓
VWF:Ag	↓	N ou ↓	N ou ↓	N ou ↓	N	N ou ↓	↓↓
Plaquetas	N	N	N ou ↓	N	N	↓	N
VWF:RCo	↓	↓↓	↓	↓↓	N	N ou ↓	↓↓
RIPA	N ou ↓	↓↓	N	↓↓	N	N	Ausente
RIPA (baixas doses ristocetina)	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
MAPM	Todos os multímeros presentes	Ausência de grandes e médios multímeros	Ausência de grandes multímeros	Todos os multímeros presentes	Todos os multímeros presentes	Ausência de grandes multímeros	Todos os multímeros diminuídos ou ausentes

Tabela 5. Resultados dos testes laboratoriais em vários tipos de DVW. Adaptado de Ministério da Saúde, 2006. Abreviações: TS (tempo de sangria); FVIII:C (atividade coagulante do fator VIII); FVW:Ag (antígeno do fator de von Willebrand); FVW:RCo (co-fator ristocetina); RIPA (agregação plaquetária induzida pela ristocetina); MAPM (multímeros de alto peso molecular); ↑(elevado); ↓ (reduzido); N (Normal).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando as dificuldades atuais para o diagnóstico da DVW relacionadas às alterações qualitativas do FVW, como mencionado acima, o desenvolvimento de novos métodos bioquímicos que permitam a identificação das alterações moleculares no FVW e diagnóstico preciso e direto das alterações encontradas da DVW, proporcionaria uma grande contribuição aos hemocentros e aos portadores dessa doença.

Sendo assim, esse trabalho apresenta como proposta o desenvolvimento de estratégias bioquímicas para a identificação de alterações na estrutura do FVW. Serão aplicados métodos proteômicos pretendendo-se a identificação direta dos peptídeos alterados e a obtenção de anticorpos específicos visando o diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver métodos que empregam abordagem proteômica e imunoquímica visando à identificação direta das alterações estruturais do FVW.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolver métodos de isolamento do FvW que utilizem pequenos volumes de amostras de sangue para preparação de amostras para espectrometria de massas.

Sintetizar peptídeos de hidrólise trípica correspondentes às sequências do fator normal e com alterações para compor amostra sintética com objetivo de validar a identificação proteômica do fator normal e suas alterações.

Analisar as alterações estruturais descritas e aplicar métodos preditivos para escolha de sequências peptídicas a serem empregadas na obtenção de anticorpos específicos, com atenção especial para as alterações R1306W, R1308C, V1316M e R1341Q que correspondem à maior prevalência no tipo 2B da DVW.

Sintetizar, purificar os peptídeos escolhidos (PPTN1, PPTR1306W, PPTR1308C, PPTN2, V1316M, PPTN3, R1341Q, PPTN4, PPTA1461D, PPTA1461V, PPTL1460V, PPTN5, L1562P, PPTN6, PPTL1276P, PPTV1279F, PPTV1279I, PPTS1285F, PPTN7, PPTD1302G, PPTN8, A1437T), preparar conjugados ao KLH e sintetizar colunas de afinidade.

Obter anticorpos específicos para o FVW normal e com alterações purificados em colunas de afinidade de peptídeos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto e catalogado sob o protocolo nº 2011/23.

4.1 Enriquecimento do FVW plasmático e preparação de amostras para espectrometria de massas.

4.1.1 Precipitação por etanol

Sangue total em anticoagulante citrato de sódio (3,8 %) na proporção de uma parte de citrato de sódio para nove partes de sangue total proveniente do Hemominas-MG foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para separar o plasma das hemácias. O plasma (800µL) foi destinado à precipitação por etanol onde foi utilizado citrato de sódio pH 5,8 para concentração final de 0,6M para facilitar a precipitação do FVW uma vez que esse pH corresponde ao ponto isoelétrico do fator. Em seguida, adicionou-se etanol P.A. para concentração final de 20, 30 e 40%, a precipitação procedeu-se em banho de gelo por uma hora em repouso. Após esse tempo, os tubos contendo o plasma precipitado foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com solução de etanol 20, 30 e 40%, respectivamente. Realizou-se uma nova centrifugação na mesma condição anterior, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 20 µL de solução NaCl 50 mM, homogeneizou-se e centrifugou-se mais uma vez por 10 minutos a 14000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e o precipitado foi descartado. Esse mesmo procedimento descrito foi feito também sem a adição inicial de citrato de sódio pH 5,8.

4.1.1.1 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas precipitadas foram solubilizadas em 20 µL de tampão da amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002%) e, em seguida, uma alíquota de 10 µL analisada por SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1979), utilizando géis de separação a 5% e géis de concentração a 3%, em condições desnaturantes.

As amostras foram diluídas (1:1) em tampão da amostra e submetidas a banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação das proteínas. Utilizou-se como padrão de peso molecular o *Molecular Weight Marker Kit* (*Sigma Aldrich, EUA*). A amperagem adotada foi de 20 mA por gel. Após a corrida em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, o gel foi corado com *Coomassie Blue R-250* 0,025% em 40% de etanol e 7% de ácido acético. Utilizou-se o *software Quantity One* (*Bio-Rad®*) versão 4.6.9 para a realização das análises densitométricas.

4.1.1.2 Western Blot

Realizou-se a técnica de *Western Blot* (Towbin *et al.* 1979) para verificar a presença do FVW na amostra advinda da precipitação do plasma sanguíneo por etanol 20% na presença de citrato de sódio concentrado pH 5,8.

A amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% como dito no item anterior e transferida para membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) (*Invitrogen*) a 200 mA em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% e SDS 0,02% sob refrigeração por duas horas. Em seguida, a membrana foi bloqueada durante a noite em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%, sendo posteriormente lavada por três vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Após essas lavagens, incubou-se a membrana em tampão *immunoblotting* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween-20 0,013% e leite em pó desnatado 5%) sob agitação por 30 minutos. Decorrido esse tempo adicionou-se ao tampão de *immunoblotting* anticorpo anti- FvW (*Sigma Aldrich*) produzido em coelhos (1:1000) deixando sob agitação a temperatura ambiente por três horas. Após o período de incubação, a membrana foi lavada três vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e novamente incubada por duas horas com tampão *immunoblotting* contendo o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:2000) (*Sigma Aldrich, EUA*). A membrana foi lavada com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e revelada com solução de NBT/BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato*) (*Sigma Aldrich, EUA*), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.1.1.3 Identificação por espectrometria de massas

Submeteu-se novamente a amostra de plasma precipitado por etanol 20% na presença de citrato de sódio pH 5,8 ao SDS-PAGE 5% e a banda correspondente a 250 kDa obtida foi enviada para o *Centre of Excellence in Mass Spectrometry* da Universidade de York na Inglaterra para análise no espectrômetro de massas *Ultraflex III - MALDI-TOF/TOF (Bruker)*.

4.1.2 Tratamento das amostras em colunas de afinidade de gelatina utilizando matriz de agarose

Segundo as instruções 71-7094-00AE da *GE Healthcare*, a fibronectina se liga especificamente à gelatina. Dessa forma confeccionou-se uma coluna de afinidade imobilizando gelatina à matriz *ϵ -amino-caproic acid-agarose (Sigma Chemical Company)* com o intuito de se diminuir a concentração de fibronectina na amostra de plasma precipitado com etanol na presença de citrato de sódio pH 5,8.

4.1.2.1 Imobilização da gelatina na matriz de *ϵ -amino-caproic Acid- agarose (Sigma Chemical Company)*

A matriz *ϵ -amino-caproic Acid- agarose (Sigma Chemical Company)* foi lavada com água destilada e seca com auxílio da bomba de vácuo. Pesou-se 4,5 g da resina seca e iniciou-se o processo de ativação com a finalidade de se imobilizar a gelatina. A ativação seguiu os seguintes passos: suspensão da resina em 13,5 mL de dioxano, adição de N-hidroxisuccinimida (NHS) e Diciclohexilcarbodimida (DCC) para a concentração final de 0.1M sob agitação da resina por 70 minutos, à temperatura ambiente. A resina ativada foi lavada com 8 volumes de dioxano, 3 volumes de metanol e 4 volumes de dioxano. À uma solução de NaHCO₃ 0,01 M, NaCl 0,9% pH 7,5 adicionou-se a gelatina para concentração final de 10 mg de gelatina/mL para a qual transferiu-se a resina que fora lavada rapidamente com água deslilada imediatamente antes do acoplamento. A reação de acoplamento foi mantida uma hora a temperatura ambiente e 12 horas sob refrigeração. A etapa final consistiu no bloqueio dos grupos carboxílicos livres com solução de etanolamina 0,1 M, pH 9 por uma hora a temperatura

ambiente. Após este procedimento procedeu-se nova lavagem com água destilada. Manteve-se o produto a 4°C até o momento do uso.

4.1.2.2 Cromatografia de afinidade em coluna de gelatina

A coluna de Gelatina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5. Aplicou-se a amostra proveniente da precipitação do plasma com etanol 20% em citrato de sódio pH 5,8 e deixou-a em contato com a matriz por 10 minutos. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio, coletando-se 20 frações, de um mL cada, da amostra não retida na coluna. Eluiu-se a coluna com Uréia 8M para deslocar a fibronectina aderida à gelatina da matriz, coletou-se 10 frações de um mL cada. A absorvância das frações foi acompanhada em espectrofotômetro à 280nm. Equilibrou-se a coluna novamente com tampão de equilíbrio para que as frações não retidas fossem submetidas novamente ao tratamento. Repetiu-se a cromatografia até que se observasse supressão de absorvância a 280 nm nas frações da eluição com Uréia. As frações não retidas na última passagem da amostra pela coluna e as frações da primeira eluição foram dialisadas contra tampão acetato de amônio 0,01M pH 7,5 durante 24 horas com trocas de tampão a cada oito horas para remoção do Tris-HCl e da Uréia. As soluções dialisadas foram então liofilizadas e submetidas à eletroforese (SDS-PAGE 5%). Foi realizado o *Western Blot* para verificar o enriquecimento da amostra em FVW na fração não retida da coluna de gelatina.

4.2 Obtenção de anticorpos específicos para FVW normal e alterado

4.2.1 Predição dos peptídios a serem sintetizados pela análise da estrutura cristalográfica do FVW e das alterações citadas pelo banco de dados ISTH-SSC VWF online data base

As sequências peptídicas para síntese foram escolhidas levando-se em consideração o fato de que as sequências deveriam conter alterações características do FVW que ocorrem em subtipos qualitativos da DVW. As alterações R1306W, R1308C, V1316M e R1341Q foram incluídas na seleção uma vez que correspondem a 90% dos casos de DVW tipo 2B segundo Castaman *et al* (2003). Os peptídeos selecionados para síntese

foram preditos levando-se em consideração o fato de que as sequências deveriam conter alterações características do FVW que ocorrem em subtipos qualitativos da DVW. As alterações foram recuperadas do banco de dados da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose, disponível em <http://www.isth.org/default/index.cfm>. As sequências peptídicas para síntese foram preditas e selecionadas levando-se em consideração os seguintes critérios: (1) as sequências deveriam conter entre 8 e 20 aminoácidos, sendo necessária a presença de um resíduo aromático para avaliação do rendimento da síntese via espectrofotometria e purificação em HPLC. Na ausência de um resíduo aromático, esse foi adicionado à extremidade C-terminal da sequência peptídica; (2) a localização da sequência na estrutura do cristal da molécula do FVW, revelada pela Swiss-PdbViewer 3.7, deveria demonstrar sequências mais expostas ao solvente. As estruturas do cristal do domínio A1 e domínio A2 do FVW utilizados estão disponíveis para download no site PDBj (*Protein Data Bank Japão*-<http://www.pdbj.org/index.html>) <http://service.pdbj.org/mine/summary/1auq> (A1) e <http://service.pdbj.org/mine/summary/3gxb> (A2); (3) sequências peptídicas altamente hidrofóbicas não foram consideradas. Após a seleção das sequências peptídicas, as mesmas foram alinhadas com a sequência do FVW de camundongos utilizando o algoritmo *ClustalW2 – Multiple sequence alignment* disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> para se verificar diferenças entre as espécies e análise de êxito na produção de anticorpos.

4.2.2 Síntese de peptídeos, confirmação da estrutura por espectrometria de massas e purificação

4.2.2.1 Síntese de peptídeos

A síntese dos peptídeos propostos foi realizada em fase sólida estabelecido por Merrifield (1965), com algumas modificações. O procedimento adotado neste trabalho requer a utilização de aminoácidos derivatizados, através da proteção da porção amino com o grupo Fmoc. Se sua cadeia lateral também for reativa, ela estará protegida por um grupo que deva responder às exigências de ser adaptado à natureza da cadeia lateral e ser clivado na última etapa da síntese pelo Ácido trifloroacético (TFA).

A síntese de peptídeos ocorreu em um suporte sólido insolúvel para o acoplamento dos aminoácidos. A resina suporte utilizada foi a *Rink Amide Resin HL* (*Merck, Alemanha*) a 0,78 mmol/g, partindo-se de um rendimento máximo de 40 μmoles de peptídeo por síntese.

4.2.2.2 Ativação da resina

Para a ativação da resina adotou-se o procedeu-se da seguinte forma: 40 μmoles de resina (52mg) foram colocados em um tubo de síntese com DMF (dimetilformamida) suficiente para cobrir a resina, permaneceu-se sob agitação constante por três horas à 37°C. Para a liberação do grupamento Fmoc, a resina foi coberta com três mL de 4-metilpiperidina 20% em DMF mantida por 20 minutos, sob agitação constante a temperatura de 37°C por três vezes. Em seguida, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF com dois mL de cada solvente por lavagem. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio de bomba de vácuo.

4.2.2.3 Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados

Os aminoácidos e reagentes auxiliares foram adicionados em concentrações quatro vezes superiores (160 μmoles) à quantidade de resina com objetivo de se favorecer o acoplamento. Os aminoácidos foram ligados pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina, formando uma ligação peptídica. O primeiro aminoácido foi adicionado ao tubo de síntese em um volume de dois mL de DMF, acrescido de 25 μL de DIPC (diisopropilcabodiimida) e 23 mg de *oxyma pure [ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate]*. Após uma hora de agitação à 37°C, foi feita nova adição de DIPC e *oxyma pure* nas mesmas quantidades anteriores deixando reagir por mais uma hora à 37°C. A resina conjugada com aminoácido foi submetida a uma acetilação preventiva para minimizar a formação de múltiplos produtos. Assim, 50 μL de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético foram adicionados em um mL de DMF ao tubo de síntese, permanecendo sob agitação à 37°C por 30 minutos. Ao final da etapa de acetilação, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF. O grupamento amino desse primeiro aminoácido acoplado foi então desprotegido: adicionou-se à resina três mL de uma solução de 4-metilpiperidina 20% em DMF e manteve-se sob agitação contínua à 37°C por 10 minutos, repetindo três vezes essa

etapa. Os demais aminoácidos foram processados conforme descrito para o acoplamento do primeiro aminoácido.

4.2.2.4 Clivagem do peptídeo

Após o término dos ciclos de acoplamento, o último grupamento Fmoc foi retirado com 4-metilpiperidina 20% em DMF, como descrito previamente, e a resina lavada por quatro vezes, durante cinco minutos cada, com DCM (diclorometano). As cadeias laterais foram desprotegidas e o peptídeo dissociado da resina pelo uso de cinco mL de solução de clivagem contendo 95% de TFA. Para os peptídeos que continham cisteína, a solução de clivagem possuía 2,5% de β -mercaptoetanol, a fim de se evitar a formação de pontes dissulfeto. O tubo de reação permaneceu sob agitação por quatro horas. A solução contendo os peptídeos foi coletada, transferida para tubos de ensaio e os produtos de síntese foram precipitados com oito a 10 volumes de éter etílico gelado durante a noite à 4°C. Posteriormente, os tubos de ensaio foram lavados com éter etílico e centrifugados por três vezes a 1.500 x g por cinco minutos. Na última etapa, o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspense em três mL de água milli-Q. Os peptídeos que não eram totalmente solúveis em água foram solubilizados em solução 50% acetonitrila e 0,1% de TFA. Após a obtenção dos peptídeos, eles foram liofilizados, analisados em sistema HPLC e caracterizados em espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF operando via *electrospray*.

4.2.3 Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram submetidos à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. As cromatografias foram realizadas em coluna C18 (250 mm x 4,6mm) (*Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu®*), em sistema HPLC da *Shimadzu®*. Amostras de 20 μ L de peptídeos resultantes da última etapa do procedimento de síntese foram submetidas a um gradiente de ACN (acetonitrila) de 20 a 60% e TFA 0,1% durante 35 minutos com um fluxo de um mL/minuto. A concentração de ACN atingiu 25% em 20 minutos, 60% em 25 minutos e retornou a 20% em 30

minutos, mantendo-se nessa concentração por 5 min. A eluição foi monitorada a 280nm ou a 260nm dependendo da sequência. Para os peptídeos mais hidrofóbicos, novas condições foram desenvolvidas até que a purificação se tornasse satisfatória. Estas outras condições cromatográficas abrangeram gradientes de ACN/TFA 0,1% variáveis entre 50, 80 e 100%, durante até 40 minutos com um fluxo de um mL/minuto. Após a purificação, os peptídeos foram caracterizados e identificados por espectrometria de massas.

4.2.4 Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF *electrospray*

Analisou-se os peptídeos purificados através do espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight*), que opera por ionização do tipo *electrospray* (*Shimadzu*®). Calibrou-se o equipamento com trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 ms. Aplicou-se as amostras através de injeções diretas (alíquotas de cinco µL). A ferramenta *ExpASy – Compute PI/Mw tool* (disponível em http://web.expasy.org/compute_pi/) foi utilizada para a predição das massas moleculares dos peptídeos.

4.2.5 Imunização de camundongos com peptídeos conjugados com KLH, análise e purificação dos antissoros em colunas de peptídeos

4.2.5.1 Conjugação de peptídeos com KLH e imunização de camundongos

A produção de soro policlonal para detecção do FVW normal e alterado foi induzida utilizando-se como antígeno os peptídeos sintetizados conforme a metodologia descrita no item 4.2.2.1. Estes peptídeos correspondem a uma sequência presente no FVW de indivíduos normais e afetados pela DVW, foram conjugados ao carregador protéico KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) (*Sigma Aldrich, EUA*) através da ligação com glutaraldeído. Para cada 1 mg de peptídeo, adicionou-se 1 mg de KLH em 200 µL de tampão borato pH 10; 0,1 M e 100 µL de glutaraldeído 0,3%. A reação ocorreu sob agitação contínua por 2 horas. Após este período, o glutaraldeído reativo foi inativado

durante 30 minutos pela adição de 25 µL de solução de glicina 1M. A solução resultante foi dialisada contra água destilada e posteriormente liofilizada.

O regime de imunização consistiu em administração intraperitoneal de três doses em camundongos *Swiss* machos com idade aproximada de 10 semanas. Cada camundongo recebeu uma dose quinzenal de 50 µg do conjugado KLH-peptídeo, na forma de emulsão com o adjuvante hidróxido de alumínio a 10%. A coleta do sangue foi realizada após 45 dias de imunização.

4.2.6 Colunas de afinidade individuais para purificação dos antissoros

4.2.6.1 Imobilização dos peptídeos sintéticos à sepharose 4B

Utilizou-se Sepharose 4B como matriz para imobilização dos peptídeos sintetizados de forma individual para purificação dos antissoros obtidos a partir da imunização dos camundongos como descrito anteriormente.

Para cada coluna utilizou-se Sepharose 4B suficiente para volume final de 0,2 mL cada. A sepharose 4B foi ativada em solução de epícloridrina 5% sob agitação a 40°C por 2 horas, como descrito por Matsumoto, Mizuno & Seno (1979).

Após lavagem com água destilada, 1,5 volumes de hidróxido de amônio P.A foram adicionados para aminação da resina epóxi-ativada incubando-se durante 90 minutos sob agitação, a 40°C. Suspendeu-se a resina aminada em 1,5 volumes de NaCl 0,1 M sendo posteriormente adicionados 0,08 g de anidrido succínico por g de resina para que ocorresse a succinilação da mesma. Manteve-se o pH igual a 6 através da adição gradual de NaOH 20%, e a mistura reacional mantida à temperatura ambiente durante 5 horas. Realizou-se uma nova lavagem e incubação por 30 min com NaOH 0,1 M e a resina foi novamente suspensa em NaCl 0,1 M. O suporte succinilado foi então lavado com 3 volumes de dioxano para tornar a resina anidra e novamente suspenso em dioxano para posterior adição NHS e DCC na concentração de 0,1M cada para ativação. Esta suspensão foi mantida por 70 minutos sob agitação leve à temperatura ambiente sendo então lavada com 8 volumes de dioxano seguidos de 4 volumes de metanol e 3 volumes de dioxano.

Após a ativação, realizou-se uma lavagem rápida com um volume de água destilada sendo a resina rapidamente transferida para um béquer com 3 volumes de

solução NaHCO₃ 0,01 M, NaCl 0,9%, pH 7,5 contendo ácido ε-amino capróico na proporção de 2,6 g de ácido para 100 mL de solução. Manteve-se a suspensão por uma hora à temperatura ambiente para inserção do braço extensor. Repetiu-se então a etapa de ativação com NHS e DCC como descrito anteriormente.

A uma solução de NaHCO₃ 0,01 M, NaCl 0,9% pH 7,5 adicionou-se o peptídeo na concentração de 10 mg/mL para a qual transferiu-se a resina ativada na última etapa. Após uma hora à temperatura ambiente e 12 horas sob refrigeração, o excesso de grupos reativos foi bloqueado com etanolamina 0,1 M, pH 9 por uma hora à temperatura ambiente. Após este procedimento procedeu-se nova lavagem com água destilada. Manteve-se a coluna de afinidade de peptídeo à 4°C até o momento do uso.

4.2.7 Purificação do antissoro

Para purificação dos antissoros, utilizaram-se as colunas previamente confeccionadas contendo os peptídeos imobilizados. Os antissoros provenientes de camundongos imunizados com peptídeos alterados do FVW foram aplicados em colunas de afinidade contendo peptídeos normais com o objetivo de se excluir da amostra os anticorpos contra o FVW normal, como mostra o fluxograma apresentado na figura 5.

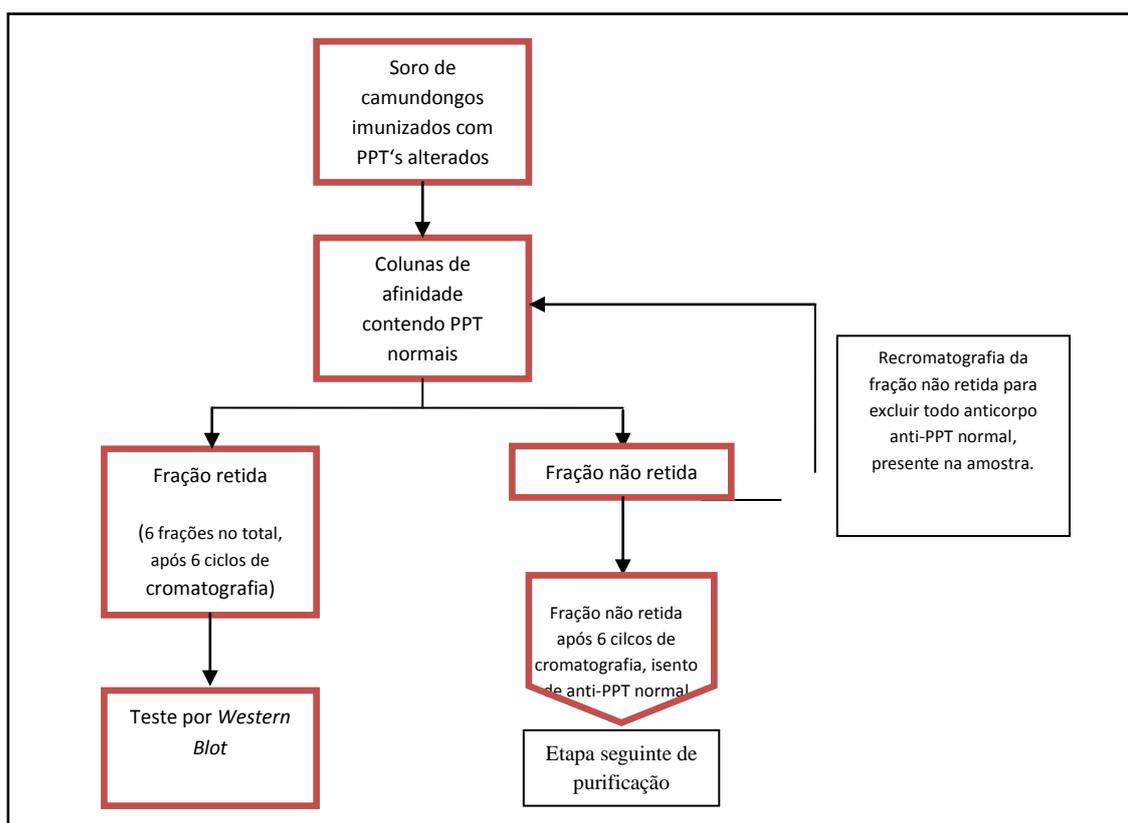


Figura 5. Fluxograma do método de tratamento do soro dos camundongos imunizados para exclusão de anticorpos anti-PPT normal

Equilibrou-se as colunas de afinidades com tampão fosfato salino - PBS (NaCl 0,15M; NaH₂PO₄ 0,2M e Na₂HPO₄ 0,2M) pH 7,4. Os soros dos camundongos imunizados com peptídeos alterados foram aplicados às colunas imobilizadas com peptídeos normais. Cerca de 100 µL das frações não retidas foram armazenadas para análise e o restante foi destinado a posterior recromatografia. Procedeu-se a eluição da fração retida na coluna com 5 mL de solução glicina 0,1M, pH 2,6 em tubo contendo 5mL de solução Tris-HCL 0,4M, pH 8,0. A coluna foi reequilibrada com PBS e a fração não retida foi submetida a mais cinco ciclos de cromatografia, totalizando 6 ciclos, nas mesmas condições citadas para se depletar todo anticorpo anti-PPT normal presente na fração não retida. Dessa forma, a amostra foi submetida à purificação em coluna contendo o peptídeo alterado imobilizado, como mostrado no esquema abaixo. Seguiu-se o mesmo procedimento de purificação em colunas com peptídeos normais, mostrada anteriormente.

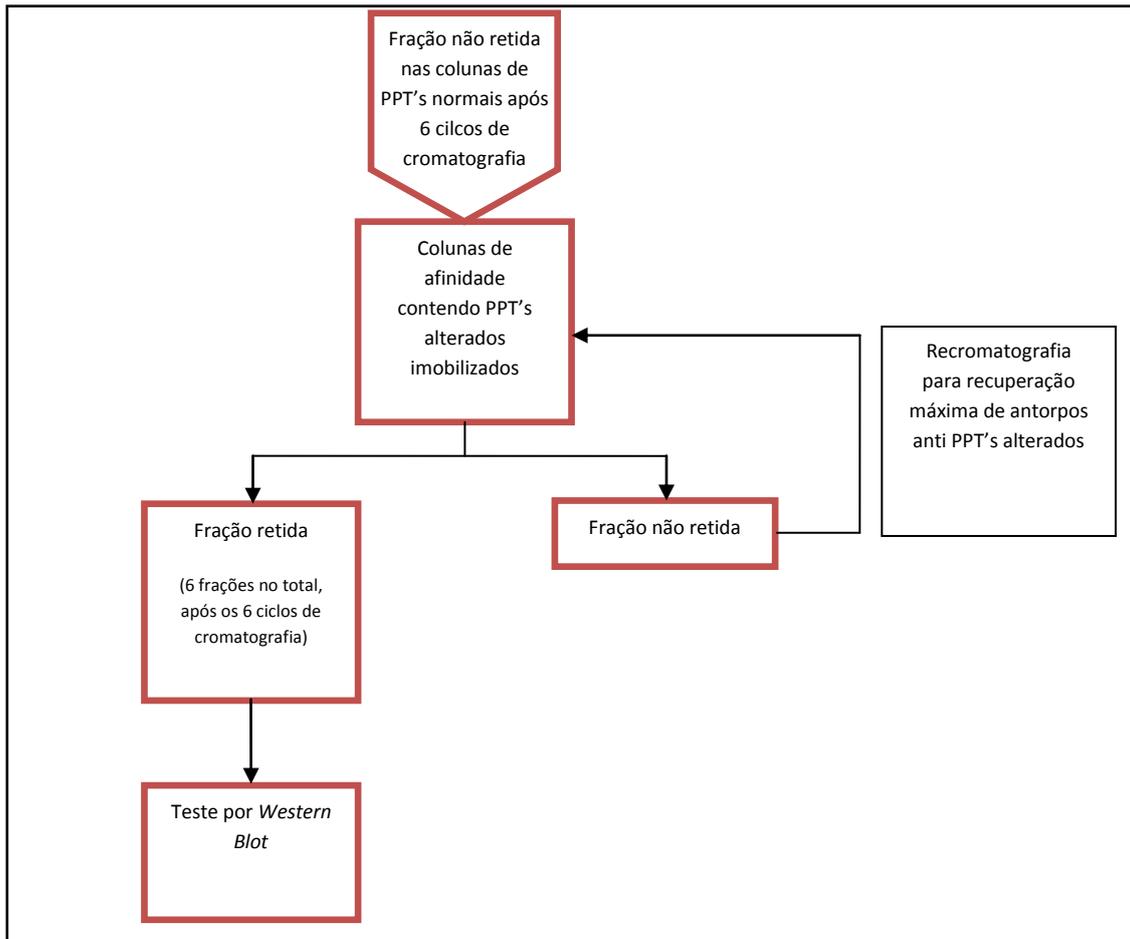


Figura 6. Fluxograma do método de purificação dos anticorpos anti-PPT alterados em colunas de PPT's alterados após o tratamento de exclusão dos anticorpos anti-PPT normal.

A fração retida proveniente do primeiro ciclo de cromatografia nas colunas de afinidade contendo peptídeo normal imobilizado foi submetida à filtração em filtro *Amicon Ultra-4 3000 Da* em 2 ciclos de centrifugação por 45 minutos a 4000 rpm à 4^o C. O volume final retido no filtro foi de 100 µL. Em seguida, adicionou-se 5 mL de acetato de amônio 0,01M e submeteu-se a nova centrifugação nas mesmas condições repetindo esse passo. O volume de 100 µL final presente no filtro foi liofilizado e, posteriormente, suspenso em 200 µL de água mili-Q. Adotou-se o mesmo procedimento para a fração retida proveniente do primeiro ciclo de cromatografia nas colunas de afinidade contendo peptídeo alterado imobilizado.

4.2.7.1 Acoplamento de peptídeos sintético alterados à albumina

Com a finalidade de produzir uma amostra modelo para testes de *Western blot* empregando anticorpos anti-FVW alterados, conjugou-se albumina purificada aos peptídeos sintéticos alterados. Para cada 1 mg de peptídeo presente em 500 µL de solução de DMF foram adicionados 17 µL de solução de diisopropilcabodimida 1:25 em dimetilformamida e 3 mg de NHS solubilizado em 20 µL de DMF. Manteve-se essa solução incubada por cinco minutos a temperatura ambiente, em repouso. Adicionou-se 50 µL de solução de acetato de sódio 0,4 M em dimetilformamida e incubou por dois minutos a temperatura ambiente para consumir o excesso de DIPC. Em seguida, adicionou-se um 1 mL de solução contendo 1 mg de BSA (*bovine serum albumin*) em bicarbonato de sódio 0,05M pH 7,5. Incubou-se por uma hora a temperatura ambiente em repouso e, em seguida, dialisou-se contra tampão acetato de amônio 0,1M por 24 horas. A solução dialisada foi liofilizada e ressuspensa em 100 µL de solução salina.

4.2.7.2 Western Blot para comprovação da presença de anticorpos purificados

Realizou-se a técnica de *Western Blot* (Towbin *et al.* 1979) para verificar a presença de anticorpo nas frações retidas nas colunas de purificação, para testar se a fração retida nessas colunas é capaz de reconhecer a amostra de peptídeo conjugada à albumina, verificar se a fração retida na coluna contendo peptídeos normais imobilizados é capaz de reconhecer FVW plasmático de um indivíduo normal e verificar se todo anti-PPT normal foi excluído da fração não retida proveniente da purificação em colunas contendo peptídeos normais imobilizados.

4.2.7.2.1 Detecção da presença de anticorpo nas frações retidas nas colunas de purificação

As frações retidas em colunas de peptídeos alterados foram concentradas e submetidas a eletroforeses em gel de poliacrilamida 12% e os respectivos géis transferidos para membranas de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) (Invitrogen) a 200 mA em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% e SDS 0,02%

sob refrigeração por duas horas. Em seguida, as membranas foram bloqueadas durante a noite em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%, sendo posteriormente lavadas por três vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Após essas lavagens, as membranas foram incubadas em tampão *immunoblotting* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween-20 0,013% e leite em pó desnatado 5%) sob agitação por 30 minutos. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (*Sigma Aldrich, EUA*) na diluição 1:2000, foi adicionado ao tampão *immunoblotting*, reagindo por 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e reveladas com solução de NBT/BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato - Sigma Aldrich, EUA*), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.7.2.2 Teste de reconhecimento da fração retida na coluna de peptídeos alterados empregando a amostra de peptídeo conjugada à albumina

Frações de 3 µL de cada solução contendo albumina conjugada à peptídeos sintéticos alterados obtidas conforme descrito foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, seguiu-se as mesmas condições de transferência, bloqueio e lavagens descritos acima. Incubou-se a membrana em tampão *immunoblotting* sob agitação por 30 minutos. Adicionou-se 50 µL fração retida nas colunas de peptídeos alterados, deixando sob agitação a temperatura ambiente por 3 horas. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas três vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e novamente incubadas por 2 horas com tampão *immunoblotting* contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (*Sigma Aldrich, EUA*) na diluição de 1:2000. As membranas foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e reveladas com solução de NBT/BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato - Sigma Aldrich, EUA*), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.7.2.3 Verificação do reconhecimento do FVW plasmático de um indivíduo normal pela fração retida na coluna contendo peptídeos normais imobilizados

Plasma de indivíduo normal precipitado por etanol 20%, como descrito no item 4.1.1 desse trabalho, foi submetido a eletroforeses em gel de poliacrilamida 5% e transferido para membranas de PVDF. Seguiu-se o protocolo acima referido, utilizando-se na primeira etapa de incubação a fração retida nas colunas contendo peptídeos normais imobilizados.

4.2.7.2.4 Teste para verificar a exclusão de todo anticorpo anti-Peptídeo normal da fração não retida proveniente da purificação em colunas de peptídeos normais

Os 100 μ L da fração não retida guardada, provenientes da primeira e sexta etapas cromatográficas de exclusão do anticorpo em colunas de peptídeos foram testados para se verificar a remoção dos anticorpos anti-peptídeos normais presentes na amostra. Para este propósito utilizou-se plasma de indivíduo normal, precipitado por etanol 20%, e a técnica de *Western blot* conforme descrito acima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho tem como objetivo tentar estabelecer método de identificações de alterações estruturais do FVW por meio de análise da proteína enriquecida a partir de plasmas humanos em espectrômetro de massas. Além disso, alguns peptídeos correspondentes às alterações do fator foram sintetizados para obtenção de anticorpos específicos.

5.1 Enriquecimento FVW plasmático e preparação de amostras para espectrometria de massas

5.1.1 Precipitação por etanol

As amostras de plasmas foram tratadas com etanol, como descrito em materiais e métodos, com objetivo de enriquecer o FVW na fração do precipitado de proteínas de elevada massa molecular em baixa concentração de solvente orgânico. Segundo Scopes (1987) há uma relação linear entre o Log da massa molecular das proteínas precipitadas e a concentração de solventes orgânicos. A figura 7 refere-se ao SDS-PAGE 5% em que se aplicou amostra proveniente da precipitação do plasma com etanol nas concentrações de 40, 30 e 20% na presença e ausência de citrato de sódio na concentração final de 0,6 M pH 5,8 (pH correspondente ao pI do FVW).

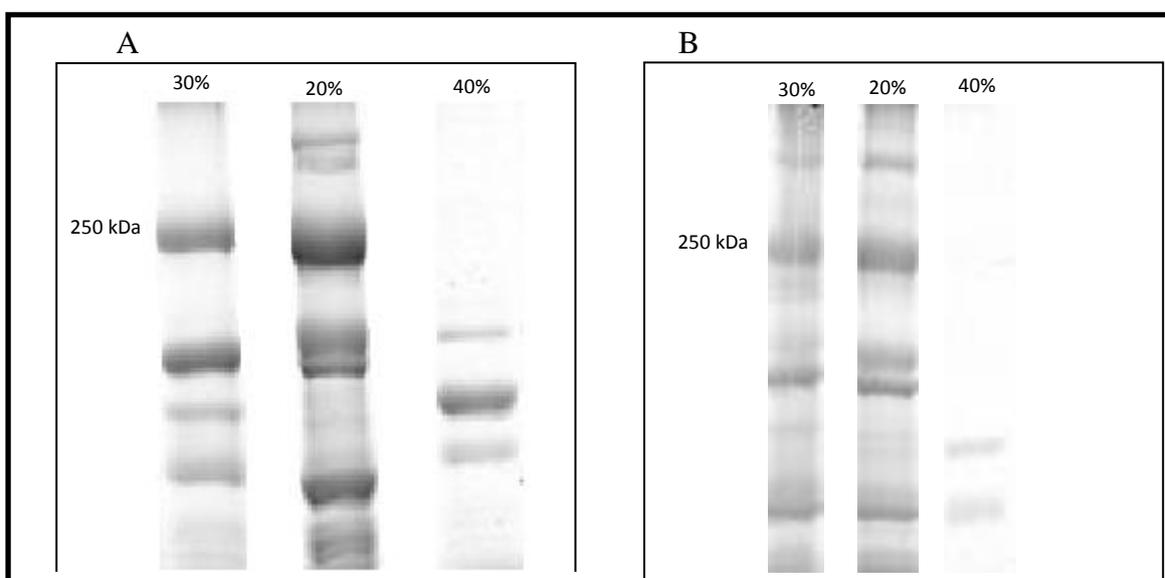


Figura 7. SDS-PAGE de amostras de plasma precipitado com etanol 20, 30 e 40% na presença (A) e na ausência (B) de citrato de sódio na concentração final de 0,6M, pH 5,8.

Uma análise densitométrica (*QuantityOne*) desses géis mostrou claramente que a concentração de 20% de etanol, na presença de citrato de sódio, foi mais eficiente entre as concentrações testadas na precipitação de proteínas de massas moleculares próximas à 250 kDa. Esses resultados foram inicialmente satisfatórios para atender ao objetivo de enriquecer amostras de plasma em FvW, pois espera-se obter banda eletroforética nessa região após a redução da proteína nativa pelo tratamento com DTT. Além disso, o procedimento permitiu a concentração na amostra de 800 μ L para 20 μ L e um isolamento parcial em gel de eletroforese frouxo à 5%, fracionando proteínas de alta massa molecular. Subsequentemente essas amostras precipitadas a 20% em etanol e fracionadas em SDS-PAGE 5% foram submetidas ao *Western Blot* para detecção do FvW humano empregando-se Anticorpo comercial obtido em coelho. Por outro lado, o baixo conteúdo de proteínas observado na amostra ressuspensa da precipitação com 40% de etanol pode ser explicado pela dificuldade de solubilização da massa de proteínas precipitadas que nesse caso apresenta-se em maior quantidade.

A figura 8 mostra *Western Blot* do SDS-PAGE 5% mencionado acima e demonstra claramente que o método foi satisfatório para o fracionamento parcial do FvW do plasma humano e sua revelação após transferência para a membrana de PVDF na região de 250 KDa.

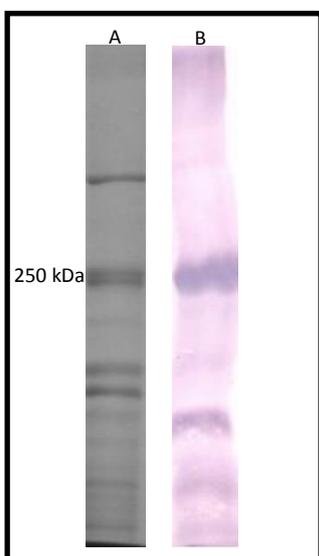


Figura 8. A) SDS-PAGE do plasma precipitado com 20% etanol na presença de citrato de sódio na concentração final de 0,6M, pH 5,8. B) *Western Blot* utilizando anti-FvW 1:2000 (*Sigma- Aldrich*).

Em um perfil eletroforético cuja amostra é o FvW plasmático tratado com agentes redutores e alquilantes, espera-se obter uma banda com peso molecular de aproximadamente 270 kDa, calculada a partir de sua sequência (Ruggeri 2001).

Entretanto, os perfis eletroforéticos obtidos por Zimmerman et al. (1986) apresentaram uma banda predominante de 225 kDa e bandas de 140, 176 e 189 kDa resultantes de degradação proteolítica de ocorrência natural *in vivo*. Nos experimentos realizados no presente trabalho verificou-se uma banda de 250 kDa revelada pelo *Western Blot* utilizando anticorpo anti-FVW. Essa banda foi excisada e enviada para análise em espectrometria de massas para a identificação da proteína e o maior número possível de peptídeos trípticos. A Figura 9 apresenta o espectro de massas que revelou a presença predominante da proteína fibronectina de massa molecular 250 kDa e apenas cinco peptídeos do FVW.

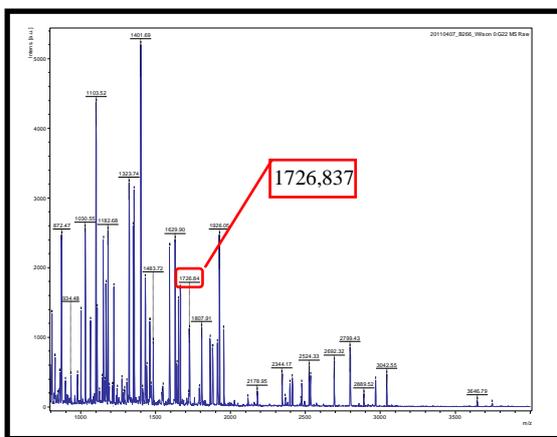


Figura 9. Espectro referente à banda 250Da marcada pelo anticorpo anti-FVW humano. Análise em espectrômetro de massas *Ultraflex III - MALDI-TOF/TOF (Bruker)*. Destaca-se a massa de 1726,837 que corresponde à massa esperada para peptídeo tríptico do FVW.

A supressão provocada pelos peptídeos trípticos gerados pela digestão da fibronectina deve ser responsável pela ausência da detecção das massas dos peptídeos trípticos do FVW. Com intuito de enriquecer ainda mais a preparação de FVW, as amostras foram tratadas com uma coluna de afinidade de Gelatina para se tentar depletar a fibronectina das amostras.

5.1.2 Tratamento das amostras em colunas de afinidade de Gelatina

A coluna de afinidade de gelatina foi confeccionada empregando-se a resina Agarose- ϵ -amino-N-capróico ativada com NHS. As amostras submetidas à cromatografia geraram perfis cromatográficos que estão apresentados na figura 10. As amostras foram sucessivamente aplicadas na mesma coluna com o intuito de remover totalmente a fibronectina presente na amostra. Como pode ser acompanhado nos perfis cromatográficos, verifica-se uma diminuição até a ausência de absorvância das frações de eluição com uréia 8 M após o terceiro tratamento. Sugerindo que toda fibronectina já havia sido depletada.

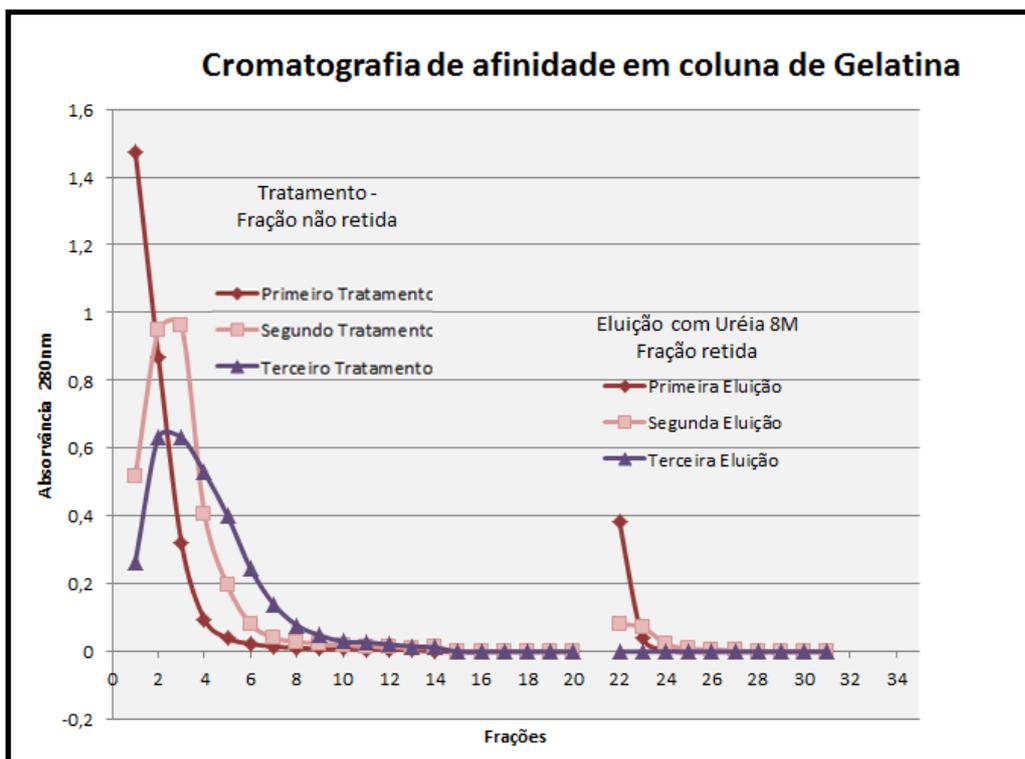


Figura 10. Cromatogramas do tratamento da amostra enriquecida FVW em coluna de afinidade de gelatina. Coluna montada em seringa de plástico com 1,5 mL de leito. Tratamento: 20 frações de 1 mL em Tris-HCl 0,5M pH 7,5, cada tratamento. Eluição: 10 frações de 1 mL com Uréia 8M.

A amostra tratada dessa forma foi submetida à SDS-PAGE 5% com a finalidade de verificar o enriquecimento da amostra em FVW na fração não retida da coluna de gelatina. Como pode ser visto na figura 11 ao realizar a essa eletroforese foi revelada pelo *Coomassie Blue* uma banda de aproximadamente 250 kDa na fração retida na coluna de gelatina que não foi reconhecida pelo anticorpo anti-FVW. Além disso, uma banda de aproximadamente 250 kDa pode ser revelada em *Western Blot* da fração não retida. Esses resultados são animadores do ponto de vista do isolamento do FVW para análise proteômica. Entretanto, apesar do sucesso na remoção da fibronectina da amostra, o perfil eletroforético da fração não retida não apresentou a banda de FVW de uma maneira evidenciada nitidamente após coloração pelo *Coomassie Blue*. Esses resultados demonstram que a obtenção de amostra isolada de FVW para análise de espectrometria de massas apresenta uma limitação no sentido de recuperar material necessário para análise a partir de 800 μ L de plasma empregando-se essa estratégia. Outros protocolos de ressolubilização do precipitado com álcool e fracionamento em filtração em gel para se obter o enriquecimento de proteínas de massas moleculares próximas as massas dos multímeros de FVW poderão aperfeiçoar a preparação de amostras para uma análise de espectrometria de massas com o efeito de supressão minimizado, para possibilitar a maior cobertura na identificação do maior número possível de peptídeos trópticos. A cobertura máxima nessa análise é fundamental para a identificação das alterações da estrutura do FVW após o seu isolamento e constituirá a base para o diagnóstico da DVW pela análise proteômica.

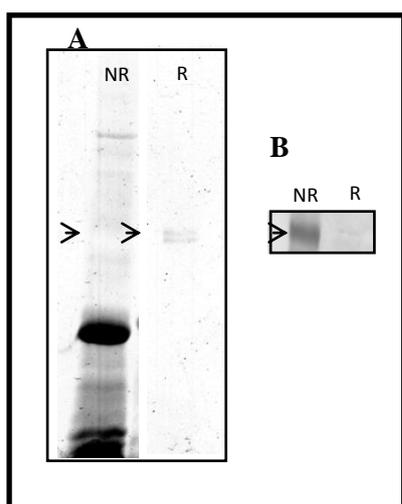


Figura 11. Depleção da fibronectina do plasma precipitado com etanol 20% na presença de citrato de sódio pH5,8. **A.** SDS-PAGE 5% corado com comassie-blue, fração não retida (NR) e retida (R) na coluna de gelatina. **B.** Western blot referente ao SDS-Page das frações retidas e não retidas na coluna de gelatina utilizando anticorpo anti-FVW humano (Sigma-Aldrich)

Considerando a dificuldade de acesso a equipamentos apropriados para análises robustas para a identificação ampla dos peptídeos alterados, optou-se pela interrupção temporária dos trabalhos envolvendo a abordagem proteômica na tentativa de identificação das alterações empregando-se métodos imunoquímicos.

5.2 Obtenção de Anticorpos Específicos para o FVW Normal e Alterado

Ao analisar o banco de dados ISTH-SSC VWF Online Database pode ser constatado a existência de inúmeras alterações que podem ser encontradas no FVW. Conforme mencionado na justificativa desse trabalho algumas dessas alterações foram escolhidas como objeto de nossa análise para a síntese de peptídeos e obtenção de anticorpos. Maior ênfase foi dada ao tipo 2B da doença envolvendo quatro alterações que representam 90% dos casos encontrados (R1306W, R1308C, V1316M e R1341Q).

5.2.1 Predição de peptídeos pela Análise da Estrutura Cristalográfica do FVW e das alterações citadas pelo banco de dados ISTH-SSC VWF Online Database

O objetivo dessa análise foi selecionar sequências que continham as alterações situadas em regiões acessíveis à face externa da proteína nativa. A seleção realizada com esse critério favorece a obtenção de epitopos mais antigênicos, gerando anticorpos com potencial para detectar a proteína nativa. Além desse critério geral de escolha, foi realizado o alinhamento entre a proteína humana e de camundongos para a seleção de peptídeos com menores identidades entre as duas espécies visando garantir a obtenção de anticorpos em camundongos. Para essa avaliação utilizaram-se os dados cristalográficos de domínios do FVW depositados no PDBj data bank empregando-se a ferramenta de determinação do grau de acessibilidade dos resíduos do programa PDB Viewer (Figura 12). Embora a seleção de peptídeos apoiada no banco de dados possa permitir a escolha de maneira precisa das sequências dos peptídeos normais, essa análise também foi útil para orientar a avaliação do posicionamento dos peptídeos alterados na mesma região.

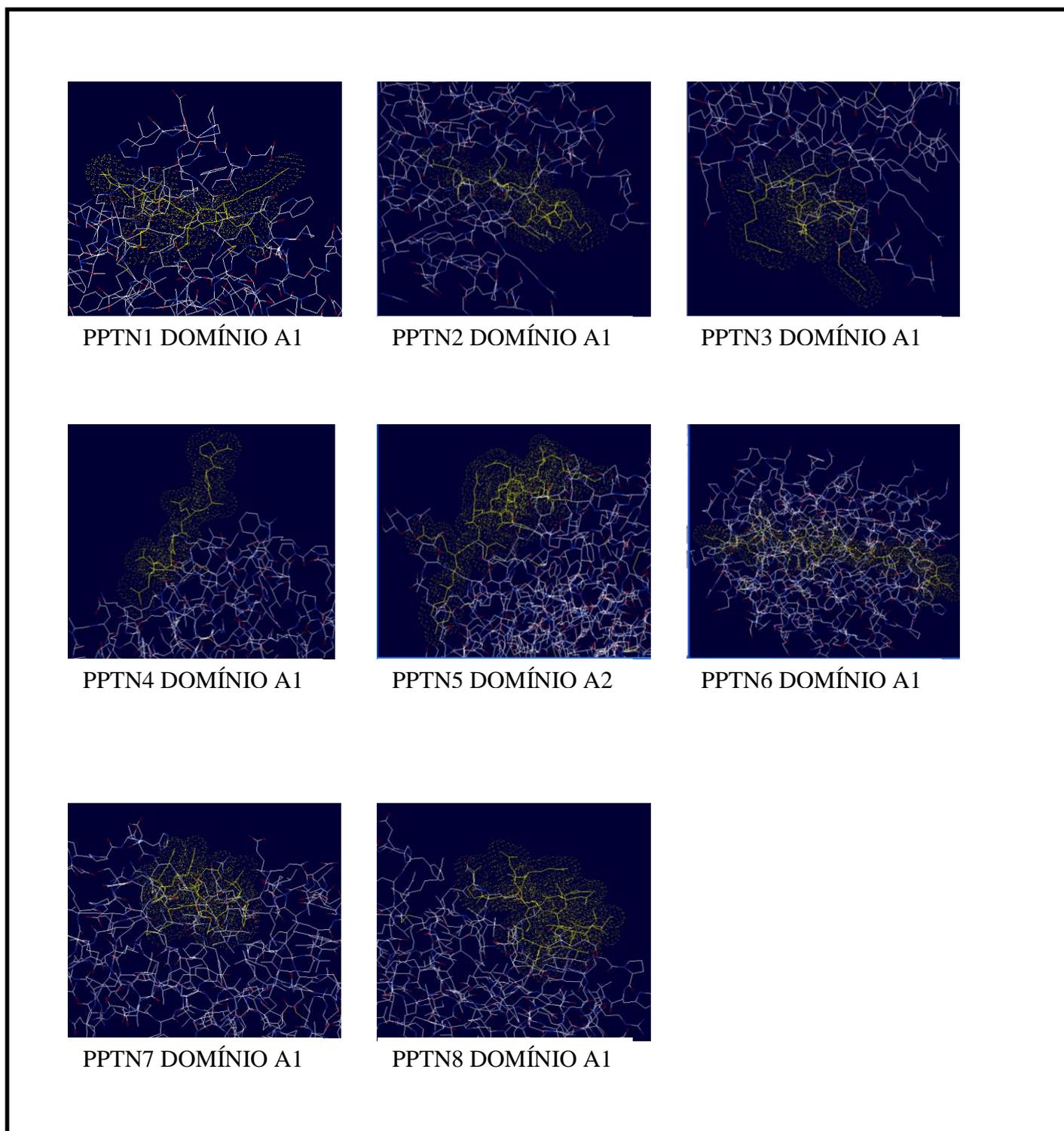


Figura 12 Domínios cristalográficos do FVW visualizados no programa *PDBViewer*. Destacam-se em amarelo a região em que os peptídeos normais selecionados para síntese se encontram no domínio mostrado do FVW.

De acordo com o alinhamento feito pelo *ClustalW2* entre FVW humano e de camundongos (Tabela 6), pode-se concluir que os peptídeos normais apresentam, pontualmente, diferenças estruturais que poderiam constituir sítios distintos de reconhecimento e possíveis regiões antigênicas na molécula. Apenas o PPTN3 é

idêntico entre as duas espécies. Quanto aos peptídeos alterados, também foi possível constatar uma ampla possibilidade de obter anticorpos em camundongos. Entretanto, o peptídeo PPTD1302G é idêntico nas duas espécies e apresenta menor potencial na imunização de camundongos.

Espécie	PPT's normais	PPT's alterados			
Hum Cam	PPTN1 MERLRIS MERL <u>HIS</u>	PPTR1306W MEWLRIS MERL <u>HIS</u>	PPTR1308C MERL <u>CIS</u> MERL <u>HIS</u>		
Hum Cam	PPTN2 SQKWVRVA SQKR <u>IRVA</u>	PPTV1316M SQKWVR <u>MA</u> SQKR <u>IRVA</u>			
Hum Cam	PPTN3 RPSELRR RPSELRR	PPTR1341Q RPSEL <u>QR</u> RPSEL <u>RR</u>			
Hum Cam	PPTN8 AFVLS <u>S</u> VDELEQQR AFL <u>LSG</u> VDELEQQR	PPTA1437T TFVLS <u>S</u> VDELEQQR AFL <u>LSG</u> VDELEQQR			
Hum Cam	PPTN4 DLAPEAPP DLAPEAP <u>A</u>	PPTA1461V DL <u>D</u> PEAPP DL <u>A</u> PEAP <u>A</u>	PPTA1461V DL <u>V</u> PEAPP DL <u>A</u> PEAP <u>A</u>	PPTL1460V D <u>V</u> APEAPP D <u>L</u> APEAP <u>A</u>	
Hum Cam	PPTN5 KGD <u>I</u> L <u>QR</u> VREIRY KEEVL <u>RH</u> VREIRY	PPTL1562P KGD <u>I</u> P <u>QR</u> VREIRY KEEVL <u>RH</u> VREIRY			
Hum Cam	PPTN6 LLDLVFLLDGSS <u>R</u> LLDLVFLLDGSS <u>M</u>	PPTV1276P LPDLVFLLDGSSR LLDLVFLLDGSS <u>M</u>	PPTV1279F LLDL <u>F</u> FLLDGSSR LLDL <u>V</u> FLLDGSSM	PPTV1279I LLDL <u>I</u> FLLDGSS <u>R</u> LLDL <u>V</u> FLLDGSS <u>M</u>	PPTS1285F LLDLVFLLDG <u>FSR</u> LLDLVFLLDGSS <u>M</u>
Hum Cam	PPTN7 AFVVDMMER AFV <u>V</u> GMMER	PPTD1302G AFVVGMMER AFVVGMMER			

Tabela 6. Alinhamento ClustalW2 dos peptídeos sintéticos humanos às sequências correspondente do FVW de camundongos. Hum: sequência dos peptídeos do FVW em humanos; Cam: sequência correspondente do FVW de camundongos. Em negrito e sublinhado estão os resíduos não correspondentes entre as duas espécies.

5.2.2 Síntese de Peptídeos, Confirmação da Estrutura por Espectrometria de Massas e Purificação.

Obteve-se pelo procedimento de Merrifield (1965), empregando-se síntese em fase sólida pela estratégia de F-moc os peptídeos da tabela 7.

Peptídeos		Sequência	Massa
1	PPTN1	MERLRISY	1067.5666
Normal			
2	PPTR1306W	MEWLRISY	1097.5448
Alterado			
3	PPTR1308C	MERLCISY	1014.4747
Alterado			
4	PPTN2	SQKWV RVA	973.5577
Normal			
5	V1316M	SQKWV RMA	1005.5298
Alterado			
6	PPTN3	RPSEL RRY	1076.5959
Normal			
7	R1341Q	RPSEL QRY	1048.5534
Alterado			
8	PPTN4	DLAPEAPPY	972.4672
Normal			
9	PPTA1461D	CDLDPEAPPY	1119.4663
Alterado			
10	PPTA1461V	CDLVPEAPPY	1103.5077
Alterado			
11	PPTL1460V	CDVAPEAPPY	1061.4608
Alterado			
12	PPTN5	CKGDILQ R VREIRY	1748.9588
Normal			
13	L1562P	CKGDIPQ R VREIRY	1732.9275
Alterado			
14	PPTN6	LLDLVFL LDGSSR	1447.8155
Normal			
15	PPTL1276P	LPDLVFL LDGSSR	1431.7842
Alterado			
16	PPTV1279F	LLDLFFL LDGSSR	1495.8155
Alterado			
17	PPTV1279I	LLDLIFL LDGSSR	1461.8311
Alterado			
18	PPTS1285F	LLDLVFL LDGFSR	1507.8518
Alterado			
19	PPTN7	AFVVDMMER	1097.5118
Normal			
20	PPTD1302G	AFVVGMMER	1039.5063
Alterado			
21	PPTN8	AFVLSSVDELEQQR	1620.8227
Normal			
22	A1437T	TFVLSSVDELEQQR	1650.8333
Alterado			

Tabela 7. Peptídeos sintetizados e suas respectivas sequências de aminoácidos e massas calculadas pelo ExPasy Peptide Mass.

Os peptídeos foram purificados empregando-se cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gradiente de água e acetonitrila. Os cromatogramas demonstram bons

rendimentos revelando nitidamente um componente principal correspondente à estrutura pretendida. Os picos principais presentes no perfil cromatográfico foram recolhidos e analisados pela espectrometria de massas. A figura 13 ilustra alguns resultados para os peptídeos normais e 3 peptídeos contendo alterações que representam 90% dos casos da DVW tipo 2B.

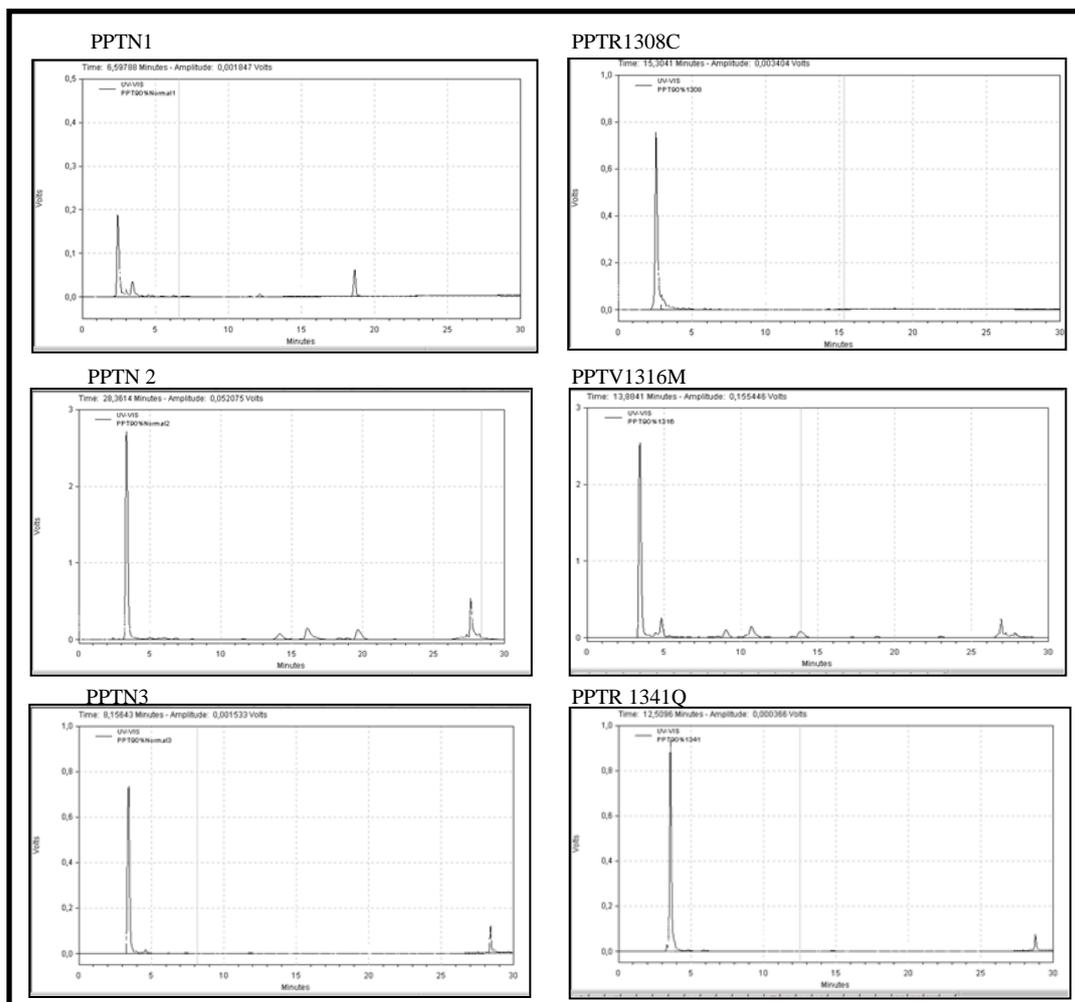


Figura 13. Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna C18 (250 mm x 4,6mm). Condições para PPTN1 e PPTR1308C: gradiente de acetonitrila de 20 a 60% e TFA 0,1% durante 35 minutos com um fluxo de um mL/minuto.; para PPTN2, PPTV1316M, PPTN3 e PPTR1341Q: gradiente de acetonitrila de 50 a 100% e TFA 0,1% durante 40 minutos com um fluxo de um mL/minuto.

A Figura 14 apresenta os espectros de massas dos componentes principais revelados pelos cromatogramas, purificados das preparações dos respectivos peptídeos. A análise das massas encontradas confirma o sucesso na síntese e a purificação do peptídeo. As massas foram, frequentemente, idênticas àquelas calculadas através do programa *ExPASy Peptide Mass* com alterações observadas apenas nos peptídeos

contendo metionina, tendo em vista a ocorrência de oxidação desse resíduo (aumento de aproximadamente 16).

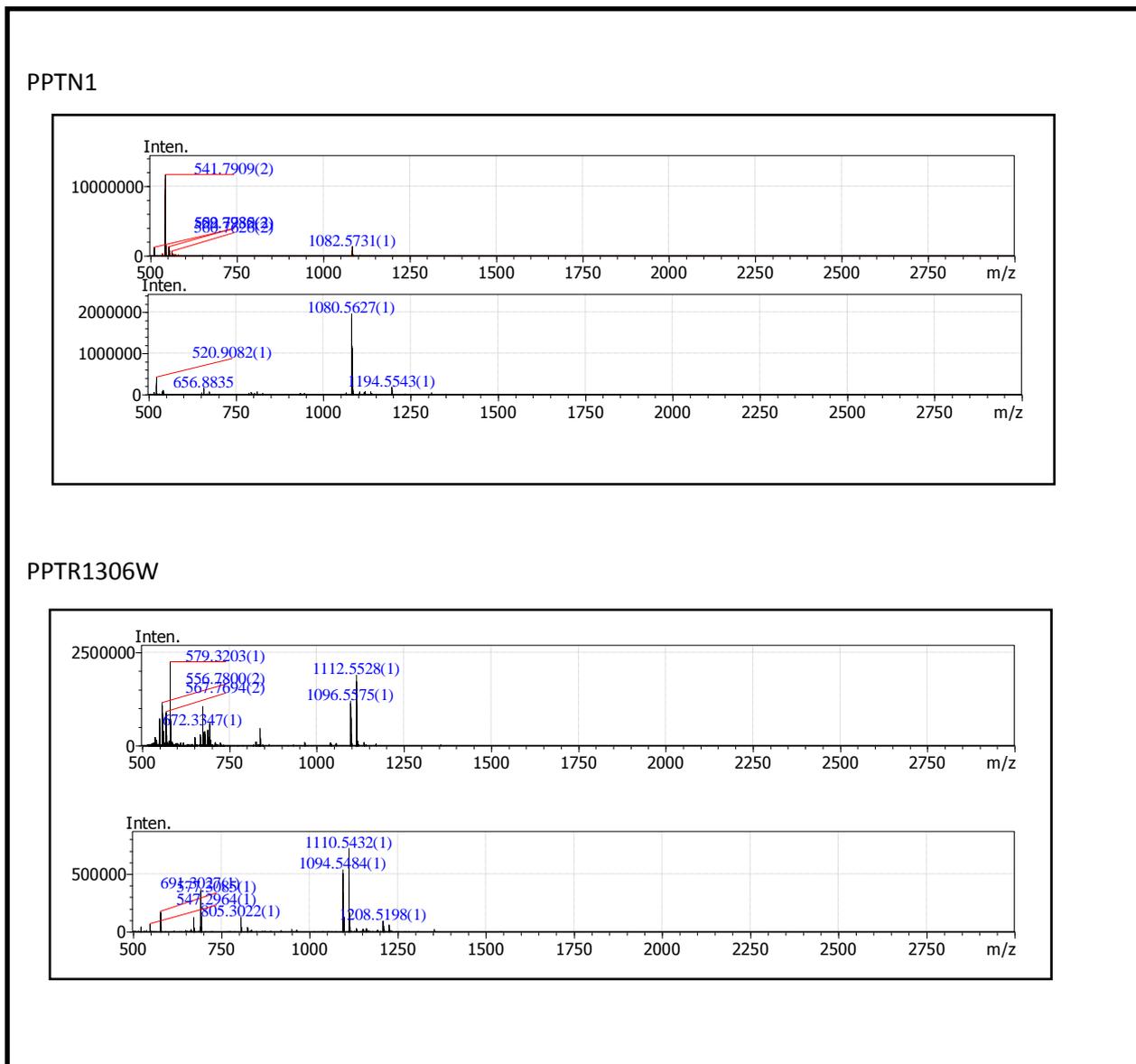
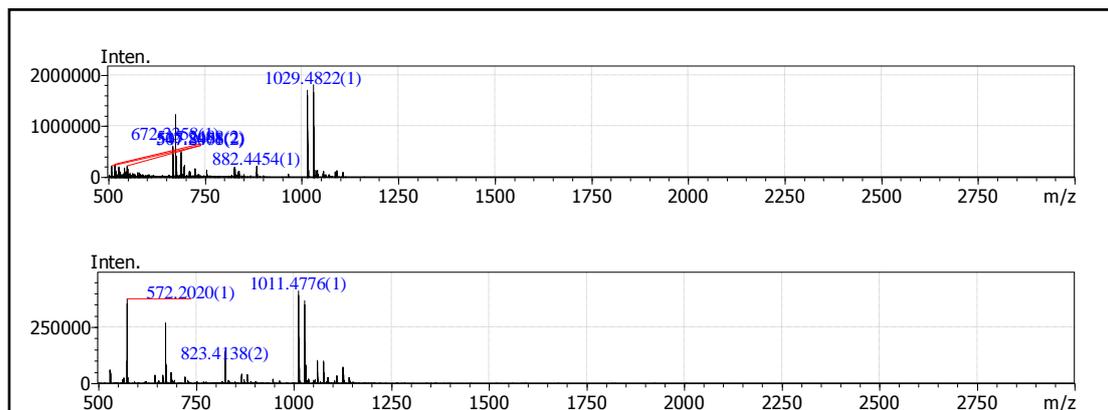
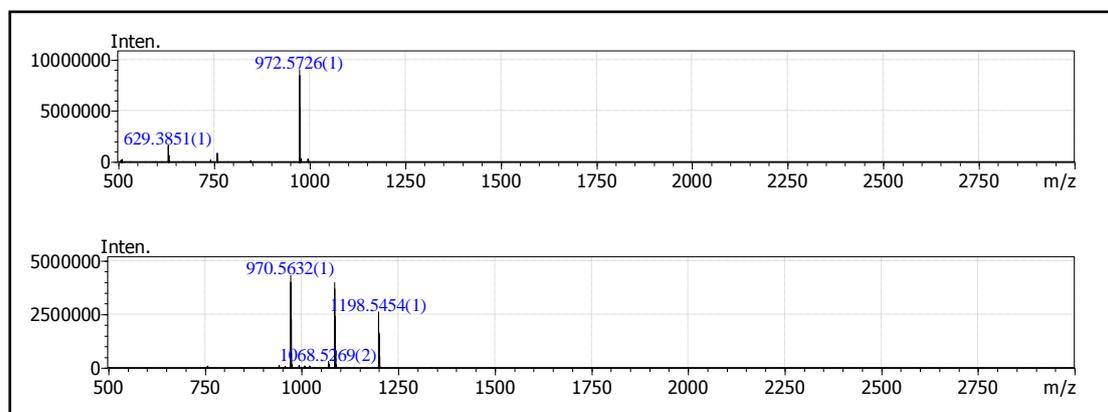


Figura 14. Identificação das massas dos peptídeos PPTN1, PPTR1306W, PPTR1308C, PPTN2, V1316M, PPTN3, R1341Q por espectrometria de massa em LCMS-ITTOF do tipo *electrospray*. O primeiro espectro de cada peptídeo refere-se à ionização no modo positivo e o segundo ao modo negativo.

PPTR1308C



PPTN2



PPTV1316M

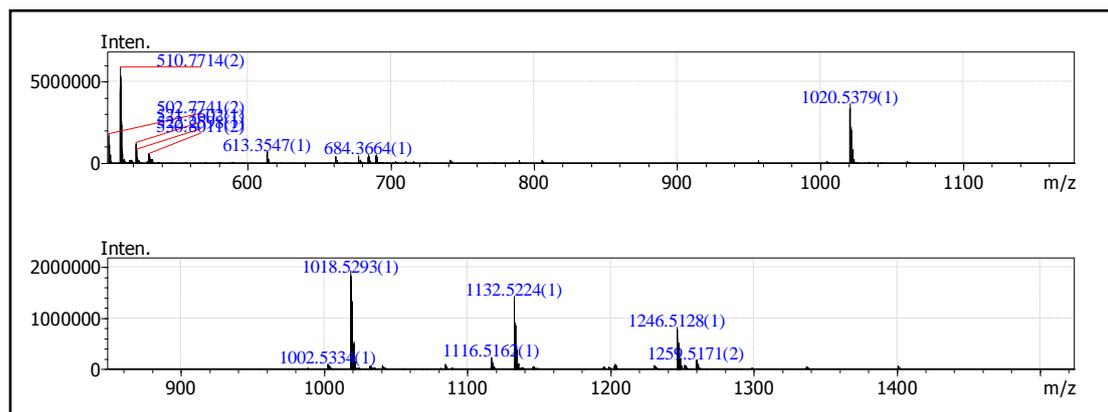


Figura 14. Continuação

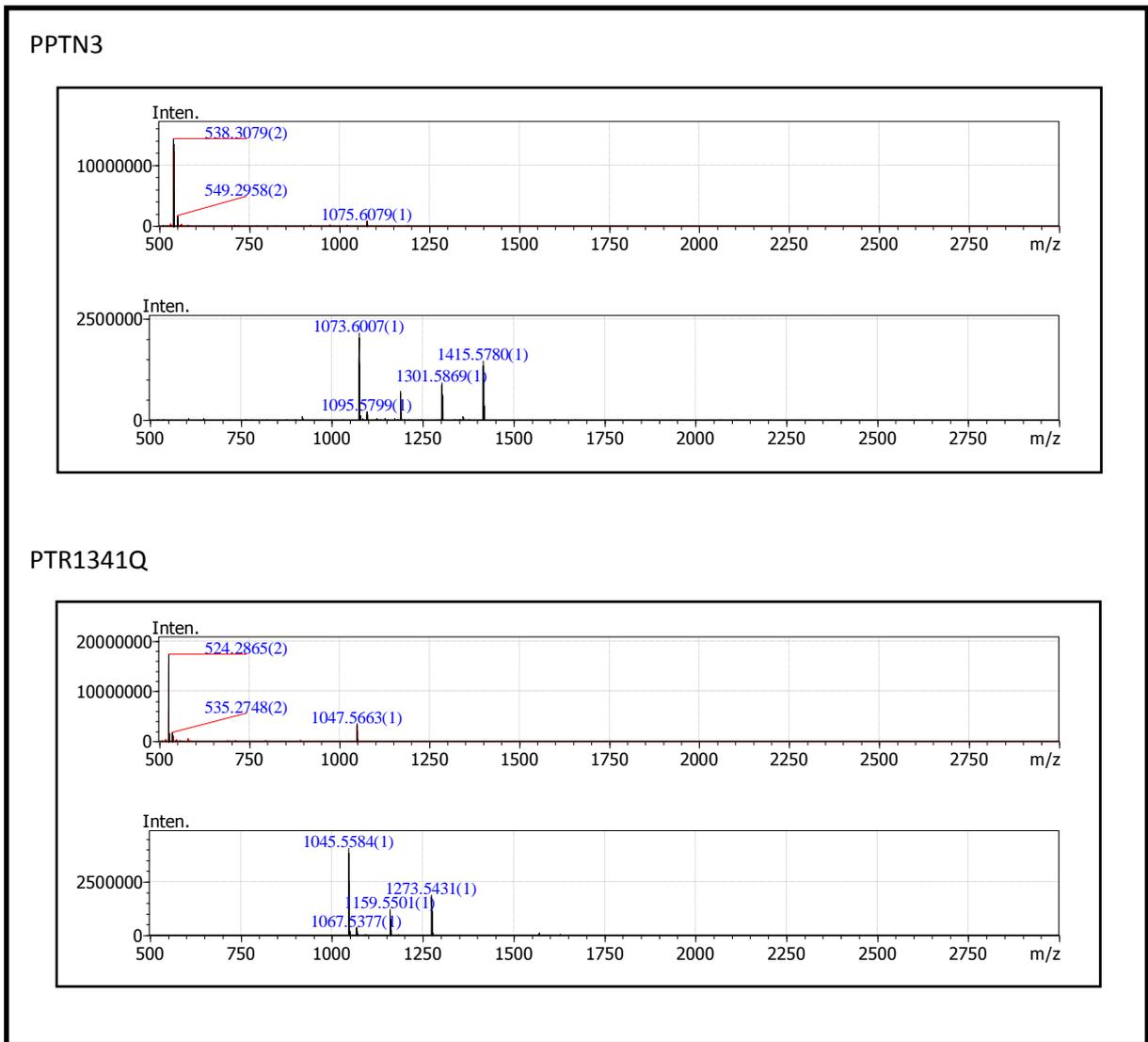


Figura 14. Continuação

5.2.3 Análise e Purificação dos Anti-soros em Colunas de Peptídeos.

Após a imunização dos camundongos com os peptídeos propostos conjugados com KLH, os soros obtidos foram analisados pela realização do *Western Blott*, empregando o enriquecido de FVW de plasma normal. Esses resultados podem ser vistos na figura 15 que demonstra reatividade de todos os antissoros obtidos. Os antissoros brutos apresentaram-se muito específicos para a detecção da banda de 250 kDa, mostrando-se melhores, nesse aspecto que o anticorpo comercial. Embora imunizados em muitos casos com peptídeos alterados, os antissoros reconheceram o FVW normal porque boa parte da estrutura desses peptídeos preserva a estrutura

original e foi capaz de imunizar os camundongos para essas regiões do FVW normal. Esses antissoros foram empregados na diluição de 1:500 que pode ser considerada uma diluição satisfatória para um antissoro bruto empregado em *Western Blot*. A elevada especificidade dos mesmos na detecção do FVW e possibilidade de purificação em colunas de peptídeos colocam esses antígenos sintéticos como preparações viáveis na obtenção de anticorpos específicos com potencial para a detecção e até mesmo na quantificação desse fator por ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), pois muitos foram selecionados a partir de regiões expostas do FVW.

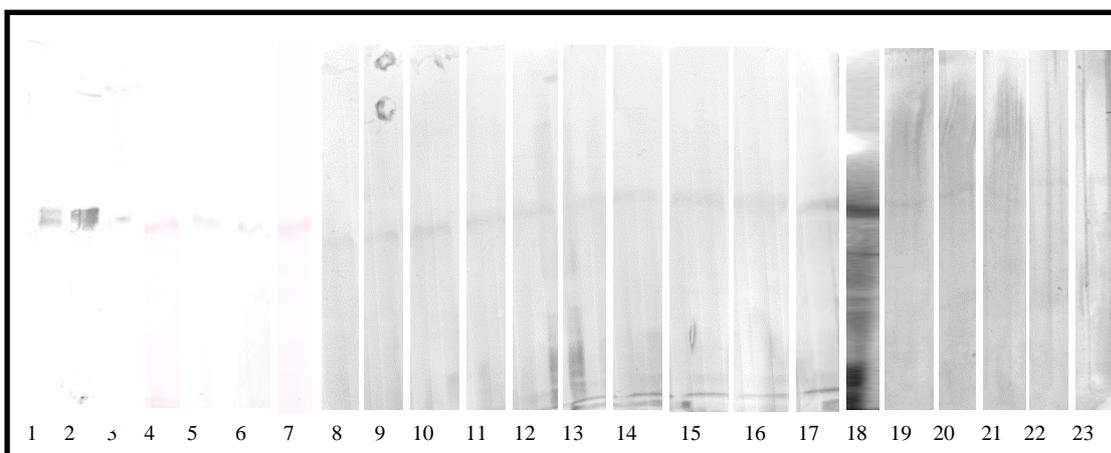


Figura 15. *Western Blot* referente ao SDS-Page utilizando antissoros dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos do FvW :1.PPTN1R1306W; 2. PPTN1; 3. PPTR1308C; 4. PPT N2; 5. PPTV1316M; 6. PPTR1341Q; 7. PPTN3; 8. PPTN4; 9. PPTL1460V; 10. PPTA1460D; 11. PPTA1461V; 12. PPTN5; 13. PPTL1562P; 14. PPTN6; 15. PPTL1276P; 16. PPTV1279F; 17. PPT1279I; 19. PPTS1285F; 20. PPTN7; 21. PPTD1302G; 22. PPTN8; 23. PPTA1437T. 18. Controle utilizando anticorpo anti-FVW (*Sigma-Aldrich*).

Como os peptídeos alterados utilizados para imunização possuem uma parte da sequência idêntica à sequência normal além das alterações, os anticorpos que reconhecem a parte normal devem ser retirados dos antissoros para se obter antissoros com reatividade específica para o FVW contendo a alteração. Para separar os anticorpos anti-PPT para a região normal daqueles específicos para a região alterada, os antissoros foram purificados em colunas de afinidade de PPT (mesmos utilizados para imunização). Primeiramente em colunas de PPT normais e subsequentemente, em colunas de PPT alterados para se obter anticorpos específicos para região alterada do PPT. Para conseguir a remoção completa dos anticorpos da primeira etapa, as amostras foram submetidas a seis ciclos de tratamento em colunas de PPT normais. A remoção completa dos anticorpos normais foi acompanhada a cada ciclo por meio do *Western*

Blot. A figura 16 ilustra o procedimento empregado e a remoção completa dos anticorpos para o FVW normal.

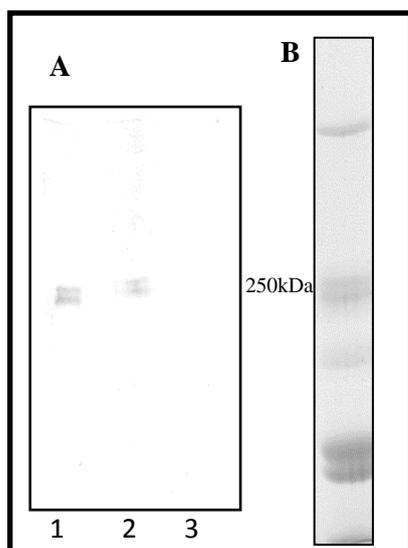


Figura 16. Etapas de esgotamento das amostras de antissoros de PPT's alterados nas colunas de PPT's normais. **A.** *Western Blot* : **1.** Antissoro antes da purificação; **2.** Fração não retida depois do primeiro ciclo de esgotamento; **3.** Fração não retida depois do sexto ciclo de esgotamento. **B.** SDS-PAGE réplica da amostra do plasma normal submetido à precipitação por etanol 20% na presença de citrato de sódio pH5,8 .

Para finalmente purificar os anticorpos específicos para as alterações, os antissoros tratados como descrito acima, foram submetidos à colunas de afinidade com PPT alterados e recuperados após a eluição com tampão glicina 0,1 M; pH 2,6. A confirmação da presença de IgG nas frações eluídas das colunas foi apreciada por meio de um *Western Blot* . Como mostrado na figura 17 (A) os peptídeos alterados PPTR1306W, PPTR1308C e PPTV1316M geraram IgG em camundongos com afinidade pela coluna de PPT alterado após a depleção dos anticorpos normais do soro em colunas de peptídeos normais. Devido à limitação de conseguir padrões de amostras de plasma com alterações confirmadas da estrutura do FVW, não foi possível realizar testes de identificação das alterações do FVW em plasmas de pacientes com os anticorpos purificados. Para testar a capacidade de reconhecimento específico dos anticorpos purificados em amostras de proteínas contendo esses peptídeos alterados, foram criadas amostras modelos de BSA (*bovine serum albumin*) conjugada de forma limitada com os peptídeos alterados. A figura 17 (B e C) mostra um *Western Blot* das proteínas conjugadas e a reatividade dos anticorpos PPTR1341Q e PPTV1316M nas condições do ensaio.

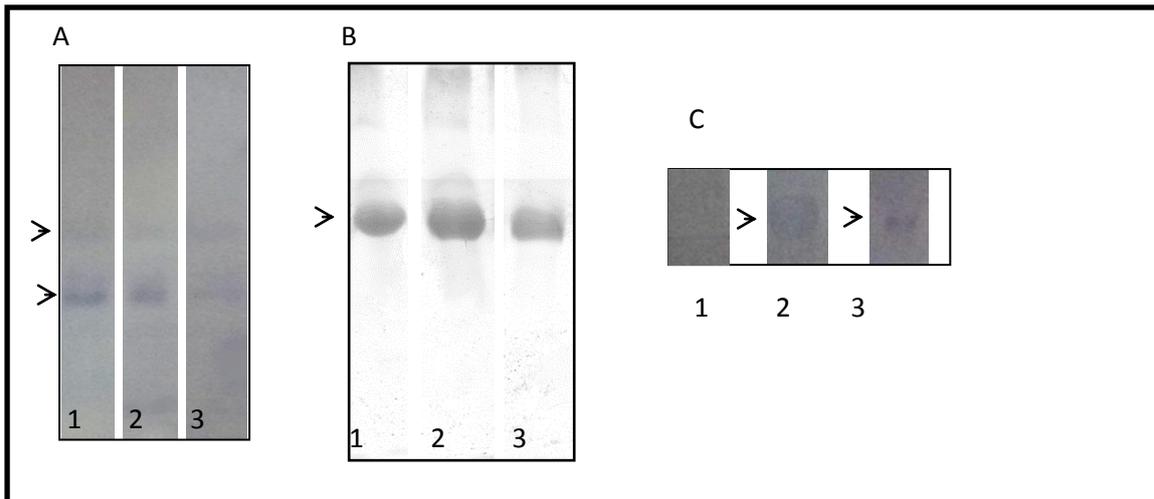


Figura 17. **A.** *Western Blot* mostrando a presença de IgG nas frações retidas nas colunas de afinidade de PPT's alterados (1. PPTR1306W; 2. PPTR1308C; 3. PPTR1341Q). **B.** SDS-PAGE 12% (1. Albumina; 2. albumina-PPTR1341Q; PPTV1316M). **C.** *Western Blot* referente ao SDS-PAGE de B.

Os anticorpos retidos nas colunas de peptídeos normais foram também analisados empregando-se o enriquecido de FvW a 20% em etanol em *Western Blot*. Todos antissoros purificados em colunas de PPT normal reconheceram o FvW normal de forma específica. Desta forma, os peptídeos PPTR1306W, PPTR1308C, PPTV1316M e PPTR1341Q permitiram a obtenção de anticorpos purificados específicos para o FvW humano normal (Figura 18).

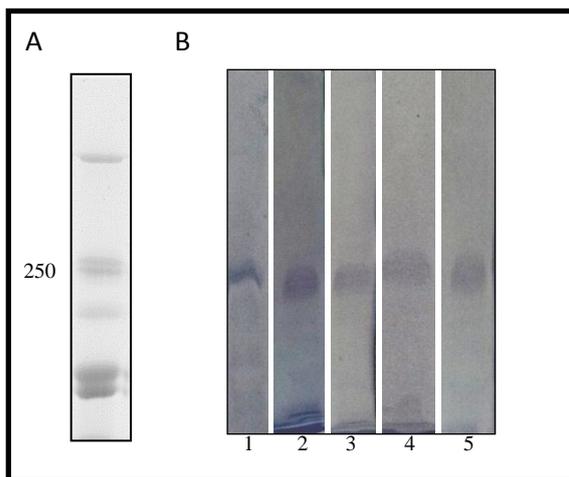


Figura 18. **A)** SDS-PAGE 5% plasma precipitado com etanol 20% na presença de citrato de sódio concentrado pH 5,8. **B)** *Western Blot* utilizando os antissoros dos camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos do FvW: 2. PPTR1306W; 3. PPTR1308C; 4. PPTV1316M e 5. PPTR1341Q; após passagem em coluna de afinidade contendo PPTN1 (2 e3), PPTN2 (4) e PPTN3 (5). 1 Refere-se ao controle feito com anticorpo anti-FvW (Sigma-Aldrich).

6 CONCLUSÃO

O trabalho de purificação do FvW permitiu o isolamento de banda de 250 kDa em SDS-PAGE 5% após a precipitação com etanol a partir do plasma. O tratamento em coluna de gelatina contribuiu para exclusão da fibronectina reduzindo a possibilidade de supressão na identificação dos peptídeos por espectrometria de massas.

Os trabalhos visando a obtenção de anticorpos anti-FVW humano alterado e normal, produzidos em camundongos, com peptídeos sintéticos geraram anticorpos específicos com potencial aplicação em métodos de diagnóstico:

- Obteve-se 22 antisoros específicos para o FVW humano em análise feita em *Western Blot* com título 1:500
- Obtenção de quatro preparações anticorpos purificadas em coluna de afinidade específicas para as alterações R1306W, R1308C, V1316M e R1341Q do tipo 2B da DVW com prevalência de 90%
- Obtenção de quatro preparações de anticorpos purificados em colunas de peptídeos específicas para o FVW normal
- Obtenção de dois produtos tecnológicos depositados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI):
 - Peptídeos antigênicos indutores de anticorpos específicos para identificação de alterações de maior prevalência do subtipo 2B da Doença de Von Willebrand.
 - Peptídeos antigênicos indutores de anticorpos específicos para o Fator de Von Willebrand normal úteis no diagnóstico e classificação da Doença de Von Willebrand.

7 PERSPECTIVAS

Os trabalhos experimentais, relacionados ao desenvolvimento de protocolo de preparo de amostras para a análise proteômica, geraram resultados que facilitará o estabelecimento de método capaz de preparar amostra para a identificação dos peptídeos alterados em espectrometria de massas e a possibilidade de identificação das alterações do FVW para diagnóstico da DVW.

A obtenção de anticorpos específicos para o FVW a partir dos peptídeos selecionados por ferramenta computacional permitirá o uso dos mesmos em análises de multímeros no teste de diagnóstico atualmente empregado na classificação de DVW e ensaios de capacidade de ligação ao fator VIII, uma vez que essas técnicas exigem anticorpos muito específicos que nem sempre estão disponíveis no mercado. A seleção desses peptídeos antigênicos característicos do FVW permitirá a produção de anticorpos monoclonais específicos.

Os anticorpos específicos obtidos para as alterações de maior prevalência do tipo 2B da DVW poderão ser utilizados no estabelecimento e validação de métodos imunoquímicos para diagnóstico desse tipo da doença. Os mesmos peptídeos com alterações características do tipo 2B da DVW, utilizados na obtenção dos anticorpos específicos nesse trabalho poderão ser utilizados na produção de anticorpos monoclonais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde, Departamento de Atenção Especializada. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2007 / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

Castaman, G., A. B. Federici, et al. (2003). "Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment." Haematologica **88**(1): 94-108.

Federici, A. B., Mannucci, P. M. (1999). "Diagnosis and management of von Willebrand disease." Haemophilia **5** (2): 28-37.

GE Healthcare. "Gelatin Sepharose". Instructions 71-7094-00 AE Affinity Media. 8f. 2006.

Ginsburg, D., R. I. Handin, et al. (1985). "Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization." Science **228**(4706): 1401-1406.

Handin, R. I. and D. D. Wagner (1989). "Molecular and cellular biology of von Willebrand factor." Prog Hemost Thromb **9**: 233-259.

Holmberg, L. and I. M. Nilsson (1992). "von Willebrand's disease." Eur J Haematol **48**(3): 127-141.

Ingram, G. I. (1976). "The history of haemophilia." J Clin Pathol **29**(6): 469-479.

International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). The University of Sheffield. ISTH-SSC VWF Online Database (VWFdb). Disponível em: <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html> . Acesso em: 2012.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

James, A. H. (2009). "Von Willebrand disease in women: awareness and diagnosis." Thromb Res **124 Suppl 1**: S7-10.

Laemmli, U.K. (1979). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.

Lillicrap, D. (2007). "Von Willebrand disease - phenotype versus genotype: deficiency versus disease." Thromb Res **120 Suppl 1**: S11-16.

Loesberg, C., M. D. Gonsalves, et al. (1983). "The effect of calcium on the secretion of factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells." Biochim Biophys Acta **763**(2): 160-168.

Mannucci, P. M., C. Capoferri, et al. (2004). "Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease." Br J Haematol **126**(2): 213-218.

Matsumoto, I., Y. Mizuno et al. (1979) "Activation of Sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent." J Biochem **85**(4):1091-8.

Mendolicchio, G. L. and Z. M. Ruggeri (2005). "New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis." Semin Hematol **42**(1): 5-14.

Merrifield, R. b. (1965) "Solid-phase peptide syntheses." Endeavour **24**: 3-7.

Miller, J. L. and A. Castella (1982). "Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder." Blood **60**(3): 790-794.

Nachman, R., R. Levine, et al. (1977). "Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes." J Clin Invest **60**(4): 914-921.

Nilsson, I. M., M. Blomback, et al. (1957). "Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0." Acta Med Scand **159**(3): 179-188.

Rodeghiero, F., G. Castaman, et al. (1987). "Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease." Blood **69**(2): 454-459.

Ruggeri, Z. M. (2001). "Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation." Best Pract Res Clin Haematol **14**(2): 257-279.

Sadler, J. E. (1998). "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor." Annu Rev Biochem **67**: 395-424.

Sadler, J. E., U. Budde, et al. (2006). "Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor." J Thromb Haemost **4**(10): 2103-2114.

Schneppenheim, R. (1996). "Von Willebrand disease." Eur J Pediatr **155**(9): 751-752.

Scopes, R.K. Protein purification: principles and practice. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1987. 329 p. Springer advanced texts in chemistry.

Shelton-Inloes, B. B., K. Titani, et al. (1986). "cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms." Biochemistry **25**(11): 3164-3171.

Sporn, L. A., S. I. Chavin, et al. (1985). "Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes." J Clin Invest **76**(3): 1102-1106.

Sporn, L. A., V. J. Marder, et al. (1986). "Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers." Cell **46**(2): 185-190.

Stites, D. P., E. J. Hershgold, et al. (1971). "Factor 8 detection by hemagglutination inhibition: hemophilia A and von Willebrand's disease." Science **171**(3967): 196-197.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci USA **76**:4350-4354.

Velloso-Rodrigues, C. (2012). Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, HEMOMINAS, Brasil.

Verweij, C. L., C. J. de Vries, et al. (1985). "Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene." Nucleic Acids Res **13**(13): 4699-4717.

Verweij, C. L., P. J. Diergaarde, et al. (1986). "Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit." EMBO J **5**(8): 1839-1847.

Wagner, D. D. (1990). "Cell biology of von Willebrand factor." Annu Rev Cell Biol **6**: 217-246.

Weiss, H. J., D. Meyer, et al. (1982). "Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers." N Engl J Med **306**(6): 326-333.

Werner, E. J., E. H. Broxson, et al. (1993). "Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study." J Pediatr **123**(6): 893-898.

Zimmerman, T. S., J. A. Dent, et al. (1986). "Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE)." J Clin Invest **77**(3): 947-951.

Zimmerman, T. S., O. D. Ratnoff, et al. (1971). "Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor." J Clin Invest **50**(1): 244-254.

9 APÊNDICE

9.1 Análise densitométrica das bandas de 250 kDa apresentadas no SDS-PAGE 5%

Utilizou-se o *software Quantity One (Bio-Rad®)* versão 4.6.9 para a realização das análises densitométricas das bandas de 250 kDa obtidas no SDS-PAGE 5% em que se aplicou 20 µL de amostra de plasma após precipitação por etanol 20, 30 e 40% na presença e ausência de citrato de sódio 0,6M pH 5,8. Comparou-se a densidade de cada banda utilizando como parâmetro o *background* do gel analisado. A figura 19 mostra os resultados da análise densitométrica.

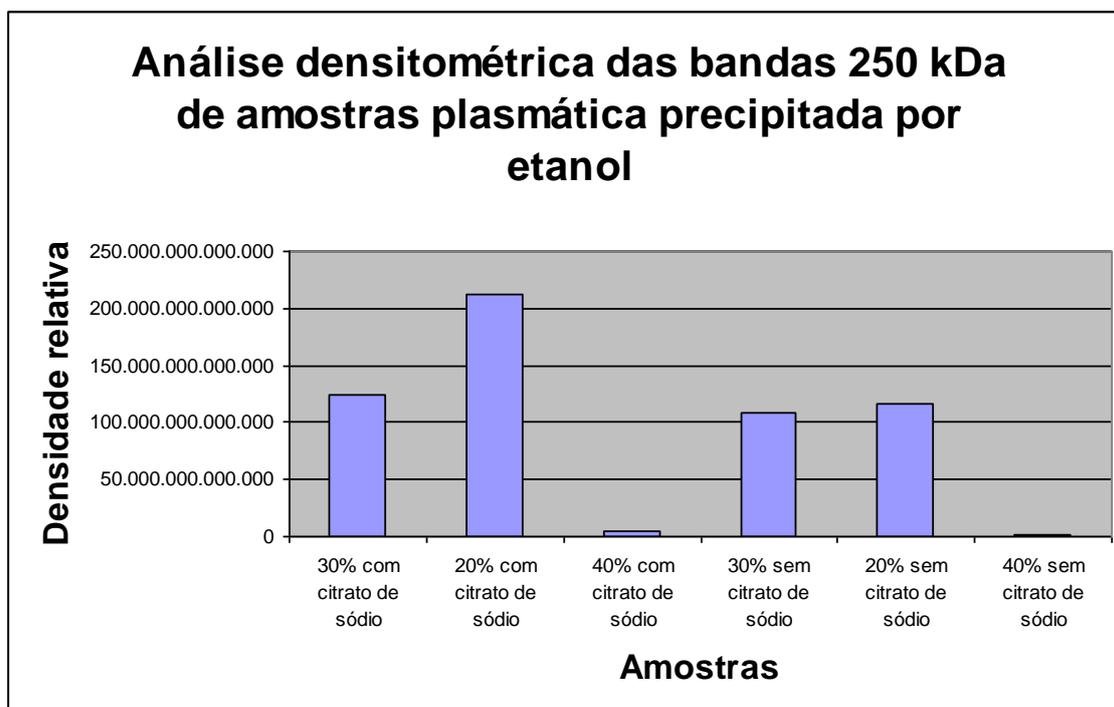
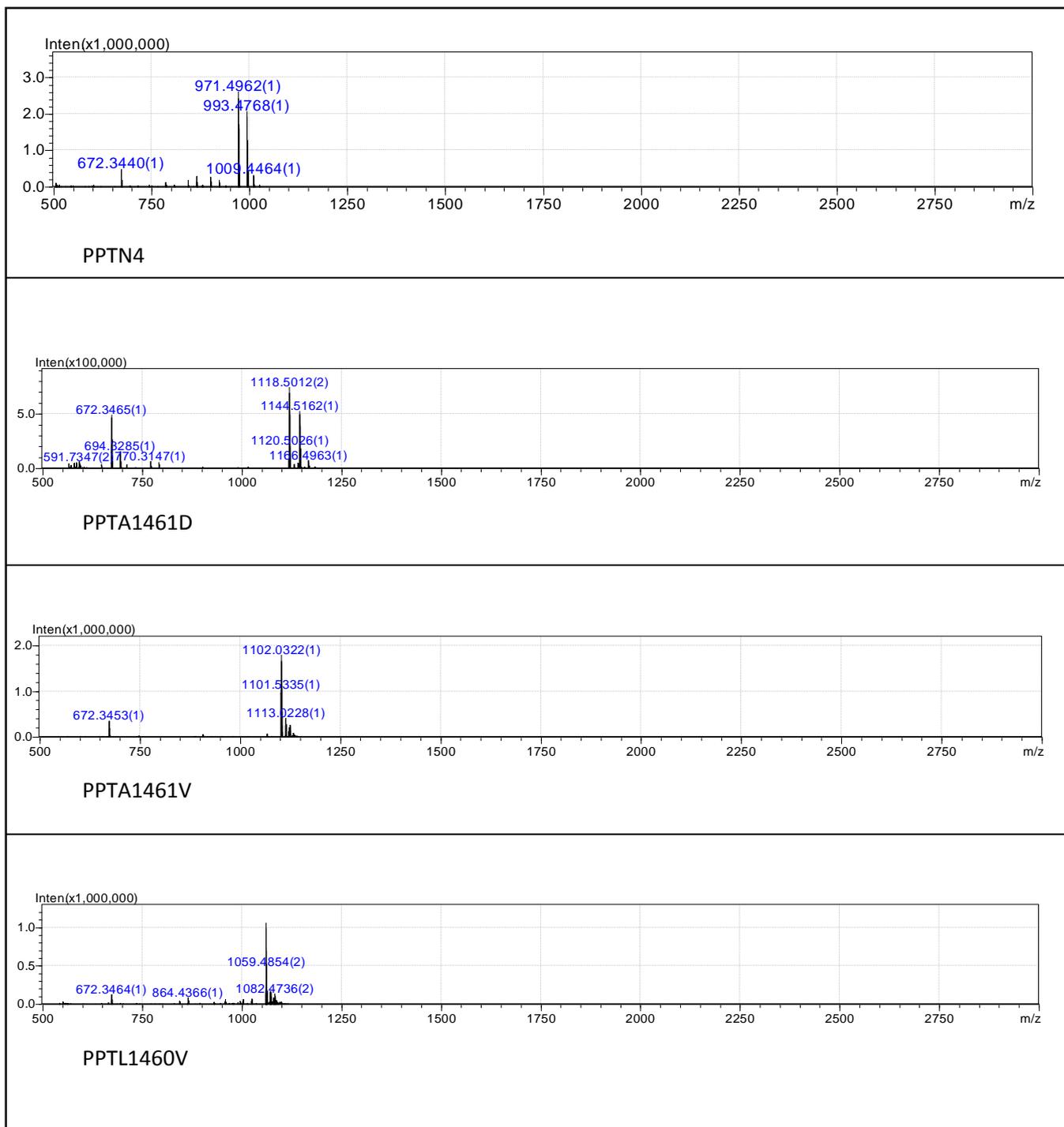


Figura 19. Análise densitométrica das bandas de 250 kDa de amostras plasmáticas precipitadas por etanol. Plasma foi precipitado com 20, 30 e 40% de etanol na presença e ausência de citrato de sódio 0,6M pH 5,8 e submetido a SDS-PAGE 5%. As bandas coradas na altura de 250 kDa foram submetidas à análise densitométrica pelo *software Quantity One*, as densidades relativas de cada uma foi obtida comparando-se com o background.

9.2 Caracterização de peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF *electrospray*

Os peptídeos sintéticos purificados em HPLC foram analisados através do espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight*). A figura 20 apresenta espectros de massas obtidos na identificação de peptídeos sintetizados.



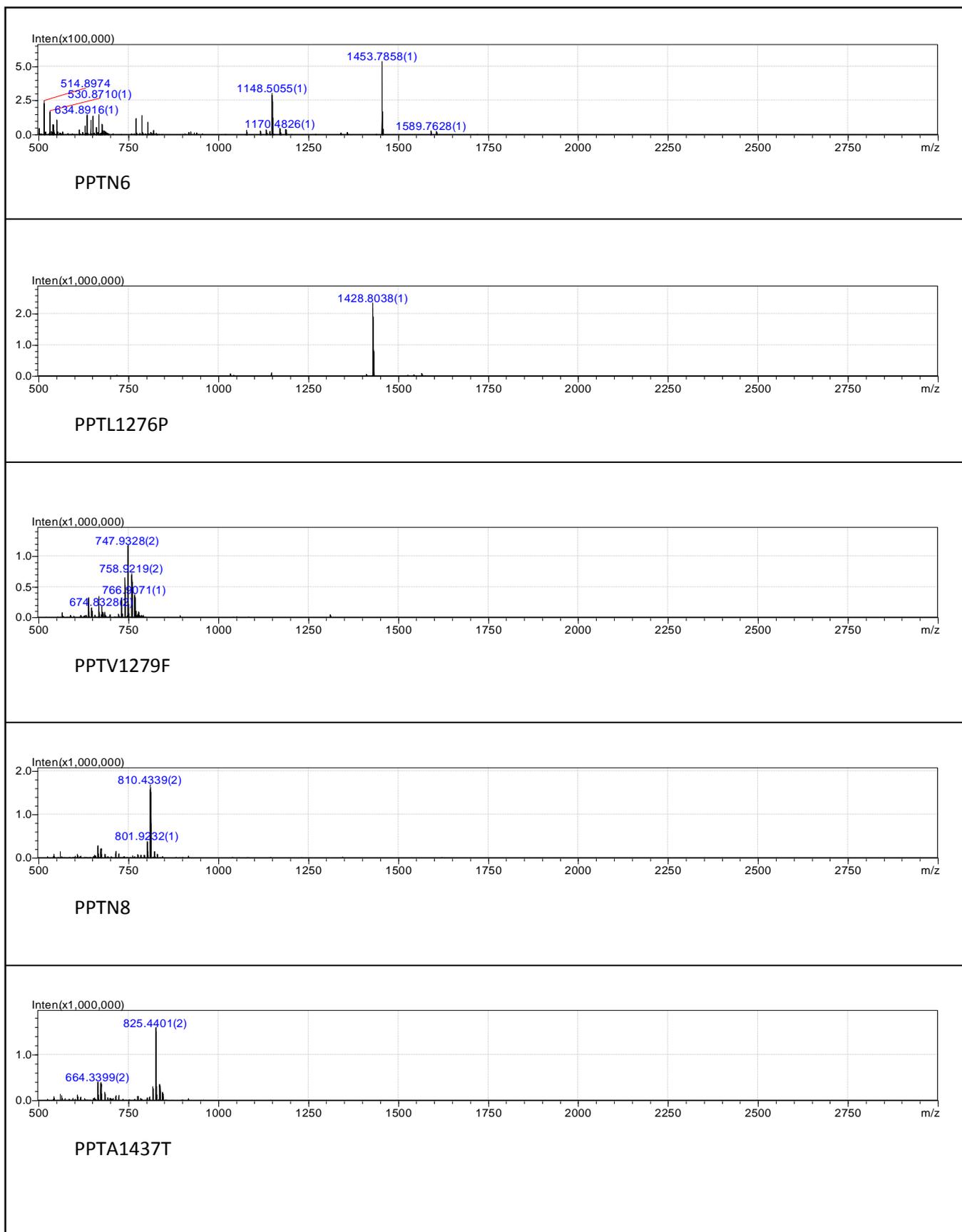


Figura 20. Identificação das massas dos peptídeos por espectrometria de massa em LCMS-ITTOF do tipo *electrospray*