Camila Martos Thomazini

Envolvimento do fator de von Willebrand na plaquetopenia do envenenamento experimental pela serpente *Bothrops jararaca*: participação da botrocetina e metaloproteinases do veneno

**São Paulo
2018**

Camila Martos Thomazini

Envolvimento do fator de von Willebrand na plaquetopenia do envenenamento experimental pela serpente *Bothrops jararaca*: participação da botrocetina e metaloproteinases do veneno

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Dr. Marcelo Larami Santoro

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Thomazini, Camila Martos

Envolvimento do fator de von Willebrand na plaquetopenia do envenenamento experimental pela serpente *Bothrops jararaca* : participação da botrocetina e metaloproteinases do veneno / Camila Martos Thomazini -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Marcelo Larami Santoro.

Descritores: 1.Bothrops 2.Mordeduras de serpentes 3.Trombocitopenia
4.Fator de von Willebrand 5.Proteína ADAMTS13 6.Fator VIII 7.Botrocetina
8.Metaloproteases 9.Hemorragia 10.Coagulação intravascular disseminada

USP/FM/DBD-095/18

Agradecimentos

Primeiramente, devo agradecer ao meu orientador Dr. Marcelo Larami Santoro que me forneceu a oportunidade de realizar esse trabalho. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento e o seu exemplo profissional é inspirador. Agradeço, em especial, a todos os animais que participaram desse estudo.

Agradeço a oportunidade de poder crescer e me tornar não só uma cientista melhor, mas um ser humano melhor. Pois o aprendizado que levo comigo está para além do profissional, pois foi um aprendizado de formação humana.

Agradeço também a todas as pessoas que de alguma maneira me auxiliaram na construção desse trabalho, pois sozinha, nada disso seria possível. À Dra. Solange Serrano e sua equipe por nos fornecerem a botrocetina e fazerem toda a análise de espectrometria de massa. E ao Dr. Ivo Lebrun e ao Admilson da Cunha por nos auxiliarem na purificação da mesma. À Rosângela Soares e Tânia da Rocha por toda a contribuição para que nós desenvolvêssemos a técnica de separação de multímeros de von Willebrand. À Dra. Kátia Bárbaro por sua didática e ensinamento das padronizações dos ELISAs. À Dra. Vânia Mattaraia, à Cynthia de Albuquerque e ao Allan Calarga que foram fundamentais para a criação dos camundongos nocautes.

Agradeço a todos aqueles que trabalharam no laboratório de Fisiopatologia e que eu tive a oportunidade de conviver. Um trabalho como esse não é feito por uma pessoa só, mas com diversos contribuintes que muitas vezes, anonimamente, fizeram seu papel para que tudo estivesse funcionando e que o trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço a todos os queridos companheiros de vida, familiares de sangue ou de coração, que me deram suporte para além do laboratório e que sem os quais a minha caminhada no doutoramento seria muito mais árdua.

Por fim, agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2013/20239-8 e 2013/25177-0) e CAPES, por terem possibilitado os fomentos para a realização deste trabalho.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

E eu diria que sozinhos, na Ciência, não chegamos nem mais rápido.

Lista de abreviaturas

vWF	Fator de von Willebrand
BjV	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>
SVMP	Metaloproteinases do veneno de serpentes
ADAMTS13	ADAM metalopeptidase com motivo trombospondina tipo, 1 membro 13
DMC	Dose mínima coagulante
FVIII	Fator VIII
vWD	Doença de von Willebrand
VPM	Volume plaquetário médio
vWF:Ag	Quantificação antigênica do fator de von Willebrand plasmático
vWF:CB	Atividade do fator de von Willebrand de ligação ao colágeno
vWF:RCo	Atividade de cofator da ristocetina
vWFpp	Propeptídeo do fator de von Willebrand
PTLC	Proteínas tipo-lectina do tipo-C
GPIbα	Receptor plaquetário – glicoproteína Ib alfa
GPIIb/IIIa	Receptor plaquetário – glicoproteína IIb/IIIa
CID	Coagulação intravascular disseminada
PDFs	Produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio
RIPA	Agregação plaquetária induzida por ristocetina
vWF:FVIII B	Teste de ligação do fator de von Willebrand ao fator VIII
FVIII:C	Fator VIII coagulante

TTP	Púrpura trombocitopênica trombótica
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
BSA	Albumina sérica bovina
PPN	<i>Pool</i> de plasmas normais

Lista de Figuras

Figura 1. Representação simplificada da subunidade de vWF	21
Figura 2. Painel diagnóstico para diferenciação de sangramentos mucocutâneos com suspeita de vWD.....	23
Figura 3. Representação esquemática da organização dos domínios da ADAMTS13 e seus sítios de ação	27
Figura 4. Representação dos sítios de atuação das toxinas do veneno de B. jararaca com a subunidade de vWF	28
Figura 5. Eletroforese para verificação dos genótipos dos camundongos nocautes .	33
Figura 6. Grupos experimentais do modelo 1	36
Figura 7. Venenemia em ratos em 3, 6 e 24 horas após o tratamento com BjV.....	53
Figura 8. Fibrinogenemia em ratos durante envenenamento experimental com BjV.	55
Figura 9. Contagem de plaquetas totais em ratos durante envenenamento experimental com BjV.....	57
Figura 10. Volume plaquetário médio (VPM) em ratos durante envenenamento experimental com BjV.....	58
Figura 11. Dosagem de vWF:Ag em ratos durante envenenamento experimental com BjV.....	60
Figura 12. Dosagem de vWF:CB em ratos durante envenenamento experimental com BjV.....	62
Figura 13. Razão de vWF:CB e vWF:Ag calculados dos ratos durante envenenamento experimental com BjV	64
Figura 14. Imagem de distribuição de multímeros de vWF e análises densitométricas de diferentes espécies (humano, rato e camundongo).....	66
Figura 15. Distribuição de multímeros de vWF dos ratos durante envenenamento experimental com BjV	68
Figura 16. Quantidade de ADAMTS13 mensurada de forma indireta por sua atividade em ratos durante envenenamento experimental com BjV	69

Figura 17. Correlação de vWF:Ag versus ADAMTS13 separados pelos diferentes grupos de tratamentos de BjV em ratos	70
Figura 18. Dosagem de FVIII em ratos durante envenenamento experimental com BjV	71
Figura 19. Razão FVIII/vWF de ratos durante envenenamento experimental com BjV	72
Figura 20. Correlação de FVIII versus vWF separados pelos diferentes grupos de tratamentos de BjV em ratos.	74
Figura 21. Células sanguíneas de ratos durante envenenamento experimental com BjV	76
Figura 22. Venenemia em camundongos durante envenenamento experimental com BjV	77
Figura 23. Fibrinogenemia em camundongos durante envenenamento experimental com BjV	79
Figura 24. Dosagem de vWF:Ag em camundongos durante envenenamento experimental com BjV	80
Figura 25. Contagem total de plaquetas em camundongos durante envenenamento experimental por BjV.	81
Figura 26. Células sanguíneas de camundongos durante envenenamento experimental com BjV	83
Figura 27. Perfil cromatográfico de eluição da solução de botrocetina em HPLC de fase-reversa (C8).....	93
Figura 28. Eletroforese SDS-PAGE a 12% para checagem da pureza da botrocetina após HPLC	94
Figura 29. Identificação da botrocetina por espectrometria de massas	95
Figura 30. Análise de western blotting para averiguar a especificidade antigênica do anticorpo anti-botrocetina, em comparação ao anticorpo anti-aspercetina.....	99
Figura 31. Agregação em plaquetas induzida pela botrocetina	100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Padrão laboratorial dos diferentes tipos de vWD	25
Tabela 2. Detalhes de primers para genotipagem de camundongos nocautes	32
Tabela 3. Resultado da identificação de proteínas por espectrometria de massas da amostra de botrocetina utilizada nos experimentos.....	96
Tabela 4. Dose Mínima Coagulante (DMC) de incubações do veneno de <i>B. jararaca</i>	101

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Animais e Amostras Humanas de Sangue	30
2.2 Procedimentos Específicos.....	30
2.2.1 Criação da colônia de camundongos nocautes	30
2.2.2 Genotipagem dos camundongos nocautes para o gene <i>Vwf</i>	31
2.2.3 Verificação de vWF:Ag plasmático nos camundongos nocautes.....	34
2.3 Delineamento experimental	34
2.3.1 MODELO 1 - RATOS.....	34
2.3.2 MODELO 2 – CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	37
2.4 Tratamento e coleta das amostras de ratos e camundongos	37
2.5 Coleta de <i>pool</i> de amostras de animais saudáveis.....	39
3 ANÁLISES	41
3.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante em ratos e camundongos.....	41
3.2 Dosagem de fibrinogênio circulante em ratos e camundongos	42
3.3 Hemograma em ratos e camundongos.....	43
3.4 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag) em ratos e camundongos	43
3.5 Atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno (vWF:CB) em ratos	45
3.6 Multímeros de fator de von Willebrand em ratos	46
3.7 Atividade da enzima de clivagem do vWF (ADAMTS13) em ratos	50
3.8 Dosagem do fator VIII plasmático em ratos	51
3.9 Análise estatística dos dados	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Modelo 1 – Ratos Wistar.....	52
4.1.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante	52

4.1.2 Dosagem de fibrinogênio circulante.....	53
4.1.3 Contagem de plaquetas.....	55
4.1.4 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag).....	58
4.1.5 Atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno (vWF:CB).....	60
4.1.6 Razão CB/Ag	62
4.1.7 Multímeros de fator de von Willebrand	64
4.1.8 Atividade da enzima de clivagem do vWF (ADAMTS13).....	68
4.1.9 Correlação vWF:Ag e ADAMTS13.....	69
4.1.10 Dosagem do fator VIII plasmático	70
4.1.11 Razão FVIII/vWF em ratos.....	72
4.1.12 Correlação FVIII e vWF:Ag	73
4.1.13 Hemograma com série vermelha e leucócitos	75
4.2 Modelo 2 - Camundongos C57BL/6J e nocautes Vwf.....	76
4.2.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante	76
4.2.2 Dosagem de fibrinogênio circulante.....	78
4.2.3 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag).....	79
4.2.4 Contagem de plaquetas.....	80
4.2.5 Hemograma com série vermelha e leucócitos	82
5 DISCUSSÃO.....	84
6 CONCLUSÕES.....	89
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	90
ANEXOS.....	92
ANEXO A.....	92
Purificação da botrocetina de 2 cadeias do veneno de <i>B. jararaca</i> e obtenção de anticorpos policlonais anti-botrocetina	92
Purificação do anticorpo anti-botrocetina.....	97
ANEXO B.....	103
ANEXO C – Artigo submetido à publicação.....	104
8 REFERÊNCIAS	131

Resumo

Pacientes envenenados pela serpente *Bothrops jararaca* manifestam uma tendência hemorrágica em que a plaquetopenia é um achado consistente. Manifestações clínicas sistêmicas, como sangramento de mucosas e microangiopatia trombótica em alguns pacientes, apresentam similaridades com sinais clínicos de doença de von Willebrand e púrpura trombocitopênica trombótica. Algumas proteínas do veneno - como a botrocetina (uma proteína relacionada às lectinas do tipo C) e as metaloproteinases do veneno (SVMP) - interferem direta ou indiretamente na interação entre plaquetas e o fator de von Willebrand (vWF) *in vitro* e *in vivo*. E dessa forma, podem contribuir para os sangramentos induzidos pelo envenenamento devido à importância que o vWF tem para a hemostasia primária. Pensando em compreender a participação do vWF do organismo e a botrocetina e as SVMP do veneno bruto de *B. jararaca* (BjV) na plaquetopenia induzida pelo envenenamento, utilizamos dois modelos experimentais: ratos Wistar heterogênicos e camundongos nocautes do gene *Vwf* (*Vwf*^{-/-}). No modelo em ratos, o BjV foi pré-incubado com salina (controle positivo), um inibidor de metaloproteinases (Na₂-EDTA), anticorpos policlonais anti-botrocetina, glicerol (veículo dos anticorpos), ou a combinação do Na₂-EDTA e anticorpos anti-botrocetina; o grupo controle negativo foi injetado somente com salina. Após a administração subcutânea (s.c.) dos venenos tratados (1,6 mg/kg), amostras de sangue foram coletadas após 3, 6 ou 24 h, e analisaram-se a contagem de plaquetas, quantificação antigênica (vWF:Ag) e da atividade de ligação do vWF ao colágeno (vWF:CB), a atividade de ADAMTS13, a distribuição multimérica de vWF, e a atividade coagulante de fator VIII (FVIII). Para explorar a participação do vWF na plaquetopenia, camundongos nocautes de vWF (*Vwf*^{-/-}) e camundongos controles (C57BL/6) foram injetados s.c. com BjV incubado com salina (grupo positivo do envenenamento) ou apenas salina (grupo controle negativo). As injeções dos tratamentos, bem como os períodos analisados foram idênticos aos dos ratos. Em nossos resultados, todos os ratos injetados com algum tratamento de BjV, inclusive nos animais que receberam veneno pré-tratado com anticorpo anti-botrocetina e/ou Na₂-EDTA, apresentaram plaquetopenia, com maior intensidade em 6 h. Na avaliação do vWF foi encontrada uma grande variação

individual nos grupos de tratamentos, porém ainda assim houve uma tendência a redução nos níveis de vWF:Ag em 3 e 6 h nos ratos que receberam BjV sem inibidores. A administração de BjV tratado somente com anticorpo anti-botrocetina promoveu uma maior redução nos níveis de vWF:Ag em 3 h, com retorno aos níveis semelhantes aos de controle negativo em 6 h e 24 h. A inibição sozinha das metaloproteinases não promoveu efeito importante, porém em 6 h, potencializou a ação do anticorpo anti-botrocetina na inibição conjunta do decréscimo de vWF:Ag e vWF:CB. A análise dos multímeros do vWF mostrou perfis bastante variáveis individualmente, porém os multímeros de alto peso molecular e intermediário tenderam a diminuir e os de baixo peso a aumentar nos animais que receberam algum tratamento com BjV, especialmente em 24 h. Na dosagem de FVIII, houve redução em 3 e 6 h em todos os ratos que receberam qualquer tratamento de BjV, sem grandes variações entre esses grupos. A atividade de ADAMTS13 apresentou uma redução dos valores em 3 e 6 h, que foi revertida pela inibição das metaloproteinases do veneno. Já nos camundongos, a plaquetopenia esteve presente em todos os animais nocautes e controles que receberam BjV, mostrando ser independente da presença de vWF. Nos camundongos controles (C57BL/6), não houve alterações evidentes em vWF:Ag durante o envenenamento, porém em 3 h houve uma tendência a sua diminuição. Em conjunto, nossos resultados mostram que a presença da botrocetina no veneno bruto não afeta a plaquetopenia desencadeada pelo envenenamento, porém influencia o vWF plasmático quantitativa e funcionalmente. As metaloproteinases do veneno têm forte efeito sobre a enzima fisiológica reguladora da atividade biológica do vWF, a ADAMTS13, que indiretamente pode afetar os níveis de vWF. Ademais, a intensidade da plaquetopenia durante o envenenamento de *B. jararaca* não depende da presença de vWF, e tendo em conta o caráter multifatorial do consumo plaquetário durante o envenenamento, sugerimos que outros mecanismos possam ser responsáveis pela plaquetopenia induzida pelo BjV. Com isso, concluímos que o consumo de vWF no envenenamento por *B. jararaca* é um fator contribuinte, porém não determinante, para as alterações da contagem plaquetária.

Descritores: Bothrops; mordeduras de serpentes; trombocitopenia; fator de von Willebrand; proteína ADAMTS13; fator VIII; botrocetina; metaloproteases; hemorragia; coagulação intravascular disseminada

Abstract

Patients bitten by *Bothrops* snakes manifest a bleeding tendency in which thrombocytopenia is consistently observed. Systemic clinical manifestations, such as mucous bleeding and thrombotic microangiopathy in some patients, share similarities with symptoms of von Willebrand disease and thrombotic thrombocytopenic purpura. Some venom proteins – e.g. botrocetin (a C-type lectin-related protein) and snake venom metalloproteinases (SVMP) – disturbs, direct or indirectly, the interaction between platelets and von Willebrand factor (vWF) *in vitro* and *in vivo*, and may contribute thereby to snakebite-induced bleedings, once vWF is required for primary hemostasis. To better understand the relation between plasma vWF, and botrocetin and SVMPs from *B. jararaca* crude venom (BjV) in the thrombocytopenia induced by envenomation, we used two experimental models: Wistar heterogenic rats and vWF knockout mice (*Vwf*^{-/-}). In the rat model, BjV was pre-incubated with saline (positive control), metalloproteinase inhibitor (Na₂-EDTA), polyclonal anti-botrocetin antibodies, glycerol (antibody vehicle), or the combination of Na₂-EDTA and anti-botrocetin antibodies; the negative control group was injected with saline only. After subcutaneous injection (s.c.) of treated venom (1.6 mg/kg), blood samples were collected after 3, 6 or 24 h, and platelet count, vWF antigen (vWF:Ag) and collagen-binding activity (vWF:CB), ADAMTS13 activity, vWF multimer distribution, and factor VIII (FVIII) coagulant activity were analyzed. To investigate the participation of vWF in thrombocytopenia, vWF knockout mice (*Vwf*^{-/-}) and control mice (C57BL/6) were injected s.c. with saline only (negative control group) or BjV pre-incubated with saline (positive control group). The same protocols used for rats were accomplished in mice. Our results showed that all rats injected with any BjV treatment, including animals which received anti-botrocetin antibodies and/or Na₂-EDTA-treated BjV, showed thrombocytopenia, with the nadir at 6h. vWF analysis exhibited a large individual variation among treatment groups, but there was a tendency to reduce vWF:Ag levels at 3 and 6 h in rats that received BjV pre-incubated with saline (without any inhibitor). Administration of BjV pre-incubated only with anti-botrocetin antibodies evoked a large reduction in vWF:Ag levels at 3 h, which returned to levels similar to those of the negative control group at 6 and 24 h. SVMP inhibition alone did not induce an

important effect, but potentialized the activity of anti-botrocetin antibodies to inhibit the fall in both vWF:Ag and vWF:CB levels at 6 h. VWF multimer analysis had a large individual profile variation, although animals that received any BjV treatment tended to decrease the high and intermediate molecular weight multimers and to increase the low ones, especially at 24 h. FVIII showed diminished levels in all rats that received any BjV treatment at 3 and 6 h, without important variations among groups. Decreased levels of ADAMTS13 activity were noticed at 3 and 6 h, which were reverted by SVMP inhibition. In mice, thrombocytopenia was present in all control and knockout mice that received BjV, demonstrating independence of vWF presence. In control mice (C57BL/6), there were no relevant alterations in vWF:Ag during envenomation, although at 3 h there was a tendency to decrease it. Al together, our results showed that botrocetin present in crude venom does not affect thrombocytopenia induced by envenomation, but it changes the levels and function of plasma vWF. SVMP had a marked effect in ADAMTS13, the physiological enzyme that regulates vWF biological activity, which may affect vWF levels indirectly. In addition, thrombocytopenia during *B. jararaca* envenomation is independent of vWF, and considering the multifactorial features of platelet consumption during envenomation, we suggest that other mechanisms might account for BjV-induced thrombocytopenia. Therefore, we conclude that vWF consumption during *B. jararaca* envenomation is an ancillary mechanism, but not the main one to decrease platelet counts.

Descriptors: Bothrops; snake bites; thrombocytopenia; von Willebrand factor; ADAMTS13 protein; factor VIII; botrocetin; metalloproteases; hemorrhage, disseminated intravascular coagulation

1 INTRODUÇÃO

Envenenamento e composição do veneno

O envenenamento por serpentes apresenta um forte impacto na população, pois ainda que não leve o afetado ao óbito provoca abrangente morbidade com sequelas que podem ser definitivas^{1,2}. Dentre as Doenças Tropicais Negligenciadas categorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o envenenamento por serpentes é considerado de alta incidência e gravidade, especialmente em países tropicais e em desenvolvimento³. No Brasil, o acidente por animais peçonhentos está incluído na Lista de Notificação Compulsória (LNC), sendo um dos agravos mais notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Dentre as famílias de serpentes peçonhentas a Viperidae é a de maior importância na saúde pública, constituindo a causa da maioria e também dos mais graves acidentes no continente americano. O gênero *Bothrops* pertence a esta família e representa o principal agente de acidentes ofídicos notificados no Brasil. Com ampla distribuição no território nacional, habita principalmente as zonas rurais e periferias de grandes cidades, com predileção para ambientes úmidos e de proliferação de roedores. No estado de São Paulo, a espécie *Bothrops jararaca* é a de maior importância epidemiológica⁴.

Os venenos de serpente tem a principal função biológica de atuar no auxílio da predação em busca de alimentos, bem como também em sua defesa. E mesmo nos casos de inoculação acidental em animais ou humanos, a variedade da composição do veneno atua em distintas atividades no organismo afetado. Todos os mecanismos de ação das proteínas do veneno ocorrem simultaneamente após a inoculação das toxinas, de modo que apresentam uma interligação entre si em que cada constituinte do veneno pode atuar em mais de uma estratégia de ataque ao organismo⁵. Além do mais, algumas moléculas do veneno podem atuar em combinação com outras e assim potencializar seus efeitos biológicos, bem como a amplitude do envenenamento.

Os venenos de serpentes são complexos peptídicos e proteicos únicos que atuam na atividade de enzimas ou receptores cruciais do organismo afetado⁶. As principais toxinas presentes no veneno de *B. jararaca* são pertencentes aos grupos das metaloproteinases, seguidas das serinaproteases, das lectinas do tipo-C, dos peptídeos potenciadores de bradicinina e das fosfolipases A2. Outras toxinas também estão presentes no veneno em menor quantidade e com atividade em diferentes sistemas do organismo⁷.

Dentre as toxinas do veneno, as metaloproteinases (SVMP) estão em maior abundância representando 53,1% das toxinas presentes no veneno de *B. jararaca*⁷. Essas enzimas participam de forma significativa na patogênese do envenenamento, sendo consideradas como fatores primários responsáveis pela hemorragia local e sistêmica. As metaloproteinases são endopeptidases dependentes de zinco e podem ser classificadas de P-I a P-III de acordo com a organização de seus domínios catalíticos: P-I é a classe de enzimas mais simples contendo apenas o domínio metaloproteinase, P-II apresenta o domínio metaloproteinase seguida pelo domínio disintegrina, e a classe P-III apresenta em sua composição os domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina e também o domínio rico em cisteína. A classe P-III das metaloproteinases pode também ser dividida em subclasses devido às distintas modificações pós-traducionais^{8,9}. Devido sua ampla composição, diversas atividades biológicas são associadas às metaloproteinases como ativação da protrombina e fator X, atividade fibrino/fibrinogenolítica, inibição da agregação plaquetária e atividade hemorrágica causada pelas hemorraginas¹⁰.

A segunda classe de toxinas mais abundantes no veneno são as serinaproteases. Elas apresentam diferentes atividades dependendo sua sequência e estrutura⁷, no entanto, apresentam em comum um mecanismo catalítico de um resíduo serina altamente reativo. As serinaproteases afetam principalmente o equilíbrio hemostático, com atuação em diversos componentes desse sistema como na cascata de coagulação, nos sistemas fibrinolíticos e calicreína-quinina, bem como também nas plaquetas¹¹.

Outras toxinas de relevância no veneno são as lectinas do tipo-C, que são proteínas não enzimáticas que se ligam a mono- ou oligossacarídeos e são dependentes de cálcio. Essas proteínas são divididas em duas superfamílias, as lectinas tipo-C verdadeiras que possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos e assim se ligam a açúcares; e as proteínas tipo-lectina do tipo-C (PTLC) que apresentam domínios relacionados ao reconhecimento de carboidratos, mas que se ligam a estruturas peptídicas de outras moléculas sem a presença de cálcio. As PTLC apresentam capacidade de interagir com vários receptores simultaneamente devido à sua estrutura primária altamente homóloga, e assim modular as funções plaquetárias causando efeitos inibitórios bem como de ativação, além de também atuar na cascata de coagulação promovendo uma ação anticoagulante¹⁰.

Com um rico complexo proteico, o envenenamento por essas serpentes gera manifestações hemorrágicas e sistêmicas, que em muitos casos podem resultar em complicações clínicas como a falência de órgãos ou até o óbito. Os indivíduos acidentados frequentemente apresentam efeitos no local da picada, como edema, equimoses, bolhas e necrose. E como as toxinas do veneno também atuam de forma sistêmica, podem levar ao estado de incoagulabilidade sanguínea e as apresentações clínicas de gengivorragia, epistaxe e hematúria como as mais comumente observadas de sangramentos espontâneos^{12,13}.

O sangramento sistêmico frequentemente ocorre em pacientes que apresentam uma coagulopatia. No entanto o risco de sangramento também existe, em menor índice, em pacientes que não apresentam esse estado sanguíneo¹⁴. A afibrinogenemia e plaquetopenia associadas contribuem para o aumento da incidência de sangramento¹⁵. No entanto, o desenvolvimento do sangramento sistêmico em envenenamentos por *B. jararaca* é multifatorial e decorre de diversas alterações associadas, como a redução e disfunção das plaquetas circulantes, dos distúrbios promovidos no processo de coagulação e fibrinólise, e também com as lesões causadas nas células endoteliais dos vasos.

A plaquetopenia é consistentemente encontrada nos envenenamentos por Viperidae e a magnitude de sua intensidade depende da gravidade do acidente¹³. A plaquetopenia também é associada a complicações clínicas, pois como participa em diferentes estágios da hemostasia sanguínea, a sua redução contribui ao surgimento de sangramento sistêmico^{15,16}, que pode ser potencializado quando associada ao tempo de coagulação prolongado. No entanto, ainda que a plaquetopenia esteja presente, concomitantemente ou não ao sangramento sistêmico, os números de plaquetas circulantes são recuperadas após a administração de antiveneno¹³, como também há o aumento de plaquetas reticuladas dentro das primeiras 48 horas do envenenamento¹⁵.

Os distúrbios hemostáticos causados pelas toxinas das serpentes *Bothrops* têm mecanismos fisiopatológicos diferentes e complexos, podendo inclusive apresentar características antagônicas. A coagulopatia desenvolvida assemelha-se ao quadro de coagulopatia de consumo¹⁷, com consumo de diferentes fatores da coagulação. As proteínas do veneno de *B. jararaca* atuam por mecanismos que podem inibir ou ativar a cascata de coagulação com o envolvimento de diversos fatores, como exemplo os fatores V, IX e X, além do fibrinogênio, da protrombina e da trombina¹². Além de também demonstrarem capacidade de modular a atividade plaquetária de maneira direta ou por meio da utilização de cofatores¹⁸.

A atuação gradativa das toxinas coagulantes do veneno promove o consumo especialmente do fibrinogênio. Outros fatores plasmáticos como o II, V e VIII também são consumidos pela ação direta do veneno ou pela geração de trombina intravascular. No entanto, níveis elevados de antitrombina, um anticoagulante natural da trombina, são encontrados no sangue. Grande quantidade de produtos da degradação da fibrina/fibrinogênio (PDFs) aparece na circulação, e decorrem da intensa geração de fibrina intravascular rapidamente transformada pelo sistema fibrinolítico. A normalização dos níveis séricos dos fatores de coagulação tende a se regularizar após o tratamento soroterápico específico¹⁹. Para os fatores V, VIII e II o retorno aos níveis hemostáticos normais ocorre geralmente após 24 horas da

neutralização do veneno²⁰, podendo chegar a 36 horas para a recuperação completa da hipofibrinogenemia²¹.

Níveis normais ou aumentados de vWF circulantes também podem ser encontrados nos envenenamentos por *B. jararaca*, com redução dos grandes multímeros de vWF e consequente aumento dos pequenos fragmentos¹⁴. Associadamente sinais clínicos semelhantes aos distúrbios de hemostasia primária ocorrem comumente nos envenenamentos, e estão relacionados a hemorragias mucocutâneas como a presença de epistaxe, equimoses, sangramento gengival e gastrointestinal¹³. Essas manifestações se assemelham ao quadro clínico observado em distúrbios relacionados ao vWF, quantitativas e/ou qualitativamente, como a Doença de von Willebrand (vWD) que pode causar diátese hemorrágica espontânea.

Fator de von Willebrand e distúrbios relacionados

O vWF tem participação essencial na hemostasia primária na ligação de plaquetas e também de plaquetas ao subendotélio, no auxílio da formação do tampão plaquetário. Atua principalmente no processo hemostático sob condições de alta taxa de cisalhamento proporcionando a adesão plaquetária por ligação ao colágeno exposto do tecido subendotelial após injúria vascular, e também contribui com a agregação plaquetária²². O vWF é uma grande glicoproteína multimérica (500 a 20.000 kDa) que apresenta subunidades ricas em cisteínas, distribuídas heterogeneamente e que resultam em muitas ligações dissulfeto²³, fundamentais para os seus diferentes domínios e funções características²⁴. Cada subunidade (250 kDa aproximadamente) apresenta múltiplos domínios com sítios de ligação para receptores GPIb e GPIIb/IIIa de plaquetas, bem como para colágeno, e também como carreador e chaperona do fator VIII circulante (Figura 1)^{22,25}. Em uma única molécula de vWF há múltiplas repetições dessas subunidades que também estão unidas por ligações dissulfeto por um processo de multimerização²⁶.

Figura 1. Representação simplificada da subunidade de vWF. Nessa subunidade estão representados os diferentes domínios com a localização para os ligantes FVIII, receptores de plaquetas (GPIIb α e GPIIb/IIIa) e colágeno; como também o sítio de proteólise para a ADAMTS13. Figura adaptada^{22,24}.

O vWF é sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos e armazenados em corpúsculos, Weibel-Palade e alfa grânulos respectivamente, em multímeros de altíssimo peso molecular. Durante seu processamento intracelular, a furina remove a porção propeptídica (vWFpp) do monômero de vWF, para que ele possa ser posteriormente processado. O vWFpp se mantém associado à molécula madura de vWF estocada e no momento da secreção, o vWF e o vWFpp são liberados simultaneamente para a circulação. Propeptídeo e vWF maduro apresentam meia vida distintas na circulação (~2 e 12 h respectivamente), o que permite que o propeptídeo seja utilizado como marcador de liberação de vWF^{22,27}. Uma vez que os multímeros de altíssimo peso molecular estocados são liberados para a circulação, sob alta taxa de cisalhamento ocorre o desdobramento da proteína e consequente clivagem pela enzima ADAMTS13, uma metaloproteinase com domínio tipo-disintegrina que atua na modulação do vWF. A degradação gradual dos multímeros de alto peso molecular do vWF promove uma distribuição heterogênea em tamanho na circulação, variando de 500 kDa para os dímeros até milhões de Da para os de alto peso molecular. A clivagem do vWF na circulação é fisiologicamente importante pois a sua atividade hemostática é relacionada ao tamanho de seus multímeros^{28,29}, sendo que os grandes multímeros apresentam maior capacidade

agregante e conseqüentemente maior potencial de ativação de plaquetas do que os pequenos fragmentos de vWF.

Devido à grande variedade de distúrbios que podem acometer o vWF, a verificação de alterações relacionadas ao vWF necessita de um amplo painel diagnóstico e que consiste em avaliar além de seus níveis quantitativos, o padrão de distribuição de seus diferentes tamanhos presentes na circulação, como também as suas diferentes funções de acordo com sua capacidade de ligação. Desse modo, o painel completo de testes laboratoriais que direciona para diferenciar entre a variedade fenotípica dos distúrbios de vWF (Figura 2).

Dentro da avaliação laboratorial, há um painel mais comumente utilizado na rotina diagnóstica para a triagem de casos de suspeita de distúrbios de vWF. São utilizadas avaliações quantitativas e de função do vWF, que direcionam para uma melhor compreensão das alterações acometidas no vWF do paciente. As avaliações quantitativas são realizadas por imunoensaio (ELISA) com mensuração antigênica do vWF (vWF:Ag), de seu propeptídeo plasmático (vWFpp), como também é possível visualizar a distribuição multimérica com seus diferentes tamanhos de vWF presentes no plasma por eletroforese em gel de agarose. Para as avaliações qualitativas, as mais amplamente utilizadas são a atividade de cofator da ristocetina (vWF:RCo) que promove a aglutinação plaquetária via vWF; a determinação do fator VIII coagulante (FVIII:C); a capacidade de ligação do vWF ao colágeno por teste imunoensaio (vWF:CB); a agregação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA); e o teste de ligação ao FVIII (vWF:FVIII^B)³⁰⁻³².

Figura 2. Painel diagnóstico para diferenciação de sangramentos mucocutâneos com suspeita de vWD. Adaptado de Christopher et al, 2015 – Blood 125, p. 2029-2037³⁰.

Dentre a heterogeneidade das categorias de distúrbios encontrados em vWD (Tabela 1), a redução quantitativa está presente nos tipos 1 e 3, sendo o primeiro com redução parcial dos níveis plasmáticos e o último com ausência virtual de vWF. A deficiência parcial do tipo 1 pode apresentar além dos baixos níveis de vWF, uma consequente redução nos testes funcionais para vWF que está associada ao número reduzido de vWF disponível. Assim, a razão função de vWF/vWF:Ag é aproximadamente 1. Níveis de vWF:Ag ou vWF:Rco < 30 UI/dL são estabelecidos para o tipo 1. Dentro do tipo 1, também há o 1C que apresenta o clearance de vWF aumentado. Já o tipo 3, é tipicamente definido com níveis de vWF $< 1\%$. Baixos níveis de vWF, variando de 30 a 50 UI/dL, também podem ser encontrados com e geralmente associados a pessoas do tipo sanguíneo O. Esses pacientes são considerados limítrofes, porém não diagnosticados como vWD.

Alterações funcionais de vWF estão agrupadas no tipo 2, separadas em quatro subtipos de acordo com sua caracterização fenotípica. O tipo 2A apresenta redução da adesão plaquetária dependente de vWF e deficiência seletiva de multímeros de alto peso molecular. Assim, tem baixos níveis de vWF:Ag com perda da correlação funcional em que RCo/Ag e CB/Ag estão tipicamente $\leq 0,6$. O tipo 2B, por outro lado, apresenta aumento da afinidade de vWF pelo GPIIb plaquetário, assim, além das alterações laboratoriais como descrito para o tipo 2A, pode também apresentar uma discreta trombocitopenia. No tipo 2M, há a diminuição da adesão plaquetária dependente de vWF mas sem a deficiência de multímeros de alto peso molecular, assim, os níveis de vWF podem estar de normais a reduzidos, geralmente com perda da correlação funcional detectada por RCo/Ag $\leq 0,6$ mas não em CB/Ag que se apresenta relativamente normal. Apesar de não ter alterações nos multímeros de alto peso molecular, pode haver outras alterações presentes em sua distribuição multimérica. Por fim, o tipo 2N apresenta uma intensa redução da afinidade de ligação de vWF pelo fator VIII^{30,31}.

Tabela 1. Padrão laboratorial dos diferentes tipos de vWD

	vWF:Ag	vWF:RCo	vWF:RCo/ vWF:Ag	FVIII:C	Padrão multímeros	Contagem plaquetária
Alterações de vWF Quantitativas						
Tipo 1	↓	↓	≥ 0,6	Normal a ↓	Normal	Normal
Tipo 1C	↓	↓	≥ 0,6	Normal a ↓	Normal	Normal
Baixos níveis vWF	↓	↓	≥ 0,6	Normal a ↓	Normal	Normal
Tipo 3	↓↓↓	↓↓↓	≥ 0,6	↓↓↓	Ausente	Normal
Alterações de vWF Qualitativas						
Tipo 2A	↓	↓↓	≤ 0,6	Normal a ↓	Perda de alto peso	Normal
Tipo 2B	↓	↓↓	≤ 0,6	Normal a ↓	Perda de alto peso	↓↓
Tipo 2M	↓	↓↓	≤ 0,6	Normal a ↓	Normal	↓↓
Tipo 2N	Normal a ↓	Normal a ↓	≤ 0,6	↓↓	Normal	Normal

↓ redução discreta, ↓↓ redução moderada, ↓↓↓ redução intensa. Adaptado de Christopher et al, 2015 – Blood 125, p. 2029-2037³⁰.

Além da forma congênita, formas adquiridas desse distúrbio também são encontradas com manifestações semelhantes a vWD, porém sem o histórico familiar de sangramento. Devido a sua patogênese variada do desencadeamento desse distúrbio, a manifestação laboratorial é abrangente e que decorre do mecanismo fisiopatológico da causa primária. A síndrome de von Willebrand adquirida é um sangramento raro que pode estar associada à distúrbios linfoproliferativos e

mieloproliferativos, neoplasias, distúrbios imunológicos ou cardiovasculares; drogas, doenças infecciosas e sistêmicas também estão associadas³³. Apesar de o envenenamento proporcionar alterações no vWF plasmático, ainda não há correlação com um distúrbio adquirido de vWF.

Para além da abordagem de alterações presentes diretamente no vWF, quantitativa ou funcionalmente, a redução da atividade da ADAMTS13 (ADAM metalopeptidase com motivo trombospondina tipo 1, membro 13), por deficiência ou disfunção, gera uma maior quantidade plasmática dos grandes multímeros de vWF na circulação. O desequilíbrio da manutenção do vWF em formas inativas e progressivamente pequenas resulta em maior atividade agregante e consequente formação de microtrombos plaquetários^{34,35}. Microangiopatia trombótica multifocal é descrita no envenenamento e considerada a causa de obstrução de artérias e arteríolas provocando infarto cerebral, miocardial, pulmonar, mesentérico e renal³⁶. A evidenciação de microangiopatia trombótica durante o envenenamento também foi observada com manifestações como a hemólise intravascular, com aumento nos níveis de hemoglobina plasmática e a presença de esquizócitos e micrócitos em envenenamento experimental por *B. jararaca*³⁷.

As microangiopatias trombóticas são amplamente estudadas na púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e na síndrome hemolítica urêmica (HUS) que são caracterizadas por trombos plaquetários que causam a oclusão de forma disseminada pela microvasculatura, associados à trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática. E os componentes intimamente ligados à formação desses microtrombos plaquetários são o vWF e sua enzima de clivagem a ADAMTS13³⁸.

A ADAMTS13 é uma protease do tipo disintegrina e metaloproteinase com motivos do tipo trombospondina, membro das ADAMTS da família das metaloproteinases (Figura 3). São sintetizadas primariamente pelas células estreladas do fígado, porém apresentam produção limitada também em células endoteliais, megacariócitos e plaquetas. A regulação de seus níveis plasmáticos

ainda é pouco elucidada, mesmo em condições fisiológicas. No entanto, o vWF aparenta ser o principal regulador da concentração de ADAMTS13 plasmática³⁴.

Figura 3. Representação esquemática da organização dos domínios da ADAMTS13 e seus sítios de ação. S) peptídeo de sinalização; P) propeptídeo; M) domínio metaloproteinase; D) domínio disintegrina; 1) primeira repetição do domínio trombospondina do tipo 1; Cys) domínio rico em cisteína; Spa) domínio espaçador; 2-8) repetições do domínio trombospondina do tipo 1; C1 e C2) primeiro e segundo domínio CUB. *Figura adaptada de Zheng, 2015*³⁴.

Toxinas do veneno que interagem com vWF

No veneno de *Bothrops jararaca* há toxinas como a botrocetina, uma PTLC capaz de interagir com o domínio A1 do vWF e ativar as plaquetas por mediação do GPIIb em seu mecanismo patológico³⁹. Na composição do veneno de *B. jararaca* há duas formas distintas de botrocetina: a de uma cadeia com 28 kDa aproximadamente, e a de cadeia dupla com 27 kDa (cadeia α e cadeia β , de 15/14,5 kDa na forma reduzida). E que, apesar de apresentarem mecanismos de ação semelhantes, a botrocetina de cadeia dupla apresenta maior afinidade de ligação com o vWF e consequentemente maior habilidade funcional⁴⁰. Em envenenamentos experimentais com administração de botrocetina em altas doses, houve o desenvolvimento do consumo de plaquetas circulantes e de vWF plasmático em modelos animais⁴¹. Há também evidências semelhantes que foram encontradas em

administração de aspercetina, uma PTLC homóloga à botrocetina pertencente ao veneno de *Bothrops asper*⁴².

Algumas toxinas do veneno pertencentes à família ADAMs das metaloproteinases (SVMPs) também são capazes de se ligar ao vWF. No veneno de *B. jararaca* a jararagina da classe PIII vem sendo mais estudada. Apesar de apresentarem a característica comum do domínio metaloproteinase, seguidas pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína como a enzima endógena do vWF, as SVMPs atuam de forma divergente da função regulatória exercida pela ADAMTS13^{11,43}. A ADAMTS13 promove a clivagem do vWF especificamente no domínio A2 (Tyr842 e Met843) gerando multímeros heterogêneos em tamanho²⁸. No entanto, as proteínas do veneno interagem com o vWF de forma pouco específica, tendo como atuante o domínio rico em cisteína de sua conformação com consequente proteólise e inibição da ligação do vWF com plaquetas *in vitro*¹¹.

Figura 4. Representação dos sítios de atuação das toxinas do veneno de *B. jararaca* com a subunidade de vWF. Descrição adaptada da interação de jararagina, uma SVMP, e da botrocetina.

A interação da botrocetina e de SVMPs, como a jararagina, do veneno de *B. jararaca* com o vWF (Figura 4) e consequente relação com as plaquetas vem sendo estudada na ação isolada das toxinas *in vitro* ou em modelos experimentais. No entanto, pouco é sabido sobre a intensidade da influência dessas toxinas na plaquetopenia ou em alterações do vWF plasmáticos desenvolvidos pelo

envenenamento, quando as toxinas analisadas na composição total do veneno de *B. jararaca*.

Objetivos

Tendo em vista a diversidade de atividades do veneno de *B. jararaca* que alteram a hemostasia, buscamos compreender o envolvimento do vWF na plaquetopenia desencadeada no envenenamento por essa serpente. Em complemento, a participação da botrocetina e das metaloproteinases (SVMP) do veneno foram estudadas no desenvolvimento de alterações quantitativas e qualitativas do vWF e de sua enzima fisiológica de hidrólise, a ADAMTS13, também associado à plaquetopenia. Assim, para melhor contribuir com o entendimento da fisiopatologia do envenenamento, optamos por utilizar dois modelos experimentais: ratos tratados com anticorpo anti-botrocetina e/ou um inibidor de metaloproteinase, e camundongos nocautes para o vWF.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e Amostras Humanas de Sangue

Os animais utilizados neste projeto e todos os procedimentos envolvendo-os foram analisados pelos Comitês de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolos nº 1117/13 e 058/14, respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados dentro das dependências do Instituto Butantan. O uso de animais geneticamente modificados foi autorizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto Butantan (Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98, CQB 039/98, na área CIBio 33 localizada no Biotério Central, com Nível de Biossegurança 1 NB1, Parecer nº 4544/2015 publicado no DOU em 12/06/2015). Amostras humanas utilizadas durante os processos de padronização das técnicas foram analisadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) via Plataforma Brasil com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 37958514.8.0000.0086.

Nosso principal modelo experimental utilizado foi o rato Wistar macho, heterogênico, cujo peso variava entre 250-330 g. Os ratos foram obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos na Sala de Animais do Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, com água e ração *ad libitum* até o momento de uso. Os camundongos geneticamente modificados e seus controles de fundo genético (C57BL/6J) foram criados e manuseados dentro das dependências do Biotério Central do Instituto Butantan.

2.2 Procedimentos Específicos

2.2.1 Criação da colônia de camundongos nocautes

A criação dos camundongos nocautes ocorreu em parceria com o Biotério Central do Instituto Butantan, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Vânia Gomes de Moura Mattaraia. Os animais permaneceram durante todo o processo de criação em ambiente apropriado e restrito para animais transgênicos, em constante

cuidado dos funcionários do biotério. Para a criação da colônia, dois casais heterozigotos da linhagem B6.129S2-Vwftm1Wgr/J⁴⁴ foram adquiridos do The Jackson Laboratory (JAX, EUA) e mantidos em acasalamento. Esses animais eram heterozigotos e assim apresentavam um gene mutante para a deleção de vWF e outro selvagem, ou seja, sem alteração de expressão de vWF. Os filhotes gerados foram genotipados na finalidade de descartar os animais que apresentassem o gene selvagem para ampliar a colônia nocaute.

2.2.2 Genotipagem dos camundongos nocautes para o gene *Vwf*

Extração de DNA: DNAs de cada camundongo foram extraídos seguindo protocolo de purificação rápida de DNA⁴⁵, sugerido pelo The Jackson Laboratory (JAX, EUA). Para isso, fragmentos de orelha (2 mm de diâmetro aproximadamente, coletados com o uso de furadores específicos) foram acrescidos a 75 µL de reagente de lise alcalino (NaOH 25 mM, Na₂-EDTA 0,2 mM, pH 12,0) e incubados em termociclador a 98°C por 1 hora, reduzindo-se a temperatura para 15°C até o momento da próxima etapa. Em seguida, as amostras foram acrescidas de 75 µL de reagente de neutralização (Tris HCl 40 mM, pH 5,5) e centrifugadas a 4000 rpm por 3 minutos. Alíquotas de 120 µL de cada amostra foram congeladas e preservadas a -80°C.

*Amplificação do gene *Vwf* selvagem e mutante:* foi realizada como sugerido no protocolo existente no sítio do JAX (https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:738,003795), utilizando *primers* para as sequências exclusivas do gene mutante e selvagem, e para uma sequência comum aos dois (Tabela 2).

Tabela 2. Detalhes de *primers* para genotipagem de camundongos nocautes

Primer	Sequência 5'→3'	Tipo
oIMR2084_vWF	AGTGAGACCTTTGGCTTTGC	comum
oIMR3006_vWF	CCCAACTTTTGCCAACAAATA	selvagem
oIMR6218_vWF	CCTTCTATCGCCTTCTTGACG	controle

Os genes mutante e selvagem foram amplificados separadamente para cada camundongo. As amostras de DNA foram diluídas em 1 parte de amostra para 4 partes de solução reagente (2 µL amostra + 8 µL de solução reagente). Dessa forma, cada amostra foi preparada em duas reações separadamente, A e B. O reagente A continha 0,25 µM do *primer* comum (oIMR 2084), 0,25 µM do *primer* mutante (oIMR 6218), e 2 partes de solução de amplificação 5 vezes concentrada (5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, Solis BioDyne, Estonia). O reagente B foi preparado de modo semelhante ao reagente A, porém com 0,25 µM do *primer* selvagem (oIMR 3006) em substituição ao *primer* mutante (oIMR 6218). A amplificação do DNA foi realizada em equipamento Step One Plus Real-Time PCR System (AB Applied BioSystems) com a seguinte ciclagem: 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos repetidos da sequência de desnaturação (94°C por 30 seg), anelamento (63°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min), e finalizado com a extensão a 72°C por 2 min. A seguir, a temperatura foi reduzida a 10°C até o momento da retirada da amostra do equipamento.

Determinação dos genótipos: as amostras de DNA amplificados foram separadas em eletroforese horizontal com gel de agarose a 1,5% dissolvido em TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH ~ 8,3) contendo brometo de etídio a 1:10.000.

Para a classificação do camundongo nocaute (Figura 5) se fazia necessário observar a banda do gene mutante (~670 pb) em contrapartida ao gene selvagem (965 pb).

Figura 5. Eletroforese para verificação dos genótipos dos camundongos nocautes. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentando: M (padrão de pares de base, pb), Bm (branco da reação contendo o primer mutante), Bw (branco da reação contendo o primer selvagem). Para cada uma das amostras 1 a 5, foram realizadas reações com cada primer separadamente, sendo **m** para o primer mutante e **w** para o primer selvagem. A banda do gene mutante tem o tamanho aproximado de 670 pb e o gene selvagem de 965 pb. Assim, cada animal tem o seguinte genótipo: 1 – homozigoto mutante, 2 – homozigoto mutante, 3 – homozigoto selvagem, 4 – homozigoto mutante, 5 – heterozigoto.

2.2.3 Verificação de vWF:Ag plasmático nos camundongos nocautes

A ausência de vWF circulante foi verificado em todos os camundongos nocautes utilizados para a experimentação. A mensuração antigênica do vWF no plasma foi realizada de modo semelhante ao descrito a seguir nos procedimentos específicos.

2.3 Delineamento experimental

Para o estudo da participação do vWF na plaquetopenia que ocorre no envenenamento pela inoculação do veneno da serpente *B. jararaca* (BjV) foram avaliados dois modelos experimentais.

O *pool* de BjV utilizado em todo o procedimento experimental foi obtido de serpentes adultas, de ambos os sexos. O *pool* foi cedido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e conservado liofilizado em freezer a -20°C. O *pool* de veneno foi dissolvido em salina somente no momento do uso.

2.3.1 MODELO 1 - RATOS

Os ratos utilizados nesse estudo foram divididos em grupos de tratamento e avaliados em momentos de 3, 6 e 24 horas após a injeção dos seus respectivos tratamentos. A dose escolhida de BjV foi de 1,6 mg/kg subcutâneo³⁷, que causa alterações hematológicas e hemostáticas em ratos e camundongos semelhantes àsquelas observadas em envenenamentos humanos. Os ratos foram alocados para receber os seguintes tratamentos (Figura 6).

- ♦ **Grupo BjV + salina:** controle positivo do envenenamento. Os animais foram injetados com BjV incubado com salina;
- ♦ **Grupo BjV sem botrocetina:** para inibir a botrocetina presente no veneno por meio de anticorpos policlonais específicos anti-botrocetina;

- ♦ **Grupo BjV + glicerol:** como a solução de glicerol a 50% (v/v) foi o veículo do anticorpo policlonal anti-botrocetina, os animais foram injetados com uma mistura de veneno e glicerol, na mesma proporção que o grupo acima;
- ♦ **Grupo BjV sem metaloproteinases:** a ação catalítica das metaloproteinases presentes no veneno foi inibida com Na₂-EDTA;
- ♦ **Grupo BjV sem botrocetina e metaloproteinases:** para inibir simultaneamente a ação catalítica das metaloproteinases e botrocetina presentes no veneno;
- ♦ **Grupo + salina:** foi o grupo controle negativo do envenenamento.

Figura 6. Grupos experimentais do modelo 1. O BjV foi diluído em solução salina estéril e incubado, na concentração final de 1 mg/mL, com os diferentes tratamentos por 1 hora a 37°C em banho seco. Para a inibição das metaloproteínases do veneno (SVMP) foi usado $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ na concentração final de 13 mM para BjV a 1 mg/mL⁴⁶. Para a inibição da botrocetina, um anticorpo policlonal (IgG) anti-botrocetina foi produzido em coelho e incubado em proporção de volumes iguais com o BjV. Após a incubação, as alíquotas de BjV foram mantidas em gelo durante o procedimento de injeção nos animais. Após a incubação, as alíquotas de BjV foram mantidas em gelo durante o procedimento de injeção nos animais. A dose de 1,6 mg/kg p.v. foi aplicada no subcutâneo da região dorsal dos animais. Para os animais do grupo salina (controle negativo) foi aplicado o volume equivalente ao administrado nos grupos injetados com BjV.

Assim, para os devidos tratamentos, o veneno foi incubado da seguinte maneira:

- ♦ **Grupo BjV + salina:** 1 mL de BjV a 1 mg/mL foi incubado com 52 µL de salina por 1 hora a 37°C em banho seco
- ♦ **Grupo BjV sem botrocetina:** uma alíquota de 0,5 mL de BjV a 2 mg/mL em salina foi incubada com 0,5 mL de anticorpo anti-botrocetina (1,125 g/dL) e 52 µL de salina por 1 hora a 37°C em banho seco.

- ♦ **Grupo BjV + glicerol:** 0,5 mL de BjV a 2 mg/mL em salina foi incubado com 0,5 mL de glicerol 50% + 52 µL de salina com glicerol por 1 hora a 37°C em banho seco;
- ♦ **Grupo BjV sem metaloproteinases:** 1 mL de BjV a 1 mg/mL em salina foi incubado com 52 µL de Na₂-EDTA 269 mM, um quelante de metais divalentes, por 1 hora a 37°C em banho seco;
- ♦ **Grupo BjV sem botrocetina e metaloproteinases:** 0,5 mL de BjV 2 mg/mL em salina foi incubado com 0,5 mL de anticorpo anti-botrocetina (1,125 g/dL) + 52 µL Na₂-EDTA 269 mM por 1 hora a 37°C em banho seco.
- ♦ **Grupo + salina:** os ratos foram injetados com salina.

Os protocolos que demonstram a efetividade dos tratamentos com anticorpo policlonal anti-botrocetina e com Na₂-EDTA para inibir a botrocetina e as metaloproteinases, respectivamente, do veneno bruto de *B. jararaca*, estão apresentados na forma de anexos (Anexo A e Anexo B).

2.3.2 MODELO 2 – CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Camundongos nocautes para fator de von Willebrand da linhagem B6.129S2-*Vwf*^{flm1Wgr}/J e seus respectivos controles isogênicos (C57BL/6J) foram utilizados para a confirmação da participação do vWF na plaquetopenia durante o envenenamento. Esses animais foram tratados com BjV, na mesma dose que os ratos (1,6 mg/kg) como controle positivo do envenenamento ou com salina para o controle negativo.

2.4 Tratamento e coleta das amostras de ratos e camundongos

A ordem dos tratamentos, bem como da coleta, foi realizada de maneira randomizada por sorteio em www.randomizer.com. O uso dessa medida evita a

introdução de erro sistemático devido a ordem da coleta e tempo de espera das amostras para serem processadas. Outro cuidado adotado foi o processamento cego dos resultados, pois os animais foram numerados conforme a ordem de injeção/coleta para que assim não houvesse a identificação dos grupos até o momento da análise estatística.

A coleta de amostras foi realizada no período diurno. E em cada procedimento de coleta, que inclui as injeções dos tratamentos seguido das coletas de amostras, foi contabilizado 1 animal de cada tratamento e de cada momento. Portanto, a somatória de animais por coleta foi: 18 ratos (6 grupos x 3 momentos) e 12 camundongos (2 linhagens x 2 grupos de tratamentos x 3 momentos). E o número total de coletas realizadas foram 8 para ratos ($n=8/\text{momento/grupo}$) e 7 para camundongos ($n=7/\text{momento/grupo}$). O mesmo conjunto de animais de cada coleta foi mantido para cada uma das análises realizadas especificamente. Essa medida foi tomada para o caso de que se houvesse a introdução de algum viés decorrente de lote de animal, ambiental ou de interferência analítica, esse viés fosse introduzido em todos os momentos de todos os grupos.

As amostras de sangue de ratos e camundongos foram coletadas da artéria abdominal nos animais mantidos em anestesia inalatória em equipamento de sistema fechado para animais de laboratório (Harvard Apparatus). A taxa de isoflurano de 4% foi utilizada para a indução e a de 2,5% de manutenção, em fluxo contínuo de oxigênio a 0,5%. A coleta em camundongos foi realizada com o auxílio de lupa Leica M60.

Após coletadas, as amostras de sangue foram imediatamente transferidas para tubos contendo ou não anticoagulantes e mantidas em temperatura ambiente durante o seu processamento. Nos tubos também foi acrescentado o soro anti-botrópico (SAB, Instituto Butantan, lote 1305077), na proporção de 1:100, para a neutralização *in vitro* do veneno. Os diferentes anticoagulantes foram utilizados nas seguintes proporções:

- ♦ Na₂-EDTA 269 mM - na proporção de 1:100 para a contagem total de células sanguíneas;
- ♦ CTAD (citrato trisódico 75 mM, ácido cítrico 42 mM, dextrose 139 mM, teofilina 15 mM, adenosina 3,7 mM, dipiridamol 0,2 mM, e imipramina 2 µM)¹⁵ - na proporção 1:7 para a avaliação de fator de von Willebrand (vWF:Ag e vWF:CB) e para a dosagem de fibrinogênio;
- ♦ Citrato de sódio 3,2% - na proporção 1:10 para dosagem de fator VIII;
- ♦ Citrato com inibidores (citrato de sódio 3,8%, Na₂-EDTA 50 mM, NEM 60 mM, aprotinina 5.000 U/mL, AEBSF 10 mM, leupeptina 280 µM)⁴⁷ - na proporção 1:10 para eletroforese de multímeros de vWF;
- ♦ Ausência de anticoagulante e de SAB, mantido por no mínimo 1 h à temperatura ambiente para obtenção de soro para dosagem da venenemia.

Para a obtenção do soro, bem como dos diferentes plasmas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 g por 15 min a 22°C. Após a centrifugação, os plasmas e soros foram aliquotados e mantidos congelados a -80°C até o momento da análise. Cada alíquota foi descongelada apenas uma única vez para ser analisada.

2.5 Coleta de *pool* de amostras de animais saudáveis

Amostras de sangue foram coletadas de ratos e camundongos C57BL/6J saudáveis para a geração de pool de amostras. As amostras de plasma foram obtidas a partir de cada um dos diferentes anticoagulantes utilizados na coleta de amostras, como também de amostra de sangue coagulado para obtenção de soro. As amostras foram coletadas sem a necessidade do soro anti-botrópico e foram processadas de forma semelhante ao descrito para as amostras experimentais. Para

a inclusão das amostras no pool, as análises de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) foram realizadas individualmente. Uma vez que os animais estavam com os valores dentro do estabelecido como normal, as amostras foram homogeneizadas e uma nova análise de TP e TTPA foi realizada para checagem.

3 ANÁLISES

3.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante em ratos e camundongos

A venenemia mensurada no soro, coletado sem a adição de soro anti-botrópico, foi realizada por ELISA⁴⁶ nos ratos e camundongos. Para isso, microplacas MaxiSorp (Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de soro anti-botrópico comercial (Instituto Butantan, lote 1305077) na concentração de 100 µg/mL em tampão carbonato (Na_2CO_3 15 mM; NaHCO_3 35 mM; pH 9,6), e incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C (concentração de 10 µg de soro anti-botrópico/poço). Os poços foram então bloqueados com albumina sérica bovina (BSA) a 3% em tampão carbonato por 2 horas a 37°C em câmara úmida. As amostras de soro, diluídas a 1/10 em tampão de incubação (BSA 1% em tampão de lavagem - PBS pH 7,4 com Tween 20 a 0,05%), foram aplicadas em triplicata (100 µL/poço) seguida de incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Uma curva padrão foi preparada usando veneno bruto de *B. jararaca*, diluído em tampão de incubação contendo 10% de soro de *pool* de animais normais das respectivas espécies avaliadas. A curva foi aplicada em triplicata em diluição seriada na razão de 2, abrangendo as concentrações de 500 a 0.488 ng/mL de veneno de *B. jararaca*. Para a marcação das amostras, soro anti-botrópico produzido em coelho foi adicionado (100 µL/poço) na diluição de 1/1000 em tampão de incubação, e incubado por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Em seguida, o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (cód. A0545, Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1/1000 em tampão de incubação foi incubado com a placa, por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Lavagens de 3 vezes de 5 min com tampão de lavagem foram realizadas entre cada etapa do teste imunoenzimático, seguida da remoção do excesso de tampão. Ao final de todas as etapas, o substrato cromogênico preparado no momento do uso (10 mg dicloridrato de o-fenilenodiamina dissolvidos em 10 mL de tampão citrato, pH 5,0, e acrescidos por fim de 10 µL H_2O_2 30%) foi adicionado em toda a placa de modo constante (100 µL/poço). Após alguns minutos e com a geração de cor, a reação foi interrompida com 50 µL/poço de H_2SO_4 30%. A leitura da placa foi realizada em 492 nm em leitor de microplacas Spectra MAX 190

(Molecular Devices). E as absorbâncias com as respectivas concentrações referentes aos valores conhecidos da curva padrão foram usadas no programa Curve Expert 1.4 (www.curveexpert.net). Assim, as absorbâncias das amostras experimentais foram comparadas a essa curva padrão resultando nos níveis de venenemia para cada uma das amostras de rato e de camundongos.

3.2 Dosagem de fibrinogênio circulante em ratos e camundongos

Plasma coletado em CTAD de ratos e camundongos foi utilizado na dosagem do fibrinogênio⁴⁸ analisada por colorimetria. Para isso, em um tubo plástico foram adicionados o volume equivalente de 0,5 mL de vidro moído, com 10 mL de salina e 50 µL de ácido 6-aminocapróico (EACA) 10%. Este último é um inibidor de plasmina e do ativador do plasminogênio. Sob a temperatura de 37°C, os plasmas das amostras experimentais também foram adicionados, 200 µL para ratos e 50 µL para camundongos. Por último, o correspondente a 50 NIH-U de trombina (69 µL de trombina a 720 NIH-U em glicerol 50%) foi adicionada por tubo e incubada por 15 min em banho-maria a 37°C para a conversão do fibrinogênio em fibrina. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado cuidadosamente para manter o coágulo espremido ao vidro moído. Lavagem com 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) por tubo, seguida de centrifugação a 3000 rpm por 5 min com descarte do sobrenadante foi repetida por 2 vezes. E ao ser descartado o último sobrenadante, 1 mL de NaOH 10% foi adicionado em cada tubo que foi coberto com folha de alumínio para ser levado ao banho-maria fervente por 10 minutos. Após essa incubação, os tubos foram resfriados e 7 mL de água destilada foi adicionada às soluções, bem como 3 mL de Na₂CO₃ 20%. Um branco da reação foi preparado com 1 mL de NaOH 10%, somado de 7 mL de água destilada, 3 mL de Na₂CO₃ 20%. Para o desenvolvimento de cor, 1 mL de reagente fenólico, adicionado de forma lenta e sob homogeneização, foi incubado com as amostras por 30 minutos em temperatura ambiente. Imediatamente após o término dessa incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Reino

Unido) a 650 nm. Dos valores de absorbância das amostras foi descontada a absorbância do branco, e o resultado foi confrontado com uma curva padrão de quantificação conhecida de tirosina. Para essa curva padrão, a L-tirosina foi preparada em triplicata em diferentes quantidades que abrangeram desde 0.0125 a 0.125 mg. E assim o volume total de 1,75 mL dessas soluções foi acrescido de 250 µL de NaOH 10%, 750 µL de Na₂CO₃ 20% e 250 µL de Folin, sendo este último adicionado lentamente e sob homogeneização. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, para o desenvolvimento de cor, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro a 650 nm. O branco da reação foi feito com água destilada em substituição à solução de L-tirosina. Os valores de absorbância e suas respectivas concentrações conhecidas de tirosina foram analisados no software CurveExpert versão 1.4 para a geração da curva padrão. E os resultados da concentração de fibrinogênio na amostra (mg/dL) foram comparados a essa curva padrão e calculados a partir da quantidade de tirosina em mg, multiplicada pelo fator de correção para o volume de plasma utilizado (5.850 para 200 µL de plasma e 23.400 para 50 µL de plasma).

3.3 Hemograma em ratos e camundongos

Amostras de sangue em EDTA foram usadas para contagens totais de plaquetas e de hemácias em contador hematológico BC-2800 Vet (Mindray, China). Parâmetros referentes ao volume plaquetário médio (VPM), hematócrito e dosagem de hemoglobina plasmática também foram coletados.

3.4 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag) em ratos e camundongos

A quantificação do vWF foi realizada em amostras de plasma em CTAD de ratos e camundongos por ensaio imunoenzimático (ELISA) de mensuração antigênica¹⁵. Para isso, placas de ELISA MaxiSorp (Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL/poço de IgG anti-vWF humano (Diasorin®) a 21,1 mg/mL, diluído 1/1.000 em tampão carbonato (Na₂CO₃ 15 mM; NaHCO₃ 34,9 mM; pH 9,6). A

sensibilização foi realizada *overnight* em câmara úmida a 4°C, seguida de bloqueio com 200 µL por poço de solução bloqueadora (BSA 3% em tampão carbonato pH 9,6) em câmara úmida a 37°C por 2 horas. As amostras de plasma foram diluídas 1/80 em tampão de incubação (BSA 1% em tampão de lavagem - PBS pH 7,4 com Tween 20 a 0,05%) e aplicadas em triplicata (100 µL/poço) com incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Uma curva padrão com amostra de *pool* de plasmas de animais saudáveis (PPN) de cada respectiva espécie foi realizada em cada uma das placas, também em triplicata. O PPN foi aplicado em diluição seriada na razão de 2 a partir de 1/10 até 1/20.480 em tampão de incubação, para que a análise das amostras fosse em comparação a esta curva. Após as lavagens, foi adicionado 100 µL/poço de IgG-biotina anti-vWF humano (Diasorim®) diluído a 500 ng/mL em tampão de incubação, e a placa foi incubada por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Para o conjugado, 100 µL de avidina-peroxidase (cód. A3151, Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1/20.000 em tampão de incubação foi aplicado em cada poço e a placa incubada em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Lavagens foram realizadas entre cada etapa do teste imunoenzimático sendo a sequência de 3 lavagens de 5 min com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 com Tween 20 a 0,05%), ao final da sequência de lavagens foi removido o excesso de tampão da placa. Por fim, o substrato cromogênico (10 mg dicloridrato de o-fenilenodiamina dissolvido em 10 mL de tampão citrato pH 5,0, e acrescidos por fim de 10 µL de H₂O₂ 30%), preparado no momento do uso, foi adicionado a 100 µL/poço de modo constante em toda a placa. Após alguns minutos, com a formação de cor, a reação foi interrompida com 50 µL/poço de H₂SO₄ 30%. A leitura da placa foi realizada em 492 nm em leitor de microplacas Spectra MAX 190 (Molecular Devices). As absorbâncias da curva padrão foram analisadas no programa Curve Expert 1.4 considerando-se a diluição de 1/80 como 100% de quantidade de vWF. Assim a absorbância das amostras analisadas foram comparadas a essa curva padrão resultando em valores relativos para o vWF:Ag. De modo a verificar a qualidade e reprodutibilidade das mensurações de vWF:Ag realizadas por ELISA, uma amostra de rato normal foi considerada como referência e aplicada em todas as placas como controle.

3.5 Atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno (vWF:CB) em ratos

A atividade do vWF de ligação ao colágeno foi eleita para análise funcional do vWF, em contrapartida com vWF:RCo, uma vez que o vWF de animais não são responsivos à ristocetina^{49,50}. A técnica de vWF:CB foi baseada em metodologia por ELISA descrita⁵¹, em que placas MaxiSorp (Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com colágeno tipo III de placenta humana (cód. C4407, SigmaAldrich, EUA). O colágeno liofilizado foi previamente reconstituído em ácido acético 0,5 M e as alíquotas congeladas a -20°C. E para a sensibilização da placa, o colágeno foi diluído a 0,25 mg/mL em tampão carbonato, e aplicado a 100 µL/poço para incubação de 24 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. A placa foi então bloqueada com 200 µL/poço de BSA 3% em tampão carbonato por 2 horas a 37°C em câmara úmida. E seguida da adição das amostras diluídas 1/40 em tampão de incubação (BSA 1% em solução de Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7,4). Uma curva padrão foi realizada com *pool* de animais saudáveis em diluição seriada na razão de 2, partindo de 1/10 até 1/20.480, em tampão de incubação. Assim, 100 µL das amostras foram adicionados aos poços, e a placa incubada por 1 hora a 37°C em câmara úmida. O anticorpo primário, anti-vWF humano produzido em coelho (cód. A0082, Dako, Dinamarca) foi diluído em tampão de incubação na proporção de 1/1000 e adicionado 100 µL/poço para incubar por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após essa incubação, o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (cód. A0545, Sigma-Aldrich, EUA), foi diluído 1/1000 em tampão de incubação e adicionado a 100 µL/poço para incubar por 1 hora a 37°C em câmara úmida. A placa foi lavada entre cada uma das etapas por 3 vezes de 5 minutos com tampão de lavagem (solução de Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7,4), e o excesso de tampão foi removido ao final de cada sequência de lavagens. Por fim, a revelação foi feita com 100 µL/poço de substrato cromogênico (10 mg dicloridrato de o-fenilenodiamina dissolvido em 10 mL de tampão citrato pH 5,0, e 10 µL de H₂O₂ 30%), preparado no momento do uso e adicionado de modo constante aos poços na

placa. Após alguns minutos, a reação foi interrompida com 50 µL/poço de H₂SO₄ 30% assim que houve a formação de cor. A leitura da placa foi realizada em 492 nm em leitor de microplacas Spectra MAX 190 (Molecular Devices). As absorbâncias da curva padrão foram analisadas no Curve Expert 1.4 considerando-se a diluição de 1/40 como 100% de atividade de ligação do vWF ao colágeno. Assim a absorbância das amostras analisadas foram comparadas a essa curva padrão resultando em valores relativos para o vWF:CB. De modo a verificar a qualidade e reprodutibilidade das mensurações de vWF:Ag realizadas por ELISA, uma amostra de rato normal foi considerada como referência e aplicada em todas as placas como controle.

3.6 Multímeros de fator de von Willebrand em ratos

A análise de multímeros de vWF foi realizada em eletroforese de SDS-agarose em sistema de minigel vertical (Mighty Small SE250/SE260, GE Life Science), com subsequente transferência semi-seca (Trans-Blot SD, semi-dry transfer cell, BIO-RAD) em membrana de nitrocelulose e revelação utilizando Alexa Fluor® 647 (cód. A21245, Invitrogen, EUA). Para a montagem do gel, mini-placas de tamanhos 10 x 10 cm foram preparadas com os espaçadores de 1,5 mm de largura. Após a higienização com etanol 70%, as mini-placas foram aquecidas em estufa a 37°C por pelo menos 5 minutos, previamente à aplicação da solução do gel de agarose. O gel consistiu de duas composições finais, sendo um gel de corrida ou de separação com 1,6% de concentração de agarose e outro, o gel de aplicação com 0,8% de agarose. Primeiramente, para a preparação do gel de corrida, 240 mg de HGT(P) agarose (Seakem HGT-P) foi dissolvida em 15 mL de tampão de gel de corrida (Tris base 0,1 M; glicina 0,1 M; SDS 0,4% p/v; pH 8,8). Esta suspensão foi aquecida em micro-ondas sob constante homogeneização, evitando-se que ocorresse a fervura da solução, até atingir a completa dissolução da agarose. A solução homogeneizada e translúcida foi transferida para as mini-placas totalizando uma altura aproximada de 8,5 cm de gel de corrida. Na sequência, o gel de aplicação foi preparado de modo semelhante ao descrito anteriormente, porém 40 mg de HGT(P) agarose foram dissolvidos em 5 mL de tampão de gel de aplicação (Tris

base 0,1 M; Na₂-EDTA 4 mM; SDS 0,4% p/v; pH 6,8). Após a dissolução da agarose e aplicação do gel na placa, o pente de 10 poços e 1,5 mm de espessura, também previamente aquecido, foi colocado no gel formando um poço de 0,7 cm de profundidade. Assim, a altura formada para o gel de aplicação de amostra foi de 0,5 cm (medida do final dos poços até o início do gel de corrida). Devido à temperatura de solidificação da agarose, a ponteira de 5 mL utilizada para a montagem dos géis foi pré-aquecida em água destilada quente, e as soluções de agarose mantidas em banho-maria a 37°C durante a aplicação nas placas. Ao finalizar a montagem do gel, esse foi mantido em temperatura ambiente para uma pré-solidificação e depois transferido para a geladeira por 30 minutos.

Para o preparo das amostras, plasmas coletados em anticoagulante com inibidores foram diluídos em tampão de amostra (Tris 10 mM, Na₂-EDTA 1 mM, SDS 2%, glicerol 20% e azul de bromofenol 2 mg/mL), homogeneizados e incubados a 60°C por 30 minutos em banho-maria seco. Para a diluição das amostras, diferentes proporções com o tampão de amostra foram utilizadas considerando-se a quantidade antigênica de vWF para cada plasma. Assim, os volumes da amostra e do tampão foram ajustados para que a concentração final de vWF:Ag fosse de 10%. Um *pool* de ratos saudáveis foi também preparado e serviu como padrão de multímeros de vWF na corrida eletroforética, para a análise comparativa das amostras. Os plasmas utilizados foram devidamente armazenados a -80°C e descongelados uma única vez para que a integridade dos multímeros fosse mantida. Em nossa experiência, o congelamento/descongelamento do plasma provoca a degradação do vWF. No momento da corrida eletroforética, o pente foi cuidadosamente removido do gel, e os poços formados foram lavados com água deionizada (Milli Q). As mini-placas foram acopladas ao sistema da cuba de eletroforese, previamente refrigerado a 9°C com circulador termostático (MultiTemp III, GE Life Science), e o tampão de corrida (Tris base 50 mM; glicina 384 mM; SDS 0,1% pH~8,3), também refrigerado, foi adicionado às câmaras superior e inferior da cuba. As amostras foram aplicadas em volume de 10 µL/poço sendo que em cada gel, 2 poços foram adicionados com a amostra do *pool* de animais saudáveis. Também as amostras testadas foram aplicadas em

duplicata em corridas diferentes. Assim, a corrida eletroforética foi realizada a 10 mA/gel em temperatura de resfriamento a 9°C, obtendo uma duração média de 2 horas.

Ao terminar a corrida, determinada com a saída do azul de bromofenol do gel, o gel foi incubado em 25 mL de 2-mercaptoetanol 1 μ M⁵² em tampão de transferência para *western blotting* (Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20%; SDS 0,037%; pH 9,2)⁵³ por 30 minutos, sob homogeneização, em temperatura ambiente. Essa incubação com 2-mercaptoetanol promove a transferência mais facilmente dos multímeros de alta massa molecular. Na sequência, o gel foi lavado em 25 mL de tampão de transferência por 15 minutos, sob as mesmas condições, para a remoção do 2-mercaptoetanol. Para a montagem da transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tamanho semelhante ao gel, hidratada em água deionizada e equilibrada em tampão de transferência. Filtros que mantêm a umidade e fazem o sanduíche do gel e da membrana também foram previamente equilibrados com o tampão de transferência. A placa da cuba de transferência foi umedecida com água deionizada e o sanduíche foi montado começando com os filtros, seguidos da membrana, o gel e por fim os filtros restantes. A cada componente adicionado, uma leve pressão foi feita com um bastão de vidro para remover bolhas que pudessem ter se formado entre as camadas, o que interfere na transferência das proteínas. A transferência dos multímeros de vWF do gel para a membrana ocorreu a 23V por 30 minutos.

Ao finalizar a transferência, a membrana foi seca em estufa a 37°C por 5 minutos para a fixação das proteínas e mantida congelada até a revelação. Para a visualização dos multímeros, primeiramente a membrana congelada foi hidratada com água deionizada, e em seguida foi incubada com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em solução de PBS com Tween 20 a 0,05%, pH 7,4) por 1 hora sob homogeneização em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo, o anti-vWF humano produzido em coelho (cód. A0082, Dako, Dinamarca) diluído 1/5000 em tampão de incubação (leite desnatado 5% em solução de PBS com Tween 20 a 0,05%, pH 7,4). A incubação com o anticorpo

primário ocorreu por 2 horas, sob homogeneização, em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi incubada com o anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 647 (cód. A21245, Invitrogen, EUA) diluído a 1/5000 em tampão de incubação. Essa incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 1 hora, sob homogeneização e protegido da luz por papel alumínio, em temperatura ambiente. Entre cada etapa de incubação da membrana, essa foi lavada por 3 vezes de 5 minutos com tampão de lavagem (solução de PBS com Tween 20 a 0,05%, pH 7,4). Para a revelação da membrana, essa foi levada para o equipamento de sistema de imagem, o ChemiDoc™ (BioRad), com emissão de luz a 647 nm para excitação do fluoróforo e consequente captura das bandas formadas pela liberação de fótons. As imagens capturadas foram analisadas no software Image Lab® 5.2.1 (BioRad) e a densitometria analisada de acordo com Studt et al, 2001⁵⁴.

Para cada animal foram estabelecidos três picos dos diferentes tamanhos de multímeros: o pico 1 referente aos de baixo peso molecular, o pico 2 para os de tamanho intermediário e o pico 3 aos multímeros de alto peso molecular. Cada pico consistiu da somatória das bandas de cada tamanho de multímero e cada banda é representada por uma banda central com suas duas sub-bandas adjacentes compondo o triplet de vWF. A individualização dos *triplets* durante a análise densitométrica é determinada pelo vale de densidade óptica entre as sub-bandas adjacentes dos diferentes picos (multímeros pequeno e intermediário) ou entre 2 picos de multímeros (multímeros de alto peso molecular)⁵⁴. Os valores de volume dos picos foram expressos como uma porcentagem relativa do volume total em pixel de sua respectiva linha, e assim puderam ser comparadas entre as diferentes amostras. Em todas as membranas, estiveram presentes duplicatas de uma amostra de *pool* de plasmas normais designada como referência de 100% para os diferentes tamanhos de multímeros de vWF. Desse modo, todas as amostras teste foram normalizadas em relação à distribuição do padrão de multímeros desse *pool* de plasmas normais, corridos no mesmo gel de eletroforese e membrana. Assim, os valores médios dos picos das amostras de *pool* de plasmas normal, consideradas padrões, foram estabelecidos como 100% para a normalização das amostras teste.

A partir da padronização da metodologia acima, um artigo foi escrito e submetido à publicação na revista *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Conjuntamente ao artigo, foi anexado um vídeo explicativo da técnica. O artigo está apresentado no Anexo C.

3.7 Atividade da enzima de clivagem do vWF (ADAMTS13) em ratos

Para a análise qualitativa de ADAMTS13 foi utilizado o kit comercial ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity (Sekisui Diagnostics, EUA), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Esse teste refere-se à mensuração de atividade de ADAMTS13 em plasma humano por tecnologia de transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET). Plasma citratado de ratos foi utilizado para a mensuração da capacidade proteolítica da ADAMTS13 presente no plasma por meio da clivagem do substrato FRET VWF86-ALEXA, entre os resíduos Tyr/Met, específicos para a enzima. Com essa clivagem, o fluoróforo ALEXA é desacoplado resultando no aumento da fluorescência capturada ($\text{Ex}=485 \text{ nm}$; $\text{Em}=535 \text{ nm}$) pelo espectrofluorímetro (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices), que é mantido a 37°C durante a análise. Os aumentos de fluorescência ao longo da cinética de 1 h foram capturados e os valores de ADAMTS13 (ng/mL) calculados por variação de unidade relativa de fluorescência ($\Delta\text{RFU} = \text{RFU}_{\text{T}=60\text{m}} - \text{RFU}_{\text{T}=0}$). A concentração de ADAMTS13 referente às amostras testes de ratos foi determinada por interpolação dos seus resultados de ΔRFU com uma curva padrão realizada concomitantemente na mesma placa, e que apresentavam valores conhecidos de concentração de ADAMTS13 em ng/mL .

A determinação quantitativa da concentração antigênica de ADAMTS13 dos ratos também foi avaliada usando o kit comercial Rat ADAMTS13/VWFCP (von Willebrand fator cleaving protease) CLIA (Elabscience Biotechnology, China) seguindo orientações do fabricante. No entanto, os valores foram descartados devido à mensuração dos valores de unidade de luz relativa (RLU) para as amostras de ratos terem sido abaixo das leituras encontradas para o branco da curva padrão da placa.

3.8 Dosagem do fator VIII plasmático em ratos

A determinação da quantidade plasmática de fator VIII dos ratos foi realizada com kit comercial de plasma deficiente em fator VIII (Diagnostica Stago, França). A metodologia foi seguida conforme orientações do fabricante, também utilizando em conjunto o kit comercial para TTPA (Labtest Diagnóstica, Brasil). Para isso, 40 µL de plasma coletado em citrato de sódio 3,2% previamente diluído em 1:10 em Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, HEPES 10 mM, glicose 5,6 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) foi incubado com 40 µL do plasma comercial deficiente em fator VIII, por 1 min a 37°C em coagulômetro (Start 4, Stago). Em seguida, 40 µL do ácido elágico (≥ 99 µM, reagente 1 do TTPA) foi incubado juntamente com os plasmas por 3 min a 37°C. E ao final, 40 µL de cloreto de cálcio (20 mM, reagente 2 do TTPA) foi adicionado e a contagem do tempo iniciada. O tempo de coagulação do plasma em segundos foi comparado a uma curva padrão. Para a construção dessa curva padrão, *pool* de plasma de ratos saudáveis (PPN) coletados em citrato de sódio 3,2% foi diluído inicialmente 1/5 em solução de Tyrode pH 7,4 e assim, seguiu-se uma diluição seriada na razão de 2. E a dosagem dessas diluições seguiu-se como descrito acima. A diluição de 1/10 do PPN foi considerada 100% dos níveis de fator VIII plasmático e assim, a quantificação nas amostras testadas foi determinada em níveis percentuais de fator VIII relativamente aos valores encontrados na curva padrão no software Curve Expert 1.4.

3.9 Análise estatística dos dados

A presença de *outliers* nos dados obtidos foi inicialmente detectada utilizando a metodologia proposta por Hoaglin e Iglewicz (1987)⁵⁵, utilizando uma planilha de Microsoft Excel® 2013 para os cálculos. A seguir, os dados foram analisados quanto à sua distribuição normal e homocedasticidade no programa estatístico Stata/MP, versão 10.0, e, sempre quando necessário, os dados foram transformados.

A análise dos dados dos ratos (ANOVA de duas vias, seguida de teste *post-hoc* de Fisher (ou LSD) foi usado para comparar dois a dois todos os pares de médias) que apresentavam distribuição normal e homocedasticidade foi feita no programa SPSS, versão 22. Os dados que não apresentavam homocedasticidade ou normalidade, mesmo após transformação, foram analisados pelo programa SigmaPlot, versão 12, pelos testes de Kruskal-Wallis e seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Para as análises de correlação linear entre as variáveis de interesse foi usado o coeficiente de correlação de Pearson (r), utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.

No caso dos camundongos, a linhagem também foi levada em consideração na análise estatística, sendo realizada a ANOVA de três vias, seguida de teste *post-hoc* de Fisher (ou LSD). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados de significância estatística ($p < 0,05$). Os dados apresentados na forma de média $\pm$ intervalo de confiança 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Modelo 1 – Ratos Wistar

4.1.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante

Todos os ratos injetados com algum tratamento com BjV apresentaram níveis de veneno circulante durante todo o período avaliado, em contraste aos grupos injetados com salina, que tiveram ausência de venenemia (Figura 7). Dessa maneira, certificamos que os resultados encontrados nos animais tratados foram decorrentes da presença do veneno na circulação sanguínea, bem como da ausência do veneno nos animais controles negativos. Do mesmo modo, a venenemia dos ratos também funcionou como certificação de que a incubação com os inibidores ou com o glicerol não impediu a saída do veneno dos tecidos subcutâneos para a circulação periférica, pois independentemente do tratamento de BjV recebido, os grupos apresentaram níveis semelhantes de veneno circulante.

A observação da dinâmica do veneno circulante ao longo do tempo também nos possibilitou associar a intensidade da venenemia com os resultados encontrados dos animais, pois o pico de venenemia encontrado em 6 h, esteve altamente associado às principais observações encontradas referentes às alterações hemostáticas induzidas pelo BjV em ratos.

Figura 7. Venenemia em ratos em 3, 6 e 24 horas após o tratamento com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8/\text{momento/grupo}$).

4.1.2 Dosagem de fibrinogênio circulante

Houve uma intensa hipofibrinogenemia nos animais inoculados com BjV pré-tratado com salina, glicerol ou anticorpo anti-botrocetina, porém não nos animais que receberam BjV tratado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ou $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ + anticorpo anti-botrocetina

(Figura 8). A hipofibrinogenemia persistiu durante todo o período avaliado. A inibição da botrocetina sozinha não interferiu nessa redução, portanto não apresentou associação ao consumo de fibrinogênio na coagulopatia decorrente do veneno de *B. jararaca*. Em contrapartida, a inibição das metaloproteinases preveniu o consumo do fibrinogênio, pois conhecidamente tem ativa participação na redução dos níveis plasmáticos de fibrinogênio durante o envenenamento em ratos⁴⁶.

Independentemente aos níveis de fibrinogênio dos grupos que receberam os tratamentos de BjV, houve uma tendência à recuperação dos níveis plasmáticos em 24 h apesar da concentração de veneno manter-se elevada na circulação. Para além do seu envolvimento na coagulopatia de consumo no envenenamento, o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda que pode aumentar seus níveis em resposta aos estímulos inflamatórios⁵⁶, que também estão presentes no envenenamento^{57,58}. Dessa forma então, o comportamento de fase aguda positiva do fibrinogênio associado à inibição do seu consumo, explicaria os elevados níveis encontrados em 24 h em ambos os grupos que tiveram as metaloproteinases do veneno inibidas.

Figura 8. Fibrinogenemia em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botroctina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botroctina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

4.1.3 Contagem de plaquetas

A plaquetopenia é um achado consistentemente encontrado no envenenamento por *B. jararaca*, decorrente de um mecanismo multifatorial que pode ser de ação direta ou indireta de diferentes proteínas do veneno. Em nossos resultados, a plaquetopenia foi persistente em todos os ratos que receberam tratamentos com BjV, sem diferenças quantitativas entre as inibições feitas no

veneno (Figura 9). Na plaquetopenia instalada, menores níveis foram encontrados em 6 h que estiveram combinados com maior presença de veneno circulante. A somatória da ação direta das proteínas do veneno nas plaquetas com a ação concomitante da coagulopatia, já desencadeada no organismo pelo próprio veneno, poderiam juntas contribuir na intensidade da plaquetopenia.

No entanto, apesar da intensa plaquetopenia encontrada houve um direcionamento para a restauração dos seus valores em 24 h, mesmo em elevados níveis de veneno circulante. Associado a isso, maiores valores de VPM foram observados em 6 h nos ratos tratados com BjV (Figura 10). O aumento do VPM demonstra que há a liberação de plaquetas imaturas ou recém-produzidas pelos megacariócitos, como um mecanismo compensatório ao consumo plaquetário^{59,60}. Com isso, podemos inferir que a produção plaquetária não é alterada pelo veneno uma vez que a plaquetopenia foi sendo restaurada mesmo em presença de altos níveis de veneno circulante. Tais resultados foram igualmente observados em coelhos¹⁵.

Apesar da botrocetina ter atividade aglutinante de plaquetas e de ter sido capaz de causar plaquetopenia quando administrada isoladamente⁴¹, a sua inibição com anticorpo específico incubado com o veneno de *B. jararaca* não apresentou relevância na intensidade da plaquetopenia durante o período avaliado. Tais observações nos sugerem que a sua ação é minoritária para a plaquetopenia do envenenamento. Resultados previamente encontrados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que as metaloproteínases e tampouco as serinaproteases do veneno de *B. jararaca* tinham uma importante participação na intensidade da plaquetopenia após 3 e 6 horas de envenenamento⁴⁶. Aqui, as metaloproteínases também não foram relevantes em 24 h.

Figura 9. Contagem de plaquetas totais em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

Figura 10. Volume plaquetário médio (VPM) em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

4.1.4 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag)

O envenenamento por BjV não causou reduções intensas nos valores de vWF:Ag, no entanto, houve uma tendência à redução nos níveis circulantes em 3 h e, mais acentuadamente, em 6 h nos animais que receberam BjV (Figura 11). A inibição da botrocetina no BjV, paradoxalmente, promoveu um maior consumo de vWF:Ag em 3 h e um aumento dos níveis em 6 h, ambos em comparação aos respectivos animais controles positivos (BjV). A inibição da botrocetina manteve o vWF plasmático em níveis semelhantes ao controle negativo somente em 6 e 24 h, tanto

quando a incubação com anticorpo anti-botrocetina foi feita sob a forma isolada como combinada com as metaloproteinases no BjV. Ademais, a inibição sozinha da atividade das metaloproteinases manteve os níveis de vWF semelhantes ao tratamento de BjV em 3 h e 6 h, sendo nesse último período com maior intensidade, diferindo até do controle negativo. Em contrapartida, na inibição combinada das metaloproteinases com a botrocetina do veneno, houve uma potencialização na reversão da queda de vWF:Ag provocada pelo BjV bruto. Em 24 h, os grupos injetados com BjV tratado com Na₂-EDTA e/ou anti-botrocetina apresentaram semelhantes ao grupo controle negativo.

Apesar da botrocetina ser capaz de reduzir significativamente os níveis de vWF plasmático e plaquetas circulantes quando administrada isoladamente *in vivo* em altas concentrações em ratos e suínos⁴¹, e algumas metaloproteinases isoladas do veneno de *B. jararaca*¹¹ promoverem a proteólise do vWF *in vitro*, não observamos uma queda acentuada dos níveis de vWF, comparáveis aquelas de fibrinogênio ou contagem de plaquetas, em animais envenenados. Como a redução dos níveis de vWF:Ag esteve presente em 3 e 6 h em alguns animais que receberam BjV bruto, porém não de forma acentuada, nos levam a inferir que o vWF:Ag estava sendo clivado e ou consumido, mas também simultaneamente secretado pelo endotélio ou plaquetas ativadas.

No entanto, interessante, observamos que a inibição da botrocetina no BjV não impediu a queda dos níveis de vWF:Ag causada pelo BjV em 3 h, mas contrariamente intensificou a redução. E que, quando combinada com a inibição das metaloproteinases, houve reversão do quadro e os níveis de vWF:Ag se mantiveram normalizados. Com isso, podemos dizer então que houve atuação da botrocetina e das metaloproteinases durante o envenenamento, e que ambas afetaram isoladamente ou em combinação a dinâmica do vWF plasmático. Apesar de, em 6 h, os níveis de vWF puderem ser relacionados com a atuação conhecida da botrocetina de aglutinação plaquetária via vWF, nenhuma relevância foi observada na plaquetopenia estabelecida pelo envenenamento no mesmo período. Aparentemente, os mecanismos fisiopatológicos de maior potência do BjV talvez

sobrepõem a atividade da botrocetina ou outras proteínas do tipo-lectinas do tipo-C, presentes em menores concentrações no veneno. Assim, para explicar a participação efetiva do complexo botrocetina-vWF na plaquetopenia induzida pelo BjV, o modelo de camundongos *VWF*^{-/-} foi utilizado.

Figura 11. Dosagem de vWF:Ag em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

4.1.5 Atividade de fator de von Willebrand por ligação ao colágeno (vWF:CB)

A avaliação de vWF:CB é capaz de mensurar a habilidade funcional do vWF relacionada à exposição do sítio de ligação do vWF presente no plasma ao colágeno subendotelial. Podemos correlacionar que essa maior capacidade de adesão está

associada aos níveis de vWF de multímeros de alto peso molecular, pois quanto maior o tamanho dos multímeros, maior disponibilidade de sítios de ligação.

Nossos resultados (Figura 12) apresentaram flutuações nos níveis de vWF:CB, semelhantes àsquelas do vWF:Ag, nos períodos de 3 a 24 h após o envenenamento. Apenas a inibição combinada de botrocetina e metaloproteinases foi capaz de inibir a redução dos níveis de vWF:CB dos animais envenenados em 6 h. Ainda assim, a botrocetina sozinha apresentou influência em 24 h. Como observado para o vWF:Ag, os resultados sugeriam que a diminuição do vWF:CB, provavelmente por proteólise do vWF, era acompanhada pela liberação das formas multiméricas de alto peso molecular do vWF.

Figura 12. Dosagem de vWF:CB em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8/\text{momento/grupo}$).

4.1.6 Razão CB/Ag

A razão CB/Ag é obtida pela divisão do valor da atividade de vWF:CB pelo respectivo valor de vWF:Ag. Os valores encontrados em ratos que receberam tratamento com BjV, apresentaram uma grande flutuação (Figura 13). Nos animais que receberam o tratamento com BjV houve um direcionamento para baixos valores de CB/Ag, não sendo observada esta queda quando o veneno foi inibido com o anticorpo anti-botrocetina e/ou para as metaloproteinases. Uma maior intensidade de valores reduzidos de CB/Ag foi observada em 24 h nos ratos que receberam BjV,

exceto quando o veneno foi tratado com anticorpo anti-botrocetina, de forma isolada ou combinada com a inibição das metaloproteinases. O impedimento dos baixos índices de CB/Ag com a inibição da botrocetina nos direciona a inferir que houve manutenção funcional de vWF referente à adesão ao colágeno. O mesmo não foi encontrado com a inibição apenas de metaloproteinases, que apresentaram índices semelhantes ao do controle positivo do envenenamento nesse mesmo período. Ainda assim, apesar da grande variabilidade nos resultados, pudemos observar que a inibição das metaloproteinases, isolada ou de forma combinada com o anticorpo anti-botrocetina no BjV, manteve prevalentemente os valores de CB/Ag superiores a 0,4 em 3 e 6 h. Em conjunto, podemos inferir que a botrocetina e as metaloproteinases influenciam a função do vWF de ligação ao colágeno.

Figura 13. Razão de vWF:CB e vWF:Ag calculados dos ratos durante envenenamento experimental com BjV. O valor de vWF:CB de cada animal foi dividido pelo seu respectivo valor de vWF:Ag. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

4.1.7 Multímeros de fator de von Willebrand

Assim como para os demais parâmetros relacionados ao vWF, houve uma grande variação dos resultados individuais da análise das 3 faixas de peso dos multímeros de vWF. Entretanto, apesar de não encontrado diferenças significativas na análise multimérica, em alguns animais o veneno de *B. jararaca* provocou um distúrbio qualitativo na distribuição dos multímeros de vWF (Figuras 14 e 15), com

redução dos multímeros de alto peso molecular e consequentemente acúmulo de multímeros de baixo peso molecular. Essa mesma alteração foi observada em camundongos que receberam o BjV (Figura 14b). Esse padrão de distribuição assemelha-se ao quadro de doença de von Willebrand (vWD) tipo 2 em humanos, que pode ter origem congênita ou adquirida (Figura 14a).

A distribuição dos três grupos de multímeros (de peso molecular alto, intermediário e baixo) teve bastante variação de resposta individual dos ratos nos grupos tratados com BjV. Diferentemente para os valores de vWF:CB e vWF:Ag, o grupo que recebeu BjV inibido pelo anticorpo anti-botrocetina e Na₂-EDTA também apresentou grande variação para os multímeros de peso molecular alto e intermediário, e os valores não se relacionaram diretamente com os valores de vWF:Ag ou vWF:CB.

A redução dos multímeros de alto peso molecular na circulação tem origem, entre outros casos, no consumo excessivo por intensa formação de agregados plaquetários e/ou por proteólise desses multímeros⁶¹. De acordo com a atuação do veneno, a redução dos multímeros de alto peso molecular observado pode consistir na combinação desses dois mecanismos de consumo. No entanto, apesar de termos observado qualitativamente as alterações de distribuição multimérica, não conseguimos demonstrar essas mesmas alterações quantitativamente, nem a atuação das metaloproteinases e botrocetina nesse processo.

Como demonstram os dados apresentados, a técnica de multímeros de vWF desenvolvida nesse projeto apresenta um método mais rápido e mais prático da visualização do perfil de distribuição dos diferentes tamanhos de vWF (Thomazini et al, 2018 – artigo submetido para publicação – Anexo C). Apesar de promover maior acessibilidade à avaliação dos multímeros, a técnica de visualização de multímeros terá melhor aplicabilidade se utilizada com caráter qualitativo da distribuição de vWF como tipicamente é usada nos laboratórios de rotina. Com isso, em nossa necessidade da avaliação quantitativa, as diferenças promovidas pelo veneno no perfil multimérico talvez tenham sido pouco evidenciadas pela técnica.

Figura 14. Imagem de distribuição de multímeros de vWF e análises densitométricas de diferentes espécies (humano, rato e camundongo). a) Distribuição de multímeros observada em membrana revelada usando anticorpo conjugado com Alexa Fluor® 647. Amostras: plasmas controles de humano (raia 1), rato (raia 3) e camundongo (raia 5), mostrando uma distribuição normal de multímeros; amostra de plasma de paciente humano com vWD tipo 2 (raia 2) apresentando ausência de multímeros de alto peso molecular; amostras de plasmas de rato (raia 4) e de camundongo (raia 6) injetados com veneno de *B. jararaca*, demonstrando uma redução de multímeros de alto peso molecular, sugestivo de vWD adquirido. Fonte: Artigo submetido à publicação (Anexo C).

Figura 15. Distribuição de multímeros de vWF dos ratos durante envenenamento experimental com BjV. Sendo a) Multímeros de alto peso molecular, b) multímeros de intermediário peso molecular e c) multímeros de baixo peso molecular. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo). Os valores apresentados são referentes aos valores das amostras teste, normalizados com os valores médios do *pool* de plasma controle, presentes em duplicata na membrana específica de cada uma das amostras. Para a normalização, foram comparados os valores respectivos aos diferentes tamanhos de multímeros de vWF.

4.1.8 Atividade da enzima de clivagem do vWF (ADAMTS13)

Os ratos que receberam o BjV pré-incubado com salina tiveram uma redução dos níveis de atividade de ADAMTS13 durante o envenenamento por *B. jararaca* entre 3 e 24 h (Figura 16). Apesar de ter também ocorrido diminuição dos níveis de ADAMTS13 em ratos que receberam BjV tratado com Na₂-EDTA, os valores médios foram pouco superiores aos dos ratos que receberam BjV tratado com salina em 3 h. Todavia, em 6 h, houve uma significativa diferença entre os grupos que receberam BjV tratado com salina e Na₂-EDTA. Sendo assim, pela primeira vez, nossos resultados indicam que as metaloproteinases do BjV atuam de maneira significativa na ADAMTS13 durante o pico de venenemia e promovem a redução dos seus níveis no plasma de ratos.

Figura 16. Quantidade de ADAMTS13 mensurada de forma indireta por sua atividade em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) e Na₂-EDTA (Met). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 5-6$ /momento/grupo).

4.1.9 Correlação vWF:Ag e ADAMTS13

Por ser a ADAMTS13 a enzima de clivagem de vWF, sua atividade está intimamente correlacionada com os níveis plasmáticos de vWF. Assim, houve uma correlação entre a atividade de vWF:Ag e níveis de atividade de ADAMTS13 em animais controles negativos, entretanto essa correlação foi afetada quando os animais foram tratados com o BjV incubado com salina (Figura 17). A inibição das metaloproteinases por Na₂-EDTA também afetou essa correlação, porém aproximou-se do encontrado para o controle negativo. A determinação da razão vWF/ADAMTS13, calculada a partir da divisão da dosagem de vWF:Ag pela sua

respectiva dosagem de ADAMTS13, também foi usada para comparar a relação entre vWF e ADAMTS13, porém nessa razão não houve diferença entre os grupos (dados não mostrados). Tais observações nos direcionam para a importância das metaloproteinases para desequilibrar o balanço hemostático entre vWF e ADAMTS13. Porém, vale ressaltar que outras proteínas do veneno bem como outros mecanismos fisiopatológicos desencadeados simultaneamente, como a presença de trombina e plasmina⁶²⁻⁶⁴, podem ser fatores contribuintes para a perda da correlação.

Figura 17. Correlação de vWF:Ag versus ADAMTS13 separados pelos diferentes grupos de tratamentos de BJV em ratos. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BJV) incubado com salina (BJV + salina) ou Na₂-EDTA (BJV + Na₂-EDTA). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (Controle negativo, salina) sob as mesmas condições. Os períodos de avaliação de 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos foram agrupados. Valores de r determinam o coeficiente de correlação, sendo $r=0$ não variam juntas e $r=\pm 1$ perfeitamente correlacionados. Nível de significância da correlação de $p<0,05$ ($n = 5-6/\text{momento/grupo}$).

4.1.10 Dosagem do fator VIII plasmático

Houve redução dos níveis de FVIII em todos os animais tratados com BJV em 3 h e a inibição da botrocetina e/ou das metaloproteinases não influenciaram na intensidade do consumo (Figura 18). No entanto, apesar desse quadro ser

semelhante em 6 h, houve um aparente efeito das metaloproteínas presentes no veneno. Pois sua inibição, isoladamente ou combinada, influenciaram discretamente os níveis de FVIII que apresentaram valores mais altos do que os de animais envenenados. Além disso, apesar da continuidade da presença de veneno circulante, houve uma tendência à recuperação dos níveis de FVIII em 24 h em todos os grupos que receberam algum tratamento com BjV.

Figura 18. Dosagem de FVIII em ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 5-6$ /momento/grupo).

4.1.11 Razão FVIII/vWF em ratos

A razão FVIII/vWF é obtida pela divisão do valor da atividade coagulante de FVIII pelo respectivo valor da dosagem de vWF:Ag, que auxilia na análise da proporção de FVIII ligado ao vWF. Assim, os animais que receberam BjV incubado com salina apresentou uma redução dessa razão em 3 e 6 h em comparação ao controle negativo salina (Figura 19). Adicionalmente, a inibição da botrocetina isoladamente provocou uma inicial reversão dos índices em 3 h, com a razão semelhante ao do controle, seguida de uma queda em 6 h. Desse modo, esses resultados reafirmam que houve um consumo independente de FVIII e vWF durante o envenenamento.

Figura 19. Razão FVIII/vWF de ratos durante envenenamento experimental com BjV. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7-8$ /momento/grupo).

4.1.12 Correlação FVIII e vWF:Ag

Por ser o vWF o carreador plasmático do FVIII, a correlação FVIII:vWF apresentou naturalmente uma correlação positiva em ratos controles negativos (Figura 20). No entanto, essa mesma correlação foi perdida nos animais injetados com qualquer um dos tratamentos de BjV. Do mesmo modo, a presença da botrocetina e/ou metaloproteinases do veneno não interferiram no distúrbio causado pelo veneno. Essa perda da relação direta entre FVIII e vWF nos indica que o veneno interfere no consumo dessas proteínas por vias diferentes e independentes. Além disso, outras classes de proteínas como as serinaproteases do veneno podem estar atuando simultaneamente no consumo do fator VIII durante o envenenamento⁶⁵.

Figura 20. Correlação de FVIII versus vWF separados pelos diferentes grupos de tratamentos de BjV em ratos. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), Na₂-EDTA (Met), anticorpo anti-botrocetina (Bot), ou Na₂-EDTA + anticorpo anti-botrocetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. Os

períodos de avaliação de 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos foram agrupados. Valores de r determinam o coeficiente de correlação, sendo $r=0$ não variam juntas e $r=\pm 1$ perfeitamente correlacionados. Nível de significância da correlação de $p<0,05$ ($n = 5-6/\text{momento/grupo}$).

4.1.13 Hemograma com série vermelha e leucócitos

Os resultados da série vermelha e de leucócitos não diferiram entre os grupos, apesar da flutuação encontrada. No entanto, na dinâmica hematológica observamos que os ratos que receberam BjV, independentemente do tratamento, apresentaram uma discreta hemoconcentração com aumento em hematócrito, hemoglobina e hemácias em 3 e 6 h (Figura 21). Proteínas do veneno, em especial as metaloproteinases, vem sendo associadas ao aumento da permeabilidade vascular com extravasamento prioritário de plasma e subsequentemente a porção celular⁶⁶. Ainda assim, a inibição das metaloproteinases no BjV não influenciou a hemoconcentração.

Seguidamente houve uma queda nos níveis da série vermelha, que pode ser caracterizada como um quadro anêmico instalado. A hemorragia local e sistêmica é um achado consistente no envenenamento por *B. jararaca*, assim, é compatível encontrar um quadro de anemia principalmente pela perda de sangue.

Figura 21. Células sanguíneas de ratos durante envenenamento experimental com BjV. Cada gráfico representa: (a) hematócrito, (b) número total de hemácias, (c) hemoglobina e (d) número total de leucócitos. Ratos foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal), glicerol (Gli), $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Met), anticorpo anti-botroctetina (Bot), ou $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ + anticorpo anti-botroctetina (B+M). Os ratos controles negativos foram injetados com salina (CN) sob as mesmas condições. O quadro do envenenamento foi avaliado em 3, 6 e 24 horas após a injeção dos tratamentos. O asterisco (*) demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 7\text{-}8/\text{momento/grupo}$).

4.2 Modelo 2 - Camundongos C57BL/6J e nocautes VWf

4.2.1 Dosagem dos níveis de veneno circulante

Todos os camundongos que receberam BjV apresentaram veneno circulante, em contraste aos respectivos controles que receberam injeção de salina (Figura 22). Independentemente da linhagem, os níveis de venenemia se mantiveram constantes

durante o período avaliado. Desse modo, podemos afirmar que os resultados encontrados para os animais injetados com BjV foram referentes à ação sistêmica do veneno. Bem como a ausência dele nos animais controles.

Figura 22. Venemia em camundongos durante envenenamento experimental com BjV. Camundongos das linhagens C57BL/6J e Vwf^{-/-} foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) como controle positivo do envenenamento; camundongos controles negativos de ambas linhagens foram injetados com salina (Sal) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 6-7$ /momento/grupo).

4.2.2 Dosagem de fibrinogênio circulante

O envenenamento desencadeou uma redução nos níveis de fibrinogênio em 3 e 6 h, independentemente da linhagem de camundongos (Figura 23). Os camundongos C57BL/6 que receberam BjV tiveram uma recuperação em seus níveis em 24 h, semelhante ao observado em ratos. Entretanto, a mesma intensidade no aumento da fibrinogenemia não foi encontrada nos camundongos nocautes. Esses animais estão associados a deficiências em proteínas pró-inflamatórias^{67,68}, o que poderia explicar a baixa recuperação dos níveis de fibrinogênio. Ainda assim, não podemos descartar a hipótese de que devido a ausência de vWF, esses animais apresentem mecanismos distintos no desencadeamento da coagulopatia do envenenamento.

Figura 23. Fibrinogenemia em camundongos durante envenenamento experimental com BjV. Camundongos das linhagens C57BL/6J e Vwf^{-/-} foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) como controle positivo do envenenamento; e camundongos controles de ambas linhagens foram injetados com salina (Sal) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 5-7$ /momento/grupo).

4.2.3 Quantificação do fator de von Willebrand plasmático (vWF:Ag)

Os camundongos controles C57BL/6 envenenados não diferiram dos controles em seus níveis de vWF:Ag em nenhum dos momentos (Figura 24). Entretanto, dentro da flutuação nos valores encontrados, pudemos observar que houve uma tendência à redução de vWF:Ag em 3 h nos animais que receberam BjV. Como

esperado nos animais nocautes *Vwf*^{-/-}, eles não apresentaram níveis circulantes de vWF.

Figura 24. Dosagem de vWF:Ag em camundongos durante envenenamento experimental com BjV. Camundongos das linhagens C57BL/6J e *Vwf*^{-/-} foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) como controle positivo do envenenamento; e camundongos controles de ambas linhagens foram injetados com salina (Sal) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 6-7$ /momento/grupo).

4.2.4 Contagem de plaquetas

Todos os camundongos que receberam o tratamento com BjV apresentaram uma intensa plaquetopenia, que se manteve constante durante todos os momentos analisados (Figura 25). A plaquetopenia encontrada também foi independente da linhagem utilizada, o que nos indica que o consumo de plaquetas durante o

envenenamento independe da participação do vWF. Considerando que o vWF participa da formação de agregados plaquetários e que há proteínas do BjV que interagem com ele, poderíamos inferir que o caráter multifatorial do consumo plaquetário durante o envenenamento apresente mecanismos alternativos frente à ausência de vWF. Assim, a presença de vWF é um fator contribuinte e não determinante para o distúrbio provocado pelo BjV.

Figura 25. Contagem total de plaquetas em camundongos durante envenenamento experimental por BjV. Camundongos das linhagens C57BL/6J e *Vwf*^{-/-} foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) como controle positivo do envenenamento; e camundongos controles negativos de ambas linhagens foram injetados com salina (Sal) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 5-6$ /momento/grupo).

4.2.5 Hemograma com série vermelha e leucócitos

Assim como nos ratos, ambas as linhagens de camundongos envenenados apresentaram um quadro de anemia em 24 h, caracterizada com a redução do hematócrito, dos níveis de hemoglobina e do número total de hemácias (Figura 26). Os camundongos nocautes que devido a deficiência de vWF podem apresentar sangramentos espontâneos⁴⁴, tiveram naturalmente menores referências para a série vermelha.

Os camundongos C57BL/6 apresentaram aumento nos leucócitos circulantes em 24 h, que poderia ser em resposta ao processo inflamatório desencadeado pelo envenenamento. Essa mesma intensidade na resposta inflamatória não foi encontrada nos camundongos nocautes, apesar de uma aparente tendência ao aumento do número de leucócitos. Camundongos deficientes em vWF apresentam deficiência em proteínas pró-inflamatórias^{67,68}, o que poderia justificar a discreta resposta inflamatória.

Figura 26. Células sanguíneas de camundongos durante envenenamento experimental com BjV. Cada gráfico representa: (a) hematócrito, (b) número total de hemácias, (c) hemoglobina e (d) número total de leucócitos. Camundongos das linhagens C57BL/6J e *Vwf*^{-/-} foram injetados com veneno de *B. jararaca* (BjV) incubado com salina (Sal) como controle positivo do envenenamento; e camundongos controles de ambas linhagens foram injetados com salina (Sal) sob as mesmas condições. O asterisco * demonstra o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ IC de 95% ($n = 5-7$ /momento/grupo).

5 DISCUSSÃO

Na tentativa de entender o envolvimento do vWF na plaquetopenia induzida pelo envenenamento da serpente *B. jararaca*, nós encontramos que a intensidade do consumo de plaquetas não é dependente da mediação com o vWF. Ao analisar a ação das proteínas do veneno de *B. jararaca* descritas até o momento que interagem direta e/ou indiretamente na relação entre plaquetas e o vWF *in vitro*^{28,69,70}, como a botrocetina e as SVMPs, observamos que, apesar da conhecida ação da botrocetina, bem como outras proteínas semelhantes de veneno de serpente, causarem plaquetopenia quando administradas em altas doses^{41,42}, a botrocetina presente no veneno bruto não influencia notavelmente a diminuição da contagem plaquetária observada durante o envenenamento experimental em ratos e camundongos. No entanto, por ser a botrocetina mediadora de agregação plaquetária através de vWF, tem importante participação no consumo de vWF plasmático.

Algumas SVMPs apresentam estrutura e função similares à ADAMTS13, enzima endógena que por proteólise regula a atividade de vWF¹¹. Mesmo não proporcionando alterações significativas nos níveis plasmáticos de vWF, as SVMPs promoveram alteração da função do vWF e suprimiram a atividade da ADAMTS13 plasmática nos animais envenenados. Esse é o primeiro relato da mediação das SVMPs na redução da atividade da enzima reguladora de vWF, a ADAMTS13, decorrente do envenenamento por *B. jararaca*.

A botrocetina é uma conhecida proteína aglutinante plaquetária do veneno de *B. jararaca* que se liga primeiramente ao domínio A1 de vWF e cria uma nova interface que aumenta a afinidade pela GPIb α das plaquetas e amplia a agregação plaquetária intravascular^{71,72}. Quando purificada e aplicada em altas doses em modelos experimentais, a botrocetina⁴¹ bem como a aspercetina (proteína homóloga do veneno de *B. asper*) desenvolvem plaquetopenia⁴². A alta afinidade do vWF à GPIb plaquetária, decorrente de mutações no domínio A1 do vWF e que podem refletir em baixas contagens de plaquetas circulantes, é também encontrada na doença de von Willebrand tipo 2B. Em similaridade, há também a redução dos

multímeros de vWF de alto peso molecular³⁰, o que poderia se assemelhar a uma forma de síndrome de von Willebrand adquirida.

Considerando as PTLCs no veneno bruto, a inibição da aspercetina utilizando anticorpo policlonal anti-aspercetina no veneno total de *B. asper* foi capaz de reverter o consumo de plaquetas causado pelo envenenamento⁴². No entanto, em nossas condições, mesmo com a habilidade do anticorpo anti-botrocetina em inibir a ação aglutinante/agregante da botrocetina, não pudemos evidenciar uma associação entre a presença de botrocetina no veneno total de *B. jararaca* com a redução das plaquetas no envenenamento. Ainda assim, devemos considerar que nossos resultados sejam reflexo de uma quantidade reduzida de botrocetina presente no veneno total (1-2,5 mg em 500 mg de veneno bruto de *B. jararaca*)⁴⁰ que, consequentemente não apresenta uma massiva influência no consumo plaquetário dentro do cenário do envenenamento em andamento de *B. jararaca*.

A evidência de uma não relevante participação da botrocetina na plaquetopenia do envenenamento também foi confirmada quando na ausência de vWF no modelo utilizado em camundongos nocautes. A intensidade do consumo plaquetário foi semelhante na presença ou não de vWF, o que adicionalmente nos indica que apesar da relevante atuação aglutinante plaquetário do vWF, o mesmo não é fundamental para que a redução do número de plaquetas ocorra na circulação.

Interessantemente, apesar da contínua atuação do veneno na circulação, os valores da contagem de plaquetas circulantes tenderam a recuperar-se em 24 h, mesmo sem a administração de soro antivenenoso. Pacientes humanos que recebem o tratamento antiveneno, apresentam uma rápida recuperação de plaquetas circulantes, superior ao encontrado para os fatores de coagulação como o fibrinogênio¹⁹. Apesar de inferido que o envenenamento não prejudica a produção plaquetária, não há evidências consistentes que demonstrem que a rápida recuperação plaquetária é devido a um aumento da trombopoese e megacariocitopoese. É ainda mais intrigante, quando não conseguimos relacionar o alto consumo plaquetário presente no envenenamento com as principais classes de

proteínas do veneno de *B. jararaca*: metaloproteinases, serinaproteinases e botrocetina.

Porém, a botrocetina contribui para o consumo de vWF plasmático durante o envenenamento, principalmente dos multímeros de alto peso molecular que são os que apresentam maior capacidade agregante⁴¹. O mecanismo de ação proposto da botrocetina é que primeiramente se liga ao domínio A1 do vWF e promove uma “ativação” do vWF antes de se conectar com GPIb das plaquetas⁷². Essa ativação do vWF ainda é pouco elucidada, porém propicia sua clivagem pela ADAMTS13 e consequente remoção da circulação⁷³. Adicionalmente, a ligação do vWF ao GPIb plaquetário também promove a clivagem do domínio A2 do vWF pela ADAMTS13, gerando multímeros de menores tamanhos mesmo em taxa de cisalhamento muito baixas⁷⁴. Com esse contexto, ambos mecanismos poderiam estar correlacionados para a relevante participação da botrocetina no consumo do vWF plasmático, sem encontrar a mesma magnitude de ação no consumo plaquetário.

Interessantemente, apesar da inibição da botrocetina ter preservado os multímeros de alto peso, não houve a mesma influência na atividade de ligação ao colágeno. Apenas a inibição combinada com as metaloproteinases do veneno foi capaz de preservar a essa função. As metaloproteinases do veneno com domínios tipo disintegrina e rico em cisteína – em muitas características semelhantes às metaloproteinases da família ADAMs, são capazes de clivar o vWF de maneira não específica¹¹, diferentemente de sua enzima de clivagem endógena, a ADAMTS13⁷⁵. Essa clivagem promove a diminuição dos multímeros de alto peso molecular e consequente acúmulo dos vWF de baixo peso molecular *in vitro*¹⁴. E, apesar da ação das metaloproteinases não ter grande efeito na redução do vWF plasmático, mostrou que potencializa a ação da botrocetina.

É importante considerar, que o vWF está presente estocado em grânulos Weibel-Palade em células endoteliais bem como nos grânulos alfa plaquetários, em multímeros de altíssimos pesos moleculares. A secreção desses grânulos é decorrente da ativação das células endoteliais como também da ativação das plaquetas²⁶. E, apesar da quantidade de vWF estocado em células endoteliais ser

proporcionalmente maior, uma massiva degranulação das plaquetas, que é promovida pelo veneno⁷⁶, também pode contribuir para o aumento nos níveis plasmáticos de vWF. Desse modo, o distúrbio sistêmico gerado pelo envenenamento poderia estimular a liberação de vWF de células endoteliais e de plaquetas, o que pode assim ocultar a magnitude do consumo de vWF pela ação do veneno.

Em contrapartida, apesar do vWF ser carreador de FVIII com liberação conjunta na circulação²⁶, o massivo consumo de FVIII e a perda da correlação entre VIII/vWF causada pelo veneno, poderia estar associada a função chaperona do vWF em relação ao FVIII^{77,78} em que o consumo de FVIII seria decorrente da coagulopatia de consumo causada pelo veneno. Além disso, a inibição da botrocetina e/ou das metaloproteinases do veneno não impediu o consumo de FVIII, o que nos indica que outras proteínas do veneno, como as serinaproteases⁶⁵ tenham maior influência na coagulopatia.

Na coagulopatia desencadeada pelo veneno de BjV, tem grande importância a quantidade de trombina intravascular gerada pela ativação do seu zimogênio no sangue, a protrombina, adicionalmente com a presença de proteínas trombina-símile no veneno¹². Essa trombina, como também a plasmina presente no envenenamento podem estar associadas à clivagem da ADAMTS13 na circulação⁶². Ainda assim, além da redução da ADAMTS13 por proteólise há também o seu alto consumo devido altos níveis de substrato natural, o vWF⁷⁹. Interessantemente, as SVMPs do veneno estão associadas com a redução da atividade de ADAMTS13, especialmente no pico de venenemia. Essa evidência poderia ser efeito de um consumo da ADAMTS13 por clivagem, ou ainda, porque por apresentarem homologia estrutural, o organismo responde por *feedback* negativo, ou seja, diminuição da atividade frente à alta presença de proteínas semelhantes originárias do veneno. Em todo caso, ainda que seja sugestiva a semelhança das alterações presentes no envenenamento, como a microangiopatia trombótica e presença esquizócitos de hemácias na circulação que demonstra a presença de hemólise intravascular, a redução de ADAMTS13 não apresentou intensidade tão significativa como a característica de casos de TTP^{80,81}.

Vale lembrar que o envenenamento é um processo complexo que destrói a harmonia fisiológica e desencadeia efeitos em diferentes direções na hemostasia, tanto pela ação das próprias proteínas do veneno como decorrente do desarranjo na resposta compensatória do organismo frente à agressão causada pelo veneno. Diversas proteínas do veneno atuam em mecanismos anti- e pró-hemostáticos¹⁰ que se apresentam desconexos frente ao olhar da ordem fisiológica. Desse modo, mesmo as respostas compensatórias do organismo frente aos desequilíbrios patológicos são muitas vezes paradoxais ou se apresentam de forma antagônica.

6 CONCLUSÕES

Assim, baseados nas evidências encontradas com nossos resultados, concluímos que a intensidade da plaquetopenia durante o envenenamento causada pela *B. jararaca* não depende da presença do fator de von Willebrand. E que, apesar da botrocetina ter sido previamente associada à redução do número de plaquetas circulantes quando administrada isoladamente, nós concluímos que a sua presença no veneno bruto não afeta a plaquetopenia desencadeada durante o envenenamento. No entanto, é capaz de influenciar os níveis plasmáticos de vWF. Adicionalmente, encontramos que mesmo que as metaloproteinases do veneno não tenham efeito marcante no vWF plasmático, apresentam uma intensa atuação na atividade da enzima reguladora de vWF, a ADAMTS13.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sabendo da importância da função do vWF na hemostasia primária, comprovada pelo maior sangramento nos camundongos nocautes de *Vwf*, e aliado com a presença de proteínas no veneno que consomem o vWF, é intrigante encontrarmos os seus níveis plasmáticos pouco reduzidos no envenenamento. Essa evidência nos leva a pensar que deve haver liberação de vWF das células endoteliais e/ou plaquetas para o plasma durante o envenenamento. Apesar de sabermos que há interação do veneno com ambas as células, e que o veneno é capaz de promover a secreção plaquetária (Rosa & Santoro, dados não publicados), a origem e a intensidade da liberação do estoque de vWF de ambas as células durante o envenenamento ainda são pouco conhecidas. Assim, abre-se uma frente de investigação para melhor compreender se há ação do veneno de *B. jararaca* na liberação plasmática de vWF, e qual a sua origem.

Adicionalmente, se faz necessário maior compreensão da ação da botrocetina no processo de degranulação, pois interessantemente, apesar da conhecida atuação da botrocetina de estímulo da aglutinação plaquetária mediada pelo vWF e de ter sido importante para o consumo de vWF em 6 h, a sua inibição no veneno apresentou valores de vWF inferiores ao encontrado para BjV bruto em 3 h. Assim, essa é também uma questão intrigante e que incita a novas investigações que estudem a atividade da botrocetina sobre as células endoteliais que apresentam maior estoque de vWF e que nunca foram estudadas como alvos da botrocetina.

Outra observação curiosa é que a dose utilizada de veneno em ratos envenenados induz naturalmente uma recuperação nas variáveis hemostáticas em 24 h, mesmo sem o tratamento com o soro anti-botrópico para a neutralização da ação do veneno. Essas evidências abrem a frente investigativa para melhor compreender a síntese das proteínas hemostáticas consumidas durante o envenenamento, bem como a produção de células sanguíneas que não apresentaram distúrbios evidentes em sua liberação. A tendência à recuperação do número de plaquetas, como também a rápida recuperação dos seus níveis em pacientes que recebem o tratamento com o antiveneno, somadas a não associação

da intensidade do consumo de plaquetas com as metaloproteinases, serinaproteases e botrocetina do BjV podem indicar que há outros mecanismos relevantes que influenciam nos níveis de plaquetas circulantes. Para além do consumo, a rápida recuperação do número de plaquetas circulantes, apesar de não haver estoque plaquetário e a sua liberação para a corrente sanguínea ser mediante sua produção, isso poderia nos direcionar para uma investigação na busca por sequestro plaquetário.

ANEXOS

ANEXO A

Purificação da botrocetina de 2 cadeias do veneno de *B. jararaca* e obtenção de anticorpos policlonais anti-botrocetina

Uma amostra de botrocetina nativa, purificada de um *pool* de veneno bruto de *B. jararaca*, nos foi doada pela Dra. Solange Maria de Toledo Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan. A equipe da Dra. Solange purificou a amostra segundo Serrano et al. 1999⁸² modificado, em cromatógrafo de sistema de FPLC (cromatografia líquida rápida de proteínas) (Äkta Purifier, GE Healthcare) em coluna superose 12 10/30 (frações 47-57). Foram realizadas 10 cromatografias consecutivas, coletando frações de 0,25 mL. Para posterior análise por espectrometria de massa, a banda proteica que resultou do isolamento da botrocetina sofreu digestão *in gel* segundo descrito em Hanna et al. 2000⁸³ com algumas modificações. Os peptídeos obtidos após esse procedimento foram submetidos à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) em sistema nanoProxiom/LTQ Orbitrap Velos (Thermo) e os dados brutos (Raw files) foram analisados em ferramentas disponíveis no Trans Proteomics Pipeline (ProteoWizard versão 2.1, disponível em <http://proteowizard.sourceforge.net/>).

A análise dos dados da LC-MS/MS revelou que a amostra de botrocetina estava contaminada com fosfolipase A₂ ácida e metaloproteinase dependente de zinco com domínio tipo-disintegrina (PIII). Sendo assim, a solução doada pela Dra. Solange Serrano foi enviada ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica, aos cuidados do Dr. Ivo Lebrun, para que fosse analisada e separada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com o protocolo descrito anteriormente⁴⁰. A solução eluída com acetonitrila teve as proteínas separadas em coluna cromatográfica C8 e os picos detectados a 280 nm. A coluna cromatográfica C8 é ideal para análise de moléculas orgânicas e tem maior especificidade para compostos básicos e quelantes

de metais. Assim, em uma triagem da solução de botrocetina em HPLC de fase-reversa foram visualizados 10 diferentes picos (Figura 27).

Figura 27. Perfil cromatográfico de eluição da solução de botrocetina em HPLC de fase-reversa (C8). A eluição foi realizada com gradiente de acetonitrila. No eixo y estão mostrados os valores de absorbância (280 nm) e no eixo x o tempo para eluição das proteínas.

Em comparação ao resultado encontrado em Fujimura et al. 1991⁴⁰, o pico que apresentou tempo de leitura semelhante ao da botrocetina de cadeia dupla referiu-se ao de número 9. Ainda assim, todos os picos gerados na HPLC foram visualizados em uma eletroforese SDS-PAGE e houve a confirmação de que o peso molecular da proteína do pico 9 era semelhante ao da botrocetina de cadeia dupla. Perante a grande diluição da amostra durante a coleta por HPLC, foi necessário que a solução fosse concentrada e optamos pela ultrafiltração. Esta foi realizada em tubo composto por membrana de porosidade de 3 kDa (Millipore) em centrifugações de 3000 rpm a 4°C. Após o processo de ultrafiltração, a amostra de botrocetina de

cadeia dupla continha 0,389 mg/mL de concentração proteica, mensurada pela técnica com ácido bicinonínico⁸⁴. Essa amostra final foi submetida à eletroforese de SDS-PAGE (Figura 28) e a banda não reduzida foi enviada para a espectrometria de massa que confirmou tratar-se da botrocetina de cadeia dupla (Figura 29).

Figura 28. Eletroforese SDS-PAGE a 12% para checagem da pureza da botrocetina após HPLC. O gel foi corado com coloração de prata⁸⁵.

A Cadeia Alfa da Botrocetina (M1V359)				
1	<u>MGRFIFVSFG</u>	<u>LLVGFLSLSG</u>	<u>TAADCP</u> SGWS	SYEGNCYKFF
51	RFCSEQA KGG	HLVSIK IYSR	EVDFVGD LVT	KNIQSSD LYA
101	KQCSSWSDGS	SVSYENVVER	TVK KCF ALEK	DLGFVLWISL
151	KSPPP			YCAQKNPFVC
B Cadeia Beta da Botrocetina (M1VNP5)				
1	<u>MGRFIFVSFG</u>	<u>LLVGFLSLSG</u>	<u>TAADCP</u> PDWS	SYEGSCYR VF
51	KFC TEQQTGG	HLVSFQ SREE	ADFVSS LTSP	MLKADVL WIG
101	EWTDGMEFDY	DDYYFIAEYE	CVASKPTNNK	WWIIPCTRL K
				NFVCE FQA

Figura 29. Identificação da botrocetina por espectrometria de massas. (A) Estrutura primária da cadeia alfa da botrocetina, onde em vermelho estão marcados os peptídeos identificados na análise por espectrometria de massas. (B) Estrutura primária da cadeia beta da botrocetina, onde em vermelho estão marcados os peptídeos identificados na análise por espectrometria de massas. A sequência sublinhada corresponde ao peptídeo sinal.

Assim, para confirmar a identidade da proteína isolada para os experimentos, a banda proteica proveniente da análise por eletroforese foi submetida ao protocolo de digestão tripsínica *in gel* e os peptídeos gerados foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Após a análise dos espectros de massas contra o banco de dados de proteínas pertencentes à taxonomia Serpentes do Uniprot, foram identificados 8 peptídeos tripsínicos provenientes da cadeia beta da Botrocetina (código de acesso do Uniprot: M1VNP5) e 6 peptídeos tripsínicos provenientes da cadeia alfa desta mesma proteína (código de acesso do Uniprot: M1V359). Na Tabela 3 constam os valores obtidos na busca em banco de dados que propiciaram a identificação da botrocetina na amostra isolada.

Tabela 3. Resultado da identificação de proteínas por espectrometria de massas da amostra de botrocetina utilizada nos experimentos

Código de acesso	Descrição	Score	Cobertura de sequência (%)	m/z	massa (Da)	carga (z)	<i>Expect value</i>	Peptídeos
M1VNP5	Botrocetin-2 beta OS=Bothrops jararaca GN=bot-2B PE=2 SV=1	496	46,6	325,679	649,3434	2	0,011	VFEQK
		496	46,6	505,1982	1008,382	2	0,00019	MDWDDAEK
		496	46,6	507,7211	1013,428	2	6,20E-05	NFVCEFQA
		496	46,6	513,2009	1024,387	2	2,00E-05	MDWDDAEK
		496	46,6	628,3095	1254,604	2	0,017	LKNFVCEFQA
		496	46,6	808,4261	1614,838	2	2,10E-08	ADVLWIGLSDVWNK
		496	46,6	827,405	1652,795	2	2,40E-09	EEADFSVSLTSPMLK
		496	46,6	991,4611	1980,908	2	2,00E-09	FCTEQQTGGHLVSFQSR
M1V359	Botrocetin-2 alpha OS=Bothrops jararaca GN=bot-2A PE=2 SV=1	372	26,5	384,1914	766,3682	2	0,0068	CFALEK
		372	26,5	405,7477	809,4808	2	5,80E-05	GGHLVSIK
		372	26,5	435,1947	868,3748	2	0,0013	FCSEQAK
		372	26,5	448,2391	894,4636	2	0,012	KCFALEK
		372	26,5	496,7162	991,4178	2	5,70E-06	MNWADAER
		372	26,5	611,3211	1220,628	2	8,40E-07	EVDFVGDVTK

Os códigos de cada cadeia da Botrocetina são provenientes do Uniprot. O valor de cobertura de sequência indica a porcentagem da estrutura primária que foi identificada. Os valores de *expect value* indicam a probabilidade da ocorrência da identificação de um outro peptídeo com pontuação igual ou maior a obtida por acaso.

Imunização

A botrocetina de 2 cadeias purificada foi inoculada em coelho New Zealand adulto por 5 imunizações intramusculares (região do músculo poplíteo). Para isso, a botrocetina era previamente diluída em adjuvante Marcol-Montanide, na proporção de 1:2.

Após essas imunizações, a titulação sérica de anticorpo atingiu um platô de reatividade ao imunógeno com valor maior que 204.800. A titulação foi determinada

por teste imunoenzimático (ELISA) em placa sensibilizada com 1 µg/poço de veneno bruto de *B. jararaca*.

Purificação do anticorpo anti-botrocetina

Uma vez que o título se mantinha constante no soro, o volume de sangue total do coelho foi coletado da artéria carótida, dissecada sob anestesia geral com tiopental e com botão de lidocaína no subcutâneo do local da coleta. Após a coagulação do sangue por 2 horas a 37°C e posterior centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos a 22°C, o soro obtido foi armazenado a - 80°C.

Para a purificação das imunoglobulinas G (IgG)⁸⁶, o soro foi descongelado rapidamente em banho-maria a 37°C, e 1 parte de volume de soro foi adicionado a 4 partes de tampão acetato (solução de acetato de sódio anidro a 60 mM, pH 4,0 ajustado com ácido acético 60 mM), homogeneizado e o pH mensurado a aproximadamente 4,5 em fita de pH. Sob homogeneização constante, 25 µL de ácido caprílico por mL de amostra diluída foi adicionado lentamente (6,25 mL de ácido caprílico para o total de 250 mL de soro diluído em tampão acetato) e mantido por 30 minutos em temperatura ambiente homogeneizando. O ácido caprílico promove a aglutinação de albumina e proteínas não-IgG. Com isso, solução foi então centrifugada a 3220 g por 30 minutos a 22°C e o sobrenadante filtrado em funil com lã de vidro para a remoção total dos precipitados.

A solução obtida foi acrescida de PBS com EDTA 10 vezes concentrado (NaCl 1,37 M; KCl 26,8 mM; Na₂HPO₄ 81 mM; KH₂PO₄ 14,7 mM; Na₂EDTA 2,21 mM; pH 7,4) na proporção de 9 partes de amostra para 1 parte do tampão, e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1 M. A solução do sobrenadante foi então refrigerada e ao atingir 4°C foi adicionado 0,277g (NH₄)₂SO₄/mL de amostra e mantido sob homogeneização refrigerada por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 5.000 g por 15 minutos a 4°C para a precipitação das IgGs. Os pellets foram ressuspensos no menor volume possível com PBS 2 vezes concentrado com posterior diálise para remoção do sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄]. Utilizando membrana com poro de 14 kDa aproximadamente, a solução de IgGs foi dialisada overnight a 4°C sob homogeneização constante contra PBS 2 vezes concentrado.

Após a diálise, a solução de IgG foi incubada em banho-seco a 52°C por 20 minutos, seguida de centrifugação a 3220 g por 20 minutos a 4°C. E finalmente, o sobrenadante contendo as imunoglobulinas G, foi adicionado de glicerol a 50% e mantido a – 20°C. A concentração de proteína total dessa solução de anticorpos anti-botrocetina era de 1,125 g/dL, na dosagem pelo método do ácido bicinconínico⁸⁴, em comparação a uma curva padrão de concentração conhecida de albumina bovina sérica.

Reatividade do anticorpo anti-botrocetina

Reconhecimento da botrocetina no BjV

Para o reconhecimento do anticorpo anti-botrocetina frente à botrocetina de 2 cadeias, uma eletroforese SDS-PAGE foi realizada com o veneno bruto de *B. jararaca* e a solução da botrocetina purificada, ambos na forma desnaturada e com ou sem o agente redutor β -mercaptoetanol. Sequencialmente à eletroforese, foi realizado um *western blotting* no qual foi utilizado o anticorpo produzido, anti-botrocetina, para a marcação da membrana (Figura 30).

A marcação da membrana demonstrou que o anticorpo anti-botrocetina foi capaz de reconhecer bandas de massas semelhantes à botrocetina de 2 cadeias em sua forma *in natura* (27 kDa) e na forma reduzida (15/14.5 kDa)⁴⁰ tanto na solução purificada de botrocetina como na solução de veneno bruto de *B. jararaca*. Isso demonstrou que o anticorpo era específico para a botrocetina purificada e utilizada para imunização. O anticorpo também marcou outras bandas dentro do veneno bruto, que podem ser referentes a outras lectinas que apresentem epítomos homólogos para o anticorpo policlonal produzido.

A ação do anticorpo anti-botrocetina também foi comparado à ação do anticorpo anti-aspercetina gentilmente fornecido pelo grupo do Dr. Gutiérrez. A aspercetina (30 kDa) é uma proteína da família tipo-lectina do tipo-C presente no veneno de *Bothrops asper* que apresenta similaridades funcionais com a botrocetina, por induzir aglutinação plaquetária na presença de plasma ou fator de von

Willebrand⁸⁷. Nossos resultados demonstraram que ambos os anticorpos apresentam um padrão de marcação da membrana semelhante entre si, tanto para com relação à botrocetina purificada como também ao veneno bruto de *B. jararaca*.

Figura 30. Análise de western blotting para averiguar a especificidade antigênica do anticorpo anti-botrocetina, em comparação ao anticorpo anti-aspercetina. Em eletroforese de SDS-PAGE a 12% de poliacrilamida, foram aplicados 1 µg de botrocetina purificada e 10 µg de BjV nas formas reduzidas e não reduzidas com 2-mercaptoetanol. Após transferência semi-seca (15V por 2 h) para membrana de nitrocelulose, essa foi incubada com anticorpo anti-botrocetina diluído 1/10.000, seguido do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase diluído 1/5.000. O anticorpo anti-aspercetina também foi incubado com a membrana, sob as mesmas condições, para a comparação de resultados com o anticorpo anti-botrocetina. A revelação da membrana foi realizada com o substrato cromogênico

DAB (5 mg de tetra-hidrocloreto de 3,3'diaminobenzidina em 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0, contendo 125 μ L de CoCl_2 0,2 M e 3,4 μ L de H_2O_2 30%)⁸⁸.

Inativação da atividade da botrocetina

A capacidade de inibição da atividade biológica da botrocetina pelo anticorpo foi analisada por agregação plaquetária em ratos e humanos (Figura 31). Para isso, plasmas ricos em plaquetas (PRP) de ratos e humanos foram obtidos de sangue coletado em citrato de sódio a 3,8% e centrifugados a 190 g por 20 min a 25°C. Plasma pobre em plaquetas (PPP) foi utilizado para zerar o equipamento, obtido após a remoção do PRP por centrifugação a 2500 g por 15 minutos a 25°C.

Para a agregação plaquetária, 400 μ L de PRP foi incubado por 2 minutos no agregômetro (Chrono-log®) a 37°C e adicionado de 10 μ L de agonista. A botrocetina purificada foi incubada por 30 minutos a 37°C com o anticorpo anti-botrocetina na proporção 1:4, ou seja, 1 parte de botrocetina para 3 partes de volume de anticorpo. A botrocetina também foi incubada com o glicerol 50% (veículo do anticorpo) e salina (dado não mostrado).

Figura 31. Agregação em plaquetas induzida pela botrocetina. A análise foi realizada com 400 μ L de PRP humano ou de rato (concentração de plaquetas de 309 e 289 $\times 10^3$ / μ L, respectivamente) incubado por 2 minutos a 37°C. Após essa incubação, foi adicionado 10 μ L de botrocetina previamente incubada com glicerol ou

anticorpo anti-botrocetina. A medição da agregação plaquetária foi realizada por 10 minutos.

Ausência de interferência do anticorpo na atividade de outras classes de proteínas do veneno

O anticorpo anti-botrocetina também foi analisado quanto a ligações inespecíficas e decorrente interferência na atividade de outras proteínas presentes no veneno de *B. jararaca*, em especial as metaloproteinases e serinaproteases. Assim, a atividade proteolítica do BjV (1 mg/mL) foi avaliada usando o substrato cromogênico benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA), específico para a atividade de serinaproteases⁸⁹. Os resultados para o BjV incubado com a o anticorpo anti-botrocetina (média de absorbância = 1,4095) não diferiu do observado para o BjV incubado com salina (média de absorbância = 1,3989).

A atividade coagulante do BjV incubado com o anti-botrocetina também foi avaliada usando a dose mínima coagulante (DMC) (Tabela 4)⁹⁰ em *pool* de plasma de ratos. E os valores estabelecidos para a menor concentração de veneno capaz de coagular o plasma em 60 segundos a 37°C. Os resultados observados para BjV com o anticorpo não diferiram do observado do BjV incubado com salina. Em suma, ambos os resultados demonstraram que o anticorpo anti-botrocetina não foi capaz de inibir a atividade das metaloproteinases nem das serinaproteases do veneno.

Tabela 4. Dose Mínima Coagulante (DMC) de incubações do veneno de *B. jararaca*

Incubações do veneno de <i>B. jararaca</i>	DMC (µg/mL)
BjV + Salina	13.26
BjV + Anti-botrocetina	12.55
BjV + IgG não imune	26.24
BjV + Anti-aspercetina	12.41

O BjV foi incubado com o anticorpo anti-botrocetina e também com soluções controles (IgG de coelho não imunizado e solução salina) por 1 hora a 37°C. O BjV também foi incubado com o anticorpo anti-aspercetina, sob as mesmas condições, para a comparação dos resultados. Os valores para a DMC foram estabelecidos para a menor concentração de veneno (BjV) capaz de coagular o plasma (*pool* de plasma de ratos saudáveis) a 37°C em 60 segundos.

ANEXO B

Inibição das metaloproteinases do veneno

Dois inibidores da atividade enzimática das metaloproteinases foram testados no veneno bruto de *B. jararaca*, o Na₂-EDTA, um quelante metálico não específico de metaloproteinases, ou o batimastat (cód. SML0041, Sigma-Aldrich, EUA), um inibidor específico de metaloproteinases. Ambos são amplamente usados nas pesquisas em Toxinologia e são eficientes no bloqueio das atividades coagulante e hemorrágica referentes às metaloproteinases do veneno de *Bothrops*. Para a escolha entre os dois inibidores, a DMC foi determinada para cada um dos venenos tratados com quelantes. A concentração final dos mesmos foi de 13 mM⁴⁶ e 500 µM⁹¹ para Na₂-EDTA e batimastat, respectivamente, para cada 1 mg/mL de veneno bruto de *B. jararaca*. As incubações do veneno foram feitas por 1 hora a 37°C e os testes realizados em triplicata.

Para o controle das inibições, o veneno foi incubado também com salina ou PBS/Tween 80 a 0,01%⁹¹, veículos de diluição do Na₂-EDTA e batimastat, respectivamente. E os valores encontrados para cada um dos inibidores de metaloproteinases foram comparados com o veneno bruto com seus respectivos veículos, incubados sob as mesmas condições.

Desse modo, os valores de DMC encontrados para o veneno incubado com os veículos foram de 13,3 e 12,7 µg/mL, respectivamente para salina e PBS/Tween 80 a 0,01%. Ambos os inibidores demonstraram uma redução da atividade coagulante do veneno, sendo 352,74 e 212,062 µg/mL para o Na₂-EDTA e batimastat respectivamente. Baseado em nossos resultados, o Na₂-EDTA foi escolhido por ter apresentado melhor bloqueio da atividade coagulante do veneno de *B. jararaca*, dentro de nossas condições estabelecidas. Além do mais, o Na₂-EDTA é solúvel em salina, diferentemente do batimastat que é dissolvido em PBS contendo Tween 80 a 0,01% o que iria requerer um grupo controle complementar para o seu veículo.

ANEXO C – Artigo submetido à publicação

A new and rapid method to analyze von Willebrand factor multimers in one day

C. M. Thomazini^{*,§}, R. P. S . Soares[†], T.R.F. Rocha[†], M. L. Santoro^{*,§}

^{*}Instituto Butantan, Laboratório de Fisiopatologia. Av. Dr. Vital Brazil, 1500. 05503-900, São Paulo-SP, Brazil

[§] Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

[†]Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

Word count: 4482

Correspondence should be addressed to:

Dr. Marcelo L. Santoro

Instituto Butantan

Laboratório de Fisiopatologia

Av. Dr. Vital Brazil, 1500

05503-900 São Paulo-SP

Brazil

Tel.: +55 11 2627-9559

e-mail: marcelo.santoro@butantan.gov.br / marcelosantoro@yahoo.com

Essentials

- The analysis of vWF multimer distribution was improved to be performed in 12 h.
- We employed a commercial vertical mini-gel electrophoresis system and a semi-dry transfer unit.
- vWF multimer distribution could be differentiated under normal and pathological conditions.
- The technique can be set up by research and clinical hemostasis laboratories.

Abstract

Von Willebrand disease (vWD) is a very common cause of bleeding worldwide. Analysis of multimer distribution of von Willebrand factor (vWF) is essential to properly classify and treat different types of vWD. Observation of vWF multimers is performed using a sodium dodecyl sulfate (SDS) agarose gel electrophoresis followed by Western blotting, a handmade technique that demands days to be completed and requires skillful execution. Aiming both to facilitate gel production and to short the preparation time, we developed an uncomplicated technique to provide agility in vWF multimer analysis, so that it can be easily accomplished in the routine practice of hemostasis laboratories. On that account, evaluation of vWF multimers was carried out using a commercial vertical mini-gel electrophoresis system for SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and a semi-dry transfer system, which allowed us to analyze vWF multimer distribution of various samples in a period shorter than 12 h. This technique was able to differentiate vWF multimer patterns in human and animal plasmas under normal, congenital and acquired (experimental envenomation by *Bothrops jararaca* snake) conditions. Thus, this new method is cheap, rapid, reproducible, easy to be performed, and it uses electrophoresis and Western blotting systems available in most laboratories. All these advantages encourage hemostasis professionals to use it in their routine practices. In order to facilitate the setup and accomplishment of the whole procedure step by step, videos were appended to the article.

Keywords: bleeding, diagnosis, acquired von Willebrand syndrome, ADAMTS13, electrophoresis, proteolysis.

Introduction

Von Willebrand disease (vWD) was firstly described in 1924 (*apud* [1]), and it is due to a defect in the quantity and/or quality of von Willebrand factor (vWF) [2]. vWD is a prevalent condition, accounting for 25% of the total number of patients identified with bleeding disorders worldwide [3].

vWF is a very large glycoprotein, particularly involved in both platelet recruitment and adhesion to subendothelium under high shear stress, and the transport of blood coagulation factor VIII (FVIII) in circulation. vWF is present in heterologous size in the blood, varying from dimers of ca. 500 kDa to multimers of more than 10,000 kDa, which may contain more than 20 dimer subunits [4, 5]. These multimers are linked by disulfide bonds between thiol groups of cysteine residues, and their normal structure assemble is required to vWF function [6]. The heterogeneity in size is also related to vWF activity, so that the higher molecular weight (HMW) multimers are more functionally active than smaller ones [5, 7, 8].

In virtue of the complexity and heterogeneity of vWF [7, 9], the phenotypic presentation of vWD shows a wide range of clinical manifestation and bleeding risks. Currently, congenital vWD is classified as type 1, 1C, 3, 2A, 2B, 2M, 2C and 3. Patients with type 1 vWD have decreased vWF concentration with nearly normal multimer distribution, whereas type 3 vWD has a complete absence of vWF. Although not presently incorporated in the classification proposed by the International Society on Thrombosis and Haemostasis, most patients with type 1C vWD have an increase in vWF clearance, low VWF levels, a higher response to desmopressin administration, and the presence of HMW multimers in some patients. Qualitative defects are included in type 2 vWD, which is subdivided considering specific dysfunction or structural change in the vWF molecule. Thus, type 2A vWD has impaired platelet adhesion mediated by vWF with a selective deficiency of HMW multimers. Type 2B shows vWF with enhanced affinity to platelet glycoprotein (GP) Ib α , and consequently

patients have different levels of thrombocytopenia. Type 2M vWD is characterized by diminished platelet adhesion dependent on vWF, along with normal levels of HMW multimers. Type 2N vWD has a marked decreased binding of vWF to FVIII [5, 10, 11]. Furthermore, acquired vWD has been described and it has been associated with lymphoproliferative and myeloproliferative disorders, neoplasias, aortic stenosis, and miscellaneous and immunological disorders [12-14]. Thus, physical examination and family history, in consonance with a panel of laboratory tests, are required for a correct diagnosis and treatment. Taking that into consideration, assays are used to determine plasma vWF levels, and vWF structure and function. Quantitative antigenic ELISA (vWF:Ag) measures all forms of vWF in blood. However, vWF:Ag alone does not provide enough data to vWD differentiation, because, even if a patient has normal vWF:Ag level, vWF dysfunction (type 2 vWD) cannot be excluded; in addition, low vWF:Ag levels can be expected in type 1 or 2 vWD. Furthermore, common practice tests useful for detecting vWF activity – e.g., the vWF:ristocetin cofactor (vWF:RCo) assay, the vWF:RCo/vWF:Ag ratio, the FVIII activity assay, the vWF:collagen binding capacity (vWF:CB) assay, and the vWF:CB/vWF:Ag ratio – serve as an important step to classify vWD [15].

Among the tests employed to diagnose vWD, the analysis of vWF multimer distribution is essential to provide an association between vWF structure and function. However, given the complexity of the whole assay, technical difficulties and the long duration to obtain results, this assay is currently performed only in specialized hemostasis centers or as a “second-line testing” in few routine hemostasis laboratories [11, 15]. Particularly, the absence of HMW vWF multimers is associated with defective formation of platelet aggregates. In cases of abnormal *in vivo* vWF proteolysis, which promotes a loss of HMW vWF multimers and a consequent accumulation of low molecular weight vWF multimers in circulation, the evaluation of multimer distribution is critical to the diagnosis [14, 15]. For this reason, the

phenotype of vWF multimer distribution is considered as a gold-standard test, which should be included in the diagnostic procedure for diagnosis and classification of vWD. However, the assay must be rigorously and carefully performed, because poor results can lead to erroneous classification of the vWD type [16].

Due to the high molecular weight nature of vWF, the evaluation of the multimer distribution requires an electrophoretic run on agarose gels, which are more brittle than polyacrylamide ones, and a laborious procedure, which usually takes various days to be completed [15, 17]. Improvements in electrophoresis and protein blotting conditions, allowing the rapid and accurate observation of vWF multimer distribution, could encourage laboratories to implement agarose gel electrophoresis in their routine practice.

Precast agarose gels can shorten the preparation and processing time [18], but as far as we know this system is not commercially available yet. Currently, a semi-automated equipment has been developed to carry out electrophoretic runs and analyses of vWF multimer distribution in one day (Hydragel 5 von Willebrand multimer kit and Hydrasys system, Sebia, France) [19], but, it cannot detect defects in the triplet structure of vWF or acquired vWD [20]. Moreover, each piece of equipment can analyze only five samples per gel in one day [19]. Inasmuch as most of laboratories use commercial vertical electrophoresis systems for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), we reasoned that it could also be used for analysis of vWF multimer distribution. On that account, our objective was (a) to obtain a sensitive and rapid method for the analysis of vWF multimers; (b) to facilitate the preparation of agarose gels by employing a commercial mini-vertical gel system for SDS-PAGE and a semi-dry transfer system; and (c) to setup a procedure that could analyze various samples simultaneously. Therefore, the analysis of the vWF multimer distribution could be implemented in the routine analysis of hemostasis. We report the use of this simplified technique to analyze plasma samples from healthy donors

and vWD carrier patients, and also control and experimental rats and mice. The whole procedure can be completed in only 12 h, with conventional equipment found in most non specialized laboratories.

Material and Methods

Ethics declaration

This study was approved by the Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from adult healthy human donors (CAAE 37958514.8.0000.0086, Ministry of Health, Brazil). One plasma sample from type 2 vWD patient was kindly donated from Dr Paula Ribeiro Villaça (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil). The use of male Wistar rats (250 – 300 g) and C57BL/6 mice (25 – 28 g) followed the guidelines from Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee in Instituto Butantan (CEUAIB 1117/2013). Male Wistar rats and male C57BL/6 mice were obtained from the Animal House, Instituto Butantan, and had free access to water and food.

Reagents

Seakem® HGT(P) agarose was obtained from Lonza (Rockland, USA). Rabbit anti-human vWF antibody was purchased from Dako (A0082, Denmark), the goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor® 647 was from Invitrogen (A21245, USA), and the goat anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase was from Sigma-Aldrich (A0545, USA). Trisodium citrate, Na₂-EDTA, N-ethylmaleimide (04260), AEBSF (A8456), leupeptin (L9783), 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (D5637), and 2-mercaptoethanol (M3148) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Aprotinin (Trasylol®) was obtained from Bayer. Lyophilized crude venom from a pool of adult specimens of *Bothrops jararaca* snake was obtained from the Laboratory of

Herpetology, Instituto Butantan, and *Bothrops* antivenin (lot 1305077) was kindly donated from Butantan Institute. All other reagents were of analytical grade or better.

The composition of solutions used in this protocol is detailed in Table 1.

Envenomation protocol, blood collection and plasma preparation of rat and mouse

Crude *Bothrops jararaca* venom diluted in sterile saline was injected s.c. [1.6 mg/kg b.w [21]] in the dorsal region of rats and mice. Control animals received saline. Blood samples were collected from the abdominal aorta of isoflurane-anesthetized mice and rats at 6 and 24 h after treatment, respectively.

Once vWF multimers are linked by disulfide bonds [22], it is essential to preserve their structure after blood collection using protease inhibitors [23]. Taking this into account, blood samples (9 volumes) were collected in 1 volume of 3.8% trisodium citrate solution containing protease inhibitors. *Bothrops* antivenin (Butantan Institute, lot 1305077) was used to neutralize the *B. jararaca* venom activity *in vitro* (1 volume of antivenin to 99 volumes of whole blood). Poor platelet plasma was obtained by centrifugation at 2500 g for 15 min, and the samples were maintained at room temperature during the whole process. Plasma aliquots were rapidly stored at – 80°C.

vWF profile of samples

The type 2 vWD human patient showed a plasma level of vWF:Ag of 97 U/dL, vWF:RCo of 1 U/mL, vWF:RCo/vWF:Ag of 0.01, and the platelet count was 42×10^9 /L. Previous results from this patient showed a vWF:CB of 46 U/dL. The normal human patient showed a plasma vWF:Ag level of 122 U/dL, and a platelet count of 323×10^9 /L. The envenomed rat showed a plasma vWF:Ag level of 72 U/dL, a vWF:CB of 12.7 U/dL, a vWF:CB/vWF:Ag ratio of 0.18, and a platelet count of 434×10^9 /L. The control rat had a vWF:Ag of 106 U/dL, a vWF:CB of

125 U/dL, a vWF:CB/vWF:Ag ratio of 1.18, and a platelet count of $1,167 \times 10^9/\text{L}$. The envenomed mouse showed a vWF:Ag of 21 U/dL, and a platelet count of $260 \times 10^9/\text{L}$. The control mouse had a vWF:Ag of 116 U/dL, and platelet count of $1,118 \times 10^9/\text{L}$.

Electrophoresis

The protocol for discontinuous SDS-agarose electrophoresis was based on protocols described elsewhere [24, 25]. All procedures of electrophoresis agarose, Western blotting, and development of nitrocellulose membranes are shown in videos (Supplement/reference material).

One rectangular glass plate (10 x 10 cm, code SE262P-5, GE Healthcare Life Sciences) and one notched alumina plate (10 x 8 cm, code SE202N-10, GE Healthcare Life Sciences) were cleaned with alcohol and mounted within mini-gel casters, using 1.5-mm spacers. The mounted set was warmed at 37°C in an incubator for at least 15 min previously to agarose solutions were poured. Running gel contained 1.6% (w/v) high gelling temperature agarose in running gel buffer, and stacking gel contained 0.8% (w/v) high gelling temperature agarose in stacking gel buffer. In order to dilute agarose, buffers were poured in 50-mL centrifuge tubes already containing the weighed agarose powder. Tubes were homogenized, and gel solutions were heated in a 10-liter capacity household microwave (1600 W), set at the maximum power, in the presence of a 200-mL recipient containing water as an energy buffer to absorb excessive microwave energy. Care was taken to avoid boiling the buffer. Once agarose were completely dissolved, the agarose solutions were immediately transferred to the mounted plates in the gel caster using a 5-mL plastic pipette. In order to avoid agarose solidification during the transference process, the tip of this pipette was pre-warmed using hot sterile water. Firstly, the pre-warmed 1.6% agarose solution (approximately 11 mL per set of mounted plates) was poured, until it reached 8.5 cm high from the bottom of the plates.

Secondly, after brief solidification on the bench of the 1.6% agarose solution, the pre-warmed stacking gel (approximately 2.5 mL per set of mounted plates) was poured until it reached 1.2 cm from the top of the running gel. Then a 1.5-mm comb (GE Healthcare Life Sciences, code SE211A-10-1.5), also pre-warmed in the incubator, was immediately inserted into the stacking gel, considering a depth of 0.7 cm for each well (Fig. 1). The mounted plates were maintained at room temperature until gel solidification, and then they were transferred and maintained at 4°C for 30 min. After this period at low temperature, to achieve complete agarose gel solidification, the plates were removed and placed in a precooled mini-vertical gel electrophoresis chamber (Mighty Small SE250/SE260, GE Healthcare Life Sciences), connected to a thermostatic circulator (MultiTemp III, GE Healthcare Life Sciences) maintained at 9°C during the whole electrophoresis procedure. Refrigerated electrode buffer was placed in the inferior and superior cameras of the electrophoresis chamber, which at this point was already cooled at 9°C. The room temperature was set to 18°C to help reducing temperature variation during the electrophoresis run, since we observed, as pointed out elsewhere [26], that a minimal variation in gel temperature can interfere in band definition.

Plasma samples were diluted in sample buffer, taking into account the assayed vWF:Ag levels, so that they reached a final concentration of about 10% in all samples. vWF:Ag levels were determined by ELISA [27]. Following a preincubation at 60°C for 30 min using a dry bath heater, samples (10 µL) were immediately loaded into the gel wells. Plasma preparation should be carried out immediately before submitting samples to electrophoresis, in order to minimize artefacts. Following sample loading, the electrophoresis chamber was set up and wires were plugged into PowerPac Power Supplies (Bio-Rad), and the electrophoresis was run at 10 mA per gel. It took approximately 2 h to the tracking dye (bromophenol blue) exits the gel.

Blotting

Electrophoresis plates were then separated according to the manufacturer's recommendations, and the running gel was soaked in transfer buffer containing 1 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME) [28], and incubated for 30 min at room temperature under homogenization. Thereafter, the gel was washed using transfer buffer without 2-ME, for 15 min at room temperature, previously to initiate the blotting. Proteins were transferred onto 0.2- μ m pore nitrocellulose membranes (Bio-Rad, code 162-0112), which had been previously hydrated in distilled water for 1-2 minutes and maintained in transfer buffer until use. Extra thick blot absorbent filter paper (Bio-Rad) was also presoaked in transfer buffer for 10 minutes before use, and employed to maintain gels in position. A gel sandwich was mounted, beginning with a filter paper, followed by the membrane and the electrophoretic gel, and finishing with another filter paper. Care was taken to remove all air bubbles from each step during the mounting of the sandwich gel. Protein transfer was carried out using a semi-dry transfer system (Trans-Blot SD, Bio-Rad) set at 23 V for 30 min [29]. Once the transfer was finished, the membranes were dried in an incubator (37°C) to fix proteins. If necessary, the procedure may be stopped at this point, by freezing the membranes, so that they can be developed later. Once the membranes are dry, they should be rehydrated with distilled water for the next steps.

Membrane development

To view the vWF multimer distribution, non-specific sites on nitrocellulose membranes were blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in washing buffer for 1 h at room temperature under homogenization. An alternative procedure for this step is an overnight incubation at 4°C. After this incubation, the membrane was washed three times of 3 min each, under homogenization at room temperature, using washing buffer. Then, the

membrane was firstly incubated with the primary antibody (rabbit anti-human vWF antibody, diluted 1:5000 in incubation buffer) for 2 h at room temperature, under homogenization. Following three washings of 5 min each, the membrane was incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor® 647, diluted 1:5000 in incubation buffer) for 1 h at room temperature under homogenization. Finally, the membrane was washed three times, 5 min each, and the fluorescence of bands was detected in a ChemiDoc™ imaging system (Bio-Rad) using the Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad) set for a 647-nm filter. Alternatively, if fluorescence detection is not available, membranes may be incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase and developed with chemiluminescence substrate [30] or 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) [31]. Images from membranes stained with DAB were acquired, processed and analyzed in TotalLab TL100 software (USA) [21].

Densitometry

A detailed quantification of different multimer size should be undertaken by densitometric analysis, and our protocol was based on that described previously [32]. Briefly, densitometric analysis was carried out on captured blotting images (Fig. 2a,b) in TotalLab TL100 software (USA). To individualize the triplets for densitometric analysis, the triplet limits were set at the optical density valley between the adjacent faint side bands of the multimer central band (for small and intermediate multimers) or between 2 central bands (for HMW multimers) [32]. For sake of comparison between samples, from the end to the top of electrophoresis run, multimers were grouped according to their molecular size: peaks 1 to 4 were grouped as low molecular weight (LMW) multimers, peaks 5 and 6 as intermediate multimers, and peaks higher than 7 were grouped as HMW multimers (Fig. 2c,d). The HMW multimer bands were grouped because the multimer band resolution could not provide enough discrimination to

segregate them. The percentages of the optical density values of multimer groups in comparison with the total integrated area of each lane were reported and used for comparison between samples and staining procedures (Fig. 2 c,d).

Results

Improvements in agarose gel electrophoresis and vWF multimer blotting

Electrophoresis is a technique widely used to study the mobility of proteins based on their charge and/or size, and since the first use of SDS-agarose gel to study vWF multimers [33, 34], several modifications have made to improve multimer segregation and to facilitate the procedure [35].

In order to achieve vWF multimer analysis in a period of 12 h, we have improved earlier techniques [24, 25], so that the procedure described herein uses vertical mini-gel electrophoresis and semi-dry protein transfer. Firstly, agarose gel electrophoresis was applied to segregate vWF multimers in a commercial mini-vertical gel system for SDS-PAGE, which expedited the time necessary for electrophoresis, and changed the agarose gel preparation from a laborious procedure to a simpler one. In virtue of the small size of the running gel, 8.5-cm-long, the refrigeration of the electrophoresis chamber was combined with a high current setting, in order to achieve a better resolution of multimer bands. The electrode buffer was also refrigerated before and during its use, avoiding temperature fluctuation in gels [26]. Additionally, samples were collected using an anticoagulant containing protease inhibitors, and the stored plasma was unfrozen only one time before use. We also noticed that the storage of plasma in sample buffer impaired the analysis.

Once vWF multimer analysis uses non-reduced protein samples, previously to electrophoresis, the denaturation temperature in SDS is also an important step to achieve well defined bands. In our experience, prolonged incubation at a lower temperature (30 min at

60°C) provided better results than short incubation at a higher temperature (7 min at 100°C). Thus, taking all these cautions, a great number of multimer bands were observed, at least eleven distinct peaks, in normal plasmas, as well as of the triplet vWF structure [36].

Furthermore, in order to facilitate the technique, to shorten the processing time, and to transfer vWF from multiple gels simultaneously, a semi-dry chamber for protein transference was used. This type of protein transference is not commonly used for vWF analysis because the large size of multimers is less easily blotted onto nitrocellulose membranes [37]. However, to promote a better transfer of HMW multimers to nitrocellulose membranes, the gel was incubated in transfer buffer containing 2-ME immediately after electrophoresis, as previously described [28]. 2-ME reduces disulfide bridges and, in this case, depolymerize vWF *in situ* [37].

Another modification to improve resolution and to expedite analysis was the use of fluorescence probes – which show a higher dynamic and linear range than chemiluminescence [38] –, as they offer higher sensitivity than colorimetric stainings [39]. The use of Alexa Fluor® 647 showed a more intense and consistent result than DAB staining, demonstrating that fluorescence is better recommended for vWF multimer analysis. However, the colorimetric staining can be used for qualitative determination of vWF multimer distribution whenever fluorescence detectors are not available.

vWF multimer distribution in plasma samples from congenital and acquired vWD

Using the modifications described above, no loss of sensitivity in multimer band detection was observed. In fact, as previously mentioned, more than eleven distinguishable multimer peaks were observed for every lane in normal individuals, independently of the species, using detection methodologies based on either fluorescence or DAB (Fig. 2). Moreover, vWF triplet structures [36] could also be discriminated in the images, facilitating the diagnosis of

defective multimerization in some patients with type 2 vWD [40-42]. In addition, results from dozens of samples from animals and normal human plasmas showed reproducible results.

Membranes developed with Alexa Fluor® 647 (Fig. 2a) gave clearer images, low background, and HMW multimer peaks were more easily discriminated by densitometric analysis (Fig. 2c). On the other hand, in membranes stained by DAB the background was higher, and the HMW and intermediate multimer peaks were not quite discriminated (Fig. 2b). However, triplet structures were better observed by DAB (Fig. 2c) and by the respective densitometric analyses of LMW multimers (Fig. 2d) than by Alexa Fluor® 647 (cf. Fig. 2a,c). More coherent results with the clinical and experimental procedures were noticed by Alexa Fluor® 647, since, as shown in Fig. 2c,d, the percentage values for bands stained with Alexa Fluor® 647 and DAB did not match sufficiently well. In general, the percentage values of optical density for the HMW peaks from membranes stained with DAB were lower than those stained with Alexa Fluor® 647, and, on the other hand, were higher for LMW peaks (Fig 2c,d), suggesting that the high background of DAB interfered in the detection of HMW multimers.

By evaluating the absence of HMW multimers and the disproportional low vWF:RCo in comparison to vWF:Ag in the analyzed patient, the condition could be classified as subtype 2A or 2B vWD (Fig. 2a,b, lane 2). In most cases of type 2B vWD, plasma vWF also lacks the HMW multimers, and therefore multimer distribution does not accurately distinguish subtypes 2B from 2A vWD [43]. Once, the patient manifested thrombocytopenia, it suggests type 2B vWD. However, the hyperactive phenotype provided by mutations in platelet GPIb α could lead to a very similar picture to vWD type 2B [44, 45]. Thus, additional tests are necessary to the correct diagnosis.

In the envenomed rat, a similar reduction in HMW multimers, vWF:Ag, vWB:CB, vWF:CB/vWF:Ag ratio, and platelet count suggested the presence of acquired vWD [14] in

experimental *B. jararaca* envenomation. As shown in Fig. 2 (lanes 4 and 6), in the rat and mouse injected with *B. jararaca* venom, the decrease in the optical density of HMW multimers was followed by an increase in that of LMW multimers, indicating that systemic proteolysis of vWF was occurring during envenomation. Plasma ADAMTS13 (a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13) levels from the envenomed rat (72.4 ng/mL) did not differ substantially from the control rat (89.1 ng/mL).

Discussion

Analysis of vWF multimer distribution is essential for an adequate classification of vWD type and can provide valuable information to be considered for patient management. However, this technique has been dismissed in the diagnostic routine practice because, until now, it required a laborious procedure to achieve reliable results.

Our technique provides a well-defined view of all different vWF multimer sizes. Using sensitive methodologies for band detection like fluorescence, it is feasible to accomplish a discriminative quantitative multimer analysis in 12 h. However, independently of the availability of fluorescence or chemiluminescence detecting equipment, the pattern of vWF multimer distribution can also be observed with horseradish peroxidase- or alkaline phosphatase-labeled antibodies, which require a substrate to develop a colored product. The chromogenic method is simple, achieves fast results, and does not require special equipment, but it cannot be used for quantitative analysis, as we have observed, because the poor contrast between the antibody reaction and the background [46]. Wet transfer is preferred for larger protein and it is less likely to dry out the gel [47]. Because of these characteristics, wet transfer is the commonly method used for vWF blotting. However, taking into consideration that semi-dry transfer has the advantage of blotting several gels simultaneously [46], we implemented this protein transfer for agarose gel, as previously

described [29, 48]. Thus, non-specialized laboratories could achieve the results for vWF multimer analysis of a large number of samples in a short period of time. Our main concern was to improve the technique and to speed up the procedure to facilitate its implementation, so that it can be used as a feasible diagnostic tool under clinical or research laboratory conditions. In fact, this technique is very flexible, and more electrophoresis chambers can be connected to a single power supply, so that more wells are available for vWF multimer analysis in a single day. This is in sharp contrast with the reduced quantity of samples (five) available to be analyzed by the new commercial VWF multimer test system in a single day [19].

Compared to previously reports [17, 18, 49], due to the relative short time needed to complete the assay, the laboratory may opt to analyze samples at once and obtain results in only one day, or can divide the task in two parts: in day one, the electrophoresis and protein transfer are performed, and membrane development and band analysis are carried out in day two. In this case, nitrocellulose membranes must be frozen at -20°C, immediately after they have dried in an incubator. Therefore, membranes can be stored and developed when needed.

The absence of HMW multimers and the increase in LMW multimers in rats and mice injected with *B. jararaca* venom suggest the occurrence of systemic vWF proteolysis and/or consumption. The presence of botrocetin in *B. jararaca* venom, which induces vWF consumption *in vivo* [50], or the activity of snake venom metalloproteinases (also belonging to ADAMs family) – which have been reported to degrade vWF unspecifically in distinct points [51, 52] – might be accounted for this phenomenon. However, excessive amounts of plasmin engendered during *B. jararaca* envenomation [53], which have been reported to evoke acquired vWD [14], may also be involved in vWF proteolysis. We are currently investigating

the pathophysiology of vWF alterations during experimental *B. jararaca* envenomation to understand it in more details.

The technique is also suited for multimer analysis in animal plasmas, such as rats and mice, which are commonly used as experimental models for thrombotic and hemorrhagic diseases. However, besides rats and mice, the procedure for vWF multimer analysis described herein can be used apparently to diagnose vWD in other animal species, such as dogs and pigs, which also suffer from vWD [47, 49], and therefore it is also useful for veterinary laboratories.

In conclusion, all the modifications carried out herein on previous protocols shortened the time and facilitated the procedure for vWF multimer analysis in plasma samples. Thus, the whole process took around 12 h to be completed, from gel preparation to membrane development. It is noteworthy that depending on the quantity of samples to be analyzed, more electrophoresis chambers can be used simultaneously, allowing a great number of samples to be analyzed. Fluorophores, due to their sensitivity, are preferred for the analysis, but if photo documentation systems that detect fluorescence are not available, DAB can be used for qualitative vWF multimer analysis. Thus, this technique provides a faster and easier method for the analysis of vWF multimer analysis, allowing it to be set up in non-specialized hemostasis laboratories.

Acknowledgements

This investigation was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants # 2013/25177-0, 2013/20239-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant # 305245/2015-5), and Fundação Butantan.

Author contributions

Conceptualization: MLS, CMT. Performance of experiments: CMT, RPSS, TRFR, MLS. Data review and analysis: CMT, MLS. Funding acquisition and project administration: MLS. General supervision: MLS. The manuscript was written by CMT and MLS, and critically reviewed by all authors.

References

1. Von Willebrand EA. Hereditary pseudohaemophilia. *Haemophilia*. 1999;5:223-31.
2. Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1985;76:1491-500.
3. World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2015. Québec: World Federation of Hemophilia; 2016. 64 p.
4. Fretto LJ, Fowler WE, McCaslin DR, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J Biol Chem*. 1986;261:15679-89.
5. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25:206-16.
6. Dong Z, Thoma RS, Crimmins DL, McCourt DW, Tuley EA, Sadler JE. Disulfide bonds required to assemble functional von Willebrand factor multimers. *J Biol Chem*. 1994;269:6753-8.
7. Springer TA. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*. 2014.
8. Federici AB, Bader R, Pagani S, Colibretti ML, De Marco L, Mannucci PM. Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol*. 1989;73:93-9.
9. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125:2019-28.
10. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, Manco-Johnson MJ, Gill JC, Montgomery RR. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood*. 2006;108:3344-51.
11. Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood*. 2015;125:2029-37.

12. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2003;349:343-9.
13. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE, Subcommittee on von Willebrand F. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost*. 2000;84:345-9.
14. Budde U, Scheppenheim S, Dittmer R. Treatment of the acquired von Willebrand syndrome. *Expert review of hematology*. 2015;8:799-818.
15. Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update. *Pathology*. 2016;48:303-18.
16. Favaloro EJ. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011;22:553-64.
17. Pruthi RK, Daniels TM, Heit JA, Chen D, Owen WG, Nichols WL. Plasma von Willebrand factor multimer quantitative analysis by in-gel immunostaining and infrared fluorescent imaging. *Thromb Res*. 2010;126:543-9.
18. Pasotti F, Martini G, Caimi L, Ricotta D. von Willebrand Factor multimers profiling with a semi-automated system. *Electrophoresis*. 2013;34:818-24.
19. Favaloro EJ, Oliver S. Evaluation of a new commercial von Willebrand factor multimer assay. *Haemophilia*. 2017;23:e373-e7.
20. Seidel H, Westhofen P, Bautista H, Beaulieu G, Nouadje G, Kruppenbacher JP. Clinical evaluation of the Sebia Hydragel von Willebrand factor assay in comparison to electrophoresis and blotting based multimer analysis. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2017;1 (Supplement S1, Abstracts of the XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, July 8-13, 2017):717-8.
21. Yamashita KM, Alves AF, Barbaro KC, Santoro ML. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2814.
22. Counts RB, Paskell SL, Elgee SK. Disulfide bonds and the quaternary structure of factor VIII/von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1978;62:702-9.
23. Lopes AA, Soares RP, Maeda NY. A mathematical framework for group analysis of von Willebrand factor multimeric composition following luminography. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1259-63.
24. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepp M, Golderer G, Sieberer A, Spannagl M, Scheibe B, Perkhof S, Will K, Budde U. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am J Clin Pathol*. 2010;133:322-30.
25. Laffan M, Manning R. Investigation of haemostasis. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM, editors. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. Vol. 11 ed ed: Elsevier; 2011. p. 393-445.
26. Smejkal GB, Shainoff JR, Kottke-Marchant KM. Rapid high-resolution electrophoresis of multimeric von Willebrand Factor using a thermopiled gel apparatus. *Electrophoresis*. 2003;24:582-7.
27. Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb Haemost*. 2004;92:369-83.
28. Weiss DR, Thiel C, Strasser EF, Zimmermann R, Eckstein R. An optimized electrophoresis method for high-resolution imaging of von-Willebrand multimers. *Thromb Haemost*. 2008;100:949-51.
29. Johnstone IB. Multimeric Analysis of Von Willebrand Factor in Animal Plasmas Using Sodium Dodecyl Sulfate Agarose Gel Electrophoresis, Semidry Electrotransfer, and Immunoperoxidase Detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1997;9:314-7.
30. Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. 726 p.

31. Pukac LA, Carter JE, Morrison KS, Karnovsky MJ. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. *Biotechniques*. 1997;23:385-8.
32. Studt JD, Budde U, Schneppenheim R, Eisert R, von Depka Prondzinski M, Ganser A, Barthels M. Quantification and facilitated comparison of von Willebrand factor multimer patterns by densitometry. *Am J Clin Pathol*. 2001;116:567-74.
33. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest*. 1980;65:1318-25.
34. Hoyer LW, Shainoff JR. Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood*. 1980;55:1056-9.
35. Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*. 2002;28:173-90.
36. Fischer BE, Thomas KB, Schlokot U, Dorner F. Triplet structure of human von Willebrand factor. *Biochem J*. 1998;331 (Pt 2):483-8.
37. Bowen DJ, Bowley SJ. Improved visualisation of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007.
38. Gorr TA, Vogel J. Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues. *Proteomics Clinical applications*. 2015;9:396-405.
39. Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 2000;21:1123-44.
40. Gralnick HR, Williams SB, McKeown LP, Maisonneuve P, Jenneau C, Sultan Y. A variant of type II von Willebrand disease with an abnormal triplet structure and discordant effects of protease inhibitors on plasma and platelet von Willebrand factor structure. *Am J Hematol*. 1987;24:259-66.
41. Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Schwaab R, Oldenburg J. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood*. 2001;97:2059-66.
42. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. 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*. 1986;77:947-51.
43. Sadler JE, Lillicrap D. von Willebrand disease: diagnosis, classification, and treatment. In: Marder JV, Aird CW, Bennett JS, Schulman S, White II GC, editors. *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and clinical Practice*. Vol. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, WoltersKluwer; 2013. p. 670-83.
44. Takahashi H, Handa M, Watanabe K, Ando Y, Nagayama R, Hattori A, Shibata A, Federici AB, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Further characterization of platelet-type von Willebrand's disease in Japan. *Blood*. 1984;64:1254-62.
45. Miller JL, Cunningham D, Lyle VA, Finch CN. Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4761-5.
46. Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods*. 2003;274:1-15.
47. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012;4:429-34.
48. Dalton RG, Lasham A, Savidge GF. A new rapid semi-dry blotting technique for multimeric sizing of von Willebrand factor. *Thromb Res*. 1988;50:345-9.
49. Denis CV, Wagner DD. Insights from von Willebrand disease animal models. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56:977-90.

50. Sanders WE, Read MS, Reddick RL, Garris JB, Brinkhous KM. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin - an animal model. *Lab Invest.* 1988;59:443-52.
51. Serrano SM, Wang D, Shannon JD, Pinto AF, Polanowska-Grabowska RK, Fox JW. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *Febs J.* 2007;274:3611-21.
52. Kamiguti AS, Cardoso JLC, Theakston RDG, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, Warrell DA, Hay CRM. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon.* 1991;29:961-72.
53. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JLC, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, Morena P, Tomy SC, Antonio LC, Mihara H, Kelen EMA. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thromb Haemost.* 1990;63:449-53.

Table 1. Solutions used for evaluation of vWF multimers using SDS-agarose gel electrophoresis and Western blotting.

Blood sample anticoagulant	3.8% trisodium citrate containing 50 mM Na ₂ EDTA, 60 mM N-ethylmaleimide, 5000 U/mL aprotinin, 10 mM AEBSF, and 280 μ M leupeptin
Sample buffer	10 mM Tris, 1 mM Na ₂ EDTA, 2% SDS, 20% glycerol, and 2 mg/mL bromophenol blue (pH was not adjusted)
Running gel buffer	0.1 M Tris, 0.1 M glycine, and 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
Running gel	1.6% (w/v) of high gelling temperature agarose in running gel buffer
Stacking gel buffer	70 mM Tris, 4 mM Na ₂ EDTA, and 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
Stacking gel	0.8% (w/v) of high gelling temperature agarose in stacking gel buffer
Electrode buffer	50 mM Tris, 384 mM glycine, and 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3 (not adjusted)
Transfer buffer	48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.037% SDS, pH 9.2 (not adjusted)
Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl, 1.47 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM Na ₂ HPO ₄ , and 2.7 mM KCl, pH 7.4
Washing buffer	PBS, pH 7.4, containing 0.1% Tween 20
Membrane blocking solution and incubation buffer for antibodies	5% nonfat dry milk in washing buffer
Development solution for DAB staining	5 mg of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dissolved in 10 mL of 0.1 M imidazole buffer (pH 7.0), and adding 125 μ L of 0.2 M CoCl ₂ and 3.4 μ L of 30% H ₂ O ₂

Figure legends

Figure 1: Dimensions of the stacking gel, running gel and well depth for the current protocol, using a Mighty Small SE250/SE260 electrophoresis system (GE Healthcare Life Sciences).

Figure 2. vWF multimer distribution and densitometric analyses of plasmas from different species (human, rat, and mouse) after discontinuous SDS-agarose electrophoresis and blotting to nitrocellulose membranes. The dye front is at the bottom of the gel. Multimer distribution was observed using antibodies conjugated with Alexa Fluor® 647 (**a**), or horseradish peroxidase (**b**) followed by staining with DAB. Samples: control plasmas from human (lane **1**), rat (lane **3**), and mouse (lane **5**) individuals, showing normal multimer distribution; plasma sample from human patient with type 2 vWD (lane **2**), showing lack of HMW multimers; plasma samples from a rat (lane **4**) and a mouse (lane **6**) injected with *B. jararaca* snake venom, depicting loss of HMW multimers, suggestive of acquired vWD. Densitometric analyses of lanes 1-6 stained by Alexa Fluor® 647 (**c**) or DAB (**d**) are shown in right side of the respective membrane images. Percentage values of multimer groups are shown inside the respective areas in densitometric graphs. The final concentration of vWF:Ag in each lane was adjusted to a better observation of bands.

Figure legends

Figure 1: Dimensions of the stacking gel, running gel and well depth for the current protocol, using a Mighty Small SE250/SE260 electrophoresis system (GE Healthcare Life Sciences).

Figure 2. vWF multimer distribution and densitometric analyses of plasmas from different species (human, rat, and mouse) after discontinuous SDS-agarose electrophoresis and blotting to nitrocellulose membranes. The dye front is at the bottom of the gel. Multimer distribution was observed using antibodies conjugated with Alexa Fluor® 647 (**a**), or horseradish peroxidase (**b**) followed by staining with DAB. Samples: control plasmas from

human (lane **1**), rat (lane **3**), and mouse (lane **5**) individuals, showing normal multimer distribution; plasma sample from human patient with type 2 vWD (lane **2**), showing lack of HMW multimers; plasma samples from a rat (lane **4**) and a mouse (lane **6**) injected with *B. jararaca* snake venom, depicting loss of HMW multimers, suggestive of acquired vWD. Densitometric analyses of lanes 1-6 stained by Alexa Fluor® 647 (**c**) or DAB (**d**) are shown in right side of the respective membrane images. Percentage values of multimer groups are shown inside the respective areas in densitometric graphs. The final concentration of vWF:Ag in each lane was adjusted to a better observation of bands.

8 REFERÊNCIAS

1. Arnold, C. The snakebite fight. *Nature* **537**, 26-28 (2016).
2. Ruha, A.M., *et al.* The Epidemiology, Clinical Course, and Management of Snakebites in the North American Snakebite Registry. *Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology* **13**, 309-320 (2017).
3. Chippaux, J.P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases* **11**, e0005662 (2017).
4. Saúde, M.d. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. (2001).
5. Aird, S.D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* **40**, 335-393 (2002).
6. Calvette, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B. & Gutiérrez, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters* **583**, 1736-1743 (2009).
7. Cidade, D.A.P., *et al.* Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* **48**(2006).
8. Takeda, S., Takeya, H. & Iwanaga, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 164-176 (2012).
9. Takeda, S. ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. *Toxins* **8**(2016).
10. Sajevec, T., Leonardi, A. & Krizaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* **57**, 627-645 (2011).
11. Serrano, S.M., *et al.* Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. *The FEBS journal* **274**, 3611-3621 (2007).
12. Sano-Martins, I. & Santoro, M.L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. 289-309 (2003).
13. Santoro, M.L., *et al.* Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, Bothrops jararaca, in Brazil. *Toxicon* **51**, 1440-1448 (2008).
14. Kamiguti, A.S., *et al.* Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* **29**, 961-972 (1991).
15. Santoro, M.L. & Sano-Martins, I.S. Platelet dysfunction during Bothrops jararaca snake envenomation in rabbits. *Thrombosis and haemostasis* **92**, 369-383 (2004).
16. Otero, R., *et al.* Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* **40**, 1107-1114 (2002).
17. Isbister, G.K. Snakebite doesn't cause disseminated intravascular coagulation: coagulopathy and thrombotic microangiopathy in snake envenoming. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **36**, 444-451 (2010).
18. Du, X.Y., Sim, D.S., Lee, W.H. & Zhang, Y. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood cells, molecules & diseases* **36**, 414-421 (2006).
19. Cardoso, J.L.C., *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (Bothrops jararaca) in Sao Paulo, Brazil. *Quarterly Journal of Medicine* **86**, 315-325 (1993).

20. Maruyama, M., *et al.* Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thrombosis and haemostasis* **63**, 449-453 (1990).
21. Rosenfeld, G., Kelen, E.M.A. & Nahas, L. Regeneration of fibrinogen after defibrination by Bothropic venom in man and in dogs. Relationships with clotting and bleeding time. *Rev Clin S Paulo* **34**, 36-44 (1958).
22. Haberichter, S.L. von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility. *Blood* **126**, 1753-1761 (2015).
23. Shelton-Inloes, B.B., Titani, K. & Sadler, E. cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry* **25**, 3164-3171 (1986).
24. Yee, A. & Kretz, C.A. von Willebrand factor: form for function. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **40**, 17-27 (2014).
25. Luo, G.P., Ni, B., Yang, X. & Wu, Y.Z. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta haematologica* **128**, 158-169 (2012).
26. Lenting, P.J., Christophe, O.D. & Denis, C.V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* **125**, 2019-2028 (2015).
27. Vischer, U.M., *et al.* Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) levels. *Thrombosis and haemostasis* **77**, 387-393 (1997).
28. Matsui, T. & Hamako, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. *Toxicon* **45**, 1075-1087 (2005).
29. Huck, V., Schneider, M.F., Gorzelanny, C. & Schneider, S.W. The various states of von Willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. *Thrombosis and haemostasis* **111**, 598-609 (2014).
30. Christopher, N.G., Motto, D.G. & Di Paola, J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood* **125**, 2029-2037 (2015).
31. Favaloro, E.J. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **22**, 553-564 (2011).
32. Sharma, R. & Flood, V.H. Advances in the diagnosis and treatment of Von Willebrand disease. *Blood* **130**, 2386-2391 (2017).
33. Federici, A.B., *et al.* Acquired von Willebrand Syndrome: data from an international registry. *Thrombosis and Hemostasis* **84**, 345-349 (2000).
34. Zheng, X.L. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annual review of medicine* **66**, 211-225 (2015).
35. Budde, U. & Schneppenheimer, R. Interactions of von Willebrand factor and ADAMTS13 in von Willebrand disease and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie* **34**, 215-225 (2014).
36. Malbranque, S., *et al.* Case report fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the fer-de-lance pit viper *Bothrops lanceolatus* of Martinique. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 856-861 (2008).
37. Senise, L.V., Yamashita, K.M. & Santoro, M.L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Experimental biology and medicine* **240**, 1528-1536 (2015).
38. Kobayashi, T., *et al.* ADAMTS13 related markers and von Willebrand factor in plasma from patients with thrombotic microangiopathy (TMA). *Thrombosis research* **121**, 849-854 (2008).

39. Arlinghaus, F.T. & Eble, J.A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon* **60**, 512-519 (2012).
40. Fujimura, Y., *et al.* Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* **30**, 1957-1964 (1991).
41. Sanders, W.E., Read, M.S., Reddick, R.L., Garriss, J.B. & Brinkhous, K.M. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. *Laboratory Investigation* **59**, 443-452 (1988).
42. Rucavado, A., *et al.* Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by Bothrops asper snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thrombosis and haemostasis* **94**, 123-131 (2005).
43. Moura-da-Silva, A.M. & Baldo, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* **60**, 280-289 (2012).
44. Denis, C., *et al.* A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9524-9529 (1998).
45. Truett, G.E., *et al.* Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* **29**, 52-54 (2000).
46. Yamashita, K.M., Alves, A.F., Barbaro, K.C. & Santoro, M.L. Bothrops jararaca venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. *PLoS neglected tropical diseases* **8**, e2814 (2014).
47. Lopes, A.A., Spoares, R.P.S. & Maeda, N.Y. A mathematical framework for group analysis of von Willebrand factor multimeric composition following luminography. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **35**, 1259-1263 (2002).
48. Ratnoff, A.D. & Menzie, C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **37**, 316-320 (1951).
49. Read, M.S., Potter, J.Y. & Brinkhous, K.M. Venom coagglutinin for detection of von Willebrand factor activity in animal plasmas. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **101**, 74-82 (1983).
50. Brinkhous, K.M., Thomas, B.D., Ibrahim, S.A. & Read, M.S. Plasma levels of platelet aggregating factor/von Willebrand factor in various species. *Thrombosis research* **11**, 345-355 (1977).
51. Favalaro, E.J., Grispo, L., Dinale, A., Berndt, M. & Koutts, J. von Willebrand's disease: laboratory investigation using an improved functional assay for von Willebrand factor. *Pathology* **25**, 152-158 (1993).
52. Weiss, D.R., Thiel, C., Strasser, E.F., Zimmermann, R. & Eckstein, R. An optimized electrophoresis method for high-resolution imaging of von-Willebrand multimers. *Thrombosis and haemostasis* (2008).
53. Harlow, E. & Lane, D. in *Antibodies: a laboratory manual* 471-510 (Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, 1988).
54. Studt, J.D., *et al.* Quantification and facilitated comparison of von Willebrand factor multimer patterns by densitometry. *American journal of clinical pathology* **116**, 567-574 (2001).
55. Hoaglin, D.C. & Iglewicz, B. Fine-tuning some resistant rules for outliers. *Journal of the American Statistical Association* **82**, 1147-1149 (1987).
56. Jain, S., Gautam, V. & Naseem, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences* **3**, 118-127 (2011).

57. Mamede, C.C., *et al.* Comparative analysis of local effects caused by Bothrops alternatus and Bothrops moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon* **117**, 37-45 (2016).
58. Moreira, V., Teixeira, C., Borges da Silva, H., D'Imperio Lima, M.R. & Dos-Santos, M.C. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by Bothrops atrox snake venom. *Toxicon* **118**, 121-128 (2016).
59. Leader, A., Pereg, D. & Lishner, M. Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Annals of Medicine* **44**, 805-816 (2012).
60. Schmoeller, D., Picarelli, M.M., Paz Munhoz, T., Poli de Figueiredo, C.E. & Staub, H.L. Mean Platelet Volume and Immature Platelet Fraction in Autoimmune Disorders. *Frontiers in medicine* **4**, 146 (2017).
61. Favaloro, E.J., Pasalic, L. & Curnow, J. Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update. *Pathology* **48**, 303-318 (2016).
62. Crawley, J.T.B., *et al.* Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* **105**(2005).
63. Brophy, T.M., *et al.* Plasmin Cleaves Von Willebrand Factor at K1491-R1492 in the A1-A2 Linker Region in a Shear- and Glycan-Dependent Manner In Vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **37**, 845-855 (2017).
64. Shin, Y., *et al.* Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by plasmin in human plasma: risk of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of biochemistry* (2017).
65. Niewiarowski, S., Kirby, E.P., Brudzynski, T.M. & Stocker, K. Trombocytin, a serine protease from Bothrops atrox venom: interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* **18**, 3570-3577 (1979).
66. Chacon, F., *et al.* The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against Bothrops asper snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon* **93**, 41-50 (2015).
67. Denis, C.V. & Wagner, D.D. Insights from von Willebrand disease animal models. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 977-990 (1999).
68. Denis, C.V., Andre, P., Saffaripour, S. & Wagner, D.D. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4072-4077 (2001).
69. Matsui, T., Hamako, J. & Titani, K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. *Toxins* **2**, 10-23 (2010).
70. de Queiroz, M.R., *et al.* The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* **133**, 33-47 (2017).
71. Fukuda, K., *et al.* Structural basis on von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. *Structure* **10**, 943-950 (2002).
72. Fukuda, K., Doggett, T., Laurenzi, I.J., Liddington, R.C. & Diacovo, T.G. The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation. *Nature structural & molecular biology* **12**, 152-159 (2005).
73. Lof, A., Muller, J.P. & Brehm, M.A. A biophysical view on von Willebrand factor activation. *Journal of cellular physiology* **233**, 799-810 (2018).
74. Nishio, K., Anderson, P.J., Zheng, X.L. & Sadler, J.E. Binding of platelet glycoprotein Ibalpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10578-10583 (2004).

75. Groot, R., Lane, D.A. & Crawley, J.T.B. The role of the ADAMTS13 cysteine-rich domain in VWF binding and proteolysis. *Blood* **125**, 1968-1975 (2015).
76. Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S. & Chamone, D.A.F. In vivo platelet activation induced by *Bothrops jararaca* venom in rabbits. *Platelets* **5**, 162-170 (1994).
77. Terraube, V., O'Donnell, J.S. & Jenkins, P.V. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* **16**, 3-13 (2010).
78. Hartholt, R.B., *et al.* To serve and protect: The modulatory role of von Willebrand factor on factor VIII immunogenicity. *Blood reviews* (2017).
79. Reuken, P.A., *et al.* Imbalance of von Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13 during systemic inflammation superimposed on advanced cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **35**, 37-45 (2015).
80. Fox, L.C., *et al.* Consensus Opinion on Diagnosis and Management of Thrombotic Microangiopathy in Australia and New Zealand. *Internal medicine journal* (2018).
81. Page, E.E., Hovinga, J.A.K., Terrell, D.R., Vesely, S.K. & George, J.N. Thrombotic thrombocytopenic purpura: diagnostic criteria, clinical features, and long-term outcomes from 1995 through 2015. *Blood Advances* **1**, 590-600 (2017).
82. Serrano, S.M.T., *et al.* A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Archives of biochemistry and biophysics* **367**, 26-32 (1999).
83. Hanna, S.L., Sherman, N.E., Kinter, M.T. & Goldberg, J.B. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* **146**, 2495-2508 (2000).
84. Smith, P.K., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85 (1985).
85. Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987).
86. McKinney, M.M. & Parkinson, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *Journal of Immunological Methods* **96**, 271-278 (1987).
87. Rucavado, A., *et al.* Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Thrombosis and haemostasis* **85**, 710-715 (2001).
88. Pukac, L.A., Carter, J.E., Morrison, K.S. & Karnovsky, M.J. Enhancement of diamino-benzidine colorimetric signal in immunoblotting. *BioTechniques* **23**, 385-388 (1997).
89. Antunes, T.C., Yamashita, K.M., Barbaro, K.C., Saiki, M. & Santoro, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* **56**, 1443-1458 (2010).
90. Theakston, R.D.G. & Reid, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* **61**, 949-956 (1983).
91. Rucavado, A., *et al.* Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating CaNa₂EDTA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **63**, 313-319 (2000).