



GLEICE REGINA DE SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO HEME LIVRE
SOBRE A ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO E SOBRE A
QUEBRA DE BARREIRA ENDOTELIAL

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO HEME LIVRE
SOBRE A ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO E SOBRE A
QUEBRA DE BARREIRA ENDOTELIAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de Concentração Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA GLEICE REGINA DE SOUZA E ORIENTADA PELO PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA.

Assinatura do Orientador

Campinas
2014
iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89a Souza, Gleice Regina de, 1990-
Avaliação in vitro dos efeitos do Heme livre sobre ativação da coagulação e sobre a quebra de barreira endotelial. / Gleice Regina de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Erich Vinicius de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Heme. 2. Trombofilia. 3. Anemia falciforme. 4. Hemostasia. 5. Testes de coagulação sanguínea. I. Paula, Erich Vinicius de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: In vitro assessment of the effect of free Heme on activation of coagulation and breach of endothelial barrier.

Palavras-chave em inglês:

Heme

Thrombophilia

Sickle cell disease

Hemostasis

Blood coagulation tests

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Paula Ribeiro Villaça

Camila Almeida

Data de defesa: 19-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GLEICE REGINA DE SOUZA

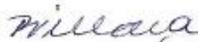
ORIENTADOR(A): PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS:

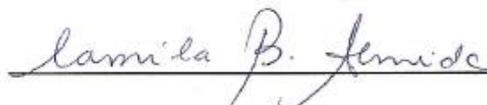
1. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA



2. PROF. DR. PAULA RIBEIRO VILLAÇA



3. PROF. DR. CAMILA ALMEIDA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19 de setembro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu noivo e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar as minhas palavras agradecendo primeiramente à Deus que me presenteou com esta rica oportunidade de fazer uma pós-graduação e agora de poder finalizá-la.

Quero agradecer aos meus pais, que ao longo da jornada, fizeram tudo que podiam para me proporcionar o melhor do estudo e hoje finalizando essa fase, sei que eles estão se sentindo com o dever cumprido. Não só me instruíram em tudo, mas também me apoiaram e estiveram ao meu lado em todo tempo, para me ensinar e me dizer com sabedoria quais seriam os passos a serem tomados. Obrigada pela paciência, amor e dedicação que vocês me proporcionaram e continuam me proporcionando durante todos esses anos.

Também quero expressar a minha gratidão ao meu noivo Felipe, que sempre apoiou as minhas decisões e me incentivou durante todo este período. Obrigada pelas compreensões, pela dedicação em me ouvir quando precisei e por sempre me aconselhar no melhor. Obrigada por estar ao meu lado mesmo em situação difícil que passamos relacionada à saúde de seu pai.

Não menos especial, mas que são muito importantes e que vão deixar muita saudade, aos meus amigos do Laboratório de Hemostasia, os quais eu aprendi a amar, a cultivar essa boa amizade, que se tornou pra mim tão especial. Obrigada pela companhia, pelo carinho, pelas risadas e choros quando mais precisei. Vocês deixaram em mim uma marca muito importante, e com certeza sentirei uma saudade imensa, e quero deixar aqui os meus agradecimentos.

Também a pessoas especiais deste mesmo grupo de amigos, como: Maiara, Vanessa, Aline Barnabé, Kiara, Bruna Mazzeto e Isadora, que sempre estiveram mais próximas e que se tornaram minhas irmãs. Sou grata por vocês terem feito parte da minha história, e com certeza vou levar dentro de mim a amizade calorosa e as boas lembranças destes momentos.

Aos funcionários do laboratório de Hemostasia: Devanira, Cristina, Tânia, Silmara, José Luis, Ricardo, Helder e Priscila.

Aos amigos e colegas que conquistei no laboratório de Biologia Molecular e Genoma, obrigada por me proporcionarem crescimento profissional e intelectual.

E por fim, quero agradecer ao meu orientador, Dr. Erich, que confiou a mim essa responsabilidade. Agradecer por demonstrar a todos nós, seus orientandos, o que é realmente ser um pesquisador e um ótimo orientador. Com certeza, suas experiências nos ensinaram e nos fizeram crescer em conhecimento intelectual e pessoal. Tenho convicção de que não há palavras que expressem a minha gratidão por esses 3 anos em que estive sob sua supervisão e orientação. O que posso fazer mais uma vez é dizer, muito obrigada por tudo.

Este estudo foi financiado com recurso fornecido pela FAPESP, bolsa de mestrado número 2012/10859-6.

RESUMO

Há cerca de 50 anos sabe-se que pacientes com anemia falciforme (AF) apresentam maiores concentrações plasmáticas de heme livre. Recentemente, foi demonstrado que o heme é capaz de ativar a resposta imune inata, desencadeando resposta dependente de receptores “Toll-like”, envolvendo a expressão de vários genes pró-inflamatórios. Em consonância com estes achados, o papel pró-inflamatório do heme foi confirmado em diferentes modelos experimentais de AF, colocando este metabólito como potencial desencadeante da oclusão microvascular e síndrome torácica aguda. Tromboses micro e macro vasculares são características da AF, e o papel do heme na patogenia destes eventos foi recentemente sugerido pela demonstração de sua capacidade de induzir a expressão de fator tecidual (FT) em células endoteliais e monócitos. No entanto, a relevância funcional da expressão deste achado ainda não foi demonstrada através de marcadores clinicamente relevantes da coagulação. **Métodos:** A expressão do FT induzida pelo heme foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) através de dois ensaios globais da hemostasia: tromboelastometria (TEM) e teste de geração de trombina (TGT). Sangue de voluntários saudáveis foram coletados por uma veia antecubital com mínima estase em tubos de citrato de sódio (1:10) ou heparina. A TEM foi realizada em amostras de sangue total (n=10) incubadas com 30 µM do heme (Sigma–Aldrich) durante 4 horas a 37°C, em um equipamento ROTEM (Pentapharm). A coagulação foi ativada pela adição de CaCl₂. Como controle, amostras dos mesmos indivíduos foram incubadas concomitantemente com o veículo (n=10). O TGT foi realizado em amostras de plasma duplamente centrifugadas, separadas a partir de sangue total estimulado com heme ou veículo sob as mesmas condições (n=16). A TGT foi realizada utilizando flurímetro Fluoroskan Ascent® (Thermolab). A coagulação foi

ativada com FT (5pM) e fosfolipídios (Reagente PPP, Thrombinoscope). A expressão de FT foi avaliada por qRT-PCR. PBMC e neutrófilos foram separados por centrifugação de gradiente de densidade (Ficoll) e então incubados com 30 uM de heme (n=6) ou salina (n=6) por 24hs. Teste estatístico não-paramétrico foi utilizado em todas as análises.

Resultados: a incubação do sangue total com 30 uM de heme resultou numa potente indução de expressão de FT quando comparado com o veículo em PBMC (AU) ($0,03 \pm 0,06$ vs $1,18 \pm 0,60$; $P=0,03$). Não foi possível detectar a expressão de FT em neutrófilos. A ativação da coagulação induzida pelo heme pode ser demonstrada através da TEM. O Heme diminuiu significativamente o tempo de coagulação (seg) ($562,1 \pm 88,2$ vs $387 \pm 84,3$; $P=0,002$) e a MaxV-t (tempo para a velocidade máxima) ($651,4 \pm 119,2$ vs $451,1 \pm 87,4$; $P=0,002$), que são dois indicadores de um estado de hipercoagulabilidade. Uma tendência para a diminuição do tempo de formação do coágulo também pode ser observada ($P=0,07$). Nenhuma diferença pode ser observada na área sob a curva da TEM. Um perfil de hipercoagulabilidade, também foi observado no TGT. Mudanças estatisticamente significativas, compatíveis com a ativação da coagulação foram observadas em parâmetros como: pico de trombina (aumentado), tempo para atingir a trombina (diminuição), índice de velocidade (aumento), período de latência (diminuição) e StarTail (diminuição) (todos $<0,05$). Nenhuma mudança estatisticamente significativa pode ser observada no parâmetro de pontencial endógeno de trombina. **Discussão e**

Conclusão: A TEM e o TGT são dois testes globais em hemostasia, amplamente utilizados para avaliação de estados de hipo e hipercoagulabilidade. Ambos os métodos tem sido utilizados em pacientes com AF, que apresentam estado de hipercoagulabilidade similar ao encontrado em nosso trabalho, caracterizada por um início mais rápido da ativação da coagulação. Nossos resultados demonstram pela primeira vez que o heme, em concentrações semelhantes às observadas em pacientes com AF, é capaz de

estimular não só a expressão do TF em PBMC, mas também de alterar o equilíbrio da coagulação para um estado de hipercoagulabilidade. Estes resultados fornecem um suporte adicional à hipótese de que o heme é um mediador chave na trombose micro e macro vascular na AF e, possivelmente, em outras doenças hemolíticas.

Nosso estudo também avaliou de forma preliminar, o efeito do heme sobre a fosforilação do resíduo S879 da proteína p120-catenina, como um marcador indireto da quebra de barreira endotelial. Os resultados, ainda preliminares, sugerem que pode haver um efeito do heme sobre a integridade de barreira endotelial, fato que será investigado em estudos futuros.

ABSTRACT

It has been known for more than 50 years that patients with sickle cell disease (SCD) present higher plasma concentrations of heme. More recently, it was shown that heme is capable to activate innate immune response, and to trigger a toll-like receptor-dependent response that involves the expression of several pro-inflammatory genes. Accordingly, the role of heme as critical inflammatory mediator in SCD has been confirmed in different experimental models, suggesting that heme can be a trigger for microvascular occlusion and acute chest syndrome (ACS). The association between innate immune response and coagulation activation dates back to 450 million years in evolution, so that activation of the former is frequently accompanied by activation of the latter. Micro and macrovascular thrombosis are a hallmark of SCD, and the role of heme in the pathogenesis of these events has been recently suggested by demonstrations of heme-induced expression of tissue factor (TF) by endothelial cells and monocytes. However, the functional relevance of heme-induced TF expression on clinically-relevant coagulation markers has not been demonstrated. **Methods:** herein we evaluated heme-induced TF expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and used two different global assays of hemostasis, namely thromboelastometry (TEM) and Thrombin Generation Test (TGT) to evaluate the effect of heme on coagulation activation. Blood from healthy volunteers was drawn from an antecubital vein with minimal stasis in 0.106 sodium citrate tubes (1:10) or heparin. TEM was performed in whole-blood samples (n=10) incubated with 30 μ M heme (Sigma-Aldrich) for four hours at 37°C, in a ROTEM equipment (Pentapharm). Coagulation was activated with the addition of CaCl₂. Samples from same individuals incubated with vehicle were assayed concomitantly as controls (n=10). TGT was performed in double centrifuged plasma samples, separated from whole blood

stimulated with heme or vehicle under the same conditions (n=16). TGT was performed using a Fluoroskan Ascent Flourimeter (Thermolab). Coagulation was activated with TF (5pM) and phospholipids (PPP reagent, Thrombinoscope). Expression of TF was evaluated by qRT-PCR. Heparin-anticoagulated blood was incubated with 30 μ M heme (n=6) or vehicle (n=6) for 24 hours. PBMC and neutrophils were then separated by density gradient centrifugation (Ficoll). Non-parametric statistics were used in all analysis.

Results: incubation of whole blood with heme 30 μ M resulted in a potent induction of TF expression in PBMC compared to vehicle (AU)(0.03 \pm 0.06 vs 1.18 \pm 0.60; P=0.03). No TF expression could be detected in neutrophils. Heme-induced coagulation activation could be demonstrated by TEM. Heme significantly decreased the coagulation time (sec) (562.1 \pm 88.2 to 387 \pm 84.3; P=0.002) and the MaxV-t (time to maximum velocity) (651.4 \pm 119.2 to 451.1 \pm 87.4 ; P=0.002), which are two indicators of shift towards a hypercoagulable profile. A trend towards a lower clot formation time was also observed (P=0.07). No difference could be observed in the area under the TEM curve. A hypercoagulable profile was also observed in TGT in samples incubated with heme. Statistically significant changes compatible with a shift towards coagulation activation were observed in parameters such as peak thrombin (increased), time to peak thrombin (decreased), velocity index (increased), lagtime (decreased) and StarTail (decreased) (all P<0.05). No statistically significant change could be observed in the endogenous thrombin potential parameter (p=0.10). **Discussion and conclusions:** TEM and TGT are global hemostasis assays, widely used for evaluation of hypo- and hypercoagulable states. Both methods have been used in patients with SCD, who present hypercoagulable profiles similar to those obtained in our study, and characterized by faster onset and offset of coagulation activation. We demonstrate for the first time that heme, in concentrations similar to those observed in patients with SCD and other hemolytic disorders, is capable to

not only stimulate the expression of TF by PBMC, but also to shift the coagulation balance towards a hypercoagulable state, similar to that observed in patients with SCD. These results provide additional support to the hypothesis that heme is a key mediator micro- and macrovascular thrombosis in SCD and possibly, in other hemolytic disorders.

Our study also evaluated in a preliminary form the effect of heme on the phosphorylation of the residue S879 from p120-catenin, as a surrogate marker of endothelial barrier breakdown induced by heme. Though preliminary, our results suggest that heme might also affect endothelial barrier integrity. Additional studies are underway to evaluate this hypothesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCi	Acidentevascular cerebral isquêmico
BAC	Beta actina
BE	Barreira endothelial
CE	Célula endotelial
DAMPs	<i>“Damage-Associated molecular patterns”</i> ; Padrões moleculares associados a danos
DF	Doença falciforme
FT	Fator tissular
HbA	Hemoglobina A
HbS	Hemoglobina S
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarideo
NET	<i>“Neutrophil Extracellular Traps”</i> ; Redes extracelulares de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
PAMPs	<i>Pathogen- associated molecular patterns</i> ; Padões moleculares associados a patógenos
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal

PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRRs	<i>Pattern recognition Receptors</i> ; Receptores de reconhecimento de Padrões
ROS	Reactive Oxygen Species; Espécies reativas de oxigênio
SARA	Síndrome da angustia respiratória aguda
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEM	Tromboelastometria
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TGT	Teste de geração de trombina
TLR-4	<i>“Toll like Receptors”</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> ; Fator de necrose tumoral alfa
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ; Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros selecionados da tromboelastografia	23
Quadro 2. Iniciadores do gene do fator tecidual.....	26
Quadro 3. Sequência de iniciadores de genes endógenos	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anemia falciforme.....	3
Figura 4. Princípios da tromboelastometria ROTEM®.	22
Figura 5. Curva Teste de Geração de Trombina.....	25
Figura 6. Ativação da coagulação induzida pelo heme	31
Figura 7. Ativação da coagulação induzida pelo heme.	32
Figura 8. Tromboelastograma.	32
Figura 9. Tromboelastometria – parâmetros derivativos.	33
Figura 10. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis.....	34
Figura 11. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis.....	35
Figura 12. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis.....	35
Figura 13. Curva de Geração de Trombina.....	36
Figura 14. Efeito do heme sobre a expressão de fator tissular em células mononucleares.....	37
Figura 15. Fosforilação do resíduo S879 da p120ctn.....	39
Figura 16. Análise por citometria de fluxo da fosforilação do resíduo S879 da p120ctn.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Anemia Falciforme	1
1.1.1. Definição e epidemiologia	1
1.2. Fisiopatologia da AF	3
1.2.1. Vaso-oclusão	5
1.2.2. Hemólise	6
1.3. Hipercoagulabilidade na AF	7
1.4. Ativação da resposta imune inata na AF	10
1.5. O heme livre como elemento central da fisiopatologia da AF	11
1.5.1. Heme e hipercoagulabilidade na AF	13
1.5.2. Heme e quebra da barreira endotelial na fisiopatologia da AF	14
2. OBJETIVO	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Aspectos éticos e sujeitos	19
3.2. Coleta e processamento das amostras de sangue	19
3.2.1. Coleta	19
3.2.2. Processamento das amostras	20
3.3. Tromboelastometria (TEM)	21

3.4. Teste de geração de trombina (TGT)	24
3.5. Quantificações da expressão gênica do fator tecidual	25
3.6. Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs).....	28
3.7. Avaliação da fosforilação do resíduo S879 da p120-catenina.....	29
3.8. Análise estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Avaliação da ativação da coagulação	31
4.1.1. Tromboelastometria	31
4.1.2. Teste de geração de trombina (TGT).....	34
4.2. Avaliação da expressão de FT	37
4.2.1 Expressão relativa de fator Tissular em células mononucleares e granulócitos	37
4.3. Avaliação do efeito do heme sobre a barreira endotelial <i>in vitro</i>	38
5. DISCUSSÃO	41
5.1. A AF como um estado de hipercoagulabilidade	41
5.2. O papel do FT na hipercoagulabilidade da AF	43
5.3. Fisiopatologia geral da hipercoagulabilidade na AF	45
5.4. O significado de testes globais da hemostasia na avaliação da ativação da coagulação.....	47
5.5. O heme como regulador-mestre da ativação da coagulação na AF.....	52
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	67

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp.....	67
Anexo 2 . Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
Anexo 3. Resumo submetido para apresentação na Reunião Anual da Sociedade Americana de Hematologia (ASH)	73
Anexo 4. Outras publicações com participação da aluna durante o mestrado	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anemia Falciforme

1.1.1. Definição e epidemiologia

A anemia falciforme (AF) é caracterizada como uma hemoglobinopatia resultante de uma mutação de ponto no códon 6 na cadeia beta da hemoglobina(β -globina). Esta mutação no gene da β -globina (*HBB*) leva a substituição do aminoácido glutamato por valina na cadeia polipeptídica, originando assim, a síntese de uma hemoglobina que possui propriedades físico-químicas anormais, a hemoglobina S (HbS) (Ingram 1958; Brittenham, et al. 1985).

A HbS quando desoxigenada, sofre agregação e polimerização dentro dos eritrócitos, danificando desta forma sua arquitetura e sua flexibilidade o que leva a perda de sua deformidade e finalmente sua falcização (Figura 1). Além disso, episódios de hemólise acompanham o quadro desses indivíduos, levando a uma anemia hemolítica severa, oclusão crônica dos vasos sanguíneos (vaso-oclusão), alterações do sistema imune e até complicações mais graves, como a disfunção crônica de órgãos(Roseff, 2009; Rees, et al. 2010).

A anemia falciforme surgiu na África, sendo disseminada para outros continentes, pelo alto índice de imigração forçado de escravos. No Brasil, a incidência desta doença é consideravelmente variável sendo maior nos estados em que há alta prevalência de afro-descendentes. De acordo com o Programa Nacional de

Triagem Neonatal (PNTN), por ano nascem cerca de 3.500 crianças portadoras da doença e 200 mil com traço falciforme, números que revelam a magnitude do desafio a ser enfrentado em nosso país. Este desafio fica mais evidente a partir de uma estimativa da carga de doença (*disease burden*) global da AF nos próximos anos que sugere que em 2050 o número de novos nascimentos anual de pacientes com AF deve alcançar a marca de 400.000. Ao mesmo tempo, a implementação de programas simples como a triagem neonatal universal, tem o potencial de salvar mais de 10 milhões de vidas com idade abaixo de 5 anos no mesmo período, levando a um aumento importante na prevalência da AF em faixas etárias mais avançadas (Piel 2013). Estes dados revelam a urgência para o desenvolvimento de novos tratamentos para a AF, capazes de modular a gravidade da doença e acessíveis a grandes contingentes de pacientes. Por sua vez, o desenvolvimento destes novos tratamentos exige uma compreensão cada vez melhor da fisiopatologia da AF.

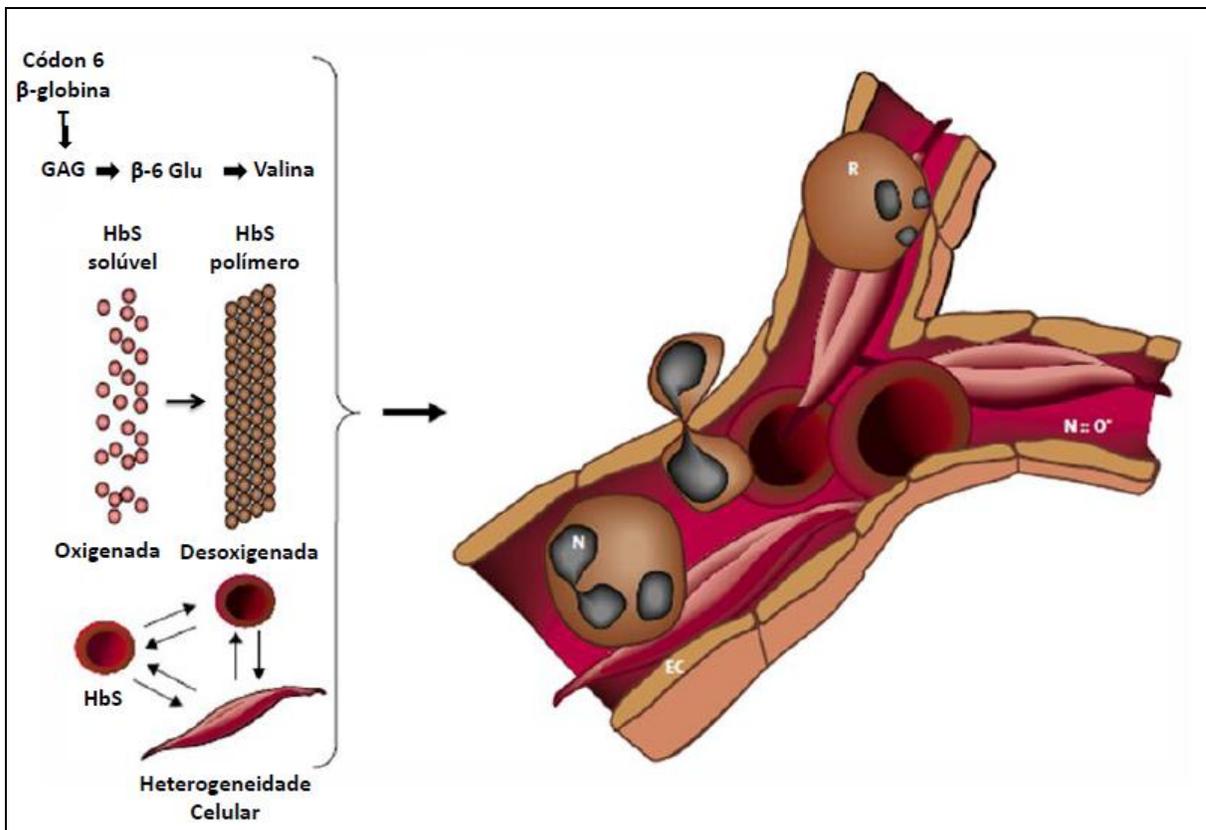


Figura 1. Anemia falciforme. A mutação do gene da β -globina leva a polimerização da hemoglobina dentro dos eritrócitos formando a HbS que quando desoxigenada, causa alterações celulares e manifestações clínicas. R = reticulócito; N = neutrófilo; EC = célula endotelial; N::O⁰ = biodisponibilidade de óxido nítrico (Stuart & Nagel 2004).

1.2. Fisiopatologia da AF

Como descrito anteriormente, o estado desoxigenado da HbS favorece sua cristalização, levando à formação de um núcleo de polimerização da hemoglobina. A partir deste núcleo, a HbS intracelular se polimeriza, levando a alterações importantes na citoarquitetura do eritrócito, que podem culminar com sua falcização irreversível. Além da falcização, a polimerização da HbS também causa uma perda importante da flexibilidade e deformabilidade do eritrócito, que interfere em suas interações com o endotélio e com outras células circulantes, e reduz sua sobrevivência.

média na circulação. Como consequência, pacientes com AF apresentam uma anemia hemolítica crônica, laboratorialmente caracterizada por anemia, hiperplasia eritroide na medula óssea, hiperbilirrubinemia e redução da haptoglobina (Zago 2013).

No entanto, embora a AF seja causada por uma única mutação de ponto no gene *HBB*, a fisiopatologia das lesões sistêmicas apresentadas por estes pacientes é extremamente complexa, envolvendo não apenas a anemia hemolítica crônica, mas também um segundo mecanismo fisiopatológico básico que consiste na ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos seguidos por lesão de isquemia: reperfusão, como demonstrados na figura 2. A seguir descreveremos com mais detalhes o significado de cada um destes mecanismos segundo o modelo fisiopatológico clássico da AF.

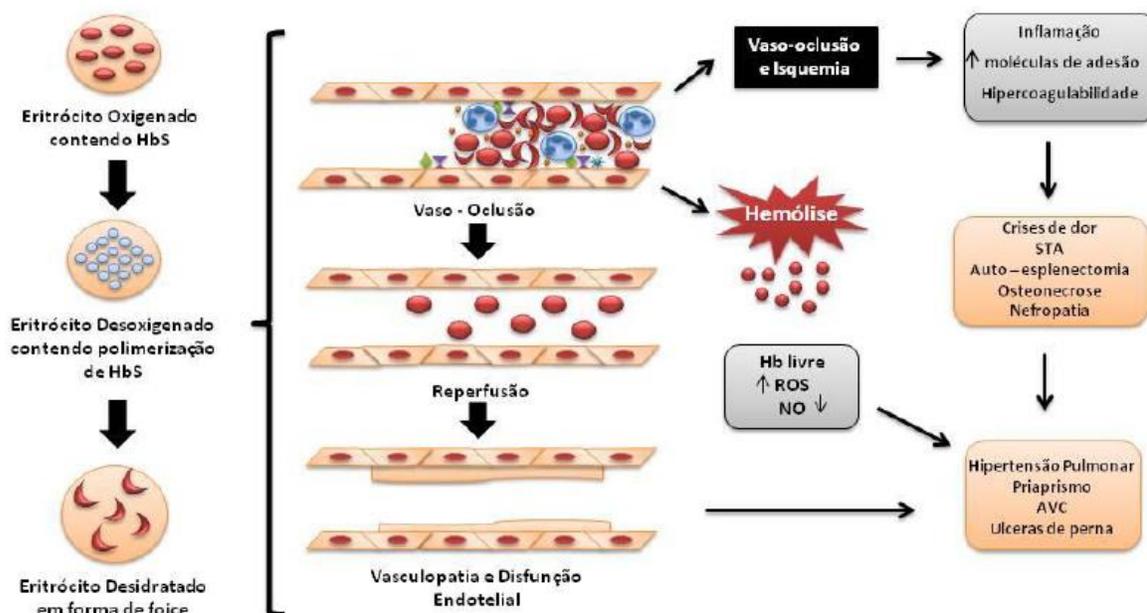


Figura 2. Esquema da fisiopatologia da AF. Sequência de eventos desencadeados pela polimerização da HbS, levando à anemia hemolítica e vaso-oclusão. Nos quadros em cinza, as

alterações celulares e moleculares decorrentes da vaso-oclusão e da hemólise. Nos quadros em laranja, as complicações relacionadas a estas alterações. ROS: espécies ativas de oxigênio; STA: síndrome torácica aguda.

1.2.1. Vaso-oclusão

A vaso-oclusão que ocorre preferencialmente nas vênulas pós-capilares é o mecanismo responsável pelas principais complicações da AF, tais como as crises vaso-oclusivas (caracterizadas por dor ou infartos localizados), a síndrome torácica aguda (STA), a autoesplenectomia e a lesão orgânica progressiva observada nestes pacientes (Rees, et al. 2010). Embora a polimerização da HbS faça parte deste processo, a oclusão não é causada pela justaposição de eritrócitos falcizados, mas sim pelas alterações de deformabilidade e de adesão celular resultantes de ciclos repetidos de polimerização da HbS (Conran & Costa 2009; Sakamoto, et al. 2013)

De acordo com o modelo fisiopatológico atual, ao atravessar regiões com diferentes concentrações de oxigênio (elevada na circulação arterial; reduzida nas vênulas pós-capilares), as hemácias de pacientes com AF passam por repetidos ciclos de polimerização e despolimerização da HbS, que interferem na interação dinâmica entre eritrócitos e células endoteliais, levando a ciclos repetidos de obstrução e reperfusão na microcirculação. Estes episódios vaso-oclusivos, e a lesão de isquemia:reperfusão subsequente, resultam em um estado inflamatório crônico descrito em pacientes com AF, e caracterizado por: dano oxidativo, ativação endotelial, recrutamento de leucócitos (leucocitose), aumento da produção de citocinas, aumento da adesão celular (hemácias, plaquetas e neutrófilos) ao

endotélio e hipercoagulabilidade. Estas ocorrem em graus variados conforme a fase da doença.

Em condições basais (chamadas de *steady state*), estabelece-se um equilíbrio instável entre todos estes fatores, e os pacientes tendem a permanecer assintomáticos. No entanto, fatores como hipoxemia, desidratação e infecções, diminuem a velocidade do fluxo sanguíneo ou a tensão de oxigênio pelas vênulas pós-capilares, favorecendo a vaso-oclusão. Uma vez iniciada, os fatores pro-inflamatórios citados acima se retroalimentam, contribuindo para o estabelecimento das crises de agudização clínica observadas na AF (Conran, et al. 2009)

1.2.2. Hemólise

Por muitos anos, entendia-se que o impacto da hemólise crônica em pacientes com AF se restringisse à anemia hemolítica. No entanto, o papel da hemólise na fisiopatologia da disfunção endotelial observada na AF, e por consequência, em algumas formas de lesão orgânica e na própria vaso-oclusão, vêm sendo descritos nos últimos anos.

A hemólise intravascular observada na AF resulta em acúmulo de Hb livre no plasma. Este excesso de Hb livre condiciona a geração de espécies reativas de oxigênio (Roseff 2009), que além de contribuírem para os danos oxidativos locais, também levam a um sequestro de óxido nítrico (NO) disponível no plasma. O NO é uma gás produzido pelo endotélio com um importante papel na regulação do tônus vascular basal, inibição da ativação plaquetária, inibição da ativação da coagulação e de outras moléculas de adesão (Kato, et al. 2007; Chen, et al. 2014). A hemólise

também resulta na liberação da arginase eritrocitária, que reduz a biodisponibilidade de um importante substrato para a síntese de NO pelas sintases (a arginina), contribuindo também para a depleção crônica de NO.

Assim, a depleção crônica de NO resultante da hemólise intravascular leva a um importante estado de disfunção endotelial, que parece contribuir não apenas para a fisiopatologia de lesões orgânicas específicas como a hipertensão pulmonar, mas também para o processo de vaso-oclusão e hipercoagulabilidade observada na AF. O fato de alterações similares ocorrerem em outras anemias hemolíticas crônicas não falciformes reforça o papel independente da hemólise na fisiopatologia destas complicações (Rother, et al. 2005, Kato, et al. 2007).

Em resumo, as alterações inflamatórias resultantes dos ciclos de polimerização e despolimerização da HbS na microcirculação, e a depleção crônica de NO, resultam em importantes alterações na interação entre hemácias, endotélio, leucócitos e plaquetas, completando um círculo vicioso que contribui para as complicações observadas na AF.

1.3. Hipercoagulabilidade na AF

Inúmeros estudos e a vasta experiência clínica demonstram inequivocamente a presença de hipercoagulabilidade em pacientes com AF. O exemplo mais clássico e contundente deste estado é a elevada frequência de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) em crianças com AF (Webb & Kwiatkowski 2013). Estudos realizados com ressonância magnética demonstraram que pelo menos 25% das crianças com AF até os 6 anos de idade apresentam

AVCi silenciosos, taxa que chega a 37% até aos 14 anos de idade (Bernaudin, et al. 2005; Kwiatkowski, et al. 2009). Curiosamente, níveis reduzidos de hemoglobina basal representam um dos fatores de risco para a ocorrência de AVCi, sugerindo uma possível relação entre a atividade hemolítica e o risco desta complicação (DeBaun, et al. 2012). É importante destacar que estes AVCi ocorrem em vasos de maior calibre, não sendo causados diretamente pelo processo de vaso-oclusão descrito anteriormente.

Eventos tromboembólicos venosos também possuem incidência elevada na AF, com destaque para o tromboembolismo pulmonar (Solovey, Kollander et al.). Um estudo realizado por Stein e cols. (2006), demonstrou que pacientes hospitalizados com doença falciforme (DF), incluindo AF e hemoglobinopatia SC, apresentaram uma prevalência quatro vezes maior de tromboembolismo pulmonar (TEP) do que pacientes sem DF (Stein, et al. 2006). Em um estudo mais recente, também realizado nos Estados Unidos por Novelli, e cols. (2012), foi observado uma incidência de TEP de 50 a 100 vezes maior em indivíduos hospitalizados com DF do que o esperado na população geral. Além disso, embora a fisiopatologia da síndrome torácica aguda (STA) seja multifatorial, o TEP parece contribuir de forma significativa para a gravidade desta complicação, especialmente em adultos (Vichinsky, et al. 2000).

A fisiopatologia das trombooses em pacientes com AF é objeto de grande interesse, tendo sido recentemente revisada por vários autores (Sparkenbaugh & Pawlinski 2013). A hipercoagulabilidade é uma característica comum a vários estados inflamatórios crônicos, e em geral envolve: (i) a expressão anômala de fator

tissular (FT) – que é a proteína responsável pela iniciação da coagulação; (ii) ativação plaquetária; (iii) disfunção endotelial; e (iv) redução dos mecanismos anticoagulantes naturais. A maioria destes mecanismos já foi individualmente demonstrado na AF. Além disso, fatores específicos da AF, como a ativação da coagulação decorrente da exposição anômala da fosfatidilserina na superfície das hemácias lesadas, parecem contribuir adicionalmente para a patogênese das trombozes na AF (Ataga & Key 2007; Setty, et al. 2008). Recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou um importante aumento da expressão de FT e da geração de trombina em pacientes com AF quando comparados a controles saudáveis (Colella, et al. 2012).

Apesar destas inequívocas demonstrações clínicas e laboratoriais deste estado de hipercoagulabilidade na AF, o mecanismo de ativação da coagulação permanece incerto. Embora seja possível que a hipercoagulabilidade represente uma consequência terminal do estado inflamatório crônico observado nestes pacientes, evidências mais recentes sugerem que a hipercoagulabilidade possa ser uma consequência direta da hemólise crônica, de forma independente da presença da mutação no gene *HBB*. Mais uma vez, a alta frequência de trombozes em pacientes com outras anemias hemolíticas crônicas como a hemoglobinúria paroxística noturna, sugere que um mecanismo independente da AF possa contribuir para a hipercoagulabilidade observada nestes pacientes.

1.4. Ativação da resposta imune inata na AF

Praticamente todos os seres vivos desenvolveram mecanismos sensores para a detecção rápida de patógenos invasores. Em humanos, estes mecanismos fazem parte da resposta imune inata, e são representados pelos receptores reconhecedores de padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares conservados presentes em bactérias, fungos e vírus, conhecidos como PAMPs (“pathogen-associated molecular patterns”) (van der Poll & Herwald 2014). Além dos PAMPs, os receptores PRRs também podem ser ativados pelos chamados DAMPs (“danger-associated molecular patterns”), que são padrões moleculares que sinalizam a ocorrência de lesão tecidual estéril como necrose ou outras formas de inflamação. A ativação destes receptores desencadeia cascatas de sinalização que culminam com o recrutamento de leucócitos, expressão de genes pró-inflamatórios, ativação endotelial, e ativação da hemostasia. Cabe destacar aqui, que todos estes elementos estão presentes na resposta inflamatória observada na AF.

A ativação de receptores *Toll-like* como o TLR-4 (um subtipo de PRR) pelo LPS (um exemplo de PAMP presente na parede de bactérias Gram negativas) é um dos mecanismos canônicos de ativação da resposta imune inata. O fato de a ativação de PRRs por DAMPs ativar vias de sinalização semelhantes às ativadas por PAMPs, explica o caráter estereotipado da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), observada em quadros clínicos heterogêneos como infecções, queimaduras, entre outras (Chen & Nunez 2010). Embora a ativação da resposta imune inata por PAMPs e DAMPs contribua para a erradicação de infecções e para o reparo tecidual na maioria dos pacientes, sua ativação excessiva ou desregulada pode resultar na

amplificação e perpetuação da lesão inicial. Este papel deletério da resposta imune inata é bem documentado na sepse grave (mediada por PAMPs) ou em grandes traumas (mediada por DAMPs) (Seeley, et al. 2012).

Como destacado acima, vários fatores que descrevemos da fisiopatologia da AF representam alterações características da resposta inflamatória ativada por PAMPs e DAMPs na sepse grave, sugerindo que a ativação da resposta imune inata pode ser um elemento também importante na fisiopatologia da AF.

Neste contexto, a identificação mais precisa de quais seriam os mediadores críticos para ativação e perpetuação da resposta imune inata na AF facilitaria a compreensão da relação hierárquica dos inúmeros mecanismos fisiopatológicos da AF.

1.5. O heme livre como elemento central da fisiopatologia da AF

Embora a inflamação resultante da vaso-oclusão e da depleção crônica de NO sejam fatores inequivocamente relacionados à fisiopatologia da AF, um outro elemento, também resultante da hemólise crônica, vem emergindo como candidato a principal ativador da resposta imune inata na AF.

Sempre presente nestes pacientes, a hemólise crônica resulta não apenas no sequestro de NO, mas também na liberação em quantidades excessivas de mediadores como a hemoglobina livre, micropartículas, e o heme, sabidamente nocivas para o organismo. Por este motivo, o organismo desenvolveu várias linhas de defesa para a eliminação destes metabólitos tais como a haptoglobina e a hemopexina, que se ligam à hemoglobina livre e ao heme respectivamente, evitando

a circulação de suas formas livres (Schaer, et al. 2013). No entanto, a capacidade de eliminação (“*scavenging*”) destes sistemas é limitada, de modo que na hemólise intravascular aguda ou crônica, pode ocorrer o esgotamento destes sistemas e o acúmulo de hemoglobina e heme livre (Muller-Eberhard, et al. 1968).

Em um estudo que lança bastante luz sobre os mecanismos de ativação da resposta imune inata na AF, um grupo brasileiro demonstrou em 2007, o papel do heme livre como ativador da resposta imune inata, através da ligação com os receptores TLR-4 (Figueiredo, et al. 2007). Por se tratar de uma molécula conservada em diferentes espécies e reinos, a evolução de mecanismos que reconhecem o heme livre como PAMP ou DAMP pode ter representado um avanço na resposta à patógenos, ou mesmo no reparo de lesões com sangramento e liberação local de heme. No entanto, em situações patológicas em que há liberação maciça de heme na circulação como na AF, este mesmo mecanismo potencialmente benéfico pode se transformar em um importante vetor de ativação da resposta imune e lesão tecidual. Esta hipótese foi recentemente reforçada por dois estudos em modelos animais de AF, e um estudo clínico. No estudo clínico, foi demonstrado que a concentração de heme livre no plasma é um fator de risco independente para a ocorrência de STA em crianças (Adisa, et al. 2013).

Além disso, um estudo publicado em 2013 demonstrou que o heme livre é capaz de desencadear um quadro de lesão pulmonar aguda semelhante à STA em dois modelos animais de AF, e que este quadro pode ser revertido pelo uso de hemopexina e inibidores de TLR-4, sugerindo que a ativação da resposta imune inata pelo heme pode estar relacionada à lesão pulmonar aguda observada na

STA(Ghosh, et al. 2013). Indo na mesma direção, um estudo publicado em 2014 mostrou de forma elegante a capacidade do heme livre em desencadear fenômenos vaso-oclusivos em dois modelos distintos de AF, assim como a possibilidade de reversão da vaso-oclusão através do uso de inibidores de TLR-4, ou de moléculas capazes de sequestrar o heme como a hemopexina (Belcher, et al. 2014).

Em conjunto, estes dados vêm colocando o heme livre, e a ativação da resposta imune inata, em uma posição central na cascata de eventos que ativa e perpetua a inflamação na AF. Esta visão pode representar uma mudança no paradigma clássico que atribui a disfunção endotelial observada na AF a um ciclo vicioso em que isquemia e vaso-oclusão exerciam papel central. Assim, este modelo abre caminho para a investigação do papel das consequências da ativação da resposta imune inata observada na sepse – entre as quais destacam-se (i) a ativação da coagulação, e (ii) a quebra da barreira endotelial - para a fisiopatologia da AF.

1.5.1. Heme e hipercoagulabilidade na AF

A capacidade do heme em ativar a coagulação é sugerida por um estudo que mostra sua capacidade de induzir a expressão de FT em células endoteliais, através da ativação de receptores TLR-4 (Setty, et al. 2008). Mais recentemente, a expressão de FT induzida pelo heme foi também demonstrada em monócitos, embora este estudo não tenha sido ainda publicado em seu formato completo (Rehani, et al. 2013). O papel do heme como ativador da coagulação em outros

contextos é desconhecido. Além disso, a relevância fisiológica da expressão de FT induzida pelo heme nunca foi demonstrada em ensaios clássicos de hemostasia.

1.5.2. Heme e quebra da barreira endotelial na fisiopatologia da AF

A quebra da barreira endotelial (BE) é uma das consequências clássicas da ativação de receptores TLR-4 observadas na sepse. Uma das principais funções do endotélio é a manutenção de uma barreira seletiva entre sangue e tecidos, através da BE. No entanto, a BE é uma estrutura dinâmica, que pode ser quebrada e reorganizada, conforme a necessidade fisiológica do organismo (Dejana, et al. 2009). Como exemplo, a integridade da BE é modificada durante a resposta a patógenos invasores, como parte da resposta imune inata (Hack & Zeerleder 2001; Aird 2003; Spronk, et al. 2004). Nesta situação, a quebra localizada e transitória da BE tem por objetivo facilitar a adesão e a diapedese de leucócitos, para que estes tenham acesso ao patógeno invasor no parênquima tecidual (ex: pulmões, fígado) (Seeley, et al. 2012). Quando localizada e adequadamente regulada, esta quebra da BE facilita a ação de fagócitos e a formação de redes compostas por neutrófilos e fibrina (NETs), que auxiliarão na contenção de um foco infeccioso. Por outro lado, se ativada de forma muito intensa ou sem a regulação adequada, esta mesma resposta, originalmente benéfica, pode se transformar no principal mecanismo de dano tecidual, como ocorre, por exemplo, durante o choque séptico ou na síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). Por analogia, se o heme for também capaz de induzir a quebra da BE via TLR-4, este papel poderia representar um novo mecanismo fisiopatológico para a STA na AF.

A investigação do papel de alterações da BE na fisiopatologia da AF exige que se conheça os mecanismos que regulam esta barreira em condições fisiológicas. Ao longo das últimas duas décadas, estes mecanismos foram descritos com detalhes através de um modelo em que proteínas das junções intercelulares do tipo “adherens” exercem um papel central nesta regulação (Dejana, et al. 2009; Potente, et al. 2011; Dejana & Giampietro 2012, Dejana & Orsenigo 2013).

O principal componente das junções “adherens” é a proteína transmembrana VE-caderina (Vittet, et al. 1997). A VE-caderina possui um domínio extracelular, uma região transmembrana de passagem única, e uma cauda citoplasmática conservada, sendo expressa exclusivamente em células endoteliais (CE) (Lampugnani, et al. 1992, Tanihara, et al. 1994, Breviario, et al. 1995). A interação homofílica em *trans* entre os domínios extracelulares da VE-caderina de CE adjacentes forma uma estrutura “em zíper”, diretamente responsável pela integridade da BE. Outro componente funcional importante da VE-caderina é sua cauda citoplasmática, que interage com proteínas da família das cateninas (alfa e beta catenina), que ancoram a junção ao citoesqueleto celular (Nagafuchi & Takeichi 1988, Ozawa, et al. 1990, Navarro, et al. 1995).

Estudos realizados em culturas de células e em camundongos geneticamente modificados mostram que as interações da VE-caderina com as cateninas representam pontos críticos da regulação da integridade da BE por vias de sinalização ativadas por estímulos pró-inflamatórias (Dejana & Giampietro 2012). Alguns destes estímulos, como o VEGF-A, a trombina, e o LPS, modificam o padrão de fosforilação da VE-caderina ou das cateninas, levando à internalização da VE-

caderina, e desorganização das junções e quebra da BE. De fato, a fosforilação do resíduo S879 da p120-catenina é um elemento crítico para a quebra da BE induzida por mediadores inflamatórios (Figura 3)(Goddard & Iruela-Arispe 2013).

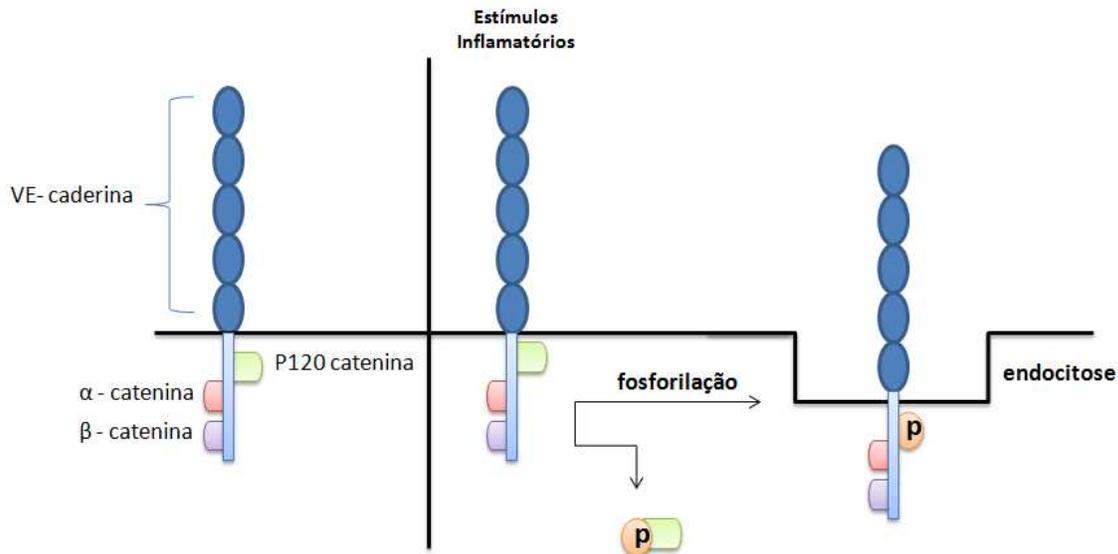


Figura 3. Mecanismo hipotético da internalização de VE-caderina.Esquema ilustrativo mostrando o mecanismo hipotético de regulação da estabilidade da VE-caderina, baseado na interação entre a 120ctn (em verde) com a cauda citoplasmacaderina(azul). Estímulos como o VEGF levam à fosforilação da VE-caderina e à dissociação da p120 catenina, o que culmina na sinalização para que a VE-caderina seja internalizada por endocitose. A fosforilação do resíduo S879 da p120ctn é um passo crítico deste processo de quebra da BE.

Ao mesmo tempo, a STA apresenta muitos elementos clínicos e laboratoriais comuns com a lesão pulmonar aguda observada na sepse. Considerando a capacidade do heme livre em ativar a resposta imune inata, torna-se interessante o estudo das alterações funcionais ou estruturais induzidas por este metabólito.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como **objetivo geral** avaliar as alterações mediadas pelo heme livre sobre a coagulação e sobre a quebra da barreira endotelial

2.2. Objetivos específicos

a) Investigar o efeito do heme sobre a ativação da coagulação através de duas metodologias diferentes de avaliação global em hemostasia:

- Tromboelastometria (TEM)
- Teste de geração de trombina (TGT) ;

b) Investigar os mecanismos associados à ativação da coagulação pelo heme, através da expressão do fator tissular em células mononucleares pela técnica de PCR quantitativo (qRT-PCR);

c) Avaliar o efeito do heme sobre a quebra da barreira endotelial através da avaliação da fosforilação do resíduo S879 da p120 catenina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e sujeitos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-Unicamp, parecer nº 1261/2011 (Anexo 1). Nenhuma atividade do estudo foi iniciada antes de sua aprovação e da assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido pelos indivíduos saudáveis.

Foram incluídos neste estudo no período de Janeiro a Maio de 2014, um total de 24 voluntários sadios. O critério para inclusão de voluntários sadios era a ausência da mutação ou história familiar de doença falciforme ou antecedente de doença tromboembólica. Os voluntários foram recrutados entre o corpo discente e colaboradores do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Campinas, UNICAMP.

3.2. Coleta e processamento das amostras de sangue

3.2.1. Coleta

As coletas foram realizadas através de punção venosa periférica de veia superficial de membros superiores, com manipulação mínima, pelo próprio pesquisador. Todos os voluntários observaram jejum mínimo de 4 horas antes da coleta. Para os testes de coagulação (Tromboelastometria - TEM e Teste de Geração de Trombina - TGT) as amostras foram coletadas em tubos com o anticoagulante citrato de sódio. Para o teste de qRT-PCR, as amostras foram coletadas em tubos com o anticoagulante heparina.

3.2.2. Processamento das amostras

Para realização da TEM, as amostras de sangue total foram imediatamente incubadas com heme livre (hemin) na concentração de 30 μ M (cat no. H9039; Sigma Aldrich, Missouri, EUA), por 4 horas, a 37 $^{\circ}$ C. Esta concentração foi escolhida por encontrar-se na mesma ordem de grandeza das concentrações de heme observadas em pacientes com AF. A solução de hemin utilizada no estudo foi diluída em NaOH 0.05M, pH 7.4, conforme descrito por Setty e cols. (2008). Amostras controle foram incubadas com a mesma quantidade de solução salina, seguindo o mesmo procedimento observado com o Hemin. Testes utilizando amostras incubadas apenas com o veículo NaOH 0.05M, também foram realizados, para que não houvesse dúvida sobre os resultados obtidos. Após a incubação, as amostras foram imediatamente utilizadas no teste de TEM.

Para TGT, o mesmo procedimento de estímulo foi realizado. Porém, após o período de incubação, as amostras foram duplamente centrifugadas a 3500rpm para obtenção de plasma pobre em plaquetas, e imediatamente utilizadas para realização do teste. Alíquotas de PPP foram armazenadas em freezer -80 $^{\circ}$ C.

Para a avaliação da expressão de FT por qRT-PCR, as amostras de sangue total passaram pelo protocolo de separação das populações celulares (células granulocíticas e células mononucleares) pela técnica de Ficoll. Esta técnica consiste na utilização de reagente de Ficoll com diferentes densidades, Histopaque $^{\circledR}$ 1.077 (Sigma Aldrich) e Histopaque $^{\circledR}$ 1.119 (Sigma Aldrich), onde a

separação celular é baseada na diferença de densidade celular. Após a adição de 3 ml de cada reagente de Ficoll em um tubo cônico de 15 ml, completou-se o volume para 13 ml com sangue total heparinizado. As amostras foram centrifugadas a uma rotação de 700g por um período de 30 minutos. Após a centrifugação, as populações celulares se encontravam divididas em: mononucleares, granulocíticas e eritrocitária. As populações de células mononucleares e granulocíticas foram transferidas para tubos cônicos de 15 ml e lavadas com PBS para a eliminação de resíduos de Ficoll que pudessem interferir nas análises subsequentes, e centrifugadas a 1500rpm por 7 minutos.

As células foram então ressuspensas com uma quantidade de 957,2µl de meio DMEM (*Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium*) – um meio específico para cultivo de células leucocitárias - e cultivadas em placas de 12 poços (TPP®). Por fim, as células foram incubadas com Hemin 30µM (42,8µl) ou salina (42,8µl), por um período de 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. Após as 24 horas de incubação, as células foram transferidas para tubos cônicos de 15 ml, lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos, para a obtenção do pellet celular, e em seguida utilizadas para extração de RNA.

3.3. Tromboelastometria (TEM)

Para a análise da ativação da coagulação, utilizamos a tromboelastometria. Os ensaios foram realizados no equipamento ROTEM® (Pentapharm, Alemanha). A tromboelastometria é um teste global em hemostasia que avalia a iniciação, formação, estabilização e lise do coágulo, documentando a interação entre plaquetas, hemácias, leucócitos e proteínas da coagulação. O

equipamento mede a viscosidade e elasticidade do sangue após a adição de cálcio (CaCl_2 0,2M; pH 7,4), com ou sem um ativador específico da coagulação. As propriedades viscoelásticas são registradas continuamente por dispositivo rotacional inserido no sangue, e transmitidas para um equipamento, onde um software transforma os dados em uma curva de tromboelastometria. A corrida tromboelastográfica ocorre em um período de 1 hora e meia (Figura 4).

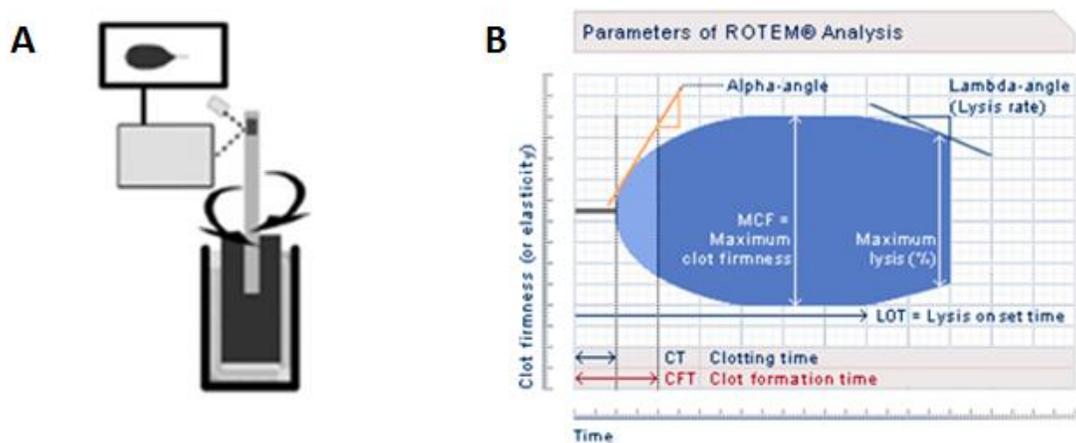


Figura 4. Princípios da tromboelastometria ROTEM®. **A)** O pino rotativo de plástico, onde fica localizado o sensor óptico, se move para frente e para trás sob um ângulo de $4,75^\circ$ sob o centro da cuveta de amostra que é aquecida a 37°C . Uma vez iniciado o coágulo, filamentos de fibrina são formados, aumentando a tensão entre a cuveta e o pino. A dissociação dos filamentos de fibrina da parede da cuveta ou a degradação da fibrina pelo processo de fibrinólise diminui essa tensão. **B)** O sinal gráfico é apresentado desde a tensão inicial dada pela formação do coágulo até a sua dissolução. Essa tensão se dá no tempo zero (ausência de coágulo), para que haja o processamento do sinal e início da mensuração após a ativação da coagulação. Do contrário, haveria uma falsa produção basal de coágulo enquanto o pino entra em contato com a amostra de sangue total. MCF= maximum clotting formation (máxima formação do coágulo); CT = clotting formation (Tempo da coagulação); CFT = clotting formation time (tempo da formação do coágulo); Alpha-angle = ângulo alfa. Adaptado(Bolliger, et al. 2012).

Juntamente com a representação gráfica, o equipamento libera parâmetros quantitativos que indicam a velocidade e a estabilidade do coágulo formado. Estes parâmetros já são validados na prática clínica como biomarcadores de diferentes etapas da coagulação, como detalhado no quadro 1. De fato, a análise destes parâmetros tem ajudado na avaliação sobre os estados de hiper e/ou hipocoagulabilidade (O'Donnell, et al. 2004, Sorensen & Ingerslev 2004), como também na utilização como guia no monitoramento de drogas farmacológicas e terapias hemodinâmicas (Noval-Padillo, et al. 2010, Schochl, Nienaber et al. 2010, Al Hawaj, et al. 2013).

Além dos parâmetros diretamente obtidos da curva, o equipamento calcula parâmetros derivativos relacionados à capacidade de geração de trombina do indivíduo, que mostram correlação com a cinética de geração de trombina no plasma (Sorensen, et al. 2003).

Quadro 1. Parâmetros selecionados da tromboelastografia

Parâmetro	Abreviação	Descrição/significado
Tempo de coagulação	CT	Tempo de início da formação do coágulo, após adição do cálcio. Está reduzido em deficiências de fatores ou com o uso de anticoagulantes. O encurtamento pode indicar hipercoagulabilidade,
Tempo de formação do coágulo	CFT	Tempo até a obtenção de uma amplitude de 20mm na curva de TEM. Está relacionado ao tempo para que se atinja um coágulo firme (cinética de formação do coágulo).
Ângulo α	A	Ângulo formado entre a base e a tangente da curva de TEM, quando se atinge uma amplitude de 20mm. Parâmetro semelhante ao CFT. Ambos são influenciados por função plaquetária e taxa de conversão de fibrinogênio em fibrina.

Máxima firmeza do coágulo	MCF	Amplitude máxima alcançada na curva de TEM. Relaciona-se com a estabilidade do coágulo e é influenciada pela função plaquetária e pela taxa de conversão do fibrinogênio em fibrina.
Velocidade máxima*	MAXV	Velocidade máxima de formação do coágulo. É um parâmetro obtido por cálculos matemáticos, que se correlaciona com a geração de trombina. Valores elevados indicam maior velocidade de geração de trombina.
Tempo para velocidade máxima*	MAXV-t	Tempo do início da reação para formação máxima do coágulo. É um parâmetro obtido por cálculos matemáticos, que se correlaciona com a geração de trombina. Valores mais curtos indicam maior velocidade de geração de trombina.
Área sob a curva*	AUC	Área total da curva de tromboelastografia. Parâmetro que depende da interação de variáveis pró e anticoagulantes, e do tempo de análise. Os parâmetros derivados (MaxV e MaxV-t são mais precisos na estimativa do potencial de geração de trombina que a AUC)

*Parâmetros Derivativos (Sorensen, et al. 2003).

3.4. Teste de geração de trombina (TGT)

A mensuração do potencial de geração de trombina também foi utilizada na avaliação do efeito do heme sobre a ativação da coagulação. Nos últimos anos, o papel da trombina como reguladora central do processo de hemostasia ficou claro, e o TGT adquiriu grande importância de pesquisa na área de hemostasia (Nair, et al. 2010, Chitlur 2012, Ten Cate 2012). O TGT mede de forma contínua a geração de trombina após a adição de um iniciador (em geral utiliza-se concentrações mínimas de FT, 5pM), através do uso de um substrato fluorogênico da trombina. Esta mensuração gera uma curva de geração de trombina conhecida como trombograma. Diversos parâmetros derivados desta curva podem ser registrados incluindo tempo de latência para início da geração de trombina (*lagtime*), o pico de geração de trombina (*peak thrombin*), o tempo para o pico

(time to peak) e área sob a curva (*AUC*, *ETP*). Estes parâmetros apresentam correlação com parâmetros fisiologicamente e clinicamente relevantes da hemostasia (Nair, Dargaud et al. 2010)(Figura 5).

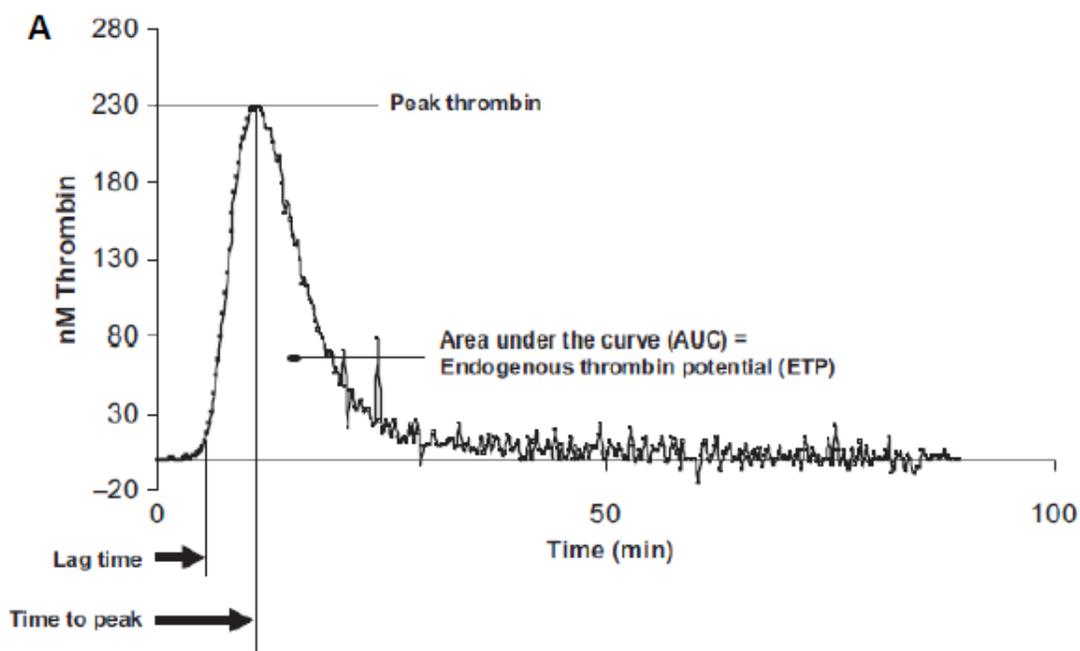


Figura 5. Curva Teste de Geração de Trombina. Curva típica do teste que demonstra 4 parâmetros descritivos: *Lagtime* (tempo de latência para detecção de trombina), *time to peak* (período de tempo até o pico de geração de trombina), *peak thrombin* (pico de geração de trombina) e *area under the curve (AUC)*, que se refere ao potencial endógeno de trombina (ETP).Fonte: (Baglin 2011).

3.5. Quantificações da expressão gênica do fator tecidual

A avaliação da expressão gênica do FT teve como objetivo explorar como um método adicional a capacidade do heme em ativar a coagulação, assim como avaliar os mecanismos desta ativação. Para tal, foi realizado extração de RNA tanto de granulócitos como em células mononucleares incubadas com salina ou

heme, utilizando kit comercial de extração *Rneasy® Mini Kit*(Qiagen, Alemanha). Posteriormente, o cDNA foi transcrito nessas amostras através da enzima Transcriptase Reversa, utilizando o kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit®* (ThermoScientific). A integridade do RNA foi confirmada através do aparecimento de subunidades ribossomais 18S e 28S em corrida eletroforética em Gel de Agarose 1.5%, a uma voltagem de 100MV.

A técnica de PCR em tempo real consiste no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação como um indicador de amplificação através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém-sintetizada. Todas as reações foram realizadas em duplicata, utilizando *SYBRGreen PCR Master Mix®* (Invitrogen), que contém todos os reagentes necessários para realização da reação e o agente intercalante *SYBRGreen*.

Iniciadores (primers) específicos do gene que codifica o FT foram desenhados com o auxílio dos programas Gene Runner e Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Verificamos também a especificidade dos primers utilizando o programa Primer Blat (www.ncbi.nlm.nih.gov). Da mesma forma, foi avaliada a temperatura de dissociação e formação de estruturas secundárias. A sequência de iniciadores escolhida está descrita no quadro 2.

Quadro 2. Iniciadores do gene do fator tecidual

Iniciador	Sequência
Foward	5' TCA GGA AAG AAA ACA GCC AAA AC 3'
Reverse	5' GGG AGG GAA TCA CTG CTT GA 3'

Também foram utilizados iniciadores para amplificação de gene usados como controles endógenos (β -actina e *GAPDH*) para confirmação da integridade da amostra de cDNA e para normalização da expressão do gene de interesse (Quadro 3). Todos os experimentos apresentavam controles negativos, onde a amostra de cDNA era substituída por água estéril (NTC).

Quadro 3. Sequência de iniciadores de genes endógenos

Iniciador	Sequência
β – actina (Foward)	5' AGG CCA ACC GCG AGA AG 3'
β – actina (Reverse)	5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'
GAPDH (Foward)	5' GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC 3'
GAPDH (Reverse)	5' CCA CTT GAT TTT GGA GGG ATC T 3'

Para a padronização da concentração ideal de primers para todas as reações, realizamos uma curva de padronização com as seguintes concentrações: 70nM, 150nM, 300nM e 600nM. Esta curva tem como objetivo escolher a melhor concentração, que é aquela que obtiver o menor ciclo *threshold* (C_t), ou seja, menor número de ciclos necessários de PCR até que a fluorescência seja detectável. O ciclo *threshold* é dependente da quantidade de moléculas presentes no início da amplificação. Quanto maior o número de moléculas, mais precoce o C_t , quanto menor o número de moléculas, mais tardio o C_t .

Foi utilizado como amostra para padronização, cDNA da linhagem leucêmica K562 (eritroleucêmica). Escolhemos a concentração de 150nM por ser aquela que apresentou melhores resultados. Em seguida, foi realizada uma curva

de eficiência dos iniciadores utilizando 7 pontos contendo diferentes diluições de cDNA, sendo elas: 2,00ng, 6,32ng, 20,00ng, 63,26ng, 120,00ng, 200,00ng e 400,00ng. A eficiência da amplificação é fundamental para o sucesso da técnica, variando idealmente entre 90–100% de eficiência.

3.6. Cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs)

Células HUVECs primárias foram adquiridas do banco de células do grupo suíço LONZA® e mantidas em nosso laboratório em nitrogênio líquido para posteriormente dar início ao cultivo e seguimento nos experimentos. Estas células são consideradas aderentes, por se fixarem ao longo de todo fundo da garrafa, formando uma espécie de “tapete” celular. As HUVECs foram cultivadas em garrafas 75 cm² previamente tratadas com meio EGM-2 (Clonetics®,Lonza) suplementado com o kit de suplementos e fatores de crescimento da Lonza®(FBS – *fetal bovine serum*; Hidrocortisona; hFGF – *Fibroblastic Growth Factor*; VEGF-*Vascular Endothelium Growth Factor*; IGF-1 – *Insulin Growth Factor 1*; Ácido Ascórbico; hEGF – *Epidermal Growth Factor*; GA –*Gentamicin and Amphotericin* e Heparina), e em seguida incubadas em ambiente a 37°C com 5% de CO₂. Ao atingirem a confluência desejada (aproximadamente 90%), estas células foram redistribuídas em outras garrafas para aumentar a proliferação celular. Para o desprendimento das HUVECs da garrafa para sua redistribuição foi necessário realizar a tripsinização. Para tal, utiliza-se 2ml de uma solução de tampão fosfato(PBS, pH =7,2) com tripsina (0,25%w/v) e EDTA (0,53nM) por um período de 3 minutos até que haja total desprendimento das células. O processo é neutralizado pela adição de 2 ml de FBS,uma vez que a tripsina é toxica para as

células. As células em suspensão são então lavadas com PBS e centrifugadas por 7 minutos a 130g, 30°C. O sobrenadante é descartado e o *pellet* celular é ressuspenso em meio EGM-2 suplementado, e redistribuído em novas garrafas, até a 3ª passagem.

A partir desta passagem, as células foram redistribuídas em placas de 6 poços (TPP®), em uma concentração igual a $2,5 \times 10^5$ células/poço, até atingirem a confluência necessária para realização dos experimentos.

3.7. Avaliação da fosforilação do resíduo S879 da p120-catenina

Como explicado anteriormente, utilizamos a fosforilação do resíduo S879 da p120-catenina como marcador da ativação das vias celulares envolvidas na quebra da BE. O método de citometria de fluxo foi utilizado nesta avaliação, através de um conjunto de reagentes especialmente desenvolvido para este fim (Phosflow Kit, BD bioscience).

Ao atingirem a confluência necessária, as HUVECs foram estimuladas com VEGF (50 ng/μl) ou TNF-α (100 ng/μl) ou Hemin (100μM). O VEGF e o TNF-α foram usados como controles positivos. Após o tempo de estímulo de 15, 20 e 30 minutos, as células foram lavadas com PBS, retiradas das placas como descrito anteriormente, e submetidas aos procedimentos descritos pelo fornecedor. De forma resumida, após a fixação e permeabilização das células, estas foram marcadas com anticorpo primário conjugado com ficoeritrina (PE) anti-p120 catenina S879 (BD Bioscience – PE mouse anti p120 catenina S879 - Cat.558634), sob proteção da luz, por 30 minutos, e transferidas para tubos de

citometria no volume final de 500µl. Cinco mil eventos foram obtidos de cada amostra e histogramas de SSC/FSC foram utilizados na identificação das populações de HUVEC. Foram utilizadas células não marcadas e não estimuladas, para demarcação do “gate” da população estudada e células não estimuladas e marcadas, usadas como controle negativo.

Os eventos foram adquiridos em um equipamento FACSCalibur™ (BD Bioscience, CellAnalyzer). Os resultados foram analisados através do software FACSDiva™ Version 6.1.3 (BD Bioscience).

3.8. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas como média e mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo, conforme especificado em cada resultado. As comparações entre os parâmetros quantitativos obtidos com e sem estímulo com hemin foram feitas usando o teste estatístico de Wilcoxon. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com software GraphPadPrism (GraphPadPrism Software Inc. San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da ativação da coagulação

4.1.1. Tromboelastometria

De acordo com o método de tromboelastometria, pudemos observar que o heme foi capaz de induzir a ativação da coagulação em amostras de sangue total de indivíduos saudáveis. Como demonstrado na figura 6, o estímulo com heme levou a uma redução significativa do tempo de coagulação (CT) e do tempo para obtenção da velocidade máxima (MAXV-t).

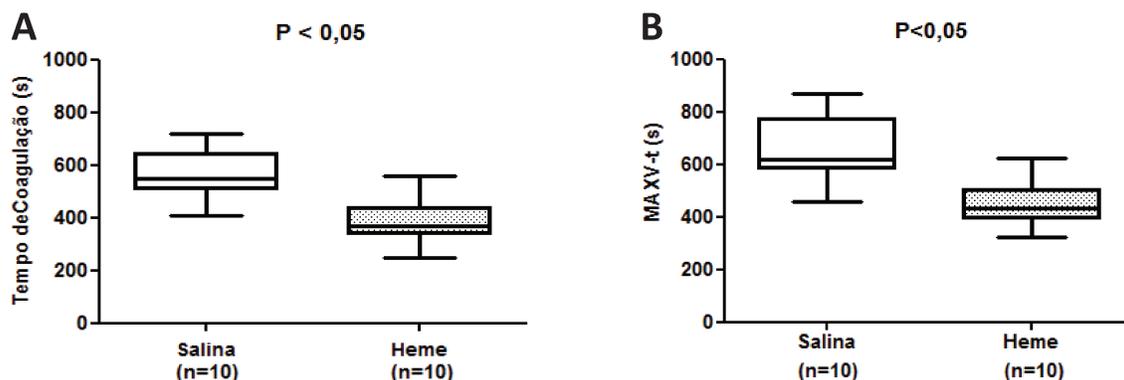


Figura 6. Ativação da coagulação induzida pelo heme. Box plots dos valores obtidos para o tempo de coagulação (segundos) e MAXV-t (segundos) antes e após o estímulo com heme 30uM por 4 horas. Teste de Wilcoxon (n=10).

Em relação a outros parâmetros significativos da TEM, não observamos diferenças significativas na área sob a curva, ou no tempo de formação do coágulo, embora este último tenha apresentado uma tendência a redução nas amostras estimuladas com heme (Figura 7).

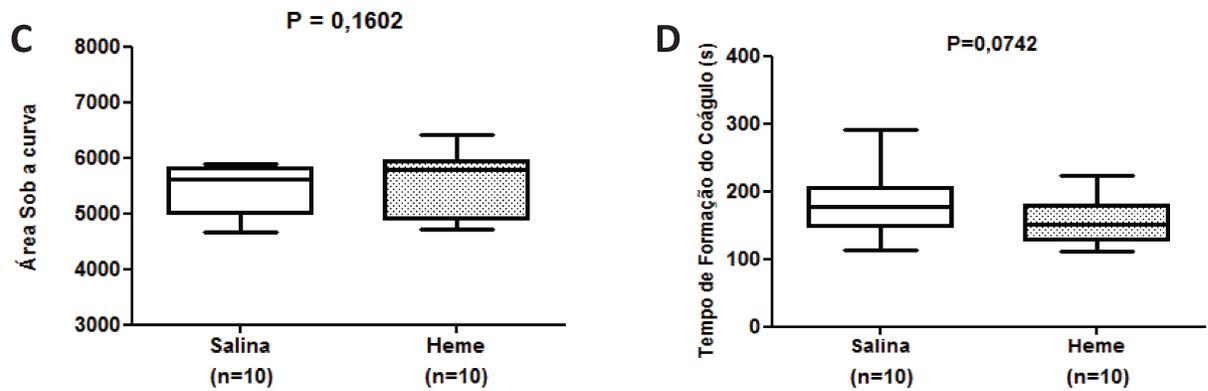


Figura 7. Ativação da coagulação induzida pelo heme. Box plots dos valores obtidos para a área sob a curva e tempo de formação do coágulo (segundos) antes e após o estímulo com heme 30 μ M por 4 horas. T (n=10).

Para melhor exemplificação do processo de hipercoagulabilidade pela ação do heme livre, se encontra demonstrado a seguir dois gráficos gerados após corrida tromboelastográfica incubados com salina e heme 30 μ M (Figura 8).

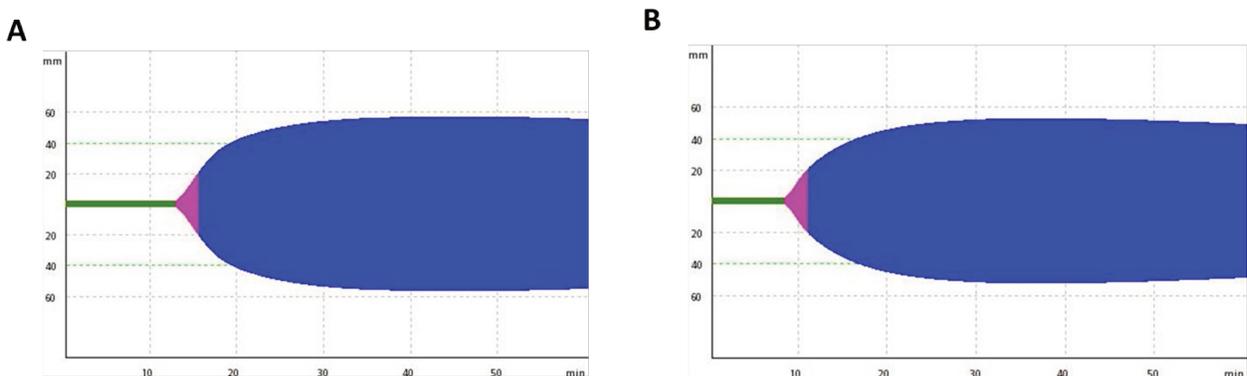


Figura 8. Tromboelastograma. (A) Representação gráfica dos experimentos realizados demonstrando parâmetros dentro do estado de normalidade (após incubação de 4 horas com salina). (B) Representação gráfica dos experimentos realizados demonstrando redução do tempo de coagulação, correspondente à linha verde (CT), após incubação de 4 horas com Heme 30 μ M.

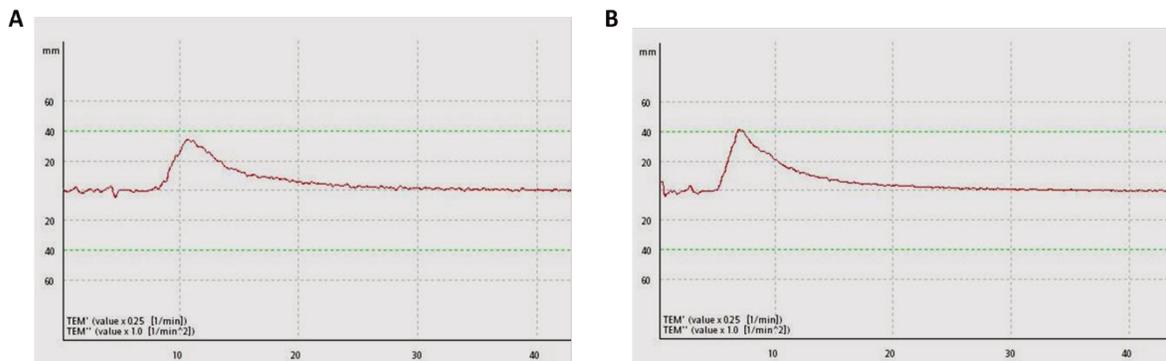


Figura 9. Tromboelastometria – parâmetros derivativos. Curva da derivada dos parâmetros de tromboelastografia, que ilustra a dinâmica de formação do coágulo. Os parâmetros MaxV e MaxV-t são obtidos desta curva, e se correlacionam com o teste de geração de trombina. (A) Curva gerada após 4 horas de incubação com salina (B) Curva gerada após 4 horas de incubação com Heme 30 μ M. Nota-se aumento do pico e encurtamento do tempo para início da curva no painel B.

4.1.2. Teste de geração de trombina (TGT)

A capacidade do heme de ativar a coagulação em amostras de plasma de voluntários sadios foi confirmada através do TGT. A adição de heme resultou em um aumento significativo do pico de trombina (Peak; $p < 0,05$) e em uma redução significativa do tempo para o pico (ttPeak; $p < 0,05$), alterações que sugerem um aumento da capacidade de geração de trombina (Figura 10).

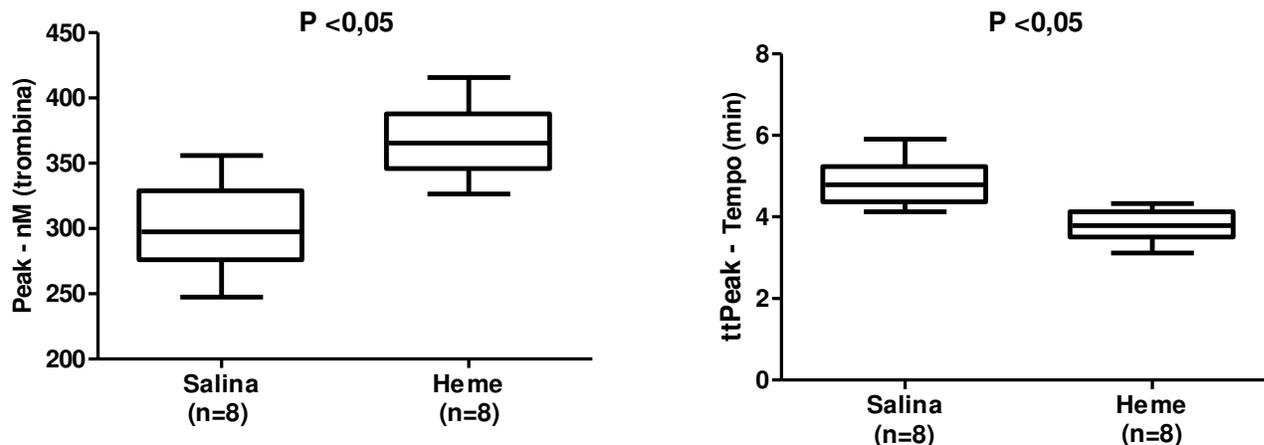


Figura 10. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis. Box plots dos valores obtidos para o pico de trombina (Peak) medido em nM e tempo para o pico (ttPeak) medido em minutos. Teste de Wilcoxon (n=8).

Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com ou sem estímulo com o heme foram também observadas nos seguintes parâmetros: (i) StartTail, que determina o término da geração de trombina, para o qual o estímulo com heme resultou em valores inferiores; (ii) índice de velocidade (VelIndex), que indica a velocidade de geração de trombina, com valores superiores após adição do heme; e (iii) tempo de latência (Lagtime), que indica o tempo para início da

geração de trombina, com valores inferiores mediante o estímulo com heme (Figuras 11 e 12).

Em contraste, não pudemos observar um aumento da área sob a curva (potencial endógeno de trombina) após o estímulo com heme (Figura 12).

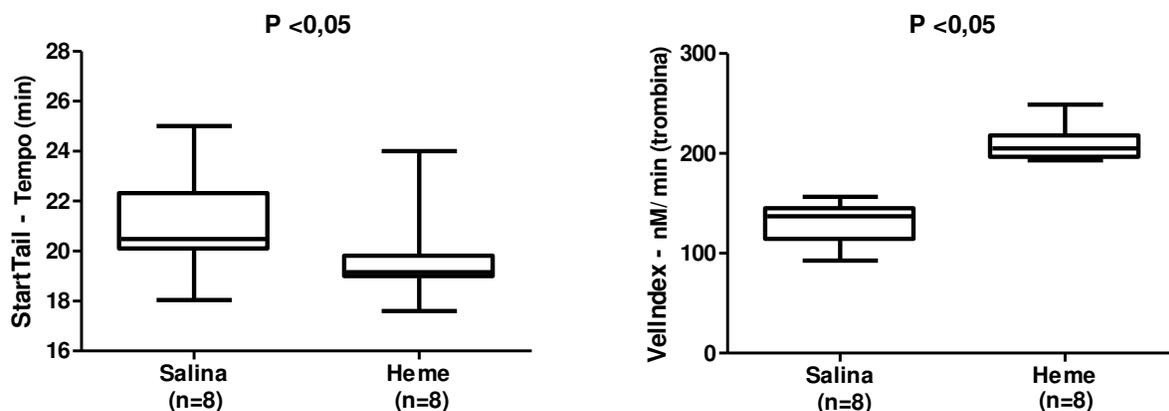


Figura 11. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis. Box plots dos valores obtidos para o StartTail, medido em minutos, e índice de velocidade (Velindex) medido em nM/min. Teste de Wilcoxon (n=8)

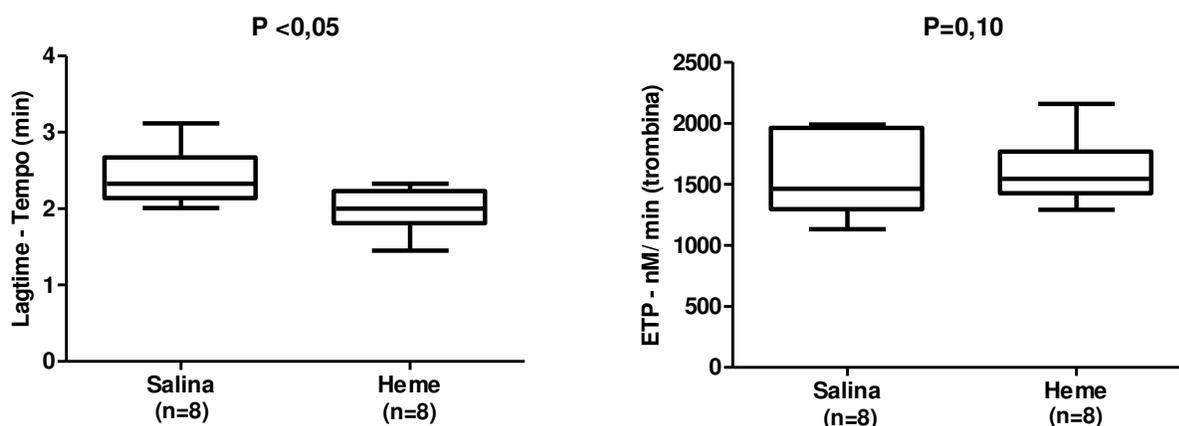


Figura 12. Efeito do heme sobre o TGT em voluntários saudáveis. Box plots dos valores obtidos para o tempo de latência (Lagtime) medido em minutos, e potencial endógeno de trombina (ETP)

medido em nM. Os resultados mostram redução do primeiro. Em contraste, não pudemos observar alteração significativa do ETP após a adição de hemin 30 μ M por 4 horas.. Teste de Wilcoxon (n=8).

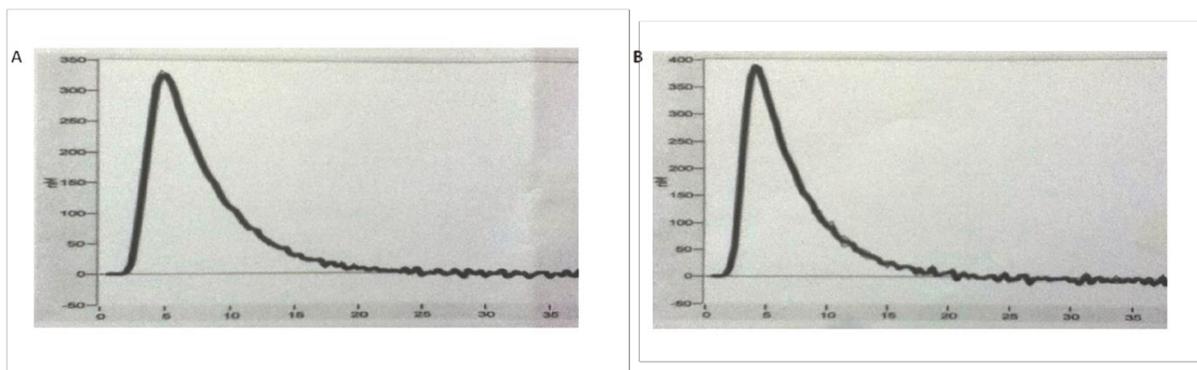


Figura 13. Curva de Geração de Trombina. (A) Curva representativa dos experimentos realizados com incubação de 4 horas com salina. (B) Curva representativa dos experimentos realizados com incubação de 4 horas com 30 μ M de Hemin.

4.2. Avaliação da expressão de FT

4.2.1 Expressão relativa de fator Tissular em células mononucleares e granulócitos

A avaliação por PCR quantitativo evidenciou um aumento significativo da expressão relativa de FT em células mononucleares estimuladas por 24 horas com o heme ($1,18 \pm 0,6$) quando comparadas a células sem estímulo ($0,03 \pm 0,06$) ($P=0.03$). Este aumento foi de aproximadamente 30 vezes o basal, como demonstrado na figura 14.

Não foi possível fazer a avaliação da população de granulócitos, visto que essa população celular não apresentou expressão de FT tanto não estimuladas quanto estimuladas com Heme $30\mu\text{M}$, através da análise do software StepOne Plus™ Real Time PCR Systems(Life Technologies).

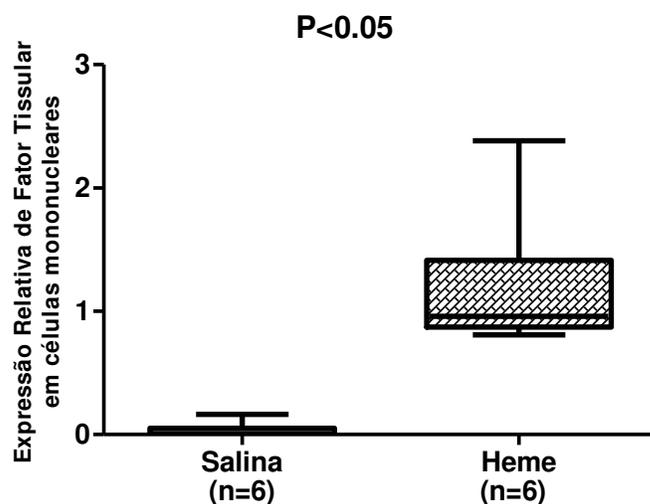


Figura 14. Efeito do heme sobre a expressão de fator tissular em células mononucleares.Box plots dos valores obtidos para a expressão relativa de FT antes e após o estímulo com hemin.

30uM por 24 horas. Um aumento de cerca de 80% na expressão pode ser observado. Teste de Wilcoxon (n=6).

4.3. Avaliação do efeito do heme sobre a barreira endotelial *in vitro*

4.3.1. Fosforilação do sítio S879 da p120 catenina

A fosforilação do resíduo S879 da p120 catenina em HUVECs foi escolhido como marcador da ativação de vias inflamatórias sabidamente associadas à quebra de barreira endotelial. Foram utilizados como controles positivos, mediadores inflamatórios como o VEGF 50ng/ml e o TNF- α 10ng/ml por um período de 15 minutos de estimulação. Para os demais tempos de 20 e 30 minutos, utilizamos apenas o Hemin 100uM.

Resultados preliminares destes experimentos podem ser observados na figura 15. Em primeiro lugar, podemos observar um aumento da fosforilação do resíduo S879 mediante o estímulo com TNF- α e VEGF. O número ainda reduzido de experimentos (n=4) não permite uma análise estatística representativa. Em relação ao heme, pudemos obter resultados em apenas 3 experimentos, que mostraram um aumento de menor magnitude, não significativo. Iremos aumentar o número de experimentos para a obtenção de conclusões mais significativas. Na figura 16, demonstramos um resultado representativo destas análises.

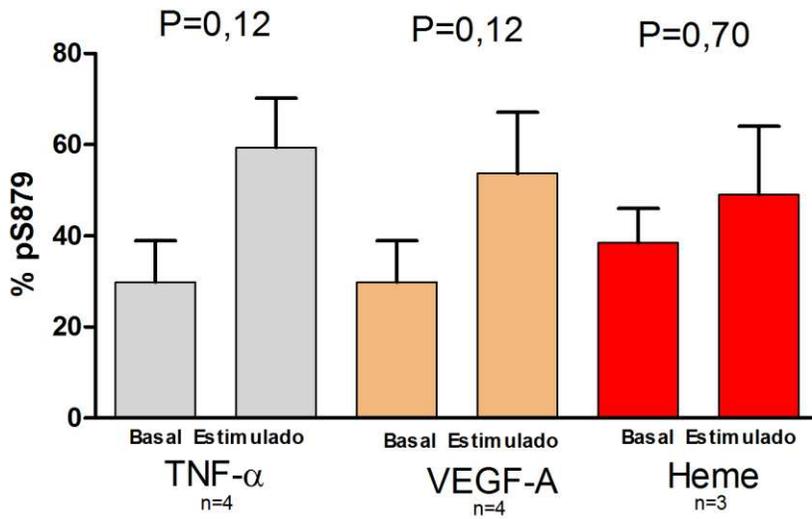


Figura 15. Fosforilação do resíduo S879 da p120 catenina. Valores obtidos para a fosforilação do resíduo S879 da p120ctn por citometria de fluxo em HUVECs na 3ª passagem, estimuladas com salina, TNF- α 10ng/ml, VEGF-A 50ng/ml ou ou hemin 100uM, por 15 minutos.

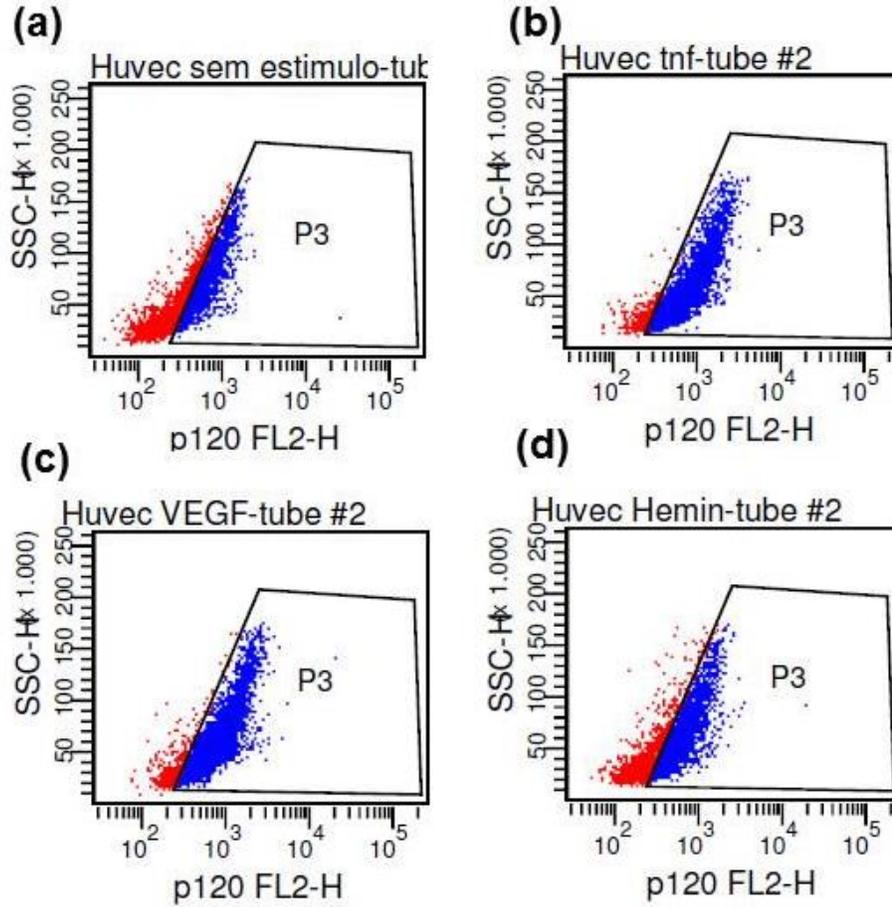


Figura 16. Análise por citometria de fluxo da fosforilação do resíduo S879 da p120 catenina.

Resultados representativos da citometria de fluxo para avaliação da fosforilação do resíduo S879 da p120ctn em HUVECs estimuladas com salina, TNF- α 10ng/ml, VEGF-A 50ng/ml ou ouhemin 100uM.

5. DISCUSSÃO

5.1. A AF como um estado de hipercoagulabilidade

Existem inúmeras evidências clínicas indicando a existência de um estado de hipercoagulabilidade na AF. A consequência clínica principal deste estado pró-coagulante é a tendência para os eventos trombóticos, tanto arteriais quanto venosos. O principal exemplo disto é o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), uma importante causa de morbidade e mortalidade em adultos e crianças com AF, chegando a uma prevalência de quase 10% aos 50 anos (Ohene-Frempong, et al. 1998). Os principais fatores de risco para ocorrência de infartos cerebrais silenciosos em crianças são pressão arterial sistêmica elevada e menores níveis de hemoglobina, indicando que pacientes com maior atividade hemolítica apresentam maior risco de AVCi.

Eventos tromboembólicos venosos também apresentam uma incidência aumentada em pacientes com AF, em especial o tromboembolismo pulmonar (Solovey, et al. 2004). Em um levantamento de dados de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos, foi encontrada uma prevalência quatro vezes maior de TEP nos pacientes com DF (incluindo indivíduos com AF e hemoglobinopatia SC), em comparação com os demais pacientes (Stein, et al. 2006). Durante o período de observação (1979-2003) a prevalência de TEP nos indivíduos com AF abaixo dos quarenta anos de idade foi de 0,44%, em comparação com 0,12% nos pacientes afro-descendentes desta faixa etária sem AF. A prevalência de trombose venosa profunda (TVP) foi similar nos dois grupos. Em um segundo estudo americano, a

incidência de TEP foi 50-100 vezes maior na população hospitalizada com DF em comparação com a população geral (Novelli, et al. 2012). O TEP é uma importante complicação clínica na AF, sendo considerada a principal causa de óbito associada à STA (Vichinsky, et al. 2000). Indivíduos com traço falciforme também têm um risco aumentado para eventos tromboembólicos. Em comparação com o grupo controle (afro-americanos hospitalizados sem traço), a incidência de tromboembolismo venoso (TEV) foi duas vezes maior nos afro-americanos com traço falciforme (OR 1,8), e a de TEP foi quatro vezes maior (OR 3,9) (Austin, et al. 2007).

Do ponto de vista laboratorial, o estado de hipercoagulabilidade da AF já foi muito bem demonstrado por diferentes abordagens experimentais (Lim, et al. 2013, Sparkenbaugh & Pawlinski 2013), e parece envolver fatores como disfunção endotelial e hemólise intravascular crônica. A disfunção endotelial se caracteriza por aumento da adesividade de células endoteliais a células circulantes do sangue, e é uma consequência da ativação de várias vias inflamatórias na AF (Conran & Costa 2009; Conran, et al. 2009). Além da ativação destas vias inflamatórias pelos ciclos repetidos de falcização e desfalcização, e pelos episódios de vaso-oclusão, a hemólise intravascular também contribui para esta disfunção endotelial, através da depleção crônica de óxido nítrico (NO). Durante a hemólise a hemoglobina é liberada do citoplasma das hemácias para o plasma, onde ela rapidamente reage com o NO levando ao seu consumo e redução. Também ocorre liberação da arginase eritrocitária durante a hemólise, o que reduz a biodisponibilidade da arginina, um importante substrato para a síntese de NO

pelas enzimas NO sintases. O NO é um regulador fundamental da homeostasia do endotélio e a sua deficiência acarreta um estado de disfunção endotelial. Além disso, o NO tem propriedades que inibem a ativação plaquetária, a expressão de FT e a geração de trombina e a sua deficiência tem uma importante contribuição para o estado pró-trombótico (Gladwin & Kato 2008).

5.2. O papel do FT na hipercoagulabilidade da AF

O FT é o principal iniciador fisiológico da coagulação *in vivo*. O FT é o receptor celular e cofator do fator VII da coagulação. O complexo TF:FVIIa numa superfície que contenha fosfatidilserina causa ativação do fator X e IX, iniciando uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a formação de um coágulo hemostático estável. A formação do coágulo hemostático requer em última instância, a conversão de fibrinogênio em fibrina mediada pela ação da trombina. O agente indutor fisiológico da coagulação *in vivo* é FT, que é uma proteína transmembrana encontrada em diversas linhagens celulares do subendotélio. De forma simplificada, a inicialização do processo da coagulação ocorre na superfície destas células onde, após a lesão vascular, o FT forma um complexo com o fator VII ativado presente em pequenas quantidades na circulação, ativa o fator X, que então desencadeia a geração de trombina. O processo pode ser dividido em três fases: a inicialização, propagação e finalização (Hoffman, 2003). Ao final da fase de iniciação, temos a geração de pequenas quantidades de trombina, ainda insuficientes para a conversão do fibrinogênio em fibrina. Durante a amplificação, a trombina regula uma série de mecanismos pró e anticoagulantes, que são responsáveis pela ativação adequada

da hemostasia. Este papel regulador coloca a trombina como a principal enzima da coagulação, fato bem ilustrado pela inviabilidade de animais *knockout* para a protrombina (Sun, et al. 1998). As reações reguladas pela trombina durante a amplificação resultam em um aumento exponencial da geração desta enzima. Após ultrapassar um limiar, a trombina gerada é capaz de converter fibrinogênio em fibrina, permitindo a formação efetiva do coágulo, na etapa conhecida como propagação.

Sob condições normais o FT é expresso nas células da camada adventícia da parede vascular, sendo exposto na circulação após a ocorrência de lesões vasculares, desencadeando então a ativação da coagulação (Mackman and J. 2009). O FT também é constitucionalmente expresso em concentrações muito pequenas por monócitos, e esta expressão é aumentada em várias condições patológicas, especialmente em estados pró-inflamatórios, tais como sepse (Egorina, et al. 2005).

A presença de níveis elevados de FT na AF já foi demonstrada em estudos não-clínicos e clínicos. Em camundongos com AF os vasos da circulação pulmonar apresentam expressão aumentada do FT e esta expressão aumenta ainda mais após episódios de hipóxia/reoxigenação (Solovey, et al. 2004). Células endoteliais circulantes (CECs) de indivíduos com AF expressam FT em porcentagem muito maior do que indivíduos normais (78% x 10%), sendo esta expressão maior nos episódios de crise álgica (83%) do que no estado crônico (66%) (Solovey, Gui et al. 1998). Além disso, monócitos de pacientes com AF são capazes de expressarem por si mesmos o FT. A atividade pró-coagulante total do

FT, mensurada através de ensaios de coagulação feitos com a fração de células mononucleares, também está aumentada na AF (Key, et al. 1998). Nesses ensaios de coagulação toda a atividade pró-coagulante do FT se concentrou na fração de células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes com AF. A importância do FT na ativação da coagulação é também sugerida em um estudo em camundongos com AF, no qual o FT foi o principal fator responsável pelo desencadeamento da ativação da coagulação, já que sua inibição reduziu os níveis de complexos trombina-antitrombina (um marcador indireto da geração de trombina) para valores normais (Chantrathammachart, et al. 2012). Por fim, nosso grupo demonstrou recentemente que a hidroxiuréia, a única intervenção farmacológica capaz de reduzir a frequência de complicações na AF, é capaz de reduzir a expressão de FT em células mononucleares de pacientes com AF (Colella, et al. 2012). Em conjunto, estes dados sugerem um papel central para a expressão de FT na fisiopatologia da hipercoagulabilidade da AF.

5.3. Fisiopatologia geral da hipercoagulabilidade na AF

É sabido que a presença de inflamação é capaz de por si só estimular a expressão de FT, iniciando um círculo vicioso em que inflamação a hipercoagulabilidade se retroalimentam de forma persistente. No entanto, a organização hierárquica e a importância relativa dos os mecanismos “*upstream*” que levam ao aumento da ativação de FT na AF ainda são desconhecidos. Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito do heme livre sobre a ativação da hemostasia, confirmando inicialmente sua capacidade de induzir a

expressão de FT, e avaliando posteriormente os efeitos *in vivo* do heme sobre a coagulação, através de testes com alta relevância biológica e clínica.

Nossos resultados demonstram que o heme é capaz de estimular a expressão de FT em células mononucleares do sangue periférico. De acordo com o que se sabe sobre a expressão de FT, é muito provável que as células mononucleares que estejam expressando este FT sejam monócitos, já que outras células do sangue não sejam capazes de expressar esta proteína. A capacidade do heme em induzir a expressão de FT já havia sido demonstrada em um estudo com células endoteliais em cultura (Setty, et al. 2008). Mais recentemente, a capacidade do heme em induzir a expressão de FT em monócitos foi reportada em um resumo apresentado na Reunião da Sociedade Americana de Hematologia em 2013, ainda não publicado em sua versão completa. De acordo com o modelo atual de hemostasia, o FT de monócitos é considerado o mais relevante para a ativação da hemostasia *in vivo* do que o FT expresso por células endoteliais, embora a participação de FT expresso em micropartículas destas células não possa ser descartada. Independente da fonte, a demonstração que o heme é capaz de induzir a expressão desta proteína é por si só muito importante para a compreensão dos mecanismos de ativação da coagulação nestes pacientes. Considerando que pacientes com AF, e outras anemias hemolíticas crônicas, apresentem níveis persistentemente elevados de heme, associados à redução dos níveis de seu “*scavenger*” natural, a hemopexina (Muller-Eberhard, et al. 1968), nossos dados reforçam o conceito de que o heme seria um ativador mestre da coagulação na AF.

5.4. O significado de testes globais da hemostasia na avaliação da ativação da coagulação

Embora a hemostasia seja classicamente avaliada através de ensaios plasmáticos como o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada, a hemostasia envolve também plaquetas e hemácias. Testes capazes de incorporar estes elementos à avaliação clássica da hemostasia têm o potencial de fornecer informações mais relevantes sobre o potencial hemostático de um indivíduo. Testes que avaliam ao mesmo tempo mais de um componente da hemostasia são genericamente chamados de “testes globais da hemostasia”(Brummel-Ziedins & Wolberg 2014).

A TEM é um teste global da hemostasia que avalia as propriedades visco-elásticas do sangue total, levando em conta o papel de plaquetas e de hemácias (Nair, Dargaud et al. 2010). Por este motivo, a TEM é usada na prática clínica como uma forma de gerar informações clinicamente relevantes sobre o estado de ativação da coagulação de pacientes. Inúmeros protocolos clínicos que incorporam a TEM validam a relevância clínica e biológica deste teste(Hampton, Lee et al. 2014). Neste contexto, o uso da TEM para avaliação dos efeitos do heme sobre a ativação da coagulação representa uma estratégia atrativa para a obtenção de dados com relevância clínica sobre esta questão. Em nosso estudo, optamos pela não utilização de ativadores da coagulação como FT ou fosfolipídeos, que poderiam mascarar efeitos mais sutis do heme sobre a hemostasia. A TEM sem estes ativadores – conhecida como NATEM - é uma metodologia aceita e padronizada inclusive em protocolos clínicos com este teste.

O TGT é um ensaio que mede a cinética e a magnitude da geração de trombina ao longo do tempo, através da utilização de um substrato fluorescente da trombina. Entre TGTs disponíveis comercialmente, a trombografia automática calibrada (“*callibrated automated thrombography*” ou CAT), desenvolvida por (Hemker, et al. 2002) é o método mais estudado. Este foi o método utilizado em nosso estudo. Evidências mostram que tanto a cinética quanto a quantidade de trombina gerada a partir do contato do FT com o plasma são determinantes críticos da qualidade do coágulo. Indivíduos com coagulopatias hereditárias como a hemofilia apresentam redução da velocidade e na quantidade de trombina gerada (Chitlur 2012). Por outro lado, pacientes com maior risco de eventos tromboembólicos apresentam aumento da velocidade e da quantidade de trombina gerada (Hron, et al. 2006, Ten Cate 2012). Por avaliar justamente a cinética e a quantidade de geração de trombina após a adição de fator tissular, o TGT é considerado um teste altamente relevante para avaliação *in vitro* do potencial hemostático. Em nosso estudo, o TGT foi ativado com concentrações picomolares de FT, que simulam a ativação fisiológica da coagulação. O TGT é mais frequentemente utilizado com amostras de plasma, devido à extinção da fluorescência por eritrócitos.

A relevância da TEM e do TGT na AF é ainda corroborada pelos resultados destes testes em pacientes com DF revisado em Lim et.al. 2013 (Lim, et al. 2013). A utilidade potencial da TEM em detectar e acompanhar as alterações hemostáticas da DF foi primeiramente relatada por Yee et al. em 2005 (Yee, et al. 2005). Estes autores demonstraram que pacientes com AF apresentam um padrão

de TEM sugestivo de hipercoagulabilidade, caracterizado por redução do tempo de coagulação, e aumento do ângulo e da amplitude da curva, quando comparados com controles pareados. Essas diferenças persistiram mesmo após o ajuste para o dímero D elevado e para a redução da proteína C e S. O estudo também constatou um aprofundamento destas alterações durante as crises de agudização, embora não seja possível descartar um efeito da leucocitose sobre este último resultado. Não há na literatura estudos que mostrem a capacidade preditiva de eventos trombóticos da TEM no contexto da AF. Em nosso estudo, a adição de heme em concentrações semelhantes às aquelas observadas em pacientes com AF, resultou em alterações compatíveis com um desvio do balanço hemostático para o pólo da hipercoagulabilidade tais como a redução do tempo de coagulação, e do tempo para obtenção da velocidade máxima (MaxV-t). O MaxV-t é um parâmetro robusto, derivado da análise conjunta da curva da TEM, que ilustra melhor o potencial hemostático dos pacientes que a análise individual de outros parâmetros (Sorensen, Johansen et al. 2003). O encurtamento significativo deste parâmetro deve ser considerada uma alteração clinicamente relevante da TEM induzida pelo heme.

Vários estudos já utilizaram o TGT para avaliação das alterações hemostática na DF. Resultados algo conflitantes foram obtidos, o que pode ser parcialmente atribuível à heterogeneidade de protocolos experimentais utilizados. Noubouossie et. al. 2012 (Noubouossie, et al. 2012), encontraram aumento da geração de trombina (redução do tempo de latência e aumentos do pico de trombina, do índice de velocidade e da área sob a curva) em comparação a controles pareados por idade. Neste estudo, a trombomodulina foi utilizada como

forma de simular a participação de células endoteliais no processo. Na ausência da trombomodulina, apenas as alterações no índice de velocidade persistiram. Não foram observadas diferenças entre pacientes com e sem crises de agudização. Em contraste, Shah et al. 2012(Shah, et al. 2012), encontraram diferenças significativas sugestivas de hipercoagulabilidade em pacientes em crise. Ambos estudos utilizaram como ativador o FT na concentração de 1pM. Utilizando doses mais elevadas de FT para ativação (5pM) Gerotziafas et. al 2012(Gerotziafas, et al. 2012), encontraram uma aceleração significativa da fase de propagação, evidenciada por um tempo para atingir o pico de trombina mais curto, e por um pico de trombina mais elevado. Este resultado é semelhante ao observado em nosso estudo, no qual a área sob a curva, que mede o potencial de trombina endógena (ETP), também não apresentou diferença estatisticamente significativa. E complementando a variabilidade dos resultados obtidos com o TGT na DF, Betal et al. 2009, apud (Lim, et al. 2013) (usando tanto 1 quanto 5 pM de FT) e Wolberg et al. 2009, apud (Lim, et al. 2013)(usando o 1pM de FT) encontraram uma redução do ETP. Cabe destacar que estes dois estudos utilizaram tubos de coleta com inibidor de tripsina de milho (CTI ou “corn trypsin inhibitor”), que é usado para inibição da ativação da coagulação pela fase de contato no tubo de coleta. Embora alguns autores argumentem que o uso destes tubos seja essencial para realização do TGT, um estudo realizado por Spronk et al. (Spronk, et al. 2009) sugere que estes tubos só sejam necessários quando concentrações muito baixas de FT (0,5 pM) são utilizadas. Diferenças do TGT por faixa etária, gênero e grupo racial também dificultam a análise destes resultados, na medida em que a constituição dos grupos controle são heterogêneas. Neste

contexto, o uso de amostras do mesmo indivíduo em nosso estudo, assim como a estratégia de comparação (pré x pós estímulo) no desenho de nosso estudo fortalecem nossas conclusões.

Apesar desta variabilidade nos resultados de TGT em pacientes com AF, nossos resultados obtidos com a adição de heme ao sangue total, em concentrações semelhantes às encontradas em pacientes com AF, mostram um padrão coerente com os resultados da TEM, isto é, de desvio do balanço hemostático para o pólo da hipercoagulabilidade, e também semelhantes aos resultados obtidos em pacientes com AF, qual seja, o encurtamento do tempo e aumento do pico de geração de trombina. A semelhança entre os achados clínicos e os resultados obtidos em nosso estudo reforçam a validade de nosso modelo.

Nossos resultados mostram que o heme é capaz de induzir um aumento robusto na expressão de FT, e de produzir alterações em dois testes globais da hemostasia que sugerem um perfil de hipercoagulabilidade. Embora seja tentador especular uma relação direta entre os dois achados, nossos resultados não permitem esta conclusão, já que não foram feitos ensaios capazes de mostrar que o FT foi o elemento diretamente responsável pelas alterações da TEM e TEG. Estudos com anticorpos inibidores de FT poderiam confirmar esta hipótese. Outra limitação de nosso estudo diz respeito ao estudo das vias responsáveis pelo efeito do heme sobre a coagulação. A partir da hipótese de estes efeitos serem mediados pela ativação de receptores TLR-4, realizamos estudos com um inibidor desta via, o TAK-242. Nos estudos que mostraram a expressão de FT em células endoteliais e em monócitos, este inibidor reverteu o aumento da expressão, sugerindo ser esta uma das vias de ativação do heme na AF. Em nosso estudo,

tentamos utilizar este inibidor no modelo de TEM, mas limitações relacionadas a sua capacidade intrínseca de ativar a coagulação impediram a obtenção de resultados conclusivos.

5.5. O heme como regulador-mestre da ativação da coagulação na AF

A ativação da resposta imune inata é um evento comum em várias formas de doenças inflamatórias tais como a sepse, o trauma, entre outras. Esta ativação resulta em uma resposta celular e molecular estereotipada, que inclui invariavelmente algum grau de ativação endotelial e de ativação da coagulação. Quando localizado e regulado, esta ativação tende a ser benéfica. Quando disseminada e sem controle, pode se tornar um mecanismo de lesão mais importante que o próprio fator desencadeante. Este paradigma clássico é reconhecido há anos no contexto da sepse, onde a ativação da coagulação pode levar desde à compartimentalização do patógeno, limitando a infecção – quando localizada - ou a quadros graves de coagulação intravascular disseminada. O mesmo se aplica à ativação endotelial, que pode facilitar o acesso de patógenos aos tecidos infectados pela quebra local da barreira endotelial, ou levar a quadros graves de lesão pulmonar aguda. A ativação desta resposta é feita pela ligação de patógenos ou outras moléculas sinalizadoras de dano ou risco celular, conhecidas como PAMPs ou DAMPs. Estes padrões moleculares, altamente conservados, se ligam a receptores reconhecedores de padrão (PRRs), que ativam a resposta imune inata. Interessantemente, o heme, uma molécula que faz parte da proteína hemoglobina, e que normalmente está restrito ao interior da hemácia, é capaz de ativar um tipo comum de PRR expresso em células endoteliais, que são os TLR-4.

Este fato permite que seja levantada a hipótese que em situações em que há aumento importante do heme na circulação, a resposta imune inata pode estar induzida de forma contínua e desregulada.

Há mais de 50 anos sabemos que pacientes com hemólise crônica apresentam níveis mais elevados de heme na circulação (Muller-Eberhard, et al. 1968). Por sua capacidade de induzir lesão tecidual, o organismo possui um sistema capaz de sequestrar este heme livre, impedindo-o de circular. Trata-se da proteína hemopexina. Ocorre que em pacientes com anemia falciforme, há um esgotamento da hemopexina, que leva à persistência de níveis elevados de heme, com consequências até recentemente desconhecidas.

Assim como ocorre na sepse, pacientes com anemia falciforme apresentam complicações clínicas compatíveis com ativação desregulada da resposta imune inata. Tromboses micro e macrovasculares são frequentes, assim como uma forma de lesão pulmonar aguda, em muitos aspectos semelhantes à síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), que é a STA. Interessantemente, foi demonstrado em 2013 que o heme extracelular em excesso pode desencadear lesão pulmonar aguda em camundongos com anemia falciforme. A STA tem como base de sua fisiopatologia tanto as tromboses, como a hipoxemia pelo desenvolvimento de infiltrados pulmonares. Assim, é tentador imaginar que o heme possa atuar sobre a coagulação e sobre a integridade da barreira endotelial.

Nossos resultados de fato sugerem que o heme possa mediar vias de sinalização sabidamente associadas à quebra patológica da barreira endotelial, como a internalização da VE-caderina mediada pela dissociação da p120-catenina

(evento marcado pela fosforilação de S879). No entanto, mais experimentos são necessários para esta confirmação.

Por outro lado, nossos resultados mostram de forma muito bem documentada que: (1) o heme é capaz de induzir a expressão de fator tissular, a proteína iniciadora da coagulação, em células mononucleares circulantes; e (2) o heme induz um perfil de hipercoagulabilidade quando adicionado ao sangue total em concentrações semelhantes às encontradas em pacientes com anemia falciforme, e que pode ser detectado por testes relevantes da coagulação como a tromboelastografia e o teste de geração de trombina. Em conjunto, estes resultados mostram pela primeira vez o efeito do heme sobre testes clinicamente relevantes da coagulação, induzindo um perfil muito semelhante ao observado em pacientes com anemia falciforme, submetidos a estes mesmos ensaios. Os resultados reforçam o conceito de que o heme pode ser um ativador mestre da atividade inflamatória na anemia falciforme, com participação crítica na hipercoagulabilidade observada nestes pacientes.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados permitem concluir que:

1. O heme é capaz de induzir a expressão de fator tissular em células mononucleares do sangue periférico.
2. O heme, nas concentrações comumente observadas em pacientes com anemia falciforme, é capaz de induzir alterações tromboelastográficas compatíveis com ativação da coagulação e hipercoagulabilidade.
3. O heme é capaz de aumentar a velocidade e o pico de geração de trombina em plasma pobre em plaquetas, levando a um perfil de trombograma semelhante ao observado em pacientes com anemia falciforme.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adisa, O. A., Y. Hu, S. Ghosh, D. Aryee, I. Osunkwo and S. F. Ofori-Acquah (2013). "Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease." Br J Haematol **162**(5): 702-705.

Aird, W. C. (2003). "The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome." Blood **101**(10): 3765-3777.

Al Hawaj, M. A., E. J. Martin, J. Venitz, J. C. Barrett, J. G. Kuhn, M. E. Nolte and D. F. Brophy (2013). "Monitoring rFVIII prophylaxis dosing using global haemostasis assays." Haemophilia **19**(3): 409-414.

Ataga, K. I. and N. S. Key (2007). "Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 91-96.

Austin, H., N. S. Key, J. M. Benson, C. Lally, N. F. Dowling, C. Whitsett and W. C. Hooper (2007). "Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks." Blood **110**(3): 908-912.

Baglin, T. (2011). "Using the laboratory to predict recurrent venous thrombosis." Int J Lab Hematol **33**(4): 333-342.

Belcher, J. D., C. Chen, J. Nguyen, L. Milbauer, F. Abdulla, A. I. Alayash, A. Smith, K. A. Nath, R. P. Hebbel and G. M. Vercellotti (2014). "Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease." Blood **123**(3): 377-390.

Bernaudin, F., S. Verlhac, L. Coic, E. Lesprit, P. Brugieres and P. Reinert (2005). "Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler." Pediatr Radiol **35**(3): 242-248.

Bolliger, D., M. D. Seeberger and K. A. Tanaka (2012). "Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice." Transfus Med Rev **26**(1): 1-13.

Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1995). "Functional

properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(8): 1229-1239.

Brittenham, G. M., A. N. Schechter and C. T. Noguchi (1985). "Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes." Blood **65**(1): 183-189.

Brummel-Ziedins, K. E. and A. S. Wolberg (2014). "Global assays of hemostasis." Current opinion in hematology **21**(5): 395-403.

Chantrathammachart, P., N. Mackman, E. Sparkenbaugh, J.-G. Wang, L. V. Parise, D. Kirchhofer, N. S. Key and R. Pawlinski (2012). "Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease." Blood **120**(3): 636-646.

Chen, G., D. Zhang, T. A. Fuchs, D. Manwani, D. D. Wagner and P. S. Frenette (2014). "Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease." Blood **123**(24): 3818-3827.

Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.

Chitlur, M. (2012). "Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders." Thromb Res **130**(1): 1-6.

Colella, M. P., E. V. De Paula, N. Conran, J. A. Machado-Neto, J. M. Annicchino-Bizzacchi, F. F. Costa, S. T. Saad and F. Traina (2012). "Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia." J Thromb Haemost **10**(9): 1967-1970.

Conran, N. and F. F. Costa (2009). "Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions." Clin Biochem **42**(18): 1824-1838.

Conran, N., C. F. Franco-Penteado and F. F. Costa (2009). "Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion." Hemoglobin **33**(1): 1-16.

DeBaun, M. R., S. A. Sarnaik, M. J. Rodeghier, C. P. Minniti, T. H. Howard, R. V. Iyer, B. Inusa, P. T. Telfer, M. Kirby-Allen, C. T. Quinn, F. Bernaudin, G. Airewele, G. M. Woods, J. A. Panepinto, B. Fuh, J. K. Kwiatkowski, A. A. King, M. M. Rhodes, A. A. Thompson, M. E. Heiny, R. C. Redding-Lallinger, F. J. Kirkham, H.

Sabio, C. E. Gonzalez, S. L. Saccente, K. A. Kalinyak, J. J. Strouse, J. M. Fixler, M. O. Gordon, J. P. Miller, M. J. Noetzel, R. N. Ichord and J. F. Casella (2012). "Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, sex, and relative high systolic blood pressure." Blood **119**(16): 3684-3690.

Dejana, E. and C. Giampietro (2012). "Vascular endothelial-cadherin and vascular stability." Curr Opin Hematol **19**(3): 218-223.

Dejana, E. and F. Orsenigo (2013). "Endothelial adherens junctions at a glance." J Cell Sci **126 Pt 12**: 2545-2549.

Dejana, E., F. Orsenigo, C. Molendini, P. Baluk and D. M. McDonald (2009). "Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees." Cell Tissue Res **335**(1): 17-25.

Dejana, E., E. Tournier-Lasserre and B. M. Weinstein (2009). "The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications." Dev Cell **16**(2): 209-221.

Egorina, E. M., M. A. Sovershaev, G. Bjørkøy, F. X. E. Gruber, J. O. Olsen, B. Parhami-Seren, K. G. Mann and B. Østerud (2005). "Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **25**(7): 1493-1498.

Figueiredo, R. T., P. L. Fernandez, D. S. Mourao-Sa, B. N. Porto, F. F. Dutra, L. S. Alves, M. F. Oliveira, P. L. Oliveira, A. V. Graca-Souza and M. T. Bozza (2007). "Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4." J Biol Chem **282**(28): 20221-20229.

Gerotziakas, G. T., P. Van Dreden, M. Chaari, V. Galea, A. Khaterchi, F. Lionnet, K. Stankovic-Stojanovic, O. Blanc-Brude, B. Woodhams, M. Maier-Redelsperger, R. Girot, M. Hatmi and I. Elalamy (2012). "The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles." Thrombosis and haemostasis **107**(6): 1044-1052.

Ghosh, S., O. A. Adisa, P. Chappa, F. Tan, K. A. Jackson, D. R. Archer and S. F. Ofori-Acquah (2013). "Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice." J Clin Invest **123**(11): 4809-4820.

Gladwin, M. T. and G. J. Kato (2008). "Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens!" Haematologica **93**(1): 1-3.

Goddard, L. M. and M. L. Iruela-Arispe (2013). "Cellular and molecular regulation of vascular permeability." Thromb Haemost **109**(3): 407-415.

Hack, C. E. and S. Zeerleder (2001). "The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation." Crit Care Med **29**(7 Suppl): S21-27.

Hampton, D. A., T. H. Lee, B. S. Diggs, S. P. McCully and M. A. Schreiber (2014). "A predictive model of early mortality in trauma patients." American journal of surgery **207**(5): 642-647; discussion 647.

Hemker, H. C., P. Giesen, R. AIDieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoord, T. Lecompte and S. Béguin (2002). "The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability." Pathophysiology of haemostasis and thrombosis **32**(5-6): 249-253.

Hoffman, M. J. (2003). "Remodeling the blood coagulation cascade." Journal of thrombosis and thrombolysis **16**: 17-20.

Hron, G., M. Kollars, B. R. Binder, S. Eichinger and P. A. Kyrle (2006). "Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation." JAMA : the journal of the American Medical Association **296**(4): 397-402.

Ingram, V. M. (1958). "Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting." Biochim Biophys Acta **28**(3): 539-545.

Kato, G. J., M. T. Gladwin and M. H. Steinberg (2007). "Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." Blood Rev **21**(1): 37-47.

Key, N. S., A. Slungaard, L. Dandelelet, S. C. Nelson, C. Moertel, L. A. Styles, F. A. Kuypers and R. R. Bach (1998). "Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease." Blood **91**(11): 4216-4223.

Kwiatkowski, J. L., R. A. Zimmerman, A. N. Pollock, W. Seto, K. Smith-Whitley, J. Shults, A. Blackwood-Chirchir and K. Ohene-Frempong (2009). "Silent infarcts in young children with sickle cell disease." Br J Haematol **146**(3): 300-305.

Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco and E. Dejana (1992). "A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts." J Cell Biol **118**(6): 1511-1522.

Lim, M. Y., K. I. Ataga and N. S. Key (2013). "Hemostatic abnormalities in sickle cell disease." Current opinion in hematology **20**(5): 472-477.

Mackman, N. and J. (2009). "The many faces of tissue factor." Haemost 7 Suppl 1 SRC - GoogleScholar: 136-139.

Muller-Eberhard, U., J. Javid, H. H. Liem, A. Hanstein and M. Hanna (1968). "Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases." Blood **32**(5): 811-815.

Nagafuchi, A. and M. Takeichi (1988). "Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain." EMBO J **7**(12): 3679-3684.

Nair, S. C., Y. Dargaud, M. Chitlur and A. Srivastava (2010). "Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders." Haemophilia **16 Suppl 5**: 85-92.

Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mandoteanu, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1995). "Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin." J Biol Chem **270**(52): 30965-30972.

Noubouossie, D. F., P. Q. Lê, F. Corazza, F. Debaugnies, L. Rozen, A. Ferster and A. Demulder (2012). "Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children." American journal of hematology **87**(2): 145-149.

Noval-Padillo, J. A., A. Leon-Justel, P. Mellado-Miras, F. Porrás-Lopez, D. Villegas-Duque, M. A. Gomez-Bravo and J. M. Guerrero (2010). "Introduction of fibrinogen in the treatment of hemostatic disorders during orthotopic liver transplantation: implications in the use of allogenic blood." Transplant Proc **42**(8): 2973-2974.

Novelli, E. M., C. Huynh, M. T. Gladwin, C. G. Moore and M. V. Ragni (2012). "Pulmonary embolism in sickle cell disease: a case-control study." J Thromb Haemost **10**(5): 760-766.

O'Donnell, J., A. Riddell, D. Owens, A. Handa, J. Pasi, G. Hamilton and D. J. Perry (2004). "Role of the Thrombelastograph as an adjunctive test in thrombophilia screening." Blood Coagul Fibrinolysis **15**(3): 207-211.

Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, L. A. Sleeper, S. T. Miller, S. Embury, J. W. Moohr, D. L. Wethers, C. H. Pegelow and F. M. Gill (1998). "Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors." Blood **91**(1): 288-294.

Ozawa, M., H. Hoschutzky, K. Herrenknecht and R. Kemler (1990). "A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin." Mech Dev **33**(1): 49-56.

Piel, F. B. (2013). "[Sickle-cell disease: geographical distribution and population estimates]." Med Sci (Paris) **29**(11): 965-967.

Potente, M., H. Gerhardt and P. Carmeliet (2011). "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." Cell **146**(6): 873-887.

Rees, D. C., T. N. Williams and M. T. Gladwin (2010). "Sickle-cell disease." Lancet **376**(9757): 2018-2031.

Rehani, T., K. Mathson, J. D. Belcher, G. M. Vercellotti and A. Slungaard (2013). "Heme Potently Stimulates Tissue Factor Expression by peripheral blood monocytes: A novel mechanism for thrombosis in vascular hemolytic diseases." Blood Rev **122**: 2215.

Roseff, S. D. (2009). "Sickle cell disease: a review." Immunohematology **25**(2): 67-74.

Rother, R. P., L. Bell, P. Hillmen and M. T. Gladwin (2005). "The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease." JAMA **293**(13): 1653-1662.

Sakamoto, T. M., C. Lanaro, M. C. Ozelo, V. T. Garrido, S. T. Olalla-Saad, N. Conran and F. F. Costa (2013). "Increased adhesive and inflammatory properties

in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients." Microvasc Res **90**: 173-179.

saúde, P. d. " Triagem Neonatal ", from http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=1061.

Schaer, D. J., P. W. Buehler, A. I. Alayash, J. D. Belcher and G. M. Vercellotti (2013). "Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins." Blood **121**(8): 1276-1284.

Schochl, H., U. Nienaber, G. Hofer, W. Voelckel, C. Jambor, G. Scharbert, S. Kozek-Langenecker and C. Solomon (2010). "Goal-directed coagulation management of major trauma patients using thromboelastometry (ROTEM)-guided administration of fibrinogen concentrate and prothrombin complex concentrate." Crit Care **14**(2): R55.

Seeley, E. J., M. A. Matthay and P. J. Wolters (2012). "Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **303**(5): L355-363.

Setty, B. N., S. G. Betal, J. Zhang and M. J. Stuart (2008). "Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia." J Thromb Haemost **6**(12): 2202-2209.

Shah, N., C. Thornburg, M. J. Telen and T. L. Ortel (2012). "Characterization of the hypercoagulable state in patients with sickle cell disease." Thrombosis research **130**(5): e241-245.

Solovey, A., L. Gui, N. S. Key and R. P. Heibel (1998). "Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia." The Journal of clinical investigation **101**(9): 1899-1904.

Solovey, A., R. Kollander, A. Shet, L. C. Milbauer, S. Choong, A. Panoskaltis-Mortari, B. R. Blazar, R. J. Kelm and R. P. Heibel (2004). "Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin." Blood **104**(3): 840-846.

Sorensen, B. and J. Ingerslev (2004). "Whole blood clot formation phenotypes in hemophilia A and rare coagulation disorders. Patterns of response to recombinant factor VIIa." J Thromb Haemost **2**(1): 102-110.

Sorensen, B., P. Johansen, K. Christiansen, M. Woelke and J. Ingerslev (2003). "Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation." J Thromb Haemost **1**(3): 551-558.

Sparkenbaugh, E. and R. Pawlinski (2013). "Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease." Br J Haematol **162**(1): 3-14.

Sparkenbaugh, E. and R. Pawlinski (2013). "Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease." British journal of haematology **162**(1): 3-14.

Spronk, H. M. H., A. W. J. H. Dielis, M. Panova-Noeva, R. van Oerle, J. W. P. Govers-Riemslog, K. Hamulyák, A. Falanga and H. T. Cate (2009). "Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed?" Thrombosis and haemostasis **101**(6): 1156-1162.

Spronk, P. E., D. F. Zandstra and C. Ince (2004). "Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation." Crit Care **8**(6): 462-468.

Stein, P. D., A. Beemath, F. A. Meyers, E. Skaf and R. E. Olson (2006). "Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease." Am J Med **119**(10): 897 e897-811.

Stuart, M. J. and R. L. Nagel (2004). "Sickle-cell disease." Lancet **364**(9442): 1343-1360.

Sun, W. Y., D. P. Witte, J. L. Degen, M. C. Colbert, M. C. Burkart, K. Holmbäck, Q. Xiao, T. H. Bugge and S. J. Degen (1998). "Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(13): 7597-7602.

Tanihara, H., M. Kido, S. Obata, R. L. Heimark, M. Davidson, T. St John and S. Suzuki (1994). "Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins." J Cell Sci **107 (Pt 6)**: 1697-1704.

Ten Cate, H. (2012). "Thrombin generation in clinical conditions." Thromb Res **129**(3): 367-370.

van der Poll, T. and H. Herwald (2014). "The coagulation system and its function in early immune defense." Thromb Haemost **112**(1).

Vichinsky, E. P., L. D. Neumayr, A. N. Earles, R. Williams, E. T. Lennette, D. Dean, B. Nickerson, E. Orringer, V. McKie, R. Bellevue, C. Daeschner and E. A. Mancini (2000). "Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group." N Engl J Med **342**(25): 1855-1865.

Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana and P. Huber (1997). "Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6273-6278.

Webb, J. and J. L. Kwiatkowski (2013). "Stroke in patients with sickle cell disease." Expert Rev Hematol **6**(3): 301-316.

Yee, D. L., R. M. Edwards, B. U. Mueller and J. Teruya (2005). "Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease." Archives of pathology & laboratory medicine **129**(6): 760-765.

Zago, M. C. P., R; Falcão, P. R ; (2013). Tratado de Hematologia.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 13/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1261/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1165.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DAS JUNÇÕES DO TIPO ADHERENS DURANTE A SEPSE EM CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gleice Regina de Souza

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/12/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 13/02/13 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Explorar a interação da VE-caderina e da p120catenina na fisiopatologia do choque séptico, em ensaio *in vitro* realizado a partir de plasma de pacientes com diagnóstico de choque séptico.

III – SUMÁRIO.

O estudo pretende utilizar o plasma de pacientes em cultivo de células endoteliais e verificar os possíveis efeitos sobre a permeabilidade celular. O ensaio biológico empregará plasma de 12 a 24 sujeitos com diagnóstico clínico-laboratorial de sepse e choque séptico e a linhagem celular HMVEC, através do sistema "transwell-COL". Os dados serão comparados com grupo controle, composto por 10 sujeitos saudáveis. A análise estatística será feita pelos testes Mann-Whitney e Wilcoxon. Os autores estipularam 8 trimestres para o estudo, a partir de março de 2012, e o projeto conta com apoio financeiro da FAPESP e CNPq. Há previsão de armazenamento do material biológico e de consulta a este CEP, quando novos projetos empregarem o mesmo material.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

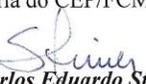
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2 . Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES EM PROTEÍNAS DAS JUNÇÕES DO TIPO ADHERENS DURANTE A SEPSE EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Responsáveis pelo projeto: Dr. Erich Vinicius de Paula e Gleice Regina de Souza

Eu, _____,
idade: _____, Data de Nascimento: _____, RG: _____,
HC: _____, Residente à Rua/Av. _____

CEP: _____, Telefones: _____,

concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,

Residente à Rua/Av. _____

_____, CEP: _____,

Telefones: _____.

Este estudo pretende identificar as formas como as infecções mais graves, conhecidas como “sepsé” podem causar danos para nosso organismo. Durante uma infecção grave, pode ocorrer um aumento da perda de líquidos normalmente presentes no sangue, para os tecidos (isto é, os outros órgãos do corpo como pulmões, fígado, pele). Este aumento é geralmente o responsável pelo inchaço observado em pacientes com infecções mais graves. O objetivo desta pesquisa é avaliar o que está por trás desta perda de líquidos, para que no futuro, novos tratamentos possam ser desenvolvidos.

Para isso, coletaremos 11mL de sangue (3 tubos) em quatro momentos separados do tratamento da sepse. Os tubos serão coletados por punção de veia periférica ou através de seu cateter. Exceto no caso da coleta inicial, as coletas serão feitas no momento em que outros exames pedidos pelo seu médico estiverem sendo coletados. Nenhum outro exame será feito nesta amostra de sangue. As coletas estão programadas para: (1ª) momento de entrada na pesquisa; (2ª) após 48 a 72 horas; (3ª) após 48 a 72 horas da 3ª coleta; (4ª) um dia antes de sua alta.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos, mas gostaríamos de saber se o senhor(a) concorda que este material possa ser armazenado.
 Sim Não
4. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade não será revelada.
5. O responsável legal poderá assinar o TCLE, quando houver qualquer restrição à liberdade, sem suspensão do limite a informação do indivíduo no limite de sua capacidade, quando o direito a não participação sem qualquer prejuízo para o tratamento do paciente.
6. A sua discordância ou a do responsável legal em participar do estudo não lhe causará nenhum prejuízo para o seu tratamento, tanto para a doença atual, quanto para qualquer tratamento do futuro, em qualquer serviço do nosso hospital.
7. A participação de indivíduos saudáveis no estudo, como “controles” será voluntária e sem ressarcimento.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: 19-3521-8936).

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Campinas ____/____/____

Assinatura do Responsável Legal

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário - Controle

Responsável pela explicação deste Termo de Consentimento:

Erich Vinicius de Paula

Médico Pesquisador

Fone: (19) 3521-8756

Gleice Regina de Souza

Pesquisadora Responsável

Fone: (19) 3521-8617

Anexo 3. Resumo submetido para apresentação na Reunião Anual da Sociedade Americana de Hematologia (ASH)

Coagulation Activation By Heme: Evidence from Global Hemostasis Assays

Gleice Regina Souza^{1*}, Maiara M L Fiusa^{1*}, Carolina Lanaro, BSc, PhD^{1*}, Marina Pereira Colella, MD, PhD^{1*}, Silmara A L Montalvão^{1*}, Sara T O Saad, MD, PhD¹, Fernando Ferreira Costa, MD, PhD¹, Fabiola Traina, MD, PhD^{2,3}, Joyce M Annichino-Bizzacchi, MD, PhD^{1*} and **Erich Vinicius De Paula, MD, PhD¹**

¹INCT do Sangue, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ²INCT do Sangue, University of Campinas, Campinas-SP, Brazil; ³Department of Internal Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Introduction: It has been known for more than 50 years that patients with sickle cell disease (SCD) present higher plasma concentrations of heme. More recently, it was shown that heme is capable to activate innate immune response, and to trigger a toll-like receptor-dependent response that involves the expression of several pro-inflammatory genes. Accordingly, the role of heme as critical inflammatory mediator in SCD has been confirmed in different experimental models, suggesting that heme can be a trigger for microvascular occlusion and acute chest syndrome (ACS). The association between innate immune response and coagulation activation dates back to 450 million years in evolution, so that activation of the former is frequently accompanied by activation of the latter. Micro and macrovascular thrombosis are a hallmark of SCD, and the role of heme in the pathogenesis of these events has been recently suggested by demonstrations of heme-induced expression of tissue factor (TF) by endothelial cells and monocytes. However, the functional relevance of heme-induced TF expression on clinically-relevant coagulation markers has not been demonstrated. **Methods:** herein we evaluated heme-induced TF expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and used two different global assays of hemostasis, namely thromboelastometry (TEM) and Thrombin Generation Test (TGT) to evaluate the effect of heme on coagulation activation. Blood from healthy volunteers was drawn from an antecubital vein with minimal stasis in 0.106 sodium citrate tubes (1:10) or heparin. TEM was performed in whole-blood samples (n=10) incubated with 30 µM heme (Sigma-Aldrich) for four hours at 37°C, in a ROTEM equipment (Pentapharm). Coagulation was activated with the addition of CaCl₂. Samples from same individuals incubated with vehicle were assayed concomitantly as controls (n=10). TGT was performed in double centrifuged plasma samples, separated from whole blood stimulated with heme or vehicle under the same conditions (n=16). TGT was performed using a Fluoroskan Ascent Flourimeter (Thermolab). Coagulation was activated with TF (5pM) and phospholipids (PPP reagent, Thrombinoscope). Expression of TF was evaluated by qRT-PCR. Heparin-anticoagulated blood was incubated with 30 µM heme (n=6) or vehicle (n=6) for 24 hours. PBMC and neutrophils were then separated by density gradient centrifugation (Ficoll). Non-parametric statistics were used in all analysis. **Results:** incubation of whole blood with heme 30 µM resulted in a potent induction of TF expression in PBMC compared to vehicle (AU) (0.03±0.06 vs 1.18±0.60; P=0.03). No TF expression could be detected in neutrophils. Heme-induced coagulation activation could be demonstrated by TEM. Heme significantly decreased the coagulation time (sec) (562.1±88.2 to 387±84.3; P=0.002) and the MaxV_t (time to maximum velocity) (651.4±119.2 to 451.1±87.4 ; P=0.002), which are two indicators of shift towards a hypercoagulable profile. A trend towards a lower clot formation time was also observed (P=0.07). No difference could be observed in the area under the TEM curve. A hypercoagulable profile was also observed in TGT in samples incubated with heme. Statistically significant changes compatible with a shift towards coagulation activation were observed in parameters such as peak thrombin (increased), time to peak thrombin (decreased), velocity index (increased), lagtime (decreased) and StarTail (decreased) (all P<0.05). No statistically significant change could be observed in the endogenous thrombin potential parameter (p=0.10). **Discussion and conclusions:** TEM and TGT are global hemostasis assays, widely used for evaluation of hypo- and hypercoagulable states. Both methods have been used in patients with SCD, who present hypercoagulable profiles similar to those obtained in our study, and characterized by faster onset and offset of coagulation activation. We demonstrate for the first time that heme, in concentrations similar to those observed in patients with SCD and other hemolytic disorders, is capable to not only stimulate the expression of TF by PBMC, but also to shift the coagulation balance towards a hypercoagulable state, similar to that observed in patients with SCD. These results provide additional support to the hypothesis that heme is a key mediator micro- and macrovascular thrombosis in SCD and possibly, in other hemolytic disorders.

Abstract ID#: 73233

Password: 209177

<https://ash.confex.com/ash/2014/cop/papers/index.cgi?username=73233&password=209177>

1/4

Anexo 4. Outras publicações com participação da aluna durante o mestrado

1) Luz Fiusa MM, Costa-Lima C, **de Souza GR**, Vigorito AC, PenteadoAranha FJ, Lorand-Metze I, Annichino-Bizzacchi JM, de Souza CA, De Paula EV. A highangiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio is associated with a high risk of septicshock in patients with febrile neutropenia. Crit Care. 2013 Aug 5;17(4):R169.