

SULEY MARA CHADDAD VANCINE

**AS DEFICIÊNCIAS DOS FATORES VIII E IX DA COAGULAÇÃO NÃO ALTERA
A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO EM UM MODELO DE SEPSE
EXPERIMENTAL MURINA**

**CAMPINAS
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**A DEFICIÊNCIA DO FATOR VIII E IX DA COAGULAÇÃO NÃO ALTERA A
RESPOSTA DO HOSPEDEIRO EM UM MODELO DE SEPSE EXPERIMENTAL
MURINA**

Suley Mara Chaddad Vancine

Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica. Sob orientação do Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula.

**CAMPINAS
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V277d

Vancine, Suley Mara Chaddad, 1979 -
A deficiência do fator VIII e IX da coagulação não
altera a resposta do hospedeiro em um modelo de sepse
experimental murina. / Suley Mara Chaddad Vancine. –
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Erich Vinicius de Paula
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1 Infecção. 2. Camundongo. 3. Hemofilia. 4.
Inflamação. I. Paula, Erich Vinicius de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Deficienciis of factor VIII and IX docs not protect the host in
experimental murine sepsis

Palavra-chave em inglês:

Infection

Mice

Hemophilia

Inflammation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Élbio Antônio D'Amico

Vânia Maris Morelli

Simone Cristina Olenscki Gilli

Marco Antônio de Carvalho Filho

Data da defesa: 24-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Suley Mara Chaddad Vancine

Orientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Membros:

1. Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico



2. Prof^a. Dr^a. Vânia Maris Morelli



3. Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Olenscki Gilli



4. Prof. Dr. Marco Antônio de Carvalho Filho



5. Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/08/2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Osvaldo e Sueley, que iluminaram meu caminho e a minha filha, Manuela, que é a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula, por ter me acolhido e ajudado durante todo o processo da pós-graduação.

A Devanira Souza Paixão por ter estado ao meu lado, me ensinando, me incentivando ao longo de todo o trabalho.

A todos os funcionários do laboratório de hemostasia do Hemocentro da Unicamp, em especial a Susan Picoli e Silmara Montalvão, e aos funcionários do laboratório de hematologia, em especial a Monica Falconi, pela colaboração ativa na execução de testes laboratoriais.

A Fapesp pelo auxílio a pesquisa.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses, 4:13

RESUMO

Durante muitos anos, a coagulação tem sido implicada na patogênese da sepse. Entretanto, os resultados dos ensaios clínicos com anticoagulantes naturais, bem como estudos com camundongos knockout para os fatores de coagulação específicos produziram resultados conflitantes sobre o papel da coagulação na patogênese da sepse. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da deficiência grave de FVIII: C e FIX: C em um modelo de sepse experimental murino induzida por LPS. Camundongos knockout com deficiência grave de FVIII: C e FIX: C e seus controles relacionados com hemostasia normal foram tratados com LPS, e vários parâmetros da resposta inflamatória foram avaliados: as curvas de sobrevivência de sete dias foram realizadas utilizando duas doses de LPS; marcadores bioquímicos e marcadores histológicos de lesão tecidual foram avaliados após 3 e 6 horas da infusão de LPS; parâmetros de coagulação e níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias foram avaliados no início e após 3 e 6 horas da injeção de LPS. A deficiência grave de FVIII e FIX foram compatíveis com sobrevivência normal na sepse experimental murina. Além disso, o dano tecidual induzido por LPS e a ativação da coagulação foram semelhantes em camundongos com deficiência de FVIII ou FIX em relação aos respectivos controles. Uma menor liberação de citocinas pró-inflamatórias foi observada em camundongos com deficiência grave de FIX, mas não em camundongos com deficiência de FVIII. Portanto, concluímos que a deficiência grave de FVIII ou FIX não protege camundongos da mortalidade ou de dano de tecido no modelo de endotoxemia, reforçando a hipótese de FVIII e FIX não são críticas para a patogênese da sepse experimental.

ABSTRACT

For many years, coagulation has been implicated in the pathogenesis of sepsis. However, the results of clinical studies with natural anticoagulant, as well as studies with knockout mice for specific coagulation factors produced conflicting results about the role of coagulation in the pathogenesis of sepsis. Our objective are evaluate the impact of severe deficiency of FVIII: C and FIX: C in an experimental murine model of sepsis induced by LPS. Knockout mice with severe deficiency of FVIII: C and FIX: C and its littermate hemostatic normal control mice were treated with LPS, and several inflammatory parameters were evaluated: survival curves seven days were done using two doses of LPS ; biochemical markers and histological markers of tissue injury were assessed after 3 and 6 hours of LPS infusion, coagulation parameters and serum levels of proinflammatory cytokines were assessed at baseline and after 3 and 6 hours of LPS injection. Severe deficiencies of FVIII and FIX were compatible with normal survival in experimental murine sepsis. In addition, the LPS-induced tissue damage and coagulation activation were similar in mice deficient in FVIII or FIX with respect to their controls. A lower release of proinflammatory cytokines was observed in mice with severe deficiency of FIX, but not in mice with deficiency of FVIII. The severe deficiency of FVIII or FIX does not protect mice from mortality and tissue damage in endotoxemia model, supporting the hypothesis that FVIII and FIX are not critical to the pathogenesis of experimental sepsis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AST/TGO	Aspartato aminotransferase/transaminase glutâmica oxalacética
ALT/TGP	Alanina aminotransferase/transaminase glutâmica pirúvica
AT	Antitrombina
CEMIB	Centro de Bioterismo da Unicamp
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
EPCR	Receptor endotelial da proteína C
FWW	Fator de Von Willebrand
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FIX	Fator IX
FXa	Fator X ativado
FT	Fator tissular
GN	Gram negativo
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LD50	Dose letal 50%
LD90	Dose letal 90%
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PAR	Receptores ativados por proteases
PCa	Proteína C ativada
PCar	Proteína C ativada recombinante
PCR	Reação de cadeia polimerase
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TFPI	Inibidor do Fator Tecidual
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de estudos com camundongos geneticamente modificados sobre a interação entre sepse e proteínas da coagulação.....	29
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Contato com microorganismo invasor. Interação entre a liberação de mediadores inflamatórios e a ativação da coagulação. Estes dois grandes processos são desencadeados pela invasão pelos microorganismos e contribuem para a fisiopatologia da sepse..... 19
- Figura 2 - Formação de um microtrombo na microvasculatura renal (<http://medsci.indiana.edu/c602web/602/c602web/pulmon/sl1351.htm>) 23
- Figura 3 - Primeira fase da ativação da coagulação: iniciação. A coagulação é ativada quando o fator tissular (FT) se se liga ao FVIIa formando o chamado complexo de iniciação da hemostasia, que ativa o FX em FXa, levando à geração de concentrações muito pequenas de trombina, ainda incapazes de levarem à formação de fibrina..... 24
- Figura 4 - Segunda fase da ativação da coagulação: amplificação. Nesta fase a trombina medeia uma série de reações que tem como objetivo aumentar sua própria geração, de modo que sua concentração final permita a formação do trombo..... 25
- Figura 5 - Terceira fase da ativação da coagulação: propagação. Nesta fase, o trombo formado rico em plaquetas e fibrina se propaga pela região onde a hemostasia foi iniciada pela expressão do fator tissular..... 25
- Figura 6 - Esquema de cruzamentos para a obtenção dos controles relacionados. Nos cruzamentos principais (letras maiores), animais em preto são C57Bl6 de origem local, e em vermelho, animais com hemofilia originais (1º cruzamento) ou das gerações anteriores (2ª e 3ª geração). X^h indica cromossomo com mutação causadora da hemofilia..... 38
- Figura 7 - Desenho do estudo 43
- Figura 8 - Curva de sobrevida após LPS em camundongos com deficiência do fator VIII. Curva de sobrevida com análise de Kaplan-Meier de camundongos C57BL/6 e FVIIIo após a injeção intraperitoneal de LPS nas doses de (a) 20mg/kg e (b) 30mg/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Log-rank). ... 50
- Figura 9 - Curva de sobrevida após LPS em camundongos com deficiência do fator IX. Curva de sobrevida com análise de Kaplan-Meier de camundongos C57BL/6 e FIX^o

- após a injeção intraperitoneal de LPS nas doses de (a) 20mg/kg e (b) 30mg/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Log-rank). ... 51
- Figura 10 - TTPa nos camundongos experimentais e controles. Avaliação do TTPa através da análise de Teste de Mann-Whitney de camundongos C57BL/6, FVIII^o e FIX^o após a injeção intraperitoneal de LPS. Barras escuras: camundongos C57Bl6; barras claras: camundongos com hemofilia..... 52
- Figura 11 - Contagem plaquetária nos camundongos experimentais e controles. Contagem plaquetária em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. Exceto por um aumento isolado da contagem plaquetária no camundongo com deficiência do fator VIII após 3 horas de LPS, a deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação (barras brancas) não resultou em diferença estatisticamente significativa quando comparado a camundongos C57Bl/6 (barras pretas) (Teste de Mann-Whitney). 53
- Figura 12 - Dosagem de fibrinogênio nos camundongos experimentais e controles. Dosagem de fibrinogênio em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado aos camundongos C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 53
- Figura 13 - Dosagem de complexo trombina-antitrombina (TAT). Dosagem de TAT em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 54
- Figura 14 - Dosagem de AST em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 55
- Figura 15 - Dosagem de ALT em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 55

- Figura 16 - Endotelialite e infiltração leucocitária. Marcadores histológicos de lesão tecidual em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIIIo (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator VIII da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 56
- Figura 17 - Esquema ilustrativo de infiltrado neutrofílico em um corte histológico de pulmão em camundongo C57Bl/6 e FVIII° antes e após 6 horas de infusão de LPS... 57
- Figura 18 - Endotelialite e infiltração leucocitária. Marcadores histológicos de lesão tecidual em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FIXo (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 58
- Figura 19 - Esquema ilustrativo de infiltrado neutrofílico em um corte histológico de pulmão em camundongo C57Bl/6 e IX° antes e após 6 horas de infusão de LPS..... 59
- Figura 20 - Mediadores inflamatórios. Mediadores inflamatórios em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII° (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator VIII da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 60
- Figura 21 - Mediadores inflamatórios. Mediadores inflamatórios em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FIXo (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney). 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A sepse.....	17
1.1.2 Fisiopatologia geral da sepse.....	18
1.2 Elementos centrais na fisiopatologia da sepse.....	19
1.2.1 O papel do endotélio.....	20
1.2.2 O papel dos mediadores inflamatórios	21
1.2.3 O papel da coagulação.....	22
1.3 Importância relativa da ativação da coagulação na sepse.....	27
1.4 Importância do estudo do papel da hemostasia na sepse.....	30
1.5 Papel do fator VIII e IX da coagulação na fisiopatologia da sepse.....	31
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.2 Animais e grupos experimentais	36
3.2.1 Obtenção de controles relacionados através de retro-cruzamentos	37
3.2.2 Caracterização molecular dos modelos animais.....	39
3.3 Procedimentos anestésicos	40
3.4 Modelo de endotoxemia	40
3.5 Desenho geral do estudo.....	41
3.5.1 Curvas de sobrevida	43
3.5.2 Avaliação de outros parâmetros da resposta do hospedeiro à sepse.....	44
3.6 Coleta das amostras (3ª fase).....	45
3.7 Avaliação de marcadores de ativação da coagulação.....	46
3.7.1 Dosagem de TTPa e fibrinogênio.....	46
3.7.2 Contagem plaquetária.....	46
3.7.3 Complexo trombina-antitrombina (TAT).....	46
3.8 Avaliação de marcadores de lesão tecidual	46
3.9 Dosagem de citocinas inflamatórias.....	47
3.10 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	50

4.1 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modifica a sobrevivência da sepse experimental murina no modelo de endotoxemia.....	50
4.2 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modificou significativamente parâmetros indiretos do grau de ativação da coagulação na sepse experimental murina no modelo de endotoxemia.....	51
4.2.1 Caracterização do fenótipo de Hemofilia A e B.....	51
4.2.2 Avaliação da ativação da coagulação	52
4.3 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modificou significativamente parâmetros de lesão tecidual em rins e pulmões na sepse experimental murina no modelo de endotoxemia.....	54
4.3.1 Marcadores bioquímicos de lesão tecidual hepática.....	54
4.3.2 Marcadores histológicos de lesão tecidual em rins e pulmões	55
4.4 Mediadores inflamatórios.....	59
4.4.1 Dosagens de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF α , INF γ , IL-1 β).....	59
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÃO.....	70
7 REFERÊNCIAS	72
8 ANEXOS.....	80

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A sepse

1.1.1 Relevância e epidemiologia da sepse

A sepse é uma síndrome clínica caracterizada por resposta inflamatória sistêmica grave secundária a uma infecção (Bone RC, 1992). A sepse e suas complicações representam atualmente um dos grandes desafios da medicina, afetando milhares de pessoas em todo mundo e, sendo a principal causa de morte entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva não coronariana. A incidência da sepse vem aumentando, de 1,5% a 8% ao ano, e a taxa de mortalidade permanece alta, variando de 50% a mais de 75%, a despeito do conhecimento crescente sobre sua fisiopatologia e dos avanços tecnológicos e em cuidados de suporte destinados a estes pacientes. Nos Estados Unidos, por exemplo, ocorrem mais de 750 mil casos de sepse por ano, com cerca de 220 mil mortes (Angus DC, 2000). No Brasil, embora os dados sejam escassos, a literatura mostra que os casos de sepse foram responsáveis por 27,3 % das internações em Unidades de Terapia Intensiva, com aproximadamente 57 casos por 1000 pacientes/dia e mortalidade de até 52,2 % (Silva E, 2004).

Além disso, o aumento da idade média da população e o uso crescente de drogas imunossupressoras têm contribuído ainda mais para o aumento do número de mortes por sepse (Williams MD, 2004, O'Brien JM, Jr., 2007). Apesar de mais de 20 anos de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, o número de mortes atribuído à sepse continua crescendo, fazendo com que a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na evolução clínica da sepse permaneça há décadas como área prioritária da pesquisa biomédica. Espera-se que através do entendimento mais detalhado dos fatores fisiopatogênicos da sepse, possamos chegar à descoberta de novos alvos terapêuticos que mudem de forma mais significativa o estado atual do tratamento desta condição.

1.1.2 Fisiopatologia geral da sepse

Conforme detalhado acima, o termo sepse pressupõe o envolvimento de um agente infeccioso como desencadeante do processo fisiopatológico que caracteriza a sepse. No entanto, um dos aspectos mais importantes da fisiopatologia da sepse é que o efeito direto deste microorganismo sobre células ou tecidos não é em geral o maior responsável pelo dano celular e tecidual que se observa durante a evolução clínica. Na sepse, é a resposta inflamatória do hospedeiro à presença deste microorganismo que determina o curso clínico em cada indivíduo. Esta resposta pode variar desde uma resposta inflamatória auto-limitada, que permite a neutralização do microorganismo invasor, ao mesmo tempo em que permite a melhora clínica do hospedeiro (condição ideal), até uma resposta inflamatória devastadora e sem controle, que pode levar à morte do hospedeiro independente dos efeitos diretos do microorganismo invasor. Os motivos detalhados pelos quais um indivíduo responde de uma forma controlada e outro de forma descontrolada muitas vezes a um mesmo agente é objeto de intensa investigação (Remick DG, 2007).

A definição precisa de todos os elementos da resposta inflamatória do hospedeiro durante a sepse ainda não é possível. Em linhas gerais, podemos afirmar que esta resposta passa necessariamente por algum grau de lesão endotelial - através da ativação de neutrófilos, monócitos e das próprias células endoteliais, ou mesmo por ação direta de alguns microorganismos. À lesão endotelial seguem-se vários grandes processos que coexistem durante a evolução da sepse: (1) liberação de mediadores inflamatórios (citocinas pró e anti-inflamatórias e outros agentes vasoativos); (2) ativação do complemento; e (3) da ativação da coagulação (Figura 1) (Cohen J, 2002, Aird WC, 2003). A relevância desta resposta inflamatória no desfecho clínico da sepse é confirmada por dados da literatura que demonstram taxas de mortalidade crescentes entre os pacientes com sepse a despeito de terapia antibiótica adequada (Rangel-Frausto MS, 1995), além do fato já citado que pacientes infectados pelos mesmos agentes apresentam grande variação na resposta e na gravidade do quadro clínico. Além disso, a administração de anticorpos contra componentes da parede bacteriana, o que em tese neutralizaria o efeito direto do agente infeccioso, não foi capaz de melhorar a sobrevida em pacientes com sepse por agentes gram negativos (Angus DC, 2000).

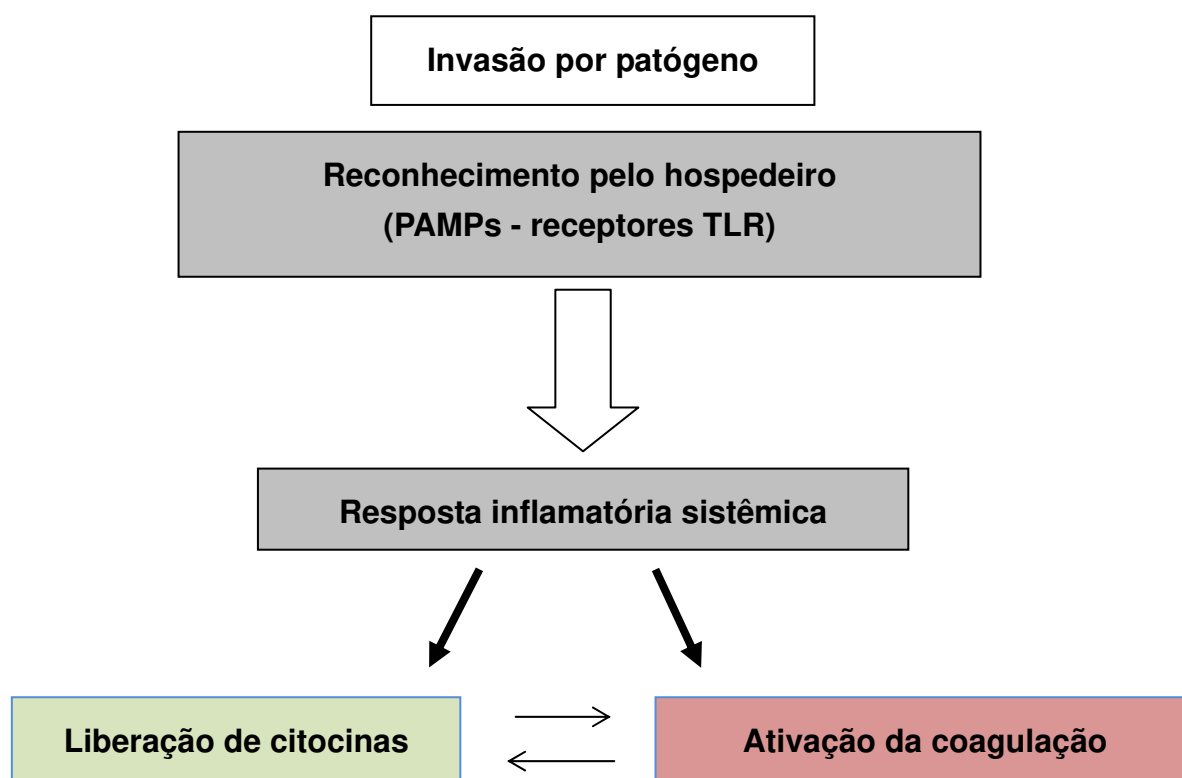


Figura 1 - Contato com microorganismo invasor. Interação entre a liberação de mediadores inflamatórios e a ativação da coagulação. Estes dois grandes processos são desencadeados pela invasão pelos microorganismos e contribuem para a fisiopatologia da sepse.

1.2 Elementos centrais na fisiopatologia da sepse

É importante destacar que todos os processos fisiopatológicos citados acima, com destaque para a ativação endotelial, a liberação de mediadores inflamatórios e a ativação da coagulação ocorrem de forma concomitante durante a sepse e se retro-alimentam continuamente, sendo difícil definir a importância relativa de cada elemento (Levi M, 2010). A seguir, descreveremos o papel dos principais componentes da resposta do hospedeiro à sepse.

1.2.1 O papel do endotélio

Em condições fisiológicas, o endotélio vascular possui várias funções relacionadas à hemostasia dentre as quais destacam-se: (1) o fornecimento de uma superfície laminar para fluxo sanguíneo adequado e livre de turbulências em situações normais, e (2) ação anticoagulante mediada pela compartimentalização da expressão do fator tissular (FT) para fora da luz do vaso, sem contato com outras proteínas da coagulação.

Durante a sepse, algum grau de ativação endotelial sempre ocorre, seja pela ação direta do microorganismo, seja pela ação de outros elementos da resposta (neutrófilos ativados, citocinas, etc). O termo ativação endotelial é freqüentemente usado como indicador de qualquer mudança ao nível celular ou molecular do endotélio em relação a seu estado quiescente (em condições não patológicas). A ativação endotelial resulta no comprometimento de uma série de funções do endotélio, de modo que este passa a exercer um papel central na fisiopatologia da sepse. Em resumo, as alterações endoteliais mais importantes para a fisiopatologia da sepse incluem:

O endotélio passa a funcionar como “palco” para ocorrência das reações iniciais da hemostasia, desencadeadas pela ativação ou lesão vascular. Estas reações iniciais incluem a formação do plugue plaquetário que se liga ao endotélio através do fator de Von Willebrand, e a ligação do fator tissular, cuja expressão é desencadeada pela sepse, com o fator VII ativado, dando início à cascata da coagulação.

Ação pró-inflamatória iniciada pela expressão de moléculas de adesão, recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas e fatores de crescimento. Todos estes elementos servem como estímulo tanto para a ativação da coagulação através do aumento da expressão de fator tissular, quanto para a desorganização da barreira endotelial, uma característica crítica da sepse (Ferrara N, 2003, Thomas M and Augustin HG, 2009).

Liberação de inibidores da fibrinólise importantes como o PAI-1, produzidos e estocados em células endoteliais, resultando em um estado clássico de hipofibrinólise (Levi M, 2003, Schouten M, 2008).

Redução da atividade de sistemas anticoagulantes naturais: o endotélio é importante para o funcionamento de sistemas anticoagulantes naturais por participar da secreção do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e pela expressão do receptor endotelial

da proteína C (EPCR). Estas duas funções estão reduzidas na sepse, concorrendo para a ativação da coagulação.

1.2.2 O papel dos mediadores inflamatórios

Diversos moduladores inflamatórios são liberados durante a sepse, com ações pró e anti-inflamatórias. É o resultado final da ação conjunta de todos estes mediadores que irá definir as características da resposta inflamatória em cada paciente com sepse.

As citocinas, proteínas secretadas pelos componentes do sistema imune e que agem como efetores ou moduladores da resposta inflamatória, desempenham papel fundamental no desenvolvimento da sepse. A seguir descreveremos o comportamento das principais citocinas durante a sepse, a partir de evidências em modelos animais de sepse experimental e em estudos em humanos.

Grande parte dos estudos sobre a importância das citocinas inflamatórias na sepse deriva de estudos em modelos animais de sepse, baseados no uso de lipopolissacárides (LPS) (modelo de endotoxemia) ou na indução da peritonite bacteriana experimental através da ligadura e punção cecal, ou na infusão de baixas doses de LPS em voluntários humanos (modelo de endotoxemia em humanos) (Andreasen AS, 2008). A endotoxina ou LPS é um abundante componente da parede celular das bactérias Gram negativas (GN) capaz de desencadear uma resposta imune inata através da interação com receptores como o CD14, que culmina com a expressão de genes pró-inflamatórios (Vincent JL and Abraham E, 2006). Portanto, a administração de endotoxinas em animais ou humanos resultam em alterações hemodinâmicas e bioquímicas similar ao observado na sepse.

Em geral, o TNF- α é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos e monócitos depois do contato do hospedeiro com um patógeno. Em babuínos com bacteremia por GN, o TNF- α eleva-se precocemente com pico após 2 horas, sendo seguido mais tardiamente por elevações das IL-1 e IL-6 (Creasey AA, 1991). Em camundongos o TNF- α atinge um pico em 2h, retornando ao normal em 4h (Remick DG, 1989). De uma forma geral, em modelos animais de sepse a elevação de TNF- α , IL-1 e IL-6 tende a ser mais intensa alta e mais precoce do que em humanos, onde este aumento é mais tardio, porém mais prolongado (Remick DG, 1989, Remick DG and Ward PA, 2005).

Independente da cinética, o aumento do TNF- α está associado à lesão orgânica, tendo sido demonstrado associação entre seus níveis e mortalidade (Waage A, 1987, Webster NR and Galley HF, 2009, van der Poll T and van Deventer SJ, 1999). Estudos pré-clínicos mostraram ainda que o bloqueio do TNF- α diminui a mortalidade em modelos animais de sepse (Tracey KJ, 1987), e uso de TNF recombinante induz a alterações e lesões orgânicas semelhantes a sepse (Tracey KJ, 1986). Estes achados levaram à estudos clínicos utilizando anticorpos anti TNF- α na sepse. No entanto, apesar de todas as evidências pré-clínicas e de estudos observacionais, o bloqueio do TNF- α na sepse em humanos não resultou em benefício clínico relevante (Abraham E, 1995), ilustrando a complexidade das vias de sinalização relacionadas a esta condição. A IL-1 β também apresenta relação prognóstica com a gravidade da sepse (Bozza FA, 2007). Em modelos animais de sepse, a IL-1 β apresenta pico um pouco mais tardio que o TNF- α (Chensue SW, 1991).

Além de atuarem como efetoras de passos importantes da resposta inflamatória, como detalhado acima, as citocinas também funcionam como importantes elementos no “cross-talk”, ou seja, nas interações entre os diversos componentes da resposta do hospedeiro durante a sepse tais como ativação da coagulação, desestruturação da barreira endotelial, entre outros. Em relação a este “cross-talk”, é importante destacar o papel proeminente da trombina. Embora os efeitos enzimáticos da trombina na coagulação sejam bem conhecidos, a trombina exerce ainda uma série de efeitos celulares independentes de sua ação na hemostasia. Estes efeitos são desencadeados a partir da ligação da trombina com receptores PAR (receptores ativados por proteases) (Coughlin SR, 2000, Camerer E, 2006). A trombina e os receptores PAR são atualmente considerados chaves no contato entre hemostasia e inflamação, na medida em que a ativação destes receptores recapitula vários eventos importantes da cadeia inflamatória tais como produção de citocinas inflamatórias, adesão de leucócitos, liberação de mediadores vasoativos como VEGF (Coughlin SR, 2000).

1.2.3 O papel da coagulação

Uma das características mais marcantes da fisiopatologia da sepse é o desequilíbrio entre fatores pró e anti-coagulantes, cuja expressão clínico-laboratorial é a coagulação intra-vascular disseminada (Levi M, 2003). Em pacientes sépticos, o

desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos vem classicamente sendo atribuído, pelo menos em parte, a distúrbios da microcirculação decorrentes deste estado pró-coagulante, que levaria em última instância à formação de microtrombos e à isquemia tecidual (Figura 2).

De acordo com o modelo mais atual de descrição da fisiologia da coagulação, o FT exerce papel central por ser a proteína responsável por sua iniciação. De acordo com este modelo, a ativação da coagulação é dividida em 3 fases: iniciação, amplificação e propagação. Para falar do papel da coagulação na fisiopatologia da sepse, é interessante fazer uma rápida revisão do processo de hemostasia.

Na fase de iniciação (figura 3), a coagulação é ativada quando o FT, uma proteína transmembrana expressada por praticamente todas as células do organismo, mas nunca por células em contato com a luz dos vasos, entra em contato com o plasma. Isto ocorre por exemplo quando há ruptura da integridade endotelial em um trauma. O FT se liga ao FVIIa formando o chamado complexo de iniciação da hemostasia, que ativa o FX em FXa, levando à geração de concentrações muito pequenas de trombina, ainda incapazes de levarem a formação de fibrina.



Figura 2 - Formação de um microtrombo na microvasculatura renal (<http://medsci.indiana.edu/c602web/602/c602web/pulmon/sl1351.htm>)

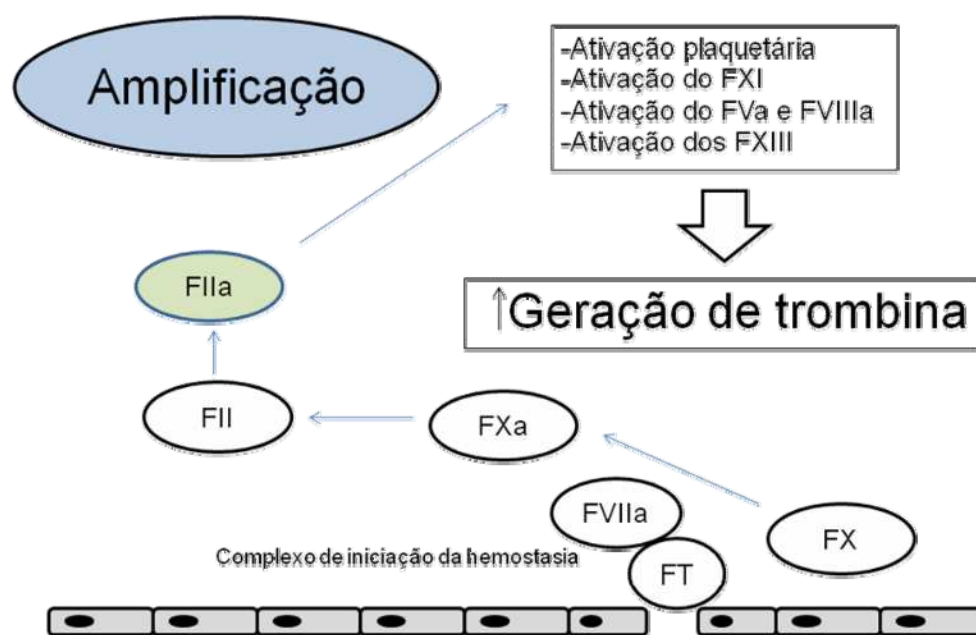


Figura 4 - Segunda fase da ativação da coagulação: amplificação. Nesta fase a trombina medeia uma série de reações que tem como objetivo aumentar sua própria geração, de modo que sua concentração final permita a formação do trombo.

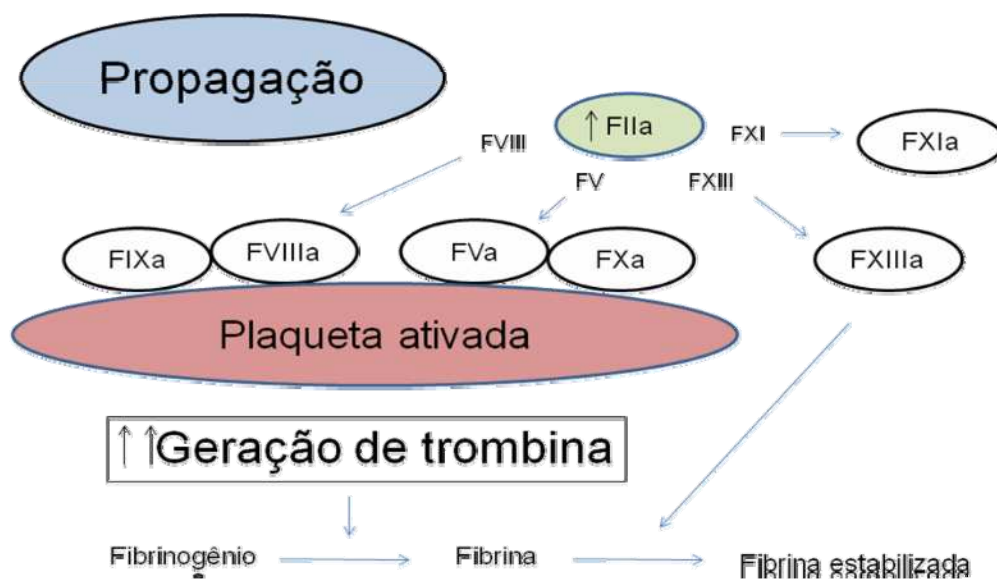


Figura 5 - Terceira fase da ativação da coagulação: propagação. Nesta fase, o trombo formado rico em plaquetas e fibrina se propaga pela região onde a hemostasia foi iniciada pela expressão do fator tissular.

Conforme já mencionado, a invasão do organismo por alguns agentes infecciosos leva à expressão anômala de FT por monócitos e por células endoteliais (Levi M, 2010), levando à ativação da coagulação, geração de trombina e formação de fibrina, e colocando o FT como um dos mediadores mais críticos na resposta do hospedeiro à sepse. Além de poder levar à formação de fibrina, a trombina gerada neste contexto leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IL-8, que por sua vez aumentam ainda mais a expressão de FT (Levi M, 2003). O resultado é a ativação contínua da coagulação através da expressão sustentada de FT.

Associado à ativação da coagulação pela expressão de FT, e contribuindo ainda mais para o desequilíbrio entre fatores pró e anti-coagulantes, observa-se durante a sepse uma supressão dos inibidores naturais da coagulação. A disfunção de sistemas anticoagulantes naturais é uma das mais bem caracterizadas alterações da hemostasia durante a sepse, havendo evidências que os três sistemas anticoagulantes naturais citados anteriormente estejam comprometidos (Levi M, 2003). O impacto desta redução é um desequilíbrio ainda maior entre elementos pró e anti coagulantes, colaborando para o estado pró-trombótico característico da sepse.

Durante a sepse, a redução da atividade da proteína C ocorre por múltiplos mecanismos entre os quais: (1) redução de síntese hepática; (2) redução do EPCR; e (3) ativação e consumo da proteína C (Schouten M, 2008). Além disso, há uma diminuição da expressão da trombomodulina mediada pelo aumento do TNF- α e IL-1, com conseqüente diminuição da ativação da proteína C remanescente (Faust SN, 2001, Nawroth PP, 1986). Durante sepse há ainda consumo de proteína S, um cofator da proteína C, comprometendo a funcionalidade desta importante via de controle da coagulação (Schouten M, 2008). Em relação à antitrombina, há uma redução marcante na sua síntese durante a resposta inflamatória severa (Jochum M, 1981). Além disso, citocinas pró-inflamatórias reduzem a síntese de glicosaminoglicanos na superfície do endotélio, contribuindo para a diminuição da função da antitrombina que depende da ligação a estes componentes na superfície endotelial (Bourin MC and Lindahl U, 1993). Finalmente, o TFPI, um inibidor do complexo FT/FVIIa secretado pelas células endoteliais ativadas encontra-se diminuído durante a sepse (Mann KG, 1999).

Além de sua ação anticoagulante, há evidências que o sistema da PCa tenha ainda um efeito anti-inflamatório na sepse. Estudos recentes indicam ainda que este efeito é independente de sua ação anticoagulante, e é clinicamente relevante na sepse (Esmon CT, 2000), colocando a redução da PCa como um dos elementos mais relevantes da fisiopatologia da sepse. De fato, entre todos os anticoagulantes naturais e mediadores inflamatórios já testados no tratamento de pacientes com sepse grave, a PCa recombinante foi a única a apresentar efeitos significativos de melhora na sobrevida (Bernard GR, 2001).

Finalmente, além da expressão sustentada de FT e da disfunção dos sistemas anticoagulantes naturais, um terceiro fator que colabora para o estado pró-trombótico na sepse é a liberação maciça de PAI-1 das células endoteliais observada na sepse. O PAI-1 é o inibidor do ativador do plasminogênio-1, o principal inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e da uroquinase (Levi M, 1993).

1.3 Importância relativa da ativação da coagulação na sepse

A relevância clínica das alterações da coagulação descritas acima durante a sepse é facilmente confirmada pela ocorrência de uma síndrome clínico-laboratorial já mencionada que é a CIVD. No entanto, embora durante vários anos se tenha atribuído à CIVD um papel central na fisiopatologia das complicações da sepse, é forçoso admitir que a mera ocorrência desta síndrome, ou mesmo a identificação de trombos na microvasculatura, não confirmam per se uma relação causal entre um estado pró-coagulante da sepse e suas complicações mais graves. Embora seja tentador associar hipercoagulação → microtrombos → isquemia tecidual, a aceitação desta sequência fisiopatológica exige cautela.

Várias evidências corroboram o papel da hemostasia como modulador de gravidade e como elemento relevante para o prognóstico da sepse. Em modelos animais de sepse, a interrupção de eventos desencadeados pelo FT com anticorpos anti-fator tissular (Dackiw AP, 1996), fator VII ativado com sítio ativo inibido (Houston DS, 2002) ou inibidor da via do fator tissular (TFPI) (Chen D, 2004, Opal SM, 2001) foi capaz de prevenir a CIVD e aumentar a sobrevida destes animais. Estas evidências, além de uma

série de outros estudos pré-clínicos apontando na mesma direção, sedimentaram o entendimento que a coagulação era um elemento crítico para a fisiopatologia da sepse, e desta forma um alvo terapêutico interessante para seu tratamento. Como resultado, grandes investimentos foram feitos em três programas de estudos clínicos utilizando versões recombinantes de três anticoagulantes naturais: TFPI, antitrombina e PCa. Curiosamente, os resultados dos estudos de fase II com estas moléculas corroboraram os resultados promissores obtidos na fase pré-clínica, sugerindo o potencial terapêutico da inibição da coagulação para o tratamento das complicações mais graves da sepse, e dando sinal verde para a condução de estudos multicêntricos de fase III que avaliaram o efeito destes agentes em pacientes com sepse. Após a inclusão de pelo menos 1000 pacientes em cada braço, os três grandes estudos clínicos de fase III que utilizaram respectivamente a antitrombina (Emerson TE, Jr., 1989, Warren BL, 2001), proteína C ativada recombinante (rPCa) (Bernard GR, 2001) e o TFPI (Abraham E, 2003, Creasey AA, 1993) falharam em demonstrar de forma sistemática um efeito benéfico sobre a gravidade da sepse, com exceção do estudo com rPCa, cujo efeito benéfico foi mais tarde atribuído a sua ação mais ampla (anti-inflamatória) sobre o sistema imune e sobre o endotélio (Bernard GR, 2001). Com exceção da rPCa, cujo uso clínico é extremamente restrito na sepse, os programas de desenvolvimento de TFPI e antitrombina da sepse foram abandonados por seus patrocinadores. Em conjunto, estes dados mostraram a importância de uso de modelos pré-clínicos robustos em estudos com sepse, além de demonstrar a freqüente limitação na tradução de resultados obtidos em camundongos para humanos.

Uma outra estratégia para aprimorar a compreensão do papel da coagulação na fisiopatologia da sepse consiste no uso de camundongos geneticamente modificados caracterizados pela diminuição de proteínas pró-coagulantes ou pela hiper-expressão de proteínas anti-coagulantes. O uso destes camundongos em modelos de sepse experimental pode gerar “insights” interessantes sobre o papel da hemostasia como um todo, ou mesmo de fatores específicos, para a fisiopatologia da sepse. Infelizmente, estes estudos também apresentam resultados contraditórios sobre o papel da hemostasia na fisiopatologia da sepse, conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de estudos com camundongos geneticamente modificados sobre a interação entre sepse e proteínas da coagulação.

Fenótipo	Modelo de sepse	Mortalidade	Referência
↑ expressão EPCR	Endotoxemia	↓↓	(Li W, 2005)
PCa ^{-/+}	Endotoxemia	↑↑	(Levi M, 2003)
Def FVII (~5%)	Endotoxemia	↓↓	(Xu H, 2006)
Def FT	Endotoxemia	↓↓	(Dackiw AP, 1996)
Def FVIII	Peritonite bacteriana	Inalterada	(Schoenmakers SH, 2005)
Def FXI	Endotoxemia e peritonite bacteriana	e ↓↓	(Tucker EI, 2008)

EPCR: receptor endotelial da proteína C; PCa: proteína C ativada; FT: fator tissular.

A Análise dos resultados destes estudos mostra que condições associadas a deficiência de vias anticoagulantes como em camundongos com deficiência parcial da proteína C (Levi M, 2003) resulta em redução da sobrevida no modelo de endotoxemia, e que condições associadas a aumento da atividade desta via como a hiper-expressão do EPCR resultam em melhoria da sobrevida no mesmo modelo (Li W, 2005). Além disso, a redução de fatores relacionados à iniciação da coagulação como o FT e o FVII também resultam em melhora da sobrevida na sepse experimental (Dackiw AP, 1996, Xu H, 2006), o que sugeriria um papel relevante da hemostasia na fisiopatologia da sepse.

Curiosamente, poucos estudos abordaram outros fatores da coagulação. Sobre fatores da via intrínseca da coagulação, que embora não associados à iniciação da coagulação pela via FT-dependente, também são críticos para a geração de quantidades normais de trombina, dois estudos foram publicados. No primeiro demonstrou-se que a

deficiência grave de FVIII, embora capaz de reduzir parcialmente a quantidade de trombina gerada, não causou qualquer impacto na sobrevivência na sepse experimental (Schoenmakers SH, 2005). Os autores especulam que isto poderia ser explicado pelo fato de na sepse a ativação da coagulação ocorrer devido à expressão contínua de FT, o que compensaria a redução da atividade da via intrínseca. Os autores inclusive mostram que a quantidade de FT ativada durante o estudo é constante, corroborando sua hipótese. A partir desta hipótese, os achados em camundongos com deficiência de outros fatores da via intrínseca como os fatores IX e XI deveria ser semelhante. Até recentemente não havia dados em relação ao fator IX, mas um estudo com camundongos com deficiência de fator XI mostrava resultados conflitantes com esta hipótese. Recentemente, Tucker et al (Tucker EI, 2008), mostraram que a deficiência do fator XI está associada à redução significativa da mortalidade de camundongos com peritonite séptica, sugerindo um papel relevante deste fator na fisiopatologia da sepse. Como discutido acima, estes resultados contrastam com os dados obtidos com animais com deficiência de FVIII em modelos semelhantes.

Analisando estes dados em conjunto, podemos afirmar que as discrepâncias entre estudos pré-clínicos e estudos clínicos, e entre os diversos estudos com camundongos geneticamente modificados sobre a interação entre coagulação e sepse, revelam que a pergunta científica sobre a importância relativa da coagulação e/ou de elementos específicos da coagulação na fisiopatologia da sepse permanece aberta.

1.4 Importância do estudo do papel da hemostasia na sepse

Ao longo das últimas três décadas, estratégias terapêuticas para a sepse baseadas no bloqueio da resposta inflamatória e bloqueio da ativação da coagulação percorreram o caminho desde as primeiras evidências experimentais de seu potencial terapêutico até a realização de grandes estudos clínicos. Embora resultados promissores tenham sido obtidos, em especial com o uso da rPCa na sepse grave (Bernard GR, 2001), é inegável que o impacto destas estratégias na forma como a sepse ainda é abordada, em especial no que diz respeito ao aumento da sobrevivência destes pacientes, foi limitado.

Uma das mais importantes conseqüências deste fato para o estudo da sepse é a necessidade de um retorno “à bancada”, com o objetivo de explorar novos aspectos desta inter-relação. A compreensão destes novos aspectos pode justificar alguns dos resultados não previstos destes estudos clínicos, além de permitir o surgimento de novos alvos terapêuticos.

1.5 Papel do fator VIII e IX da coagulação na fisiopatologia da sepse

A maioria das evidências experimentais que sugerem que possa haver benefício no bloqueio da ativação da coagulação na sepse deriva de estudos que manipularam elementos envolvidos na iniciação da coagulação (via extrínseca) como o FVIIa, FT e TFPI. Isto se baseia na importância do FT como ativador da coagulação na sepse. No entanto, considerando a importância do complexo tenase intrínseco (FVIII e FIX) para a geração de quantidades de trombina necessárias para a manutenção da hemostasia normal (claramente ilustrada pelo quadro clínico observado nas hemofilias A e B), é possível especular que deficiências dos fatores VIII e IX também pudessem causar algum impacto na evolução clínica da sepse. Do ponto de vista clínico-epidemiológico, não há na literatura descrições sobre diferenças na evolução clínica de pacientes hemofílicos grave com sepse, nem estudos sobre outras características da resposta inflamatória nestes pacientes. Não obstante, considerando que múltiplos fatores adquiridos e ambientais estão envolvidos na gravidade da sepse e suas complicações, e que muitos destes fatores coexistem em pacientes com hemofilia, é admissível que a ausência de dados clínicos que indiquem que a deficiência de fator VIII ou IX modifique a gravidade da sepse não exclua esta possibilidade. Infelizmente, grandes coortes avaliando especificamente a questão da sepse em hemofilia não existem e nem devem ser publicados pela raridade desta condição. Neste contexto, estudos em modelos animais de hemofilia e sepse são extremamente atrativos para a exploração inicial do papel do fator VIII e IX da coagulação na sepse experimental.

Como destacado anteriormente, estudos com camundongos com deficiência de fator VIII já foram realizados, mas os resultados são parcialmente conflitantes com estudos realizados com outras linhagens de camundongos com deficiência de fatores da coagulação.

A utilização de modelos de sepse distintos nos dois estudos, ou mesmo diferenças relacionadas à linhagem dos camundongos utilizados podem explicar estas diferenças. Neste contexto, a avaliação destes camundongos sob condições experimentais semelhantes (modelo de sepse, dose de LPS, laboratório), ou ainda, a análise de outros modelos como camundongos com deficiência de fator IX, poderiam ajudar na compreensão destas discrepâncias.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivo geral** avaliar o papel do fator VIII e IX da coagulação na fisiopatologia da sepse experimental murina.

Para este fim, os **objetivos específicos** foram avaliar uma série de parâmetros relacionados à resposta inflamatória desencadeada pela infusão de LPS em camundongos geneticamente modificados com deficiência de FVIII ou FIX da coagulação, incluindo sobrevivência em 7 dias, parâmetros de ativação da coagulação, parâmetros bioquímicos e histológicos de dano tecidual e liberação de citocinas inflamatórias.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA) e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação em Animais da Unicamp, protocolo número 1367-1 (Anexo).

3.2 Animais e grupos experimentais

Camundongos com deficiência de FVIII (Bi L, 1995) e FIX (Lin HF, 1997), doados respectivamente pelo Dr. Haig Kazazian, da Universidade da Pennsylvania e pela Dra. Katherine High do The Children's Hospital of Philadelphia, PA, Estados Unidos da América) e camundongos da linhagem C57BL/6 Uni, todos provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB-Unicamp, Campinas, SP, Brasil), entre 8 e 10 semanas de vida foram utilizados nos experimentos. Originalmente, os camundongos com deficiência de FVIII e FIX foram produzidos sobre a linhagem ("background") C57BL/6 (> 8 gerações). Com o intuito de limitar a diferença entre os grupos aos níveis de fator VIII e IX (excluindo diferenças de "background"), os grupos experimentais foram gerados através de cruzamentos destas 3 linhagens de camundongos entre si (figura 6), com a introdução do controle C57Bl/6 até a 3ª geração dos cruzamentos (F3). Os controles usados foram também obtidos de F3 (animais sem deficiência de FVIII ou IX).

Os seguintes grupos experimentais foram utilizados:

- **FVIII °**: camundongos com deficiência grave de FVIII - machos e fêmeas
- **FIX °**: camundongos com deficiência grave de FIX - machos e fêmeas
- **Controles relacionados**: machos e fêmeas

Por conta de sua origem distinta, ainda que com background teoricamente semelhante, não realizamos comparações entre camundongos FVIII° com FIX°. Com exceção dos experimentos de curva de sobrevida, foram utilizados apenas animais do sexo masculino. Eles foram mantidos em gaiolas pequenas em grupo máximo de 5 animais, sob temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclos de luminosidade alternados por 12h, com livre acesso a água e alimento.

3.2.1 Obtenção de controles relacionados através de retro-cruzamentos sucessivos

Com o objetivo de garantir que o grupo experimental (hemofilia A e B) e grupo controle (C57Bl6) diferissem apenas pela deficiência do fator VIII e IX, foi optado realizar cruzamentos sucessivos (F1 até F3) entre a linhagem transgênica (animais com hemofilia A e B) com os animais controle (C57Bl6) da colônia local, já que os animais já haviam sido submetidos à pelo menos 8 retro-cruzamentos na ocasião em que foram caracterizados nos laboratórios de origem. Desta forma, todos os animais usados no estudo já haviam sido submetidos a pelo menos 10 gerações de retro-cruzamento, o que é considerado satisfatório. O esquema destes cruzamentos está demonstrado na figura 3. Os animais gerados nos cruzamentos foram obrigatoriamente genotipados para definição da presença da hemofilia A e B antes de serem novamente cruzados com animais controle provenientes do Cemib-Unicamp. De um cruzamento até a obtenção de animais adultos aptos a serem novamente cruzados, foi necessário um período de cerca de 12 semanas.

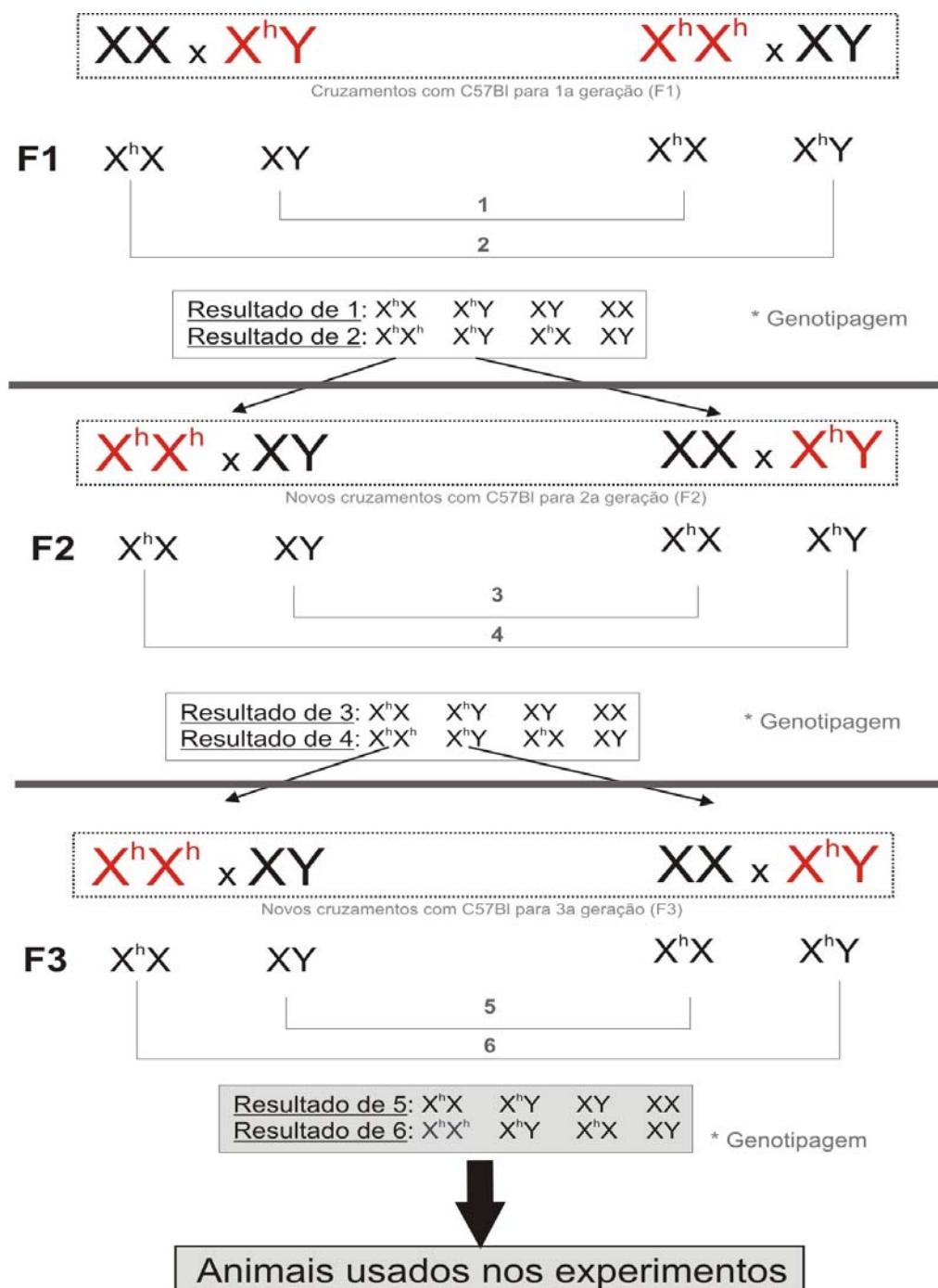


Figura 6 - Esquema de cruzamentos para a obtenção dos controles relacionados. Nos cruzamentos principais (letras maiores), animais em preto são C57Bl6 de origem local, e em vermelho, animais com hemofilia originais (1º cruzamento) ou das gerações anteriores (2ª e 3ª geração). X^h indica cromossomo com mutação causadora da hemofilia.

3.2.2 Caracterização molecular dos modelos animais

A caracterização molecular dos modelos animais foi feita em dois momentos: (1) durante os ciclos de retrocruzamento, quando era necessário o conhecimento do genótipo das fêmeas para programação dos cruzamentos; e (2) aleatoriamente durante os experimentos para confirmação por amostragem do genótipo dos animais usados nos estudos. Os genótipos de cada modelo foram confirmados por PCR, conforme previamente descrito (Bi L, 1995, Lin HF, 1997).

a) Extração de DNA: a extração do DNA murino, a partir de sangue total coletado da ponta cauda dos animais (sob anestesia), foi padronizada utilizando-se o kit para extração de DNA (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – Amersham Inc, Piscataway, NJ, EUA).

b) Genotipagem para os alelos do gene do FIX (Lin HF, 1997): a identificação do gene do fator IX murino normal ou mutante foi realizada a partir de 1,5 µl do DNA genômico, utilizando-se os primers:

P1: 5'-AACAgggATAgTAAgATTgTTCC-3' gene do fator IX normal (sense).

P2: 5'-ATATACAgTTACCAAATTCaG-3' gene do fator IX mutante (sense)

P3: 5'-CAgTAATgTTgACTgTATTTTCCAA-3' (antisense)

O gene do fator IX mutante envolvido contém uma sequência adicional que rompe com o gene normal (identificado pelo uso dos primers P2 e P3). O produto do PCR relativo a cópia normal do fator IX é identificado por um fragmento de 1 kb, enquanto o gene mutante (que inclui a sequência artificial) gera um produto de 1,4 kb. Os resultados dos PCRs são avaliados em gel de agarose 1,5%.

Genotipagem para os alelos do gene do FVIII (Bi L, 1996): é realizada a partir de 1,5µl do DNA genômico, utilizando-se os primers:

- MC-19: 5'TgCAAggCCTgggCTTATTT3'extremidade 5'do exon 16 (sense)

- NEO: 5'TgTgTCCCgCCCCTTCCTTT 3' neo exon 17 (sense).

- MC-18: 5'gAgCAAATTCCTgTACTgAC 3' exon 17 (antisense)

Usando a combinação dos produtos destes PCRs (MC-18 e MC-19 e MC-18 e NEO), foi feita a distinção entre os genótipos. O fragmento de 680 pb representa o cromossomo X normal, e o fragmento com 420 pb representa a amplificação dos exons 16 e 17 contendo a neo sequência utilizada nos animais deficientes de FVIII. Os produtos de PCRs foram submetidos em paralelo a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta.

3.3 Procedimentos anestésicos

Previamente aos procedimentos invasivos, os animais foram anestesiados com solução salina estéril contendo quetamina 80-100 mg/kg e xilazina 5-10 mg/kg por via intra-peritoneal (ip). Quando necessário, doses subsequentes eram realizadas apenas com quetamina.

3.4 Modelo de endotoxemia

Inicialmente os experimentos foram realizados utilizando o modelo de ligação e punção cecal para indução a sepse (Hubbard WJ, 2005). Porém, nos animais hemofílicos, esta estratégia resultou em uma mortalidade maior que 50% dos animais FIX^o após 24h da infusão por hemorragia colônica maciça. Assim, optamos por prosseguir o estudo usando o modelo de endotoxemia através da injeção de LPS intraperitoneal (Schoenmakers SH, 2005). Conforme explicado anteriormente, a interação do LPS com receptores em células endoteliais induz a numerosos sinais que levam à transcrição de citocinas pró-inflamatórias, expressão de FT, e outros (Bohrer H, 1997). Embora haja diversas críticas quanto a este modelo - por ele não mimetizar a sepse humana da mesma forma que os modelos de ligadura e punção cecal e pela grande variabilidade na resposta ao LPS entre estudos distintos (Otero-Anton E, 2001, Wichterman KA, 1980)- a infusão de LPS é um dos mais estudados modelos de estudo de fenômenos celulares e moleculares que fazem parte da resposta inflamatória da sepse. O modelo tem como vantagem a facilidade de manuseio, a

homogeneidade da resposta quando fatores como lote e forma de diluição do LPS são controladas, além de menor risco hemorrágico se comparado com modelo de punção e ligadura cecal. Este último motivo foi fundamental para nossa escolha na medida em que não foi possível o estudo com outros modelos em camundongos com deficiência de fator IX (Remick DG and Ward PA, 2005, Buras JA, 2005).

Em nosso estudo, uma série de medidas foram tomadas para minimizar variações no efeito do LPS entre os grupos, a saber: diluição em tubos cônicos de polipropileno de 50 mL estéreis com homogeneização virorosa (com vórtex) por 30 minutos; preparação do LPS em solução salina isotônica estéril no dia da infusão seguido por uso imediato; padronização rigorosa destes procedimentos, realizados sempre pelo mesmo pesquisador; uso de um único lote de LPS durante todos os experimentos semelhantes; injeção intercalada das doses de LPS (grupo experimental e grupo controle) durante os experimentos de sobrevida.

3.5 Desenho geral do estudo

A estratégia para avaliação do efeito da deficiência do fator VIII e IX da coagulação na sepse experimental murina foi a avaliação de múltiplos parâmetros clínicos e laboratoriais da sepse experimental em camundongos com estas deficiências, e nos seus controles relacionados. Os parâmetros selecionados, bem como o racional para sua seleção, foram:

Sobrevida em 7 dias: marcador robusto do impacto da deficiência destes fatores na evolução clínica da sepse.

Ativação da coagulação: marcadores do grau da ativação da coagulação, classicamente alterados na sepse humana e usados como marcadores de gravidade neste contexto, tais como fibrinogênio, contagem de plaquetas e complexos trombina-antitrombina.

Marcadores de lesão tecidual: usados a fim de detectar impactos protetores ou deletérios da deficiência dos fatores VIII ou IX da coagulação na sepse experimental murina. O racional para uso destes marcadores está relacionado ao fato de a sobrevida em 7

dias ser um parâmetro muito robusto para ser usado isoladamente. Em tese, a ausência de impacto na sobrevida em 7 dias não descartaria um efeito protetor ou negativo das deficiências destes fatores na sepse experimental, e por este motivo é necessário a associação de parâmetros mais sensíveis. Avaliamos a presença de sinais de lesão tecidual em três importante órgãos-alvo da sepse; No fígado foram avaliados marcadores bioquímicos de lesão (AST e ALT). Em pulmões e rins avaliamos indicadores histológicos de lesão.

Dosagem de citocinas inflamatórias: a sepse está relacionada a profundas alterações nos níveis de citocinas anti e pró inflamatórias. Por este motivo, avaliamos os níveis séricos de algumas destas citocinas após a indução da sepse experimental.

A estratégia para avaliação destes parâmetros foi dividir o estudo em 3 fases. Na primeira fase os grupos experimentais foram preparados. Na segunda fase, foram realizadas as análises de sobrevida em 7 dias após a aplicação de LPS. Na terceira fase, foram avaliados os demais parâmetros através da coleta de amostras de sangue e tecidos após 3 e 6 horas da injeção do LPS. Nesta terceira fase, os animais eram sacrificados após o término dos experimentos. O racional para seleção dos tempos de 3 e 6 horas será discutido mais adiante (figura 7).

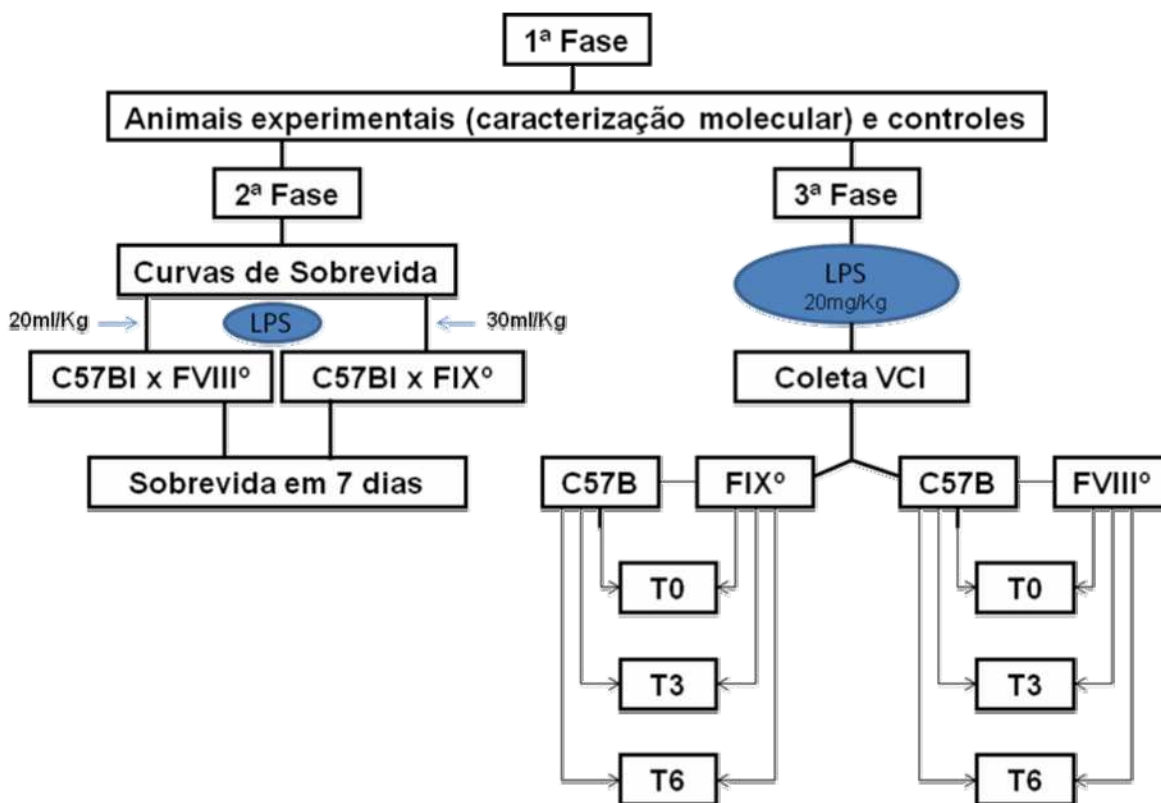


Figura 7 - Desenho do estudo

3.5.1 Curvas de sobrevida

Inicialmente realizamos a avaliação do impacto das deficiências de fatores VIII e IX na sobrevida de camundongos após a injeção de LPS. Os camundongos receberam doses específicas de lipopolissacáride (LPS; *Escherichia coli*, sorotipo 0111:B4; Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha) por via ip. Para esta avaliação, optamos por utilizar duas doses distintas de LPS a fim de aumentar a sensibilidade de nosso estudo para a detecção do impacto das deficiências destes fatores na sobrevida neste modelo de sepse experimental. É sabido que estudos no modelo de endotoxemia apresentam grandes variações na resposta ao LPS. Além disso, o uso de doses extremamente elevadas de LPS poderia levar a uma reação inflamatória tão severa, que nos impediria de detectar diferenças na resposta ao LPS entre os grupos. Por este motivo trabalhamos com estas duas doses nesta fase dos experimentos. As doses foram selecionadas após experimentos preliminares que mostraram que em nosso laboratório, nas nossas condições experimentais, o uso de 20 e 30mg/kg por via intra-peritoneal (ip) resultava em sobrevida de aproximadamente 50% e 10% respectivamente após 7 dias, correspondendo às chamadas LD50 e LD90.

Selecionamos estas doses por acreditar que elas permitiriam uma avaliação mais adequada do impacto das deficiências na sobrevivência. O uso de doses menores que a LD50 de LPS reduz muito a mortalidade, de modo que a avaliação torna-se inviável.

Assim, camundongos dos grupos experimental e controle receberam doses equivalentes do mesmo lote de LPS i.p. e foram acompanhados periodicamente para avaliação da mortalidade, ao longo de um período de 7 dias. As injeções foram administradas em animais controle e do grupo experimental de forma intercalada (animais experimentais x respectivos controles) de modo a evitar diferenças relacionadas à homogeneização do LPS. A frequência das avaliações era maior nos primeiros dias, ou nos experimentos com doses mais elevadas em que se antecipava mortalidade mais precoce. Camundongos que colocados em decúbito dorsal não re-adquiriam a posição normal (“righting reflex”), ou que apresentavam sinais evidentes de sofrimento, foram considerados moribundos, sacrificados e incluídos como óbitos na curva de sobrevivência. Durante os experimentos, alguns animais com hemofilia foram aleatoriamente submetidos à necropsia para exclusão de sangramento relacionado à injeção intra-peritoneal ou outros sangramentos traumáticos como causa de óbito.

3.5.2 Avaliação de outros parâmetros da resposta do hospedeiro à sepse experimental

Para esta fase, optamos por utilizar a dose de 20mg/kg, correspondente à DL50. Esta escolha foi arbitrária, e seu objetivo foi selecionar uma dose em que os animais não apresentassem um quadro excessivamente grave de sepse experimental, que pudesse mascarar o impacto da deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação na sepse experimental. O uso da dose de 30mg/Kg associa-se a mortalidade muito elevada já nas primeiras 24 horas, o que poderia dificultar os experimentos desta fase do ponto de vista técnico, já que os animais precisam ser submetidos a anestesia após 3 ou 6 horas da injeção do LPS. Estes estudos foram realizados com outro grupo de animais em relação às curvas de sobrevivência. Os animais eram tratados com LPS e submetidos à coleta de amostras após 3 ou 6 horas da infusão de LPS. Após cada coleta os animais eram sacrificados, de modo que grupos independentes foram usados nos tempos +3 e +6 horas. Nesta fase avaliamos parâmetros da coagulação, lesão tecidual e inflamação que serão detalhados adiante.

3.6 Coleta das amostras (3ª fase)

Amostras de sangue total foram obtidas antes, e após 3 e 6 horas da injeção de LPS (apenas na 3ª fase do estudo) através da punção da veia cava inferior com material estéril, conforme descrito a seguir e então centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente. A punção da veia cava foi selecionada como método de coleta por ser a via em que a ativação da coagulação é menos pronunciada, se comparada com punção cardíaca ou retro-orbital. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento, respeitando o tempo máximo de 30 minutos entre a coleta e o início da centrifugação. O soro e o plasma obtidos por centrifugação foram imediatamente separados em alíquotas, de 100 a 200 µl, e armazenados a -80 °C. Para obtenção de amostras necessárias para todas as avaliações bioquímicas e coagulométricas, foram necessários aproximadamente 30-40 animais por tempo e por grupo experimental.

Punção de veia cava inferior: após anestesia geral, foi realizado uma laparotomia mediana, e 1 ml de sangue total colhido através de punção direta usando seringas plásticas de 3ml e agulha calibre 26G. As amostras foram colhidas sob duas diferentes formas: (1) Plasma: 1ml de sangue total para 100mcl de citrato a 3,2%, destinados aos testes da coagulação e (2) Soro: 1ml de sangue total em tubo seco, para realização dos ELISAs.

Rim e pulmão: após a coleta de sangue da veia cava inferior, os animais foram perfundidos com 10ml de salina a 0,9%, seguido da infusão de 10 ml de formalina a 4% e amostras de rins e pulmão coletadas e fixadas em formalina para análise histopatológica.

3.7 Avaliação de marcadores de ativação da coagulação

3.7.1 Dosagem de TTPa e fibrinogênio

Uma alíquota de plasma de cada amostra foi descongelada a temperatura ambiente e utilizada para avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e dosagem de fibrinogênio, realizados em um coagulômetro automatizado (BCS XP, Siemens Healthcare Inc, Marburg, Alemanha). A utilização de reagentes humanos para realização de testes de coagulação em murinos já foi padronizada em nosso laboratório (De Paula EV, 2006).

3.7.2 Contagem plaquetária

A contagem de plaquetas foi determinado em amostras de plasma, coletadas em citrato de sódio 3,2% imediatamente após a coleta em contador automatizado de células (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

3.7.3 Complexo trombina-antitrombina (TAT)

Para avaliação indireta da geração de trombina, níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina (TAT) foram determinados por ensaio imuno-enzimático utilizando kit comercial específico para camundongos (Enzygnost TAT, Dade-Behring, Marburg, Alemanha).

3.8 Avaliação de marcadores de lesão tecidual

Hepáticos: para avaliação da extensão da lesão tecidual hepática durante a evolução clínica da sepse, marcadores bioquímicos de lesão tecidual foram avaliados tais como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), antigamente chamadas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP), respectivamente. Estes testes foram realizados em amostras de soro, descongeladas a temperatura ambiente, utilizando reagentes comerciais em um analisador bioquímico automatizado (Architect, Abbot, Illinois, EUA).

Renal e pulmonar . a avaliação de lesão tecidual nestes órgãos alvo foi feita por método histológico. Os tecidos (pulmão e rins) armazenados em formalina 4% foram

processados e corados com a coloração de hematoxilina e eosina. As lâminas foram codificadas, e a análise feita por um observador cego para o grupo de cada lâmina. Os cortes parafinados de pulmão e rim foram analisados como proposto por Schoenmakers e colaboradores (Schoenmakers SH, 2005), através da avaliação da infiltração tecidual de leucócitos e pela presença de endotelialite (i.e. adesão de leucócitos à parede do vaso). A seguinte metodologia foi usada:

Infiltração tecidual por leucócitos: foi classificada como (0) se ausente, (1) esparsa, (2) regular atingindo < 50%, (3) regular em mais de 50% e (4) se resultar em denso infiltrado nos septos intraalveolares.

Grau de Endotelialite: foi classificado (0) se ausente, (1) se presente em vasos esparsos, (2) se presente em todos os vasos, e (3) se houver adesão maciça em todos os vasos.

3.9 Dosagem de citocinas inflamatórias

As amostras de soro coletas foram descongeladas em temperatura ambiente, sendo então utilizadas para realização das dosagens séricas das interleucinas e para avaliação da resposta inflamatória sistêmica nos dois grupos experimentais e seus controles. Foram avaliadas as seguintes citocinas: IL-10, IL-6, INF- γ , TNF- α e IL-1 β

As análises foram realizadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se kits comerciais específicos para camundongos (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

3.10 Análise estatística

Os dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão da média. As medianas foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney. Os dados histológicos foram avaliados como variáveis ordinais e comparados pelo mesmo método. A sobrevida nos experimentos com LPS foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas

comparadas pelo teste de Logrank. As análises foram realizadas através do software GraphPad Prism Software (Inc. San Diego, California, EUA). O nível de significância estatística de 0,05 foi usado.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modifica a sobrevida da sepse experimental murina no modelo de endotoxemia

Os experimentos de sobrevida foram realizados utilizando duas doses distintas de LPS. As curvas abaixo demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre animais com deficiência de fator VIII ou IX da coagulação quando comparados com seus controles relacionados (figuras 8 e 9).

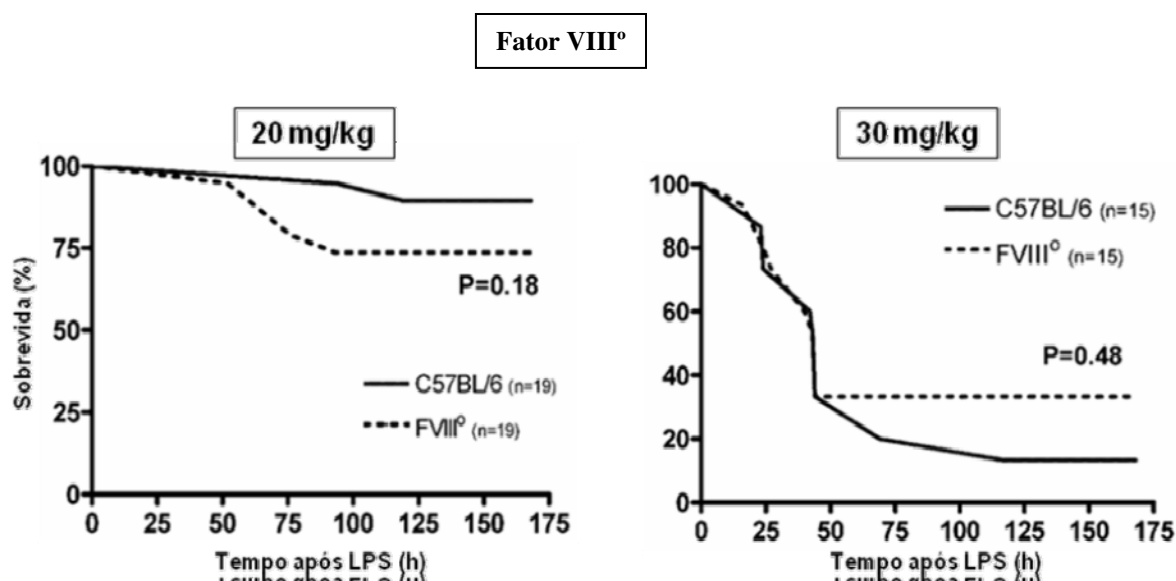


Figura 8 - Curva de sobrevida após LPS em camundongos com deficiência do fator VIII. Curva de sobrevida com análise de Kaplan-Meyer de camundongos C57BL/6 e FVIII^o após a injeção intraperitoneal de LPS nas doses de (a) 20mg/kg e (b) 30mg/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Log-rank).

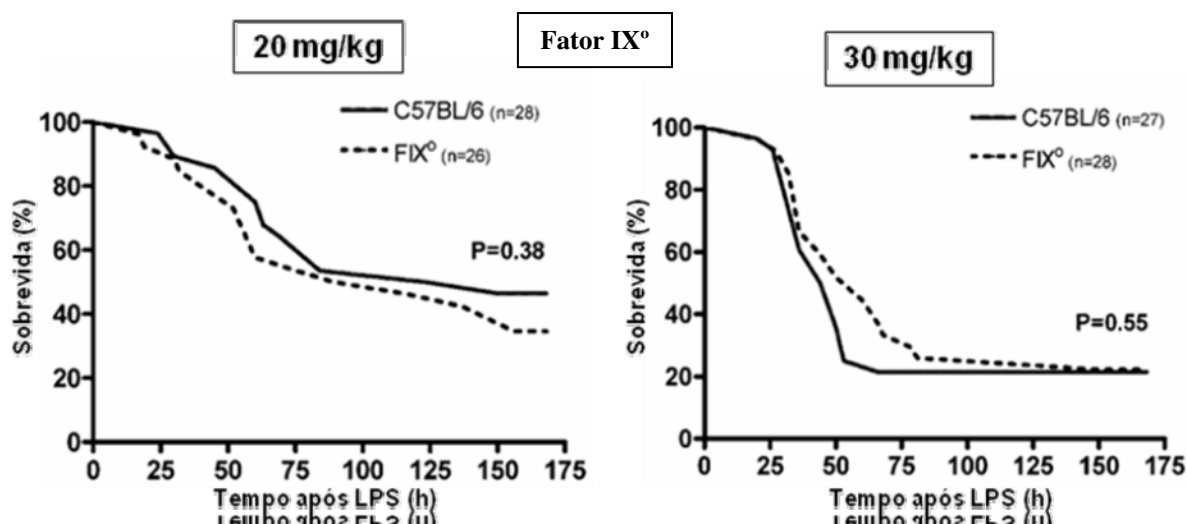


Figura 9 - Curva de sobrevivência após LPS em camundongos com deficiência do fator IX. Curva de sobrevivência com análise de Kaplan-Meier de camundongos C57BL/6 e FIX^o após a injeção intraperitoneal de LPS nas doses de (a) 20mg/kg e (b) 30mg/kg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de Log-rank).

4.2 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modificou significativamente parâmetros indiretos do grau de ativação da coagulação na sepse experimental murina no modelo de endotoxemia

4.2.1 Caracterização do fenótipo de Hemofilia A e B

Além da avaliação aleatória do genótipo (já descrito), o TTPa foi avaliado em todos os camundongos. Conforme esperado, houve diferença significativa nos valores do TTPa basal entre o grupo experimental e controle. A magnitude do prolongamento do TTPa é aquela esperada para estes modelos quando mensurada com reagentes humanos, de acordo com as descrições originais destes modelos (Bi L, 1995, Lin HF, 1997). Esta diferença permaneceu estatisticamente significativa após 3 e 6 horas (figura 10). Além do TTPa, foram realizadas algumas dosagens aleatórias de FVIII ou FIX, que também mostraram resultados semelhantes aos descritos nos artigos originais de caracterização destes modelos (dados não demonstrados).

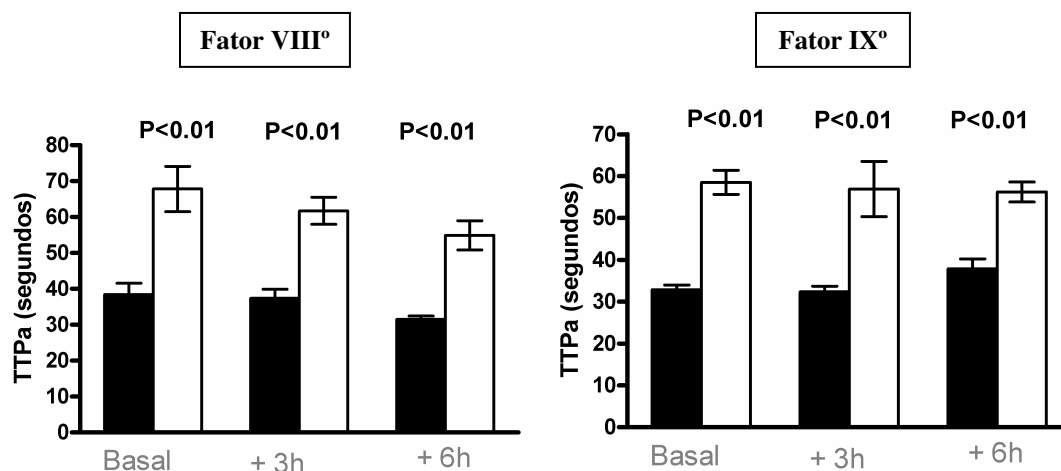


Figura 10 - TTPa nos camundongos experimentais e controles. Avaliação do TTPa através da análise de Teste de Mann-Whitney de camundongos C57BL/6, FVIIIo e FIXo após a injeção intraperitoneal de LPS. Barras escuras: camundongos C57BL6; barras claras: camundongos com hemofilia.

4.2.2 Avaliação da ativação da coagulação

Para caracterização da ativação da coagulação foram analisados a contagem de plaquetas, a dosagem de fibrinogênio e os níveis de TAT. A contagem plaquetária aumentou após 3 e 6 horas da infusão de LPS em ambos modelos experimentais (FVIIIo and FIXo). Entretanto, não houve diferença significativa entre camundongos com deficiências dos fatores VIII ou IX quando comparados com seus respectivos controles (figura 11).

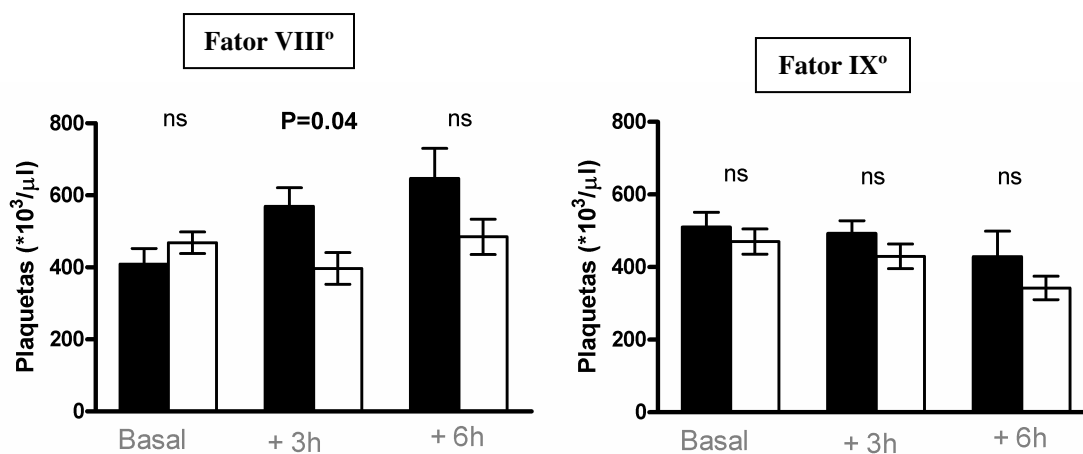


Figura 11 - Contagem plaquetária nos camundongos experimentais e controles. Contagem plaquetária em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. Exceto por um aumento isolado da contagem plaquetária no camundongo com deficiência do fator VIII após 3 horas de LPS, a deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação (barras brancas) não resultou em diferença estatisticamente significativa quando comparado a camundongos C57Bl/6 (barras pretas) (Teste de Mann-Whitney).

Um achado similar foi observado em relação aos níveis plasmáticos do fibrinogênio. Conforme esperado, observamos uma tendência de aumento nas dosagens de fibrinogênio após 3 e 6 horas de infusão de LPS. No entanto, não houve qualquer diferença na magnitude deste aumento entre animais com a deficiência dos fatores VIII ou IX e controles (Figura 12). Este achado sugere que as deficiências de FVIII ou FIX não estão associadas à mudanças no grau ou na velocidade de consumo de fibrinogênio durante a sepse experimental.

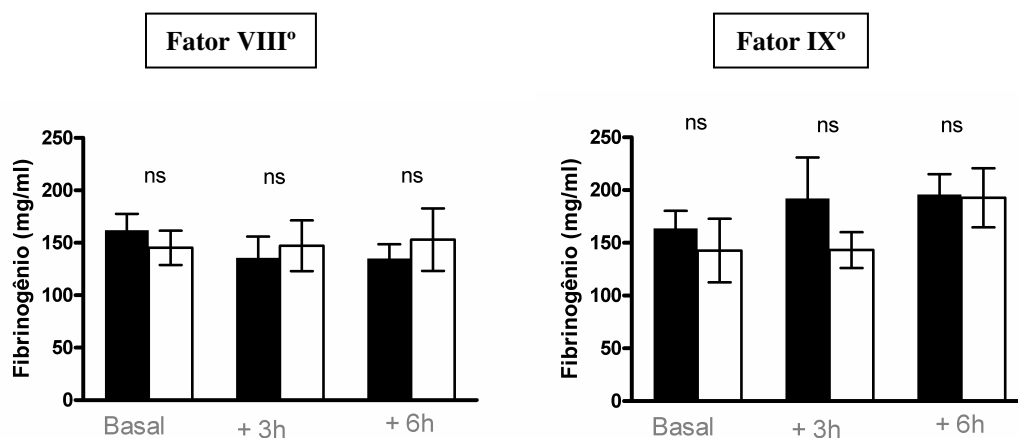


Figura 12 - Dosagem de fibrinogênio nos camundongos experimentais e controles. Dosagem de fibrinogênio em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o ou FIX^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado aos camundongos C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

Finalmente, os níveis de TAT tampouco apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais e controles, indicando que a deficiência grave dos fatores VIII e IX é compatível com graus normais de ativação da coagulação durante a sepse experimental murina (Figura 13).

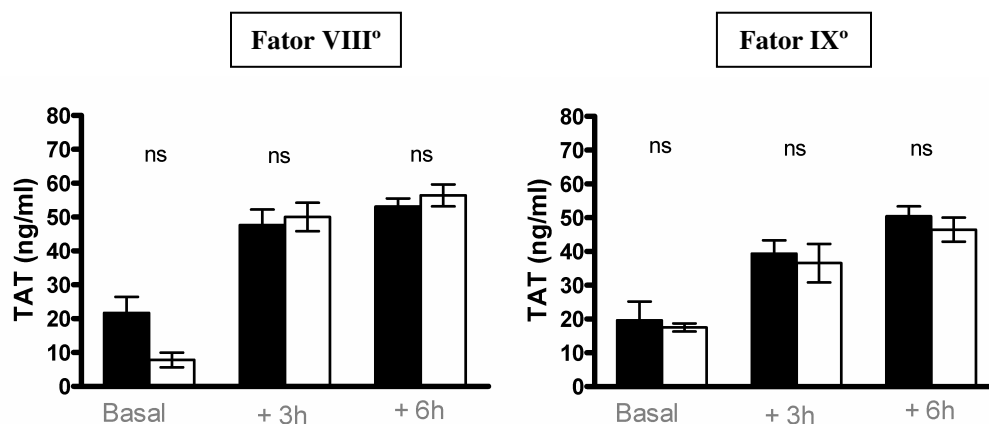


Figura 13 - Dosagem de complexo trombina-antitrombina (TAT). Dosagem de TAT em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII° ou FIX° (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

4.3 A deficiência grave de FVIII ou FIX da coagulação não modificou significativamente parâmetros de lesão tecidual em rins e pulmões na sepse experimental murina no modelo de endotoxemia

4.3.1 Marcadores bioquímicos de lesão tecidual hepática

Conforme esperado, houve aumento dos níveis séricos de ALT e AST após a infusão de LPS, em todos os tempos, mas não houve diferença significativa atribuída à deficiência de fatores (VIII ou IX) quando comparada aos seus respectivos controles (figura 14 e 15).

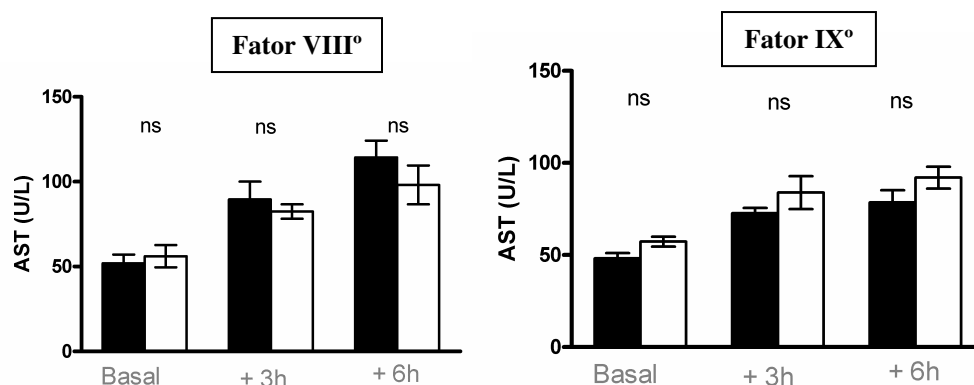


Figura 14 - Dosagem de AST em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIIIo ou FIX° (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

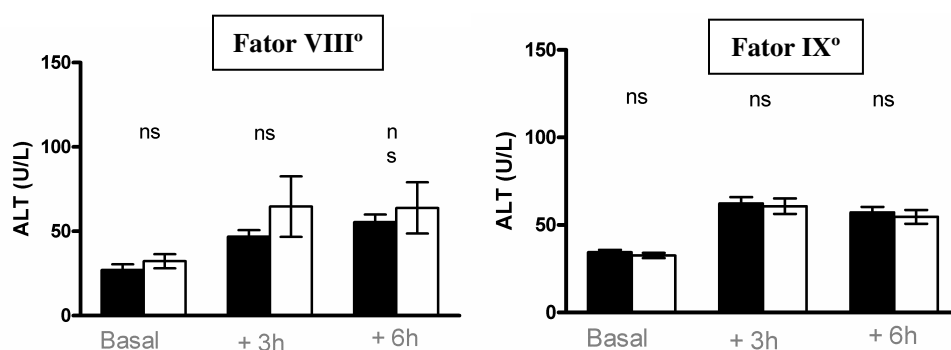


Figura 15 - Dosagem de ALT em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIIIo ou FIX° (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

4.3.2 Marcadores histológicos de lesão tecidual em rins e pulmões

Como esperado, houve aumento progressivo no grau de endotelialite e do influxo de leucócitos em pulmão e rim ao longo do experimento (3 e 6 horas). Porém, não houve diferença significativa atribuída à deficiência de fatores (VIII ou IX) quando comparada aos seus respectivos controles (figuras 16, 17, 18, 19). Estes resultados indicam

a ausência de efeito protetor da deficiência de fator VIII ou IX na progressão da sepse, mesmo ao nível histopatológico.

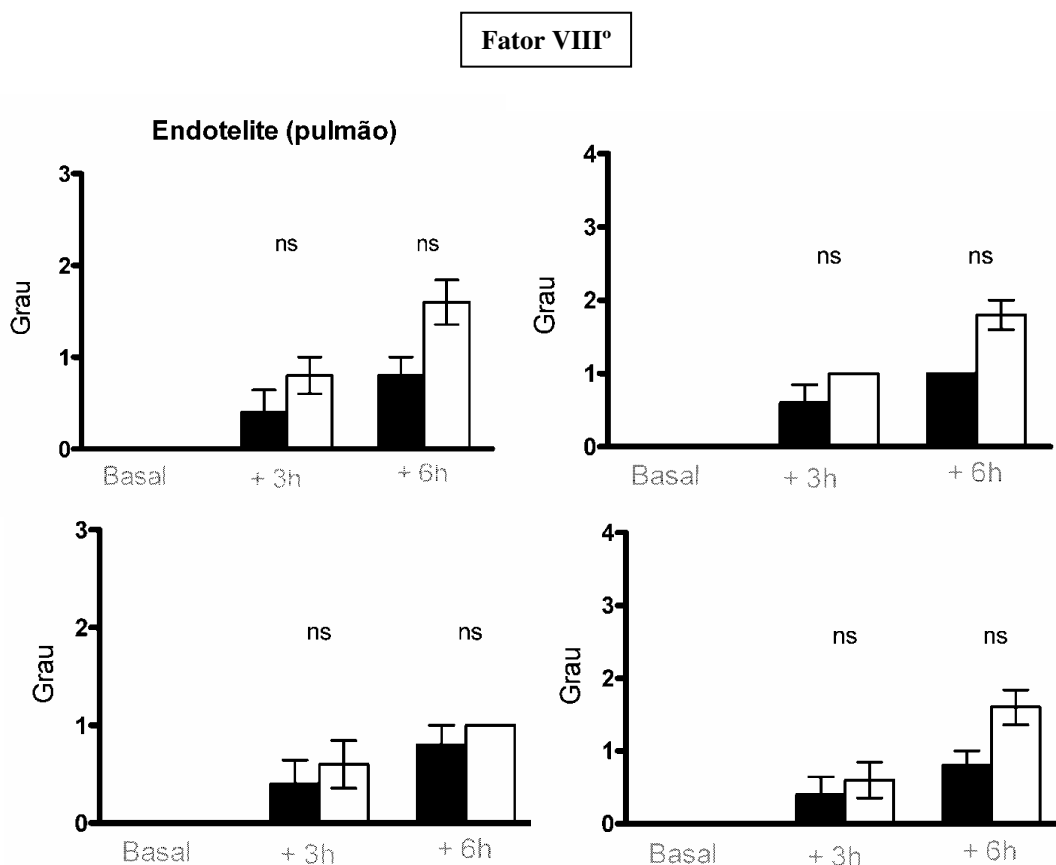


Figura 16 - Endotelialite e infiltração leucocitária. Marcadores histológicos de lesão tecidual em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator VIII da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57BL/6 (Teste de Mann-Whitney).

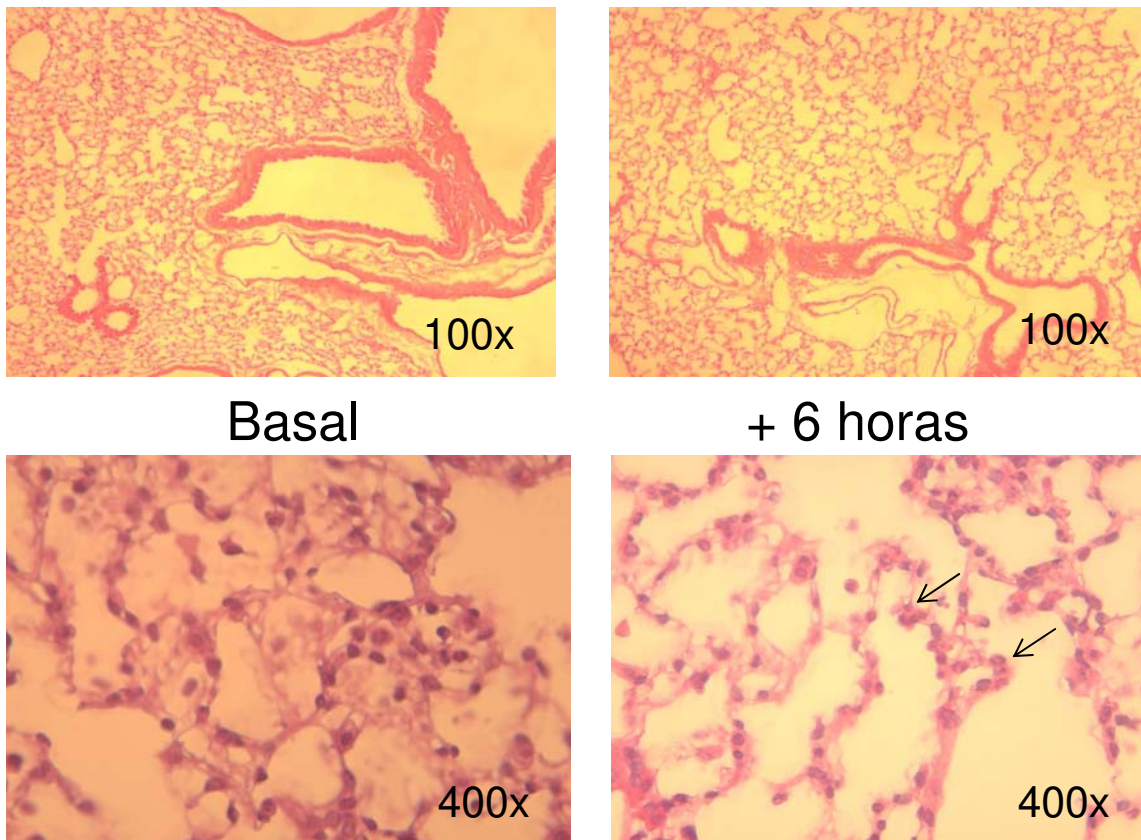


Figura 17 - Esquema ilustrativo de infiltrado neutrofílico em um corte histológico de pulmão em camundongo C57Bl/6 e FVIII^o antes e após 6 horas de infusão de LPS.

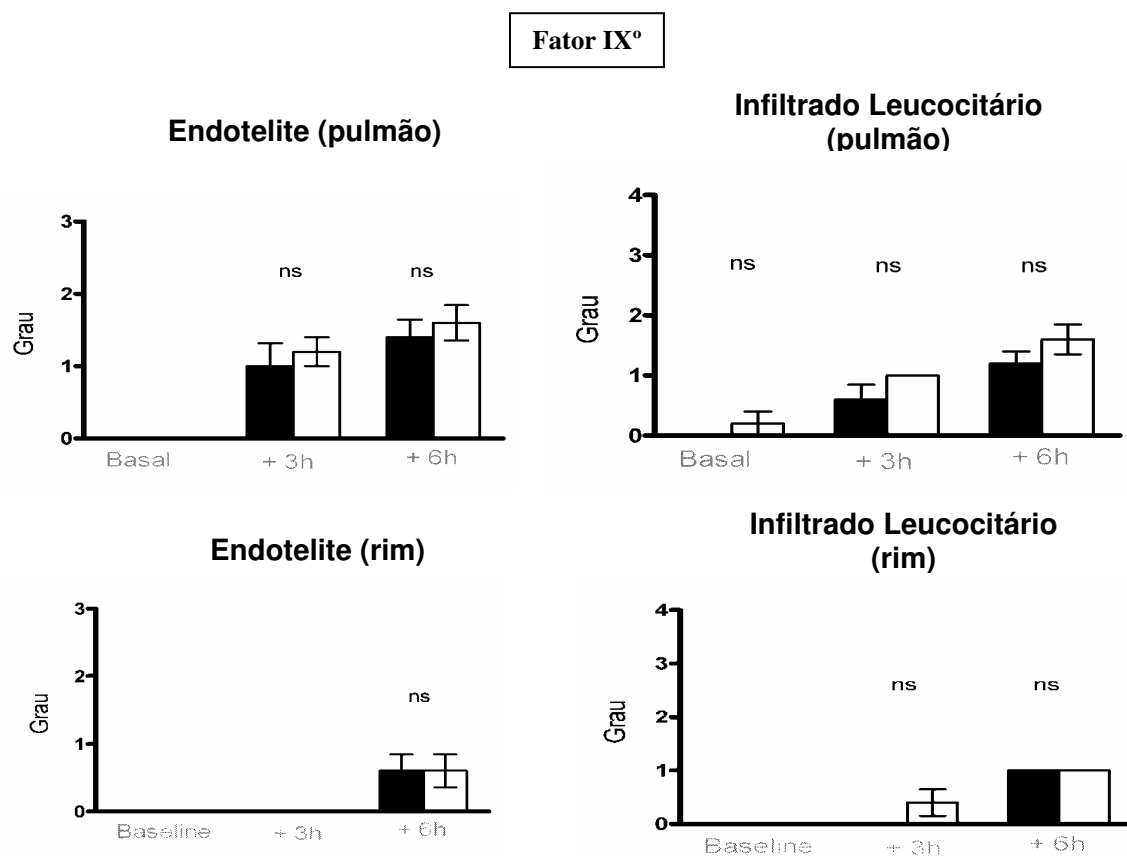


Figura 18 - Endotelialite e infiltração leucocitária. Marcadores histológicos de lesão tecidual em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FIXo (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

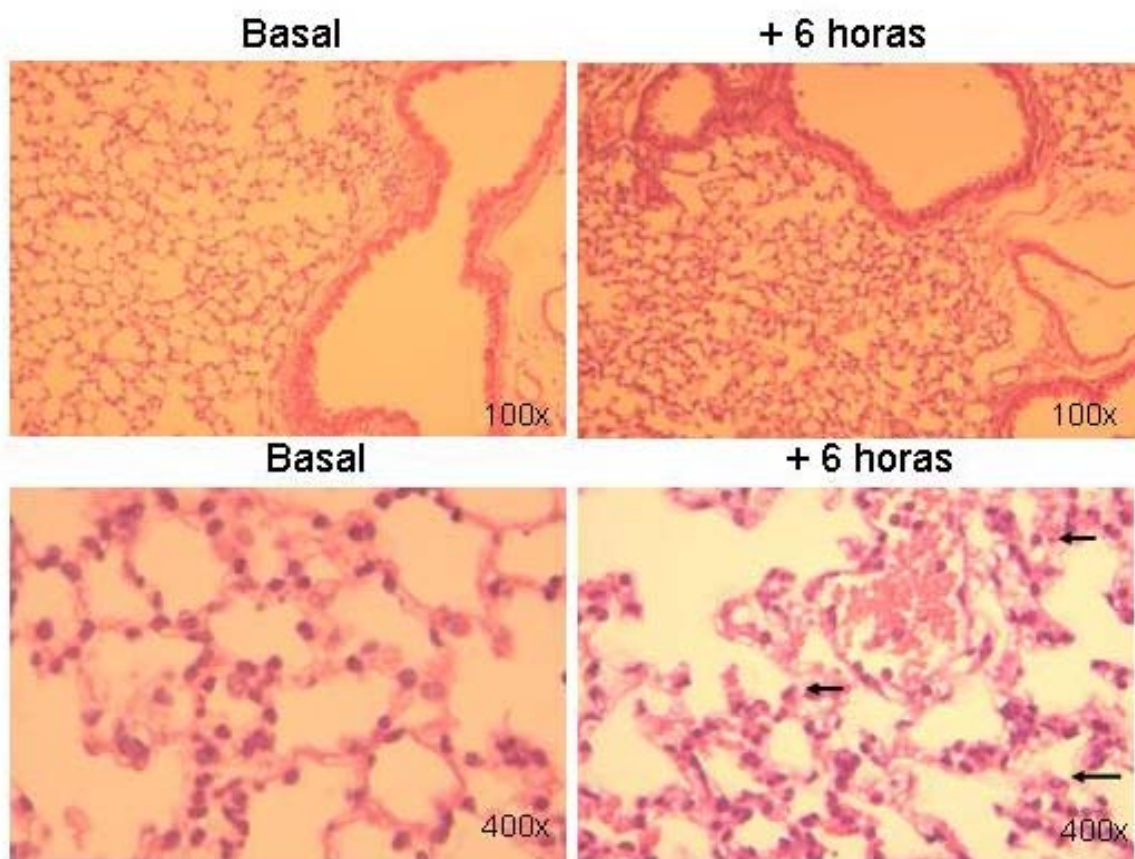


Figura 19 - Esquema ilustrativo de infiltrado neutrofílico em um corte histológico de pulmão em camundongo C57Bl/6 e IX^o antes e após 6 horas de infusão de LPS.

4.4 Mediadores inflamatórios

4.4.1 Dosagens de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF α , INF γ , IL-1 β)

O nível das citocinas pró e anti-inflamatórias testadas estavam abaixo do nível de detecção antes da administração de LPS. Após a infusão, o nível de IL-10 permaneceu indetectável (dados não demonstrados). No entanto, houve aumento importante dos níveis de citocinas pró- inflamatórias em todos os camundongos, conforme esperado. Em camundongos com deficiência de FVIII, não observamos diferenças estatisticamente significativas e sustentadas ao longo do experimento quando comparados a camundongos controle (Figura 20).

Ao contrário, a liberação de citocinas pró-inflamatórias foi significativamente menor em camundongos FIXo quando comparada com seus respectivos controles (Figura 21). Camundongos FIXo apresentaram níveis significativamente inferiores de IL-6 (após 6h de LPS), e de IL-1 β e TNF- α (ambos após 3 e 6 horas da infusão do LPS) quando comparados. O nível de IFN- γ permaneceu estável durante os experimentos.

Fator VIII^o

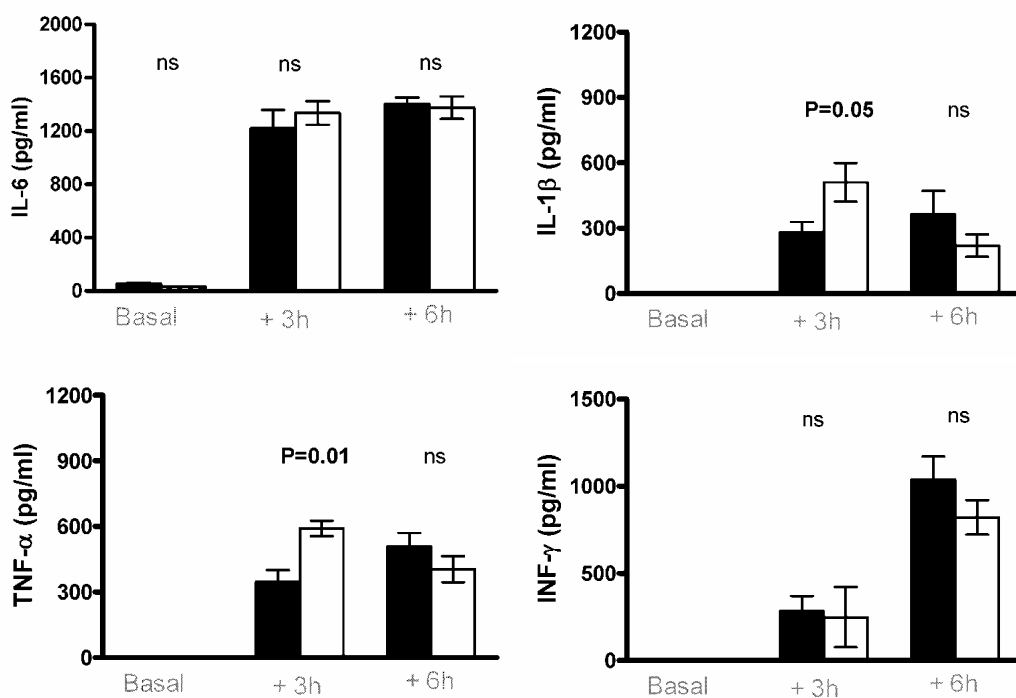


Figura 20 - Mediadores inflamatórios. Mediadores inflamatórios em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FVIII^o (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator VIII da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57BL/6 (Teste de Mann-Whitney).

Fator IX⁰

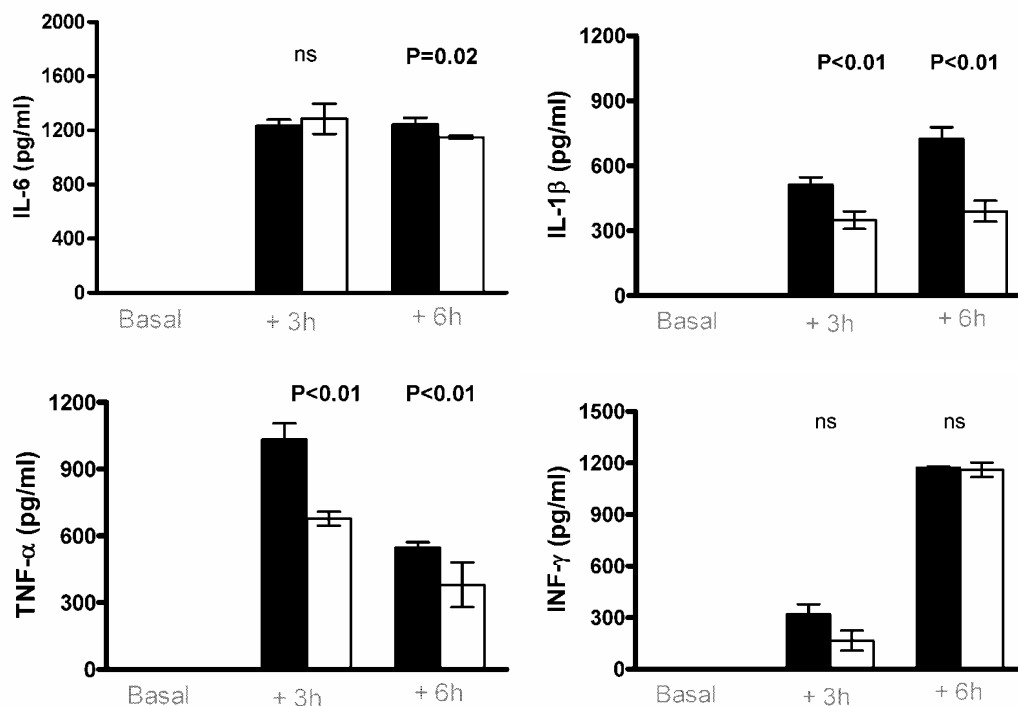


Figura 21 - Mediadores inflamatórios. Mediadores inflamatórios em camundongos C57BL/6 (barras pretas; n=8-16) e FIXo (barras brancas; n=8-16) após injeção de LPS. A deficiência do fator IX da coagulação não resultou em diferença estatisticamente quando comparado ao camundongo C57Bl/6 (Teste de Mann-Whitney).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Por muito tempo a ativação da coagulação e a formação de microtrombos na microvasculatura foram consideradas o grande vilão na morbidade e mortalidade dos pacientes com sepse e CIVD. Esta visão baseia-se em achados histopatológicos clássicos que mostravam a presença de trombos na microvasculatura de pacientes com sepse, os quais eram associados a isquemia tecidual e falência de órgãos (Levi M, 1993). Além disso, foram demonstradas várias alterações na sepse já discutidas nesta tese, entre as quais aumento da expressão de FT, redução da atividade de sistemas anticoagulantes naturais, e aumento da fibrinólise, que em conjunto podem explicar de forma racional e elegante a ocorrência de um estado de hipercoagulabilidade na sepse. Algumas destas alterações tiveram inclusive sua relevância clínica comprovada em estudos de inibição e bloqueio em modelos animais relevantes de sepse.

Ao longo dos últimos anos, esta visão clássica teve que ser revista a partir de uma série de estudos clínicos que utilizaram anticoagulantes naturais no tratamento da sepse, mas que ao contrário das expectativas, não resultaram em benefícios significativos de sobrevida de pacientes com sepse (Warren BL, 2001, Abraham E, 2003). Estes resultados negativos sugerem que a ativação da coagulação observada na sepse não é responsável isoladamente pela lesão tecidual e falência orgânica, e reforça o papel de outros elementos da fisiopatologia da sepse tais como a inflamação e a integridade da barreira endotelial na gênese de complicações como o choque séptico e a falência de múltiplos órgãos. Não por acaso, a única molécula anticoagulante que se mostrou marginalmente benéfica em estudos clínicos de sepse foi a proteína C ativada, que hoje sabemos possuir forte ação anti-inflamatória (Bernard GR, 2001). Estes resultados incentivaram um retorno à bancada com o intuito de melhor compreender os mecanismos relacionados à sepse envolvendo inflamação e hemostasia (Abraham E, 2006, Abraham E and Singer M, 2007).

Estudos de sepse em modelos animais com deficiências graves de fatores da coagulação (em geral animais transgênicos) representam uma estratégia válida para exploração do papel da hemostasia na sepse. No entanto, como discutido anteriormente, os resultados destes estudos revelaram algumas controvérsias. Estudos iniciais reforçaram o papel crítico da ativação e iniciação da coagulação pelo FT na fisiopatogenia da sepse, na medida em que tanto camundongos com deficiência de FT quanto aqueles com deficiência

de FVII apresentaram fenótipo de menor gravidade na sepse. Estes resultados estão de acordo com a hipótese que na sepse ocorre ativação contínua da coagulação pela expressão anômala de FT mediada pela inflamação. A manipulação da via da PCa em camundongos também resultou em achados que corroboram as hipóteses clássicas sobre a fisiopatologia da sepse, na medida em que a hiperexpressão de EPCR (aumento da função da via) resultou em efeito protetor, ao passo que a deficiência da PC resultou em aumento da mortalidade. No entanto, quando avaliamos os resultados de estudos que avaliaram o papel de fatores envolvidos na amplificação da geração de trombina (fatores da via intrínseca), os resultados não são consensuais. Camundongos com deficiência de FVIII não apresentaram qualquer alteração na resposta à sepse, ao passo que camundongos com deficiência de FXI apresentaram efeito protetor. A hipótese dos autores do primeiro estudo (def FVIII) especularam que durante a sepse, a ativação da coagulação pelo FT seria forte o suficiente para compensar a redução da geração de trombina decorrente da deficiência de FVIII. Como se sabe, o papel dos fatores da via intrínseca (VIII, IX e XI) é de amplificar a geração de trombina, a fim de garantir a hemostasia normal. Pacientes com hemofilia ou deficiência de FXI não apresentam problemas com a iniciação da coagulação, mas apresentam redução na geração de trombina, que resulta em tendência a sangramentos. Analogamente, podemos assumir que camundongos com deficiências destes fatores apresentem iniciação normal da coagulação, mas com menor geração de trombina. Assim, poderíamos esperar que o efeito da deficiência destes fatores fosse menor na sepse experimental, se comparado à deficiência de fatores VII e fator tissular. No entanto, os resultados dos estudos com camundongos com deficiência de FXI não apontaram nesta direção. Além disso, os resultados obtidos com camundongos com deficiência de FVIII foram obtidos com apenas um modelo experimental. Neste contexto, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o papel dos fatores VIII e IX (este previamente não explorado) na sepse experimental murina. Um dos pontos fortes deste estudo reside no fato de estudarmos os dois modelos de hipocoagulabilidade usando um único modelo de sepse no mesmo laboratório, com o mesmo lote de LPS e sob as mesmas condições experimentais. O modelo de endotoxemia em murinos é amplamente utilizado em estudos sobre sepse (Camerer E, 2006, Cao C, 2010, Xu J, 2009).

Em nosso estudo, camundongos com deficiência grave do fator VIII ou IX apresentaram sobrevida similar a seus controles na sepse experimental murina avaliada com duas doses distintas de LPS. Além disso, estes camundongos não apresentaram qualquer diferença no grau de dano tecidual em pulmão e rins, indicando a que deficiência do fator VIII ou IX não foi crítica para a evolução da sepse neste modelo.

Além disso, o aumento do fibrinogênio, o consumo de plaquetas e dos níveis de TAT foram similares aos observados em camundongos controle. Estes dados são interessantes pois sugerem que durante a sepse, a deficiência na etapa de amplificação da coagulação é pelo menos parcialmente compensada por outras vias de ativação da coagulação. Conforme discutido acima, Schoenmakers e colaboradores especularam que a ativação contínua da coagulação pela via do FT seria o responsável por este achado, e demonstram de forma experimental a ativação desta via durante a sepse através do estudo da relação FT/TFPI ao longo do tempo (Schoenmakers SH, 2005). Nosso estudo não avaliou detalhadamente esta questão, mas os dados do fibrinogênio, contagem de plaquetas e TAT sugerem que o consumo destes elementos da coagulação na sepse experimental murina não é influenciado pela deficiência de F VIII ou IX. Embora não tenhamos avaliado esta questão de forma mais específica, a obtenção de resultados semelhantes com camundongos com deficiência do FVIII e F IX, em experimentos independentes reforçam a possibilidade que de fato a deficiência destes fatores pode ser compensada por outras vias de ativação da coagulação. Na verdade, a possibilidade de a geração de trombina ser compensada em indivíduos com hemofilia grave por outras vias de ativação da coagulação é conhecida há anos e usada terapeuticamente quando agentes de bypass como os complexos protrombínicos ativados ou o fator VII ativado recombinante são utilizados com sucesso em pacientes com hemofilia grave e inibidores.

Uma das grandes limitações de estudos com o modelo da endotoxemia diz respeito à possibilidade de comparações diretas de resultados entre estudos distintos. Os resultados obtidos com este modelo são influenciados por variáveis de difícil controle como as diferenças entre a diluição de LPS (vórtex, sonicação, etc), diferenças de potência entre lotes de LPS, além de diferenças na linhagem e background dos camundongos. No caso do Brasil, soma-se ainda a manipulação distinta do LPS pelo fabricante (Sigma), que o mantém em temperatura ambiente durante o transporte, baseado em estudos de validação

internos. Até que ponto esta conduta pode reduzir a potência deste reagente é desconhecido. Estas diferenças podem explicar os resultados conflitantes de estudos feitos em laboratórios distintos, tais como aqueles obtidos com camundongos com deficiência de FXI. Vale destacar aqui nossa experiência com o efeito do background genético de camundongos experimentais em estudos com LPS. Em um primeiro momento, quando utilizamos controles da mesma linhagem que os camundongos transgênicos, porém não relacionados (C57Bl6 obtidos diretamente do CEMIB), os resultados de nossos experimentos foram completamente distintos dos resultados finais. A homogeneização do background genético consumiu cerca de 18 meses de trabalho, mas foi fundamental para que tivéssemos segurança de nossos resultados. Em conclusão, o fato de nosso trabalho ter sido realizado com camundongos deficientes de fator VIII e IX submetidos às mesmas condições experimentais, e com controles relacionados com background semelhante permitem concluir que as deficiências graves de FVIII e FIX não são ponto crítico na patogênese da sepse experimental murina

Um achado interessante em nosso estudo foi a diminuição das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1b e TNF-a) dos camundongos com deficiência do fator IX em relação ao controle. Apesar de não reproduzir perfeitamente a resposta inflamatória sistêmica da sepse em humanos, o perfil das citocinas expressado após a injeção de LPS pode ser considerado uma característica inata do sistema imune em resposta a um estímulo padrão. A partir desta premissa, nossos resultados sugerem que embora a deficiência de fatores VIII ou IX não tenha impactado no grau de lesão tecidual da sepse experimental, seu impacto na liberação de citocinas pró-inflamatórias foi heterogêneo, sendo que camundongos com deficiência do F IX apresentaram uma redução inesperada de algumas citocinas. O fato de esta redução ter sido observada tanto após 3 quanto após 6 horas reforça a consistência do resultado. O significado clínico deste achado é desconhecido, sendo prematuro qualquer conclusão definitiva sobre o tema. Não há na literatura evidências clínicas que sugiram diferenças na resposta imune entre pacientes com hemofilias A ou B. No entanto, devemos reconhecer que a grande maioria de estudos com estes pacientes não os avalia de forma distinta, e que um grande número de variáveis de confusão pode influenciar estas observações em humanos (infecção pelo HIV, hepatite C, etc). Além disso, a resposta imune ao LPS nunca foi estudada de forma sistemática na

hemofilia. No entanto, podemos especular que alguns achados recentes podem sim estar relacionados a esta observação. É sabido que camundongos com deficiência do FIX apresentam lentificação na cicatrização de feridas, caracterizada por menor infiltração por macrófagos nas áreas lesadas (Hoffman M, 2006). O mecanismo relacionado a esta observação ainda não foi identificado, mas a menor geração de trombina não parece ser a única responsável, já que a reposição com FIX não é suficiente para reverter este fenótipo. A cicatrização de feridas é um processo complexo da hemostasia, ainda não completamente conhecido. É possível imaginar que diferenças na resposta imune poderiam ser relevantes para este processo. Outro resultado que permite especulações interessantes é o de um recente estudo retrospectivo que sugere que pacientes portadores de hemofilia B apresentam menos artropatia que pacientes com hemofilia A (Tagariello G, 2009). Este estudo gerou críticas e comentários, mas avaliou um grande número de pacientes submetidos a cirurgias de artroplastia. As conclusões baseiam-se na menor frequência deste procedimento em pacientes com hemofilia B. Em termos gerais, a patogênese da artropatia na hemofilia tem como fator desencadeante os sangramentos articulares repetidos, que leva à perpetuação da resposta inflamatória crônica, responsável então pela destruição articular. Níveis elevados de IL-1, IL-6 and TNF- α foram demonstrados em culturas de tecido sinovial de pacientes com hemofilia grave (Roosendaal G, 1998).

De fato, diferenças na resposta imune de camundongos com deficiência de fatores da coagulação já foram descritas por outros grupos, que demonstraram menor liberação de IL-6 durante a sepse experimental em camundongos com deficiência do FT (Schoenmakers SH, 2004) e FVII (Xu H, 2006). No último trabalho, um mecanismo independente da trombina para diminuir a resposta imune foi sugerido, através da observação da lepirudina, um inibidor direto da trombina que não reproduziu esta queda na IL-6 quando usada em camundongos normais. Os mecanismos pelos quais deficiências de fatores da coagulação poderiam resultar em mudanças na resposta imune permanecem desconhecidos.

O foco da pesquisa na área de hemofilia ao longo dos últimos anos mudou da segurança dos concentrados de fatores (em relação ao risco de infecções) para o manejo das complicações relacionadas à idade (Konkle BA, 2009). Embora a sepse não possa ser considerada uma condição relacionada à idade, ela pode sim ser agravada por ela na medida

em que comorbidades como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, mais prevalentes em idosos, contribuem com a gravidade da sepse (Martin GS, 2003). Em consequência é razoável esperar que a sepse passe ser mais frequentemente observada nos pacientes com hemofilia nos próximos anos, e questões relacionadas ao seu manejo ganhem relevância clínica. Nossos dados demonstram que a deficiência severa dos fatores VIII e IX da coagulação não influencia na evolução clínica em um modelo de sepse murina, e introduzem a discussão sobre a apresentação clínica da sepse na hemofilia. No entanto, nossos dados não permitem conclusões sobre este aspecto na medida em que já foi demonstrado que a tradução de resultados clínicos obtidos em modelos murinos de sepse para humanos não deve ser feita de forma liberal.

Em conclusão, nossos resultados demonstram pela primeira vez que a deficiência grave de fator IX não interfere na sepse experimental induzida pela administração de LPS no que diz respeito a uma série de parâmetros tais como: (1) mortalidade em 7 dias em camundongos expostos a doses escalonadas de LPS; (2) marcadores bioquímicos de lesão tecidual; (3) padrão de expressão de citocinas inflamatórias; (4) marcadores histológicos de lesão inflamatória. Em relação à deficiência de fator VIII, onde o papel do fator VIII na sepse já havia sido avaliado utilizando outro modelo de sepse, nossos dados apresentam resultados semelhantes, e confirmam conclusões análogas, mesmo com outro modelo experimental.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- Camundongos com deficiência de fator VIII ou IX da coagulação apresentam sobrevida semelhante a camundongos controles na sepse experimental murina.
- Parâmetros clássicos de ativação da coagulação durante a sepse, tais como contagem de plaquetas, dosagem de fibrinogênio e níveis de TAT não apresentam variações significativamente diferentes entre camundongos com deficiência grave de fator VIII ou IX ou camundongos controles na sepse experimental murina.
- Camundongos com deficiência de fator VIII ou IX da coagulação apresentam marcadores bioquímicos e histológicos de lesão tecidual semelhantes a camundongos controles na sepse experimental murina.
- Camundongos com deficiência de fator IX apresentam redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias quando comparados a camundongos com deficiência de fator VIII e a camundongos controles na sepse experimental murina.
- Os que os fatores VIII e IX da coagulação não apresentam papel crítico na fisiopatologia da sepse experimental murina.

Referências

7 REFERÊNCIAS

Bone, RC, Balk, RA, Cerra, FB, Dellinger, RP, Fein, AM, Knaus, WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55.

Angus, DC, Birmingham, MC, Balk, RA, Scannon, PJ, Collins, D, Kruse, JA, et al. E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. Jama. 2000 Apr 5;283(13):1723-30.

Silva, E, Pedro Mde, A, Sogayar, AC, Mohovic, T, Silva, CL, Janiszewski, M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care. 2004 Aug;8(4):R251-60.

Williams, MD, Braun, LA, Cooper, LM, Johnston, J, Weiss, RV, Qualy, RL, et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. Crit Care. 2004 Oct;8(5):R291-8.

O'Brien, JM, Jr., Ali, NA, Aberegg, SK, Abraham, E. Sepsis. Am J Med. 2007 Dec;120(12):1012-22.

Remick, DG. Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol. 2007 May;170(5):1435-44.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.

Aird, WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood. 2003 May 15;101(10):3765-77.

Rangel-Frausto, MS, Pittet, D, Costigan, M, Hwang, T, Davis, CS, Wenzel, RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. Jama. 1995 Jan 11;273(2):117-23.

Levi, M. The coagulant response in sepsis and inflammation. Hamostaseologie. 2010 Jan;30(1):10-2, 4-6. Ferrara, N, Gerber, HP, LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003 Jun;9(6):669-76.

Thomas, M, Augustin, HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):125-37.

Levi, M, Keller, TT, van Gorp, E, ten Cate, H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*. 2003 Oct 15;60(1):26-39.

Schouten, M, Wiersinga, WJ, Levi, M, van der Poll, T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008 Mar;83(3):536-45.

Andreasen, AS, Krabbe, KS, Krogh-Madsen, R, Taudorf, S, Pedersen, BK, Moller, K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr Med Chem*. 2008;15(17):1697-705.

Vincent, JL, Abraham, E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Feb 1;173(3):256-63.

Creasey, AA, Stevens, P, Kenney, J, Allison, AC, Warren, K, Catlett, R, et al. Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ Shock*. 1991 Feb;33(2):84-91.

Remick, DG, Strieter, RM, Lynch, JP, 3rd, Nguyen, D, Eskandari, M, Kunkel, SL. In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor-alpha gene expression. Kinetics of dexamethasone-induced suppression. *Lab Invest*. 1989 Jun;60(6):766-71.

Remick, DG, Ward, PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:7-11.

Waage, A, Halstensen, A, Espevik, T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*. 1987 Feb 14;1(8529):355-7.

Webster, NR, Galley, HF. Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth*. 2009 Jul;103(1):70-81.

van der Poll, T, van Deventer, SJ. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infectious disease clinics of North America*. 1999 Jun;13(2):413-26, ix.

Tracey, KJ, Fong, Y, Hesse, DG, Manogue, KR, Lee, AT, Kuo, GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4.

Tracey, KJ, Beutler, B, Lowry, SF, Merryweather, J, Wolpe, S, Milsark, IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*. 1986 Oct 24;234(4775):470-4.

Abraham, E, Wunderink, R, Silverman, H, Perl, TM, Nasraway, S, Levy, H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *Jama*. 1995 Mar 22-29;273(12):934-41.

Bozza, FA, Salluh, JI, Japiassu, AM, Soares, M, Assis, EF, Gomes, RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49.

Chensue, SW, Terebuh, PD, Remick, DG, Scales, WE, Kunkel, SL. In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *Am J Pathol*. 1991 Feb;138(2):395-402.

Coughlin, SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):258-64.

Camerer, E, Cornelissen, I, Kataoka, H, Duong, DN, Zheng, YW, Coughlin, SR. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*. 2006 May 15;107(10):3912-21.

Faust, SN, Levin, M, Harrison, OB, Goldin, RD, Lockhart, MS, Kondaveeti, S, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*. 2001 Aug 9;345(6):408-16.

Nawroth, PP, Handley, DA, Esmon, CT, Stern, DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 May;83(10):3460-4.

Jochum, M, Lander, S, Heimburger, N, Fritz, H. Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1981 Feb;362(2):103-12.

Bourin, MC, Lindahl, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J.* 1993 Jan 15;289 (Pt 2):313-30.

Mann, KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):165-74.

Esmon, CT. Does inflammation contribute to thrombotic events? *Haemostasis.* 2000;30 Suppl 2:34-40.

Bernard, GR, Vincent, JL, Laterre, PF, LaRosa, SP, Dhainaut, JF, Lopez-Rodriguez, A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):699-709.

Levi, M, ten Cate, H, van der Poll, T, van Deventer, SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Jama.* 1993 Aug 25;270(8):975-9.

Dackiw, AP, McGilvray, ID, Woodside, M, Nathens, AB, Marshall, JC, Rotstein, OD. Prevention of endotoxin-induced mortality by antitissue factor immunization. *Arch Surg.* 1996 Dec;131(12):1273-8; discussion 8-9.

Houston, DS. Tissue factor - a therapeutic target for thrombotic disorders. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2002 Apr;6(2):159-74.

Chen, D, Giannopoulos, K, Shiels, PG, Webster, Z, McVey, JH, Kembell-Cook, G, et al. Inhibition of intravascular thrombosis in murine endotoxemia by targeted expression of hirudin and tissue factor pathway inhibitor analogs to activated endothelium. *Blood.* 2004 Sep 1;104(5):1344-9.

Opal, SM, Palardy, JE, Parejo, NA, Creasey, AA. The activity of tissue factor pathway inhibitor in experimental models of superantigen-induced shock and polymicrobial intra-abdominal sepsis. *Critical care medicine.* 2001 Jan;29(1):13-7.

Emerson, TE, Jr., Fournel, MA, Redens, TB, Taylor, FB, Jr. Efficacy of antithrombin III supplementation in animal models of fulminant *Escherichia coli* endotoxemia or bacteremia. *Am J Med.* 1989 Sep 11;87(3B):27S-33S.

Warren, BL, Eid, A, Singer, P, Pillay, SS, Carl, P, Novak, I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama*. 2001 Oct 17;286(15):1869-78.

Abraham, E, Reinhart, K, Opal, S, Demeyer, I, Doig, C, Rodriguez, AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama*. 2003 Jul 9;290(2):238-47.

Creasey, AA, Chang, AC, Feigen, L, Wun, TC, Taylor, FB, Jr., Hinshaw, LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2850-60.

Li, W, Zheng, X, Gu, J, Hunter, J, Ferrell, GL, Lupu, F, et al. Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost*. 2005 Jul;3(7):1351-9.

Levi, M, Dorffler-Melly, J, Reitsma, P, Buller, H, Florquin, S, van der Poll, T, et al. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4823-7.

Xu, H, Ploplis, VA, Castellino, FJ. A coagulation factor VII deficiency protects against acute inflammatory responses in mice. *J Pathol*. 2006 Dec;210(4):488-96.

Schoenmakers, SH, Bruggemann, LW, Groot, AP, Maijs, S, Reitsma, PH, Spek, CA. Role of coagulation FVIII in septic peritonitis assessed in hemophilic mice. *J Thromb Haemost*. 2005 Dec;3(12):2738-44.

Tucker, EI, Gailani, D, Hurst, S, Cheng, Q, Hanson, SR, Gruber, A. Survival advantage of coagulation factor XI-deficient mice during peritoneal sepsis. *J Infect Dis*. 2008 Jul 15;198(2):271-4.

Bi, L, Lawler, AM, Antonarakis, SE, High, KA, Gearhart, JD, Kazazian, HH, Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):119-21.

Lin, HF, Maeda, N, Smithies, O, Straight, DL, Stafford, DW. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood*. 1997 Nov 15;90(10):3962-6.

Bi, L, Sarkar, R, Naas, T, Lawler, AM, Pain, J, Shumaker, SL, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood*. 1996 Nov 1;88(9):3446-50.

Hubbard, WJ, Choudhry, M, Schwacha, MG, Kerby, JD, Rue, LW, 3rd, Bland, KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:52-7.

Bohrer, H, Qiu, F, Zimmermann, T, Zhang, Y, Jllmer, T, Mannel, D, et al. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):972-85.

Otero-Anton, E, Gonzalez-Quintela, A, Lopez-Soto, A, Lopez-Ben, S, Llovo, J, Perez, LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res*. 2001;33(2):77-9.

Wichterman, KA, Baue, AE, Chaudry, IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980 Aug;29(2):189-201.

Buras, JA, Holzmann, B, Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Oct;4(10):854-65.

De Paula, EV, Nascimento, MC, Ramos, CD, Ozelo, MC, Machado, TF, Guillaumon, AT, et al. Early in vivo anticoagulation inhibits the angiogenic response following hindlimb ischemia in a rodent model. *Thromb Haemost*. 2006 Jul;96(1):68-72.

Abraham, E. Do coagulation abnormalities contribute to sepsis associated organ failure? *Crit Care Med*. 2006 Jun;34(6):1842-4.

Abraham, E, Singer, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*. 2007 Oct;35(10):2408-16.

Cao, C, Gao, Y, Li, Y, Antalis, TM, Castellino, FJ, Zhang, L. The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD11b. *J Clin Invest*. 2010 Jun 1;120(6):1971-80.

Xu, J, Zhang, X, Pelayo, R, Monestier, M, Ammollo, CT, Semeraro, F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009 Nov;15(11):1318-21.

Hoffman, M, Harger, A, Lenkowski, A, Hedner, U, Roberts, HR, Monroe, DM. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3053-60.

Tagariello, G, Iorio, A, Santagostino, E, Morfini, M, Bisson, R, Innocenti, M, et al. Comparison of the rates of joint arthroplasty in patients with severe factor VIII and IX deficiency: an index of different clinical severity of the 2 coagulation disorders. *Blood*. 2009 Jul 23;114(4):779-84.

Roosendaal, G, Vianen, ME, Wenting, MJ, van Rinsum, AC, van den Berg, HM, Lafeber, FP, et al. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia. *J Bone Joint Surg Br*. 1998 May;80(3):540-5.

Schoenmakers, SH, Versteeg, HH, Groot, AP, Reitsma, PH, Spek, CA. Tissue factor haploinsufficiency during endotoxin induced coagulation and inflammation in mice. *J Thromb Haemost*. 2004 Dec;2(12):2185-93.

Konkle, BA, Kessler, C, Aledort, L, Andersen, J, Fogarty, P, Kouides, P, et al. Emerging clinical concerns in the ageing haemophilia patient. *Haemophilia*. 2009 Nov;15(6):1197-209.

Martin, GS, Mannino, DM, Eaton, S, Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546-54.

Anexos

8 ANEXOS



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1367-1, sobre "Avaliação do papel da coagulação na fisiopatologia da sepse através do modelo de endotoxemia em camundongos com deficiência e hiper-expressão do fator IX da coagulação" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula / Suley Mara Chaddad Vancine Califani está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 19 de dezembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1367-1, entitled "Evaluation of the role of hemostasis in the pathophysiology of sepsis using the endotoxemia model mice with hemophilia B", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 19, 2007.

Prof. Dra. Liana Verinaud
Respondendo pela presidência

Campinas, 19 de dezembro de 2007.

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>