



KIARA CRISTINA SENGER ZAPPONI

**"AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS DE NEUTRÓFILOS,
ERITRÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES COM TROMBOEMBOLISMO
VENOSO"**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KIARA CRISTINA SENGER ZAPPONI

**"AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS DE
NEUTRÓFILOS, ERITRÓCITOS E PLAQUETAS DE PACIENTES
COM TROMBOEMBOLISMO VENOSO"**

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Nicola Amanda Conran Zorzetto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestra em Fisiopatologia Médica, na área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KIARA CRISTINA
SENGER ZAPPONI E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A).
JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Z182a

Zapponi, Kiara Cristina Senger, 1986-
Avaliação das propriedades adesivas de neutrófilos,
eritrócitos e plaquetas de pacientes com
tromboembolismo venoso / Kiara Cristina Senger
Zapponi. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Coorientador : Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adesão celular. 2. Neutrófilos. 3. Eritrócitos. 4.
Plaquetas. 5. Tromboembolismo venoso. I. Annichino-
Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Zorzetto, Nicola
Amanda Conran. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets of patients with venous thromboembolism.

Palavras-chave em inglês:

Cell adhesion

Neutrophils

Erythrocytes

Blood platelets

Venous thromboembolism

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestra em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]

Erich Vinicius de Paula

Maria Carolina Tostes Pintão

Data da defesa: 21-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Kiara Cristina Senger Zapponi

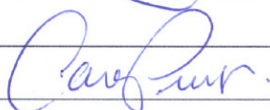
Orientador(a): Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Membros:

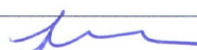
Professor (a) Doutor (a) Erich Vinicius de Paula



Professor (a) Doutor (a) Maria Carolina Tostes Pintão



Professor (a) Doutor (a) Joyce Maria Annichino Bizzacchi



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

Data: 21/12/2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meus crescimentos pessoais e profissionais, e ao meu noivo Marcio, por estar sempre ao meu lado me incentivando e me fazendo mais feliz a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas, por me confortar nas horas difíceis e me dar forças para seguir sempre em frente.

A minha orientadora Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, agradeço pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, Heider e Clarita, meus avós Manoel e Virginia, meu irmão Frederico por todo amor, carinho, apoio incondicional e por superarem a distância.

Ao meu noivo Marcio, por estar sempre ao meu lado me incentivando, graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço.

A todos meus amigos, pelo apoio e momentos de alegria, em especial as minhas irmãs de coração, Bruna e Silmara, pelo apoio, companheirismo e sólida amizade que construímos, a qual tenho certeza que será para sempre.

As funcionárias Deva, Cristina e Ucha pelos ensinamentos e por toda a ajuda ao longo destes anos.

Aos meus amigos do laboratório: Aline Urban, Lucas, Stephany, Josie, Carol, Mayara, Ricardo, Tânia, Susan, Vagner, Laís, Mariane, Bruna pelo carinho e em especial, ao Luis Fernando, Fernanda e Aline Barnabé por terem me ajudado sempre.

Ao Dr. Kleber Yotsumoto Fertrin, Dra. Carolina Lanaro e em especial ao Dr. Erich Vinícius de Paula pelos ensinamentos recebidos no exame de qualificação.

A Dra. Nicola Conran por sua colaboração na padronização das técnicas e leitura final deste trabalho.

A Dra. Fernanda Orsi pela amizade, apoio e auxílio nas análises estatísticas.

Aos pacientes, pois sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da FAPESP, bolsa de mestrado (processo 2010/12352-0) e INCTs.

SUMÁRIO

1.1. Tromboembolismo Venoso	24
1.2. Risco de Recorrência no TEV.....	25
1.3. Inflamação e TEV	27
1.4. Leucócitos e TEV	28
1.5. Eritrócitos e TEV	32
1.6. Plaquetas e TEV	33
1.7. Ensaio de adesão estática usando fibronectina e fibrinogênio como ligante	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
4. CAUSUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1. Pacientes e controles	39
4.2. Coleta e isolamento de neutrófilos	40
4.3. Coleta e separação de eritrócitos.....	41
4.4. Coleta e separação de plaquetas.....	41
4.5. Ensaio de adesão estática de neutrófilos.....	42
4.6. Ensaio de adesão estática de eritrócitos.....	44
4.7. Ensaio de adesão estática de plaquetas.....	46
4.8. Citometria de fluxo	47
4.9. Dosagem de DD	48
4.10. Avaliação dos marcadores inflamatórios	48
4.11. Avaliação ultrassonográfica do trombo residual.....	49
4.12. Análises estatísticas.....	50
5. RESULTADOS	51
6. DISCUSSÃO GERAL	91
7. CONCLUSÃO.....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
9. ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Bovine serum albumin

CRP: C Reactive Protein

CAMs: Famílias de moléculas de adesão celular

DVT: Deep venous thrombosis

DD: D-dímero

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

EP: Embolia pulmonar

FB: Fibrinogênio ou Fibrinogen

FN: Fibronectina ou Fibronectin

FXa: Fator X da coagulação ativado

FVW: Fator de Von Willebrand

GP: Glicoproteínas plaquetárias

HTAB: Hexadecyltrimethylammonium bromide

HBSS: Hanks buffered saline solution

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

Inside-out: de dentro para fora

IL: Interleucinas

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

LFA-1: Leukocytes function associated antigen-1

MAC-1: Macophage antigen-1

MEC: Matriz extra celular

MPO: Mieloperoxidase

Outside-in: de fora para dentro

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Proteína C reativa

PE: Pulmonary embolism

RPMI: Meio de cultura usado para leucócitos Humanos, desenvolvidos pelo Instituto Roswell Park Memorial (RPMI)

RVO: Residual vein Obstruction

TB: Trombina ou Trombin

TCLE: Termo de consentimento livre esclarecido

TEV: Tromboembolismo venoso

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

TR: Trombo residual

TVP: Trombose venosa profunda

VTE: Venous thromboembolism

RESUMO

Tromboembolismo venoso (TEV) é uma doença multifatorial que afeta 1-3:1000 indivíduos mundialmente. A formação do trombo venoso na superfície endotelial é um processo multicelular, de estrutura laminar composta por camadas de plaquetas, leucócitos, eritrócitos e fibrina, originando uma resposta inflamatória loco-regional. A relação entre inflamação e coagulação é bidirecional, e tem sido principalmente avaliada através de interações de proteínas entre citocinas pró-inflamatórias e elementos da cascata de coagulação. As células inflamatórias tais como neutrófilos, não foram previamente correlacionadas com os processos trombóticos ou pró-coagulantes. Objetivo: Avaliar as propriedades adesivas de neutrófilos, eritrócitos e plaquetas, assim como a expressão das moléculas de adesão de superfície dos neutrófilos em pacientes com TEV, correlacionando-os com marcadores sistêmicos da resposta inflamatória, presença de trombo residual e D-dímero aumentado. Pacientes e Métodos: Foram incluídos neste estudo 10 pacientes com TEV agudo atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp (HC-UNICAMP), 30 pacientes com TEV crônico (1 a 6 anos após o evento agudo), atendidos no Hemocentro de Campinas-UNICAMP, e controles normais pareados aos pacientes por idade, gênero e etnia. A adesão de neutrófilos, eritrócitos e plaquetas foram determinados através de ensaio estático usando fibronectina (FN) e fibrinogênio (FB) como ligantes. A expressão das moléculas de adesão dos neutrófilos (CD11a, CD11b, CD18) foi avaliada por citometria de fluxo. Os níveis dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-8, TNF- α e PCR) foram avaliados por ELISA e nefelometria. O trombo residual (TR) por ultrassom com Doppler e o Dímero-D (DD) por método coagulométrico. Resultados: A adesão de plaquetas ao fibrinogênio com e sem estímulo de trombina em pacientes dos grupos agudo e crônico foi semelhante ao observado nos controles normais. Da mesma forma, não houve diferença da adesão de eritrócitos à fibronectina nesses mesmos grupos analisados. No subgrupo de pacientes com alto risco de recorrência de TEV definido pela presença de altos níveis de D-dímero ($>0,55\text{mg/L}$) e trombo residual observou-se um aumento significativo da adesão de neutrófilos em relação aos controles (24.68% vs 19.07%, $P<0.05$). A atividade inflamatória

também estava aumentada neste subgrupo em comparação aos outros pacientes, demonstrada pelo aumento significativo dos níveis séricos de IL-6, IL-8, TNF- α e PCR (2.08pg/mL VS 0.90pg/mL, $P=0.01$; 28.72pg/mL vs 16.46pg/mL, $P=0.02$; 4.50pg/mL vs 2.11pg/mL, $P=0.04$; 0.35 pg/mL vs 0.14 pg/mL, $P=0.09$, respectivamente). Houve uma correlação das propriedades adesivas de neutrófilos com IL-6 ($r=0.3815$ e $P=0.0375$), e D-dímero ($r=0.3831$ e $P=0.0367$). A quantificação das proteínas de superfície (CD11a, CD11b e CD18) de neutrófilos não foi diferente entre os grupos analisados. Conclusão: Nossos resultados sugerem que pacientes com TEV não apresentam aumento das propriedades adesivas de plaquetas e eritrócitos. Entretanto, as propriedades adesivas dos neutrófilos foram aumentadas em pacientes com D-dímero aumentado e presença de trombo residual, independente da expressão quantitativa das proteínas de superfície em sua membrana. A hipótese para este aumento pode ser devido as alterações na afinidade das moléculas de adesão de superfície aos seus ligantes, como consequência do processo inflamatório associado com a hipercoagulabilidade que é característica desta doença.

ABSTRACT

Venous Thromboembolism (VTE) is a multifactorial disease that affects 1-3:1000 individuals worldwide. The venous thrombus develops via a multicellular process on the surface of the endothelium and presents a laminar structure comprised of layers of platelets, leukocytes, erythrocytes and fibrin. The relationship between inflammation and coagulation is bidirectional, and has been mainly evaluated through protein interactions between pro-inflammatory cytokines and elements of the coagulation cascade. Inflammatory cells such as neutrophils, have not been previously correlated with thrombotic or procoagulant processes. Objective: To evaluate the adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets, as well as the expression of neutrophil adhesion molecules in patients with VTE, correlating them with markers of the systemic inflammatory response, and with the presence of residual vein obstruction (RVO) and higher D-dimer (DD). Patients and Methods: Study group consisted of 30 chronic VTE patients (1-6 years after the acute episode) followed in our outpatient clinic, and 10 patients with VTE during the acute episode treated at the Hospital of Clinics (HC-UNICAMP) Campinas, as well as age, gender and ethnic background-matched healthy. Adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets were determined by a static adhesion assay using ligands such as fibrinogen (FB) and fibronectin (FN). The expression of neutrophils adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD18) was evaluated by flow cytometry. Levels of inflammatory markers (IL-6, IL-8, TNF- α , PCR) were evaluated by ELISA and nephelometry. RVO was evaluated by Doppler ultrasound and DD by coagulometric method. Results: No significant difference could be observed in the platelets adhesion (basal: 16.37% vs. 14.59%, $p=0.309$; and stimulated with thrombin: 33.45% vs. 26.62%, $p=0.200$) and erythrocytes adhesion (7.28% vs 7.49%, $p=0.859$) between chronic VTE patients and healthy individuals. Similarly, no statistical differences were observed in the platelets adhesion (basal: 28.36% vs. 21.63%, $p=0.109$; and stimulated with thrombin: 38.45% vs. 30.15%, $p=0.715$) and erythrocytes adhesion (6.00% vs 4.62%, $p=0.326$) in the VTE acute

patients when compared to their respective controls. Interestingly, in patients with a higher risk of recurrent VTE (defined by the presence of high levels of DD and RVO), a significant increase in neutrophils adhesion was observed when compared to healthy individuals (24.68% vs. 19.07%, $p < 0.05$). Inflammatory markers (IL-6, IL-8, TNF- α and CRP) were significantly elevated (2.08pg/mL vs 0.90pg/mL, $p=0.01$; 28.72pg/mL vs 16.46pg/mL, $p=0.02$; 4.50pg/mL vs 2.11pg/mL, $p=0.04$; 0.35 pg/mL vs 0.14 pg/mL, $p=0.09$, respectively) in this subgroup of patients when compared to the other patients. Adhesive properties of neutrophils were correlated with IL-6 ($r= 0.3815$ and $p= 0.0375$) and D-dimer levels ($r= 0.3831$ and $p= 0.0367$). Neutrophils adhesion molecules (CD11a, CD11b and CD18) were not altered in any of the groups. Conclusion: Our results suggest that VTE patients do not exhibit increased adhesive properties of platelets and erythrocytes. Neutrophils adhesive properties were increased in patients with higher D-dimer levels and RVO, independently of the expression of neutrophil adhesion molecules. A hypothesis for this increase is alterations in affinity of surface adhesion molecules to their ligands, as a response to inflammatory processes associated with the hypercoagulability demonstrated in this subgroup of patients.

1. ANTECEDENTES NA LITERATURA

1.1. Tromboembolismo Venoso

O tromboembolismo venoso (TEV) é caracterizado por duas manifestações clínicas: a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP). O TEV é uma doença de alta prevalência, com incidência geral em torno de 1 caso para cada 1000 indivíduos ao ano, sendo um importante problema de Saúde Pública (Hansson *et al.*, 1997; Silverstein *et al.*, 1998; Lippi *et al.*, 2010; Von Bruhl *et al.*, 2012). No Brasil a incidência do TEV é semelhante à mundial, de 0,6 a 1 caso por 1000 indivíduos ao ano (Maffei, 1995). O TEV afeta mais de um milhão de pessoas na Europa Ocidental e cerca de 900.000 indivíduos nos EUA anualmente, e 670.000 mortes são causadas por EP todos os anos, nos EUA e Europa Ocidental (Heit *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2007).

Pelo elevado número de indivíduos acometidos, incluindo pacientes jovens sem doenças prévias, e também os idosos, o TEV é um problema sócio-econômico que acarreta grande ônus, tanto pelas internações quanto pelo absenteísmo em pacientes em idade produtiva (Orra, 2002).

O TEV é uma doença resultante da exacerbação da resposta hemostática normal no sistema vascular venoso, onde os principais fatores envolvidos são a hipercoagulabilidade, estase venosa e dano na parede vascular (López *et al.*, 2004). Etiologicamente é uma doença multifatorial em que fatores genéticos e adquiridos interagem dinamicamente provocando inicialmente a ativação e propagação inapropriada dos mecanismos de coagulação e, posteriormente a formação de trombos patológicos na circulação (Rosendaal, 1999a; White *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2008; Ho, 2010).

Dentre os fatores de risco adquiridos conhecidos, os mais importantes são: imobilização, viagens aéreas com duração superior a 6 horas, viagens rodoviárias longas, cirurgias, obesidade, gravidez, puerpério, câncer, anticoncepção ou reposição hormonal, trauma e presença de anticorpos antifosfolipídios (Albuquerque e Vidal, 1996; Rosendaal, 1999a; Robetorye e Rodgers, 2001; Heit *et al.*, 2005).

Os fatores de risco genéticos, que caracterizam a trombofilia hereditária, compreendem a deficiência de anticoagulantes naturais, como a proteína C, proteína S e a antitrombina, ou as mutações que levam a ganhos de função, como a mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden) e mutação G20210A no gene da protrombina (Rosendaal, 1999b; Robetorye e Rodgers, 2001).

Em 25% dos casos não se identifica à causa etiológica, caracterizando TEV idiopático ou espontâneo (Heit *et al.*, 2002).

1.2. Risco de Recorrência no TEV

O TEV é uma doença com freqüente recorrência, chegando a 20-25% em um período de 5 anos após o primeiro evento, sendo ainda mais elevado em pacientes com TEV espontâneo (Hansson *et al.*, 2000; Prandoni *et al.*, 2007; Eischer *et al.*, 2009). Uma recente revisão sistemática sugeriu que a taxa de letalidade do TEV recorrente é de 3.6% (Carrier *et al.*, 2010).

O risco de recorrência é dependente, principalmente, da presença de fatores de riscos adquiridos e pode variar substancialmente entre os pacientes. Os fatores de risco para a ocorrência do primeiro episódio de TEV são, na sua

maioria, distintos dos fatores de risco para a recidiva; visto que as trombofilias hereditárias não influenciam na recidiva da doença (Rosencher *et al.*, 2011).

Nas trombofilias adquiridas em que o fator de risco pode ser persistente, como síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAF), neoplasias, síndrome nefrótica, bem como nas trombooses de repetição, devido ao elevado risco de retrombose, indica-se a manutenção da anticoagulação enquanto o fator de risco estiver presente após o primeiro evento trombótico (Rosencher *et al.*, 2011).

Nos pacientes com TEV espontâneo, a quantificação do D-dímero (DD) após o término da anticoagulação e o estudo ultrassonográfico do membro, para a avaliação da presença de trombo residual (TR), têm sido empregados como preditores de recidiva, contribuindo para a decisão de manter ou não a anticoagulação após o evento agudo (Cosmi *et al.*, 2005; Siragusa *et al.*, 2008).

O DD é um marcador de hipercoagulabilidade, e está elevado quando a fibrina formada em excesso é degradada (Adam *et al.*, 2009). Estudos têm demonstrado que pacientes com DD normal têm um risco de recidiva 60% menor, quando comparado com pacientes com DD aumentado (3,55% vs 8,9% risco anual) (Vershovsek *et al.*, 2008). Em uma meta-análise onde caracterizaram *scores* de risco de recorrência, o DD recebeu o maior *score* (+2) quando comparado a outros fatores de risco, como idade ≤ 50 anos (+1) e gênero masculino (+1) (Tossetto *et al.*, 2012).

Há a hipótese de que a presença de TR em uma veia profunda após um episódio de TVP poderia prever recorrência; no entanto os resultados dos diversos estudos não são unânimes nessa conclusão, o que pode ser decorrente de diferentes métodos de execução do exame e de definição de um TR (Cosmi *et al.*,

2005; Siragusa *et al.*, 2008; Prandoni *et al.*, 2009; Cosmi *et al.*, 2010; Carrier *et al.*, 2011).

1.3. Inflamação e TEV

Durante a década passada, o papel da inflamação na fisiopatologia das trombooses arteriais foi extensivamente estudado. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado uma relação entre inflamação e TEV, contudo, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente definidos (Poredos e Jezovnik, 2007).

A literatura tem demonstrado que a formação do trombo é um processo multicelular e desenvolve-se na superfície do endotélio, apresentando uma estrutura laminar composta por camadas de plaquetas, leucócitos, eritrócitos e fibrina (Wakefield *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2006; Wakefield *et al.*, 2008; Manfredi e Rovere-Querini, 2010; Saha *et al.*, 2011; Von Bruhl *et al.*, 2012).

A interação do trombo com a parede venosa origina uma resposta inflamatória intensa loco-regional mediada por neutrófilos e monócitos, e presença de citocinas (Orra, 2002)

A inflamação é capaz de interferir em diversas etapas da hemostasia, seja através da ativação da coagulação, do aumento da atividade plaquetária ou da inibição dos anticoagulantes naturais e da fibrinólise, resultando em um desequilíbrio a favor da geração de trombina, fibrina e trombose. Além disso, a trombina também participa desse processo como um mediador pró-inflamatório (Esmon, 2003; Esmon, 2004).

A relação entre inflamação e coagulação é bidirecional, visto que proteases da coagulação como trombina e fator Xa, ao se ligarem a receptores ativáveis por proteases (PARs) presentes em células endoteliais e mononucleares, são capazes de estimular a produção de várias citocinas (Levi *et al.*, 2004; Levi e Van der Poll, 2010).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas que agem em células alvo através da ligação com receptores específicos, iniciando complexa sinalização intracelular durante a resposta imune, e também são elementos fundamentais na composição da interface entre resposta inflamatória e hemostasia (Bidwell *et al.*, 1999).

A relação entre trombose e inflamação tem sido demonstrada por vários estudos em modelos animais (Wakefield *et al.*, 1995; Downing *et al.*, 1997; Humphries *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2002; Thanaporn *et al.*, 2003) e em estudos clínicos, em que se observou um aumento dos níveis de citocinas nos pacientes, mesmo após o episódio agudo de TEV (mínimo de 6 meses) (Van Aken *et al.*, 2000; Reitsma e Rosendaal, 2004).

1.4. Leucócitos e TEV

Um evento chave durante o processo inflamatório é o recrutamento de leucócitos nos locais de inflamação, que freqüentemente é iniciado pela adesão destas células ao endotélio (Burns *et al.*, 2001). A infiltração dessas células em áreas de inflamação e a adesão ao endotélio são mediadas por interações de várias famílias de moléculas de adesão celular (CAMs), incluindo as selectinas, integrinas e seus ligantes (Saha *et al.*, 2011).

Os neutrófilos usam selectinas para interagir com o endotélio inflamado e, subsequentemente ligam-se a sítios específicos na vasculatura através da integrina β_2 expressa em sua membrana (Lawrence e Springer, 1991; Konstantopoulos e McIntire, 1997; Caimi *et al.*, 2005).

As integrinas são receptores de adesão celular com muitas funções biológicas, incluindo proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento de tecido. Todas as integrinas apresentam uma cadeia α e uma cadeia β , cada subunidade contendo um grande domínio extracelular e um curto domínio citoplasmático (Kinashi, 2005; Humphries *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007; Hu e Luo, 2012).

Integrinas são mais que moléculas de adesão, pois podem transmitir sinais bidirecionais através da membrana plasmática. Na superfície celular, normalmente são encontradas em um estado de baixa afinidade, e podem ser ativadas através de vias de sinalização "*inside-out*" ou "*outside-in*". A via de sinalização "*inside-out*" é responsável por mudanças conformacionais na integrina levando a um estado de alta afinidade para os ligantes, enquanto que a via de sinalização "*outside-in*" exerce uma significativa influência na mobilidade, proliferação e diferenciação celular (Ginsberg *et al.*, 2005; Schurpf e Springer, 2011; Hu e Luo, 2012).

As integrinas β_2 são compostas por uma cadeia β comum (CD18) e quatro cadeias α diferentes (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d). Os complexos CD11a/CD18 e CD11b/CD18 são respectivamente identificados como moléculas de adesão LFA-1 (leukocytes function associated antigen-1) e MAC-1 (macrophage antigen-1) e estão envolvidos especialmente na adesão de neutrófilos a células endoteliais (Smith *et al.*, 1989; Caimi *et al.*, 2005; Saha *et al.*,

2011). Estudos em modelos animais têm mostrado que o CD11a e CD11b contribuem significativamente para uma firme adesão do neutrófilo ao endotélio (Kurose *et al.*, 1994; Issekutz e Issekutz, 1992).

A expressão fenotípica das integrinas β_2 aumenta depois da ativação celular, estimulada pela trombina e produção local de citocinas pro-inflamatórias durante a trombogênese (Caimi *et al.*, 2005).

O LFA-1 é importante na ligação e ativação linfocitária através da interação com seu principal ligante endotelial, a molécula ICAM-1 (superfamília das imunoglobulinas), permitindo que os leucócitos atravessem a camada endotelial e induzindo a ligação leucócito-endotélio. Com relação ao MAC-1, é responsável por mediar a interação entre células polimorfonucleares e células endoteliais através de ligações com a molécula ICAM-1, fibronectina (FN) e outros ligantes (Caimi *et al.*, 2005).

Dados estruturais e biofísicos recentes mostraram que as moléculas LFA-1 e MAC-1 existem em pelo menos 3 estados conformacionais, os quais diferem em extensão total sobre a membrana plasmática e na disposição do "*headpiece*", constituindo o estado de baixa afinidade, afinidade intermediária e alta afinidade (figura 1) (Montresor *et al.*, 2012):

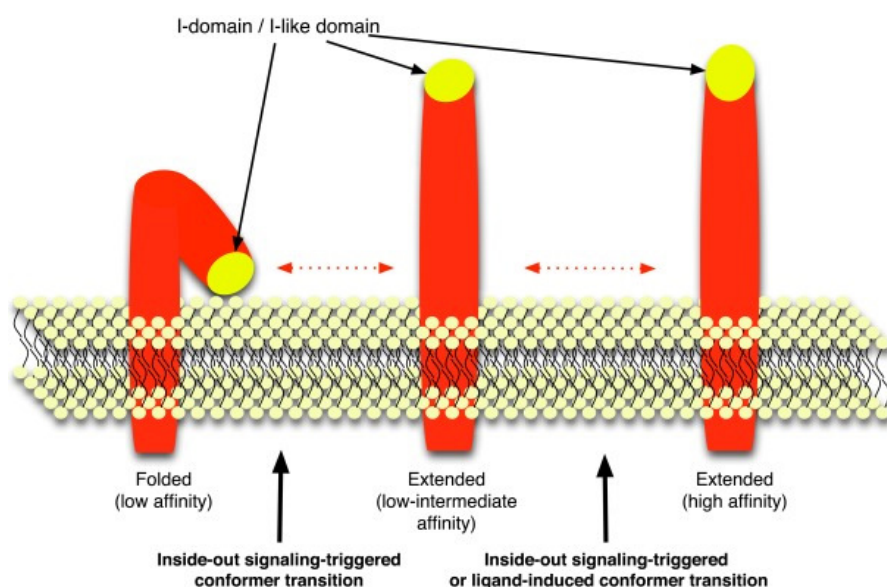


Figura 1. Adaptado de Montresor *et al.*, 2012. O diagrama refere-se ao modelo do desencadeamento da afinidade do LFA-1. Está mostrando o equilíbrio dinâmico entre três estados conformacionais, baixa afinidade, afinidade intermediária e alta afinidade para a molécula de adesão LFA-1. A extensão progressiva do heterodímero (em vermelho) é acompanhada pelo aumento da disponibilidade topológica do domínio-I (em amarelo), os quais estão envolvidos na ligação com o ligante com uma afinidade cada vez maior.

Estas moléculas de adesão são marcadores relevantes da inflamação, e têm sido muito estudadas na anemia falciforme - doença caracterizada por um estado inflamatório crônico - cujos leucócitos possuem um papel importante no processo de vaso-oclusão (Conran *et al.*, 2009). Em ensaios *in vitro* de adesão estática e dinâmica, observou-se que os neutrófilos de pacientes com anemia falciforme apresentam uma adesão aumentada a FN e às células endoteliais ativadas com TNF- α (Assis *et al.*, 2005; canalli *et al.*, 2008; Finnegan *et al.*, 2007). Essas moléculas também foram estudadas em doenças vasculares cerebrais e insuficiência venosa crônica (Baran *et al.*, 2001; Stvrnova *et al.*, 2001; Faxon *et al.*, 2002; Krams *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2012).

Um estudo recente utilizando o método de análise de indução de trombose venosa por microscopia intra-vital em modelo animal, induzida por restrição de fluxo sanguíneo, demonstrou que o principal constituinte celular presente no trombo venoso foram os leucócitos. Os neutrófilos, expressando mieloperoxidase, constituíram 70% de todos os leucócitos. Também se observou que a parede venosa apresentava um fenótipo pró-inflamatório, constituído por células endoteliais ativadas expondo moléculas de adesão em sua superfície (Von Bruhl *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que os leucócitos polimorfonucleares estão presentes nas fases de remodelamento da parede vascular e de resolução do trombo, porém a contribuição destas células para a indução e desenvolvimento da trombose ainda não foi elucidada (Caim *et al.*, 2005; Roumen-Klappe *et al.*, 2009; Von Bruhl *et al.*, 2012).

1.5. Eritrócitos e TEV

A adesão de eritrócitos à parede venosa é de considerável significância em patologias envolvendo eventos vaso-oclusivos, tais como a anemia falciforme. Muitos estudos têm investigado a interação dos eritrócitos ao endotélio e demonstrou-se que, na anemia falciforme, essa adesão é modulada por proteínas plasmáticas. (Kasschau *et al.*, 1996; Gambero *et al.*, 2007).

As proteínas plasmáticas implicadas em promover a adesão dos eritrócitos às células endoteliais incluem a FN, o fibrinogênio (FB), os multímeros de alto peso molecular do fator de Von Willebrand (FVW), e trombospondina. Em pelo menos alguns casos, proteínas plasmáticas poderiam servir como pontes

moleculares entre integrinas ou moléculas com integrinas, tais como receptores da FN, nas células falciformes e/ou células endoteliais (Kasschau *et al.*, 1996).

Os eritrócitos normais são relativamente não aderentes e, possivelmente são aprisionados na malha de fibrina durante o processo de coagulação (Saha *et al.*, 2011). Contudo, sob baixas condições de fluxo demonstrou-se que os eritrócitos normais aderem a neutrófilos ativados, plaquetas ativadas e fibrina polimerizada do plasma (Goel e Diamond, 2002). Entretanto, apesar da abundância destas células no início da formação do trombo, sua contribuição para o TEV, bem como para a adesão ao endotélio permanecem pouco compreendidas (Saha *et al.*, 2011).

1.6. Plaquetas e TEV

A ativação plaquetária é um processo fisiológico fundamental para a formação do tampão hemostático primário (Kulkarni *et al.*, 2000). Em condições normais, as plaquetas não aderem à superfície do endotélio nem formam agregados. Quando ocorre uma desestabilização da integridade do fluxo sanguíneo, as moléculas de adesão plaquetárias (integrinas e selectinas) são ativadas e promovem a adesão às células endoteliais (Levi, 2005).

O mecanismo de adesão das plaquetas envolve o sequestro celular no local da lesão endotelial através da interação de quatro receptores: a glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b/CD42a); a integrina $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa; CD49b/CD29), ligante para o colágeno; a integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa; CD41a/CD61), ligante para o FB e, a integrina $\alpha 5\beta 1$ (GPIC/IIIa; CD51/CD61), ligante para a FN (Ruggeri, 2002).

A interação entre a GPIb e o FVW, secretado pelas células endoteliais, pode levar ao sequestro transitório de plaquetas e adesão ao endotélio. Essa interação é amplificada pela ativação dos receptores da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ das plaquetas e a ligação com o colágeno e estruturas subendoteliais, resultando na formação de um agregado plaquetário estável, e ligações irreversíveis com o FB, encontrado no plasma e matrix extracelular (MEC), e FVW (Kulkarni *et al.*, 2000; Eriksson e Whiss, 2005).

A adesão desencadeia a ativação plaquetária, com o recrutamento de mais plaquetas no local da lesão vascular. Enquanto vários receptores e ligantes participam do processo de adesão plaquetária, há somente um receptor para a agregação, a GPIIb/IIIa. O FVW e, principalmente, o FB promovem a agregação plaquetária, formando pontes entre as plaquetas (Li *et al.*, 1996).

A ativação plaquetária é modulada por agonistas que, ao se ligarem a seus receptores, desencadeiam a degranulação plaquetária e a síntese de novos agonistas, amplificando o fenômeno de ativação. Os principais agonistas fisiológicos da ativação plaquetária são representados pelo colágeno, ADP, tromboxano A_2 , trombina, epinefrina, serotonina, vasopressina e o fator de ativação plaquetária. A trombina é um dos principais agonistas da ativação plaquetária, e da geração de fibrina, consolidando o trombo plaquetário (Michelson e Barnard, 1987).

As plaquetas são os principais componentes do tampão hemostático formado para impedir o sangramento após a injúria da parede vascular. Sua adesão ao sítio danificado e o recrutamento de novas plaquetas é um estágio crítico na formação do tampão hemostático assim como no trombo patológico.

(Tokarev *et al.*, 2011). A ativação e agregação plaquetária são processos centrais no TEV e hemostasia (Li *et al.*, 1996; Denis e Wagner, 2007).

Entretanto são poucos os métodos que possibilitam a avaliação da ação das superfícies adesivas e compostos solúveis sobre a adesão plaquetária *in vitro* (Eriksson e Whiss, 2005).

1.7. Ensaio de adesão estática usando fibronectina e fibrinogênio como ligante

O ensaio de adesão estática é um ensaio *in vitro* sensível e versátil, conhecido por mimetizar condições de baixo cisalhamento ou interrupção do fluxo sanguíneo, os quais podem ocorrer em eventos vasos oclusivos. Diversas são as suas utilidades, entre elas: avaliar como um tipo de célula adere a um ligante ou às células endoteliais; identificar quais moléculas de adesão intermediam essa adesão; e as vias de sinalização que estão envolvidas nesta adesão. As células mais comumente investigadas por esta técnica são: leucócitos, hemácias e plaquetas. Os ensaios de adesão estática são realizados mediante a utilização de ligantes que incluem principalmente a FN, FB, colágeno e ICAM-1 recombinante. (Bellavite *et al.*, 1994; kasschau *et al.*, 1996; Canalli *et al.*, 2008; Proença-Ferreira *et al.*, 2010).

A FN é uma proteína adesiva multifuncional, cuja principal função consiste em fixar as células a uma variedade de matrizes. Trata-se de uma glicoproteína (cerca de 450kDa), que consiste em duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto. A FN, que está associada às superfícies celulares, às membranas e às matrizes pericelulares, é produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e outras

células. A FN liga-se a diversos componentes da matriz extracelular (incluindo colágeno, fibrina e proteoglicanas) através de domínios específicos. A FN é considerada a maior glicoproteína mesenquimal da matriz extracelular envolvida na adesão célula-matriz (Kasschau *et al.*, 1996; Wojciak-stothard *et al.*, 1997).

O FB é uma proteína abundante no plasma que desempenha papel fundamental na hemostasia. Está envolvido nas etapas finais da coagulação como precursor de monômeros de fibrina pela ação da trombina, que é a enzima ativa. O FB é o principal ligante da glicoproteína plaquetária IIb/IIIa, mediadora da via final de agregação. Por meio de receptores semelhantes aos das glicoproteínas IIb/IIIa, interage com o endotélio e interfere na adesão, motilidade e organização do citoesqueleto. Uma vez formada a fibrina, estimula a adesão, a dispersão e a proliferação de células endoteliais (Zago e Falcão 2001; Tabuchi e Wolfgang, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A definição dos processos relacionados à fisiopatologia do TEV pode contribuir de forma expressiva na prática médica, auxiliando na escolha de tratamentos mais adequados e inovadores. O TEV é uma doença com importante impacto na saúde pública mundial, em função de sua incidência, mortalidade e complicações, como recorrência e síndrome pós-trombótica. Além disso, o fato do TEV afetar desde os pacientes mais jovens, sem doenças prévias, até os mais idosos, faz com que se constitua em um problema sócio-econômico com grande ônus.

Vários são os fatores de risco que contribuem para a ocorrência e recorrência do TEV, mas ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim, estudos pilotos que visam um melhor entendimento de sua fisiopatologia são importantes na identificação de novos fatores, para investigação futura em estudos populacionais.

Os estudos demonstraram a presença de neutrófilos, plaquetas e eritrócitos no trombo venoso; portanto, a avaliação das propriedades adesivas e funcionais dessas células em pacientes com TEV, torna-se uma proposta interessante, que pode contribuir para uma melhor compreensão da participação das mesmas no processo trombótico.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar as propriedades adesivas de neutrófilos, eritrócitos e plaquetas de pacientes com TEV agudo e crônico.

Para isto, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- 3.1 Avaliar a capacidade adesiva de neutrófilos e eritrócitos de pacientes com TEV e controles, por ensaio de adesão estática usando FN como ligante;
- 3.2 Avaliar a capacidade adesiva de plaquetas de pacientes com TEV e controles, por ensaio de adesão estática usando FB como ligante;
- 3.3 Quantificar a expressão das moléculas de adesão LFA-1 e Mac-1 na superfície de neutrófilos em pacientes com TEV crônico, através da citometria de fluxo;
- 3.4 Correlacionar os achados sobre as propriedades adesivas de eritrócitos, neutrófilos e plaquetas com marcadores sistêmicos da resposta inflamatória (IL-6, IL-8, TNF- α e PCR), presença de TR ao ultrassom com Doppler e quantificação do DD.

4. CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Pacientes e controles

A casuística foi constituída por dois grupos de pacientes com TVP denominados neste estudo como: agudo (ao diagnóstico) e crônico (1 a 6 anos após o episódio agudo).

O critério de inclusão foi o diagnóstico de TVP de membro inferior comprovado por ultrassom com Doppler, com ou sem embolia de pulmão, comprovada por cintilografia ou tomografia pulmonar. No grupo crônico também foi critério de inclusão o antecedente de TEV, de 1 a 6 anos após o evento agudo.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: idade inferior a 18 anos ou superior a 70 anos na época da trombose, trombose em sítio incomum, presença de neoplasia, doenças inflamatórias, hepatopatia ou nefropatia grave, doenças auto-imunes, síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAF) e gestação. Os pacientes não estavam em uso de medicação antiagregante e anticoagulante, exceto os do grupo agudo, que utilizaram a primeira dose de enoxaparina, de 1mg/Kg de peso, 12 horas antes da coleta.

Através dos critérios de inclusão e exclusão, no período de agosto de 2010 a março de 2012, foram incluídos 30 pacientes no grupo TEV crônico atendidos no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas/UNICAMP.

No período de agosto de 2010 a abril de 2012, foram incluídos 10 pacientes com TEV agudo, acompanhados no Hospital de Clínicas da UNICAMP ou Hospital Municipal Dr Mário Gatti.

Os indivíduos controles saudáveis, foram pareados em gênero, idade e etnia com os pacientes. Os controles foram convidados a participar do estudo pelo pesquisador, através de contato telefônico, e eram oriundos da mesma região geográfica dos pacientes. Os controles responderam a um questionário, apresentado no anexo 3. Os critérios de exclusão dos controles foram os mesmos utilizados para os pacientes.

4.2. Coleta e isolamento de neutrófilos

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos de heparina (9 mL) e em seguida 6 ml foram transferidos para um tubo falcon de 15mL, contendo 3 mL de Ficoll-Hypaque de densidade de 1.119 g/L e 3 mL de Ficoll-Hypaque de densidade 1.077 g/L. Após a separação das células mononucleares e granulócitos por centrifugação a 700 g por 30 minutos, a camada de granulócitos foi lavada em PBS (1X), pH 7,4. As hemácias contaminantes foram lisadas com tampão de lise (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 15 minutos 4°C) e as células lavadas novamente em PBS (1X).

Após a separação, os neutrófilos foram mantidos a 4°C e foi analisada a pureza de cada amostra. Os neutrófilos foram colocados em lâmina hematológica e centrifugados em uma citospin (Shandon Cytospin 4, Thermo). Em seguida, realizou-se a contagem dos neutrófilos ($\geq 92\%$ das células leucocitárias). Para a avaliação da viabilidade celular ($\geq 92\%$), foi realizada a contagem de neutrófilos em uma câmara de Neubauer com corante azul de tripan (contagem de células viáveis).

Para a adesão estática de neutrófilos, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (pH 7,2) em uma concentração de 2×10^6 células/mL. Para análise da expressão das moléculas de adesão os neutrófilos foram ressuspensos em PBS em uma concentração de 1×10^6 cel/mL.

4.3. Coleta e separação de eritrócitos

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio e centrifugadas por 10 minutos a 500 g para remoção do plasma e *buffy coat*. As células foram lavadas 3 vezes, sendo ressuspensas em PBS e centrifugadas a 700 g, 600 g e 480 g, respectivamente, sendo finalmente ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem de células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700 (ABBOT, IL, USA). A concentração final foi ajustada para 2×10^8 cel/mL.

4.4. Coleta e separação de plaquetas

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de plástico contendo Ácido Citrato Dextrose (ACD-A) e em seguida centrifugadas por 15 minutos a 200 g a 22°C. Ao plasma rico em plaquetas (PRP) foi adicionado um tampão de lavagem (140 mM NaCl / 0.5 mM KCl / 12 mM citrato de sódio / 10 mM glicose / 12.5 mM sacarose, pH 6) e centrifugado por 12 minutos a 800 g a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de plaquetas ressuspenso, cuidadosamente, em 500 µL de solução de Krebs (118 mM NaCl / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 1.7 mM MgSO₄ / 5.6 mM glicose, pH 7.4, ajustado com carbogênio). O número de plaquetas foi ajustado para 1.2×10^8 plaquetas/mL na presença de 1 mM CaCl₂.

4.5. Ensaio de adesão estática de neutrófilos

Os ensaios de adesão estática foram realizados em placas (Cellstar, 655180, greiner bio-one) de 96 poços, recobertas com 60 μ L do ligante FN (20 μ g/mL de FN em PBS) e incubadas por 1 hora a 37°C. Os poços da placa foram lavados 3 vezes com PBS antes de bloquear os sítios inespecíficos com PBS/BSA 0.5% (Albumin, from bovine serum, A9647-500 G, Sigma-Aldrich) por 60 minutos à 37°C. Depois de lavar a placa 3 vezes com PBS e secá-la, os neutrófilos foram adicionados em um volume de 50 μ L em RPMI 1640 (2×10^6 células/mL) e incubados durante 30 minutos (37°C, 5% CO₂) para permitir a adesão (tempo ideal para adesão celular à FN). Após incubação, as células não aderidas foram removidas através de 3 lavagens com PBS. Por fim, foi colocado um volume de 50 μ L de meio de cultura RPMI nos poços onde foi realizado o ensaio de adesão. Para mensurar a porcentagem dos neutrófilos que aderiram à FN, foi realizada uma curva padrão. Para construir a curva, foram adicionadas concentrações que variaram de 0-100% da suspensão original de células (2×10^6 células/mL) em 50 μ L de RPMI. As placas foram congeladas por pelo menos 12 horas antes de medir o conteúdo de mieloperoxidase (MPO) encontrado tanto nas células da curva padrão como nas células aderidas do ensaio (Bradley *et al.*, 1982) (Fig 2A). Em seguida, as placas foram descongeladas e a MPO foi extraída das células aderidas e das células da curva padrão, com hexadeciltrimetil amônio bromida (HTAB – 0.5%). Foram transferidos 20 μ L de HTAB e MPO de cada poço para uma nova placa e adicionou-se 200 μ L de solução de o-dianisidina (o-dianisidina di-hidrocloreto 0,167 mg/mL, peroxidase de hidrogênio 0,0005% em tampão

fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0). A absorbância foi medida, após 5 minutos, a 490 nm usando um espectrofotômetro (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação das absorbâncias das amostras desconhecidas com às da curva padrão (Fig 2B).

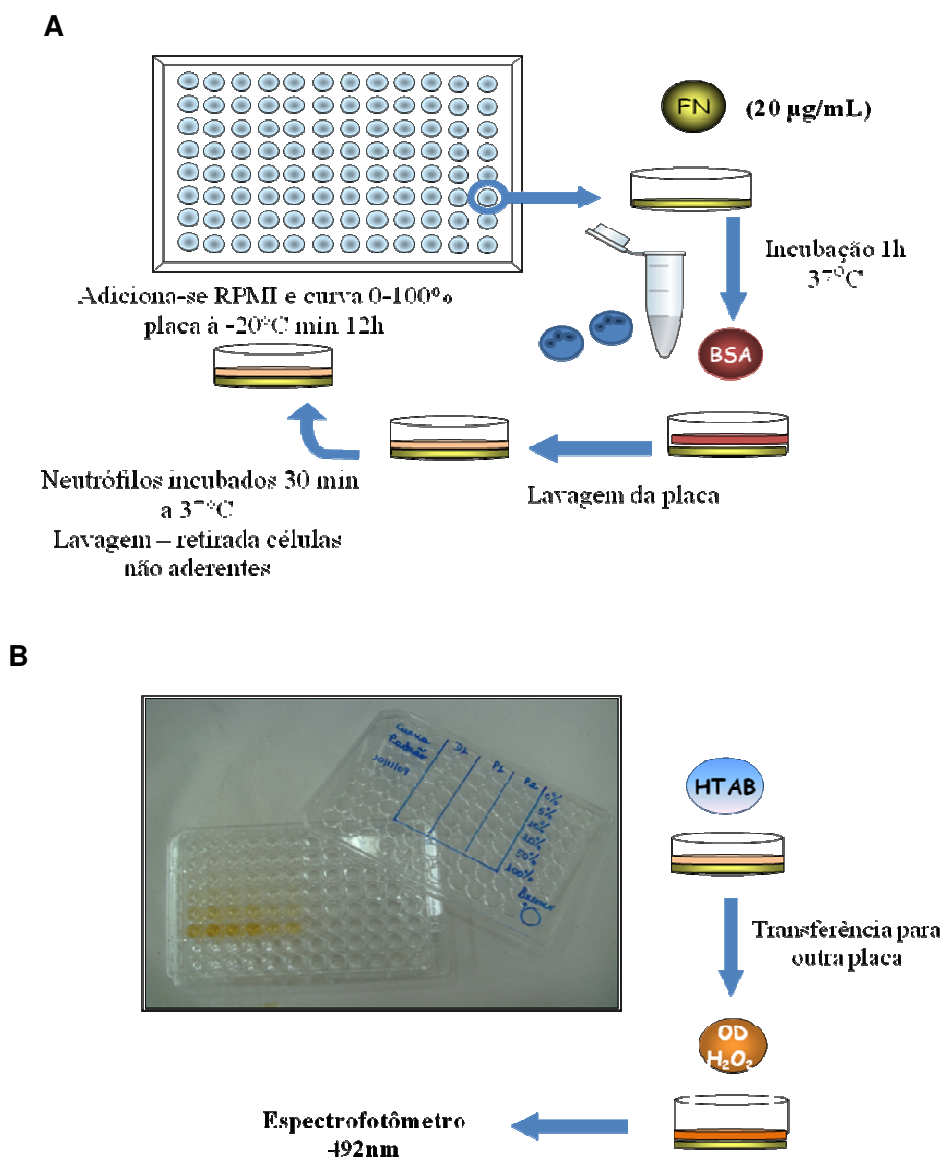


Figura 2. A) Preparação da placa e adição dos neutrófilos. B) Extração da MPO e revelação da placa

4.6. Ensaio de adesão estática de eritrócitos

Placas (Costar 3590) com 96 poços de fundo plano foram recobertos com 60 µL de FN (20 µg/mL de FN em PBS; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) e incubados por 60 minutos a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Os sítios inespecíficos bloqueados com PBS/BSA a 1% (Albumin, from bovine serum, A9647-500G, Sigma-Aldrich) por 60 minutos a 37°C. Os poços foram novamente lavados (3x) com PBS e o excesso foi retirado. Para cada amostra (paciente e controle) adicionou-se em triplicata, 50 µL da solução celular contendo 2×10^8 cel/mL em HBSS (HBSS; GIBCO BRL, Life Technologies) e incubados por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, os poços foram lavados gentilmente por três vezes com PBS e adicionou-se 50 µL de meio HBSS em cada poço para evitar que as células aderidas se desidratassem. Para mensurar a quantidade de células vermelhas que aderiram à FN, realizou-se uma curva padrão com concentrações decrescentes da suspensão inicial de células (0 - 2×10^8 cel/ml), onde a concentração de 0% foi preparada apenas com meio HBSS e a concentração de 100% foi preparada a partir da solução original de células (2×10^8 cel/ml). Em seguida, foi adicionado 50 µL da solução de revelação DRABKIN 1% (Solução estoque 10 mM KH₂PO₄, 6 mM K₃[Fe(CN)₆], 7.7 mM KCN qsp 100 mL) e a placa incubada por 10 minutos a 37°C. A solução de revelação utilizada é um reagente muito utilizado na rotina hematológica, contendo cianeto e ferrocianeto de potássio. Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. Após isso ocorre a oxidação da hemoglobina e metahemoglobina em cianometahemoglobina. A intensidade de cor

desse composto se mede colorimetricamente em leitor de ELISA a 540 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresenta concentrações celulares conhecidas (Fig 3).

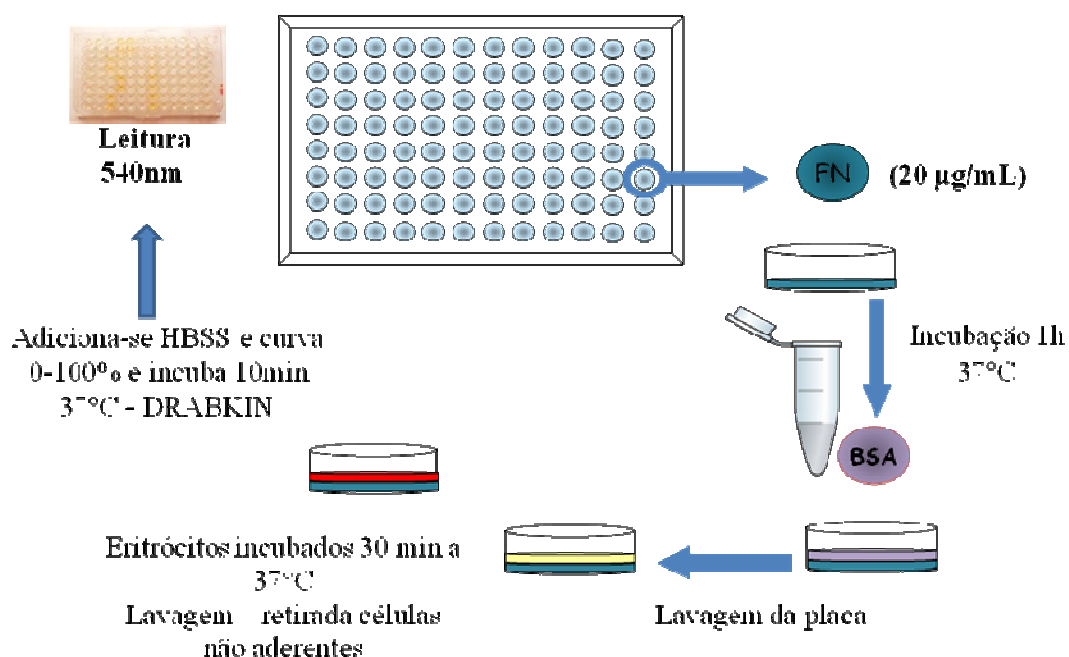


Figura 3. Preparação da placa, adição dos eritrócitos e revelação da placa

4.7. Ensaio de adesão estática de plaquetas

O ensaio de adesão foi realizado de acordo com Bellavite, et al. (1994). Foram preparadas placas (Costar 3590) de 96 wells com 50 µg/mL de FB (Sigma, St. Louis, EUA) e incubadas por 60 minutos a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs e os sítios inespecíficos bloqueados com solução de Krebs e BSA 1% (Albumin, from bovine serum, A9647-500G, Sigma-Aldrich) durante 60 minutos a 37°C. As placas foram lavadas novamente como descritas anteriormente, e os ensaios realizados em triplicata. A suspensão de plaquetas foi adicionado 50 mM de solução de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de acordo com a concentração de células presentes para a reposição do cálcio que foi retirado durante a lavagem. Em seguida, colocou-se 50 µL da suspensão de plaquetas a cada poço da placa e outra triplicata com a suspensão de plaquetas e ligante trombina (Thrombin from human plasma T9010-10v1, Sigma Aldrich) por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, as plaquetas não aderentes foram desprezadas, e a placa lavada 2 vezes com solução de Krebs. Após a lavagem da placa, foram adicionados 50 µL de Krebs e 150 µL do substrato fosfatase ácida (0.1 M tampão citrato; pH 5.4; 5 mM p-fosfato de nitrofenila e 0.1% de Triton X-100, Sigma), em cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Para interromper a reação foi adicionado NaOH (2 N) em cada poço. O resultado foi analisado em um leitor de ELISA num comprimento de onda de 405 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A porcentagem de plaquetas aderidas foi calculada a partir da comparação das absorbâncias dos poços com uma curva padrão, formada por diluições da suspensão original de plaquetas.

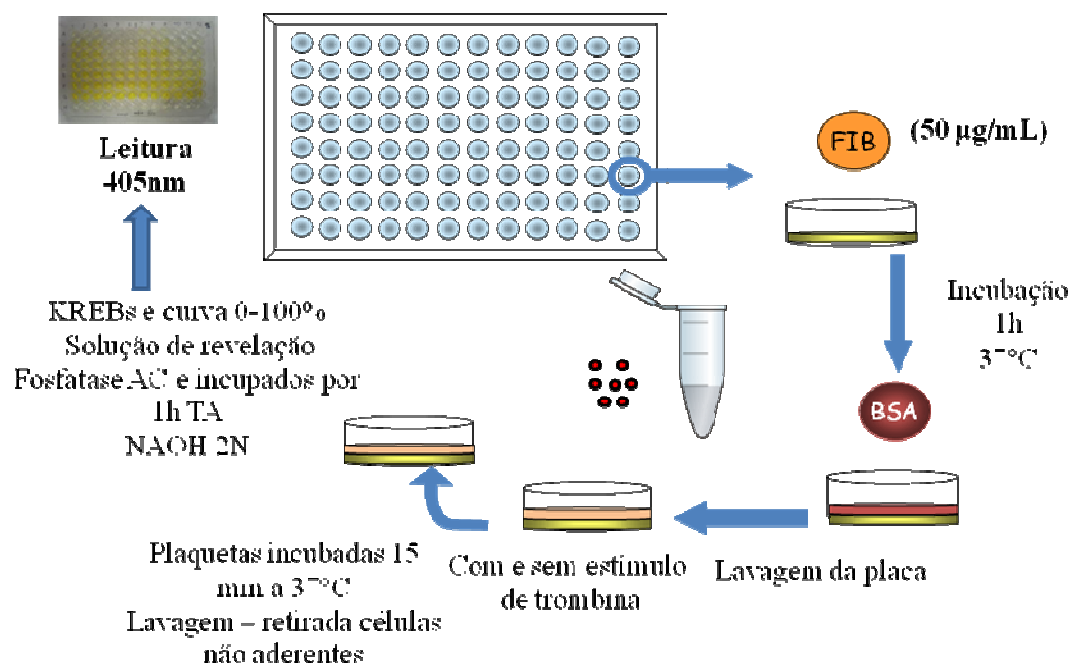


Figura 4. Preparação da placa, adição das plaquetas e revelação da placa

4.8. Citometria de fluxo

Os neutrófilos isolados e resuspenso em PBS em quantidade de 1×10^6 células/mL foram colocados em 4 tubos de ensaio; em seguida acrescentou-se 5 µL de cada anticorpo, anticorpo CD11a (FITC Mouse Anti-Human CD11a-BD Biosciences), CD11b (Alexa flúor 488 mouse Anti-Human CD11b-BD Biosciences), CD18 (PE Mouse Anti-Human CD18-BD Biosciences) em cada tubo, que foram incubados por 30 minutos a 4°C protegido da luz. As amostras foram lavadas com PBS e centrifugadas a 500 g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 300 µL de PBS e/ou fixadas em 1% de paraformoldeído para leitura no citômetro de fluxo (Facscalibur, laser 488nm e 635nm, BD).

4.9. Dosagem de DD

A determinação de DD foi realizada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas. A técnica foi realizada em um coagulômetro automatizado BCS-XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha), através de análise imunoturbidimétrica potenciada por partículas de poliestireno revestidas covalentemente com anticorpo monoclonal específico para a detecção de DD. O reagente utilizado foi o Innovance DD (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha). O método foi padronizado através da dosagem do DD em 20 amostras normais do laboratório e padrões normais e alterados do próprio *kit* comercial, considerando-se como valor normal até 0.55 mg/L.

4.10. Avaliação dos marcadores inflamatórios

Para a dosagem das citocinas e PCR coletou-se um volume de 8ml de sangue através de punção venosa em tubos secos. Dentro de um período máximo de 30 minutos após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000xg por 15 minutos, e o soro separado em alíquotas e congelado a -80 °C para ensaio posterior. Utilizou-se o método de ELISA para determinação dos níveis plasmáticos de IL-6 , TNF- α e IL-8.

A IL-8 foi dosada utilizando-se kit comercial da BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, Califórnia, USA). As dosagens de IL-6 e TNF- α foram realizadas empregando-se o método de ELISA de alta sensibilidade (Quantikine® HS, R&D Systems, Minneapolis, USA).

Para a determinação dos níveis de PCR, utilizou-se um kit ultra-sensível (C-Reactive Protein Test System, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg,

Alemanha), em equipamento automatizado, que utiliza o princípio nefelométrico. Resultados até 0,5 mg/dL são considerados normais.

4.11. Avaliação ultrassonográfica do trombo residual

O estudo ultrassonográfico foi realizado por um único médico, com ampla experiência e com certificado na área de atuação em ecografia vascular pela Sociedade de Angiologia e Cirurgia Vascular e pelo Colégio Brasileiro de Radiologia. O tempo entre a coleta do sangue e a realização do exame ultrassonográfico foi de no máximo 3 meses. O aparelho utilizado foi um SIEMENS SONOLINE G40 (Siemens Healthcare, Mountain View, Calif) e transdutores convexo de 3-5 MHz e linear de 5-10 MHz. Foram estudadas a veia cava inferior, ilíacas comum e externa, femorais comum e superficial, poplítea, gastrocnêmia e tibial posterior. O paciente foi orientado para realizar jejum de 10 horas e uso de antiflatulento.

Primeiramente, o exame foi realizado com o paciente em decúbito dorsal para a avaliação da imagem bidimensional, Doppler pulsado e fluxo colorido. Os segmentos venosos normais são compressíveis, apresentam fluxo fásico com a respiração e aumentam com a compressão distal. A manobra de compressibilidade é realizada com a veia em sessão transversal, comprimindo-se a mesma com o transdutor. Em sessão longitudinal da veia, obtém-se o espectro do fluxo venoso com o Doppler pulsado e o fluxo em cores espontâneo e com compressão distal. O segmento venoso incompressível e sem fluxo no estudo em cores foi considerado ocluído. Os segmentos semi-compressíveis e com fluxo parcial foram considerados semi-ocluídos ou parcialmente recanalizados. Foram

realizadas medidas dos diâmetros transversos das veias em compressão máxima e a extensão longitudinal das alterações encontradas.

O teste para a avaliação do refluxo venoso foi realizado com o paciente em posição ortostática, com o Doppler pulsado, das veias femoral superficial, poplítea e tibial posterior com manobra de Valsalva e compressão distal. Foi considerado refluxo a presença de fluxo retrógrado com duração maior que 1 segundo nas veias femorais superficiais e poplíteas, e 0.5 segundo nas veias tibiais posteriores.

4.12. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados de forma descritiva, representados pelas medianas, mínimo e máximo. Para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney entre dois grupos independentes, Kruskal-Wallis entre três ou mais grupos independentes e o teste de Wilcoxon para análise de dois grupos relacionados. Para a análise de variáveis categóricas foi utilizado o teste de qui-quadrado. O teste de correlação utilizado foi o de coeficiente de correlação de Spearman. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas através de um software estatístico comercial (R Development Core Team version 2.0, 2011, Vienna, Austria).

5. RESULTADOS

Increased adhesive properties of neutrophils and inflammatory markers in VTE patients with residual vein occlusion and high D-dimer levels

Artigo em elaboração

Zapponi, K.C.S; Bittar, L.F; Mazetto BM; Santiago-Bassora, F.D; Barnabé, A; De Paula, E.V; Orsi, F.L.A; Conran, N; Annichino-Bizzacchi, J.M.

Increased adhesive properties of neutrophils and inflammatory markers in VTE patients with residual vein occlusion and high D-dimer levels

Kiara Cristina Senger Zapponi, Luiz Fernando Bittar, Bruna de Moraes Mazetto; Fernanda Bassora, Aline Barnabé, Erich Vinicius de Paula, Fernanda Loureiro de Andrade Orsi, Nicola Conran, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Hematology and Hemoterapy Center – Instituto nacional de Ciência e Tecnologia do sangue (INCTS), UNICAMP, Campinas, São Paulo, 13083-878, Brazil

Keywords: Adhesion, neutrophils, erythrocytes, platelets, inflammatory markers and venous thromboembolism

Corresponding author: joyce@unicamp.br

Abstract

Venous Thromboembolism (VTE) is a multifactorial disease that affects 1-3:1000 individuals worldwide. The venous thrombus develops via a multicellular process on the surface of the endothelium and presents a laminar structure comprised of layers of platelets, leukocytes, erythrocytes and fibrin. The relationship between inflammation and coagulation is bidirectional, and has been mainly evaluated through protein interactions between pro-inflammatory cytokines and elements of the coagulation cascade. Inflammatory cells such as neutrophils, have not been previously correlated with thrombotic or procoagulant processes. Objective: To evaluate the adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets, as well as the expression of neutrophil adhesion molecules in patients with VTE, correlating them with markers of the systemic inflammatory response, and with the presence of residual vein obstruction (RVO) and D-dimer (DD) levels. Patients and Methods: Study group consisted of 30 VTE patients (1-6 years after the acute episode) followed in our outpatient clinic, and 10 patients with VTE during the acute episode treated at a university hospital (HC-UNICAMP). In addition, age, gender and ethnic background-matched healthy volunteers were included as a control group. Adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets were determined by a static adhesion assay using ligands such as fibrinogen (FB) and fibronectin (FN). The expression of neutrophils adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD18) was evaluated by flow cytometry. Levels of inflammatory markers (IL-6, IL-8, TNF- α , PCR) were evaluated by ELISA and nephelometry. RVO was evaluated by Doppler ultrasound and DD by coagulometric method. Results: No significant difference could be observed in the

platelets adhesion (basal: 16.37% vs. 14.59%, $p=0.309$; and stimulated with thrombin: 33.45% vs. 26.62%, $p=0.200$) and erythrocytes adhesion (7.28% vs 7.49%, $p=0.859$) between chronic VTE patients and healthy individuals. Similarly, no statistical differences were observed in the platelets adhesion (basal: 28.36% vs. 21.63%, $p=0.109$; and stimulated with thrombin: 38.45% vs. 30.15%, $p=0.715$) and erythrocytes adhesion (6.00% vs 4.62%, $p=0.326$) in the VTE acute patients when compared to their respective controls. Interestingly, in patients with a higher risk of recurrent VTE (defined by the presence of high levels of DD and RVO), a significant increase in neutrophils adhesion was observed when compared to healthy individuals (24.68% vs. 19.07%, $p < 0.05$). Inflammatory markers (IL-6, IL-8, TNF- α and CRP) were significantly elevated (2.08pg/mL vs 0.90pg/mL, $p=0.01$; 28.72pg/mL vs 16.46pg/mL, $p=0.02$; 4.50pg/mL vs 2.11pg/mL, $p=0.04$; 0.35 pg/mL vs 0.14 pg/mL, $p=0.09$, respectively) in this subgroup of patients when compared to the other patients. Adhesive properties of neutrophils were correlated with IL-6 ($r=0.3815$ and $p=0.0375$) and D-dimer levels ($r=0.3831$ and $p=0.0367$). Neutrophils adhesion molecules (CD11a, CD11b and CD18) were not altered in any of the groups. Conclusion: Our results suggest that VTE patients do not exhibit increased adhesive properties of platelets and erythrocytes. Neutrophils adhesive properties were increased in patients with higher D-dimer levels and RVO, independently of the expression of neutrophil adhesion molecules. A hypothesis for this increase is alterations in affinity of surface adhesion molecules to their ligands, as a response to inflammatory processes associated with the hypercoagulability demonstrated in this subgroup of patients.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) comprises deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE). VTE is a common multifactorial disease with an annual incidence of 1-3:1000 in the general population. Its pathogenesis depends on the interaction of genetic and acquired factors, and despite several already-identified risk factors, 25% of cases are considered idiopathic (Hansson *et al.*, 1997; Silverstein *et al.*, 1998; Rosendaal, 1999a; Rosendaal, 1999b; Heit *et al.*, 2002; Ho, 2010; Lippi *et al.*, 2010; Von Brühl *et al.*, 2012). Many patients experience residual vein obstruction (RVO) and presence of reflux, increasing local inflammatory processes, which can lead to the postthrombotic syndrome (Prandoni *et al.*, 2007; Roumen-Klappe *et al.*, 2009). Reports demonstrated that RVO and hypercoagulability characterized by elevated levels of D-dimer (DD) may also be associated with risk of recurrence (Verhovsek *et al.*, 2008; Carrier *et al.*, 2011; Tosetto *et al.*, 2012).

Thrombus formation is a multicellular process and develops on the surface of the endothelium presenting a laminar structure consisting of layers of platelets, leukocytes, erythrocytes and fibrin. (Wakefield *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2006; Wakefield *et al.*, 2008; Manfredi & Rovere-Querini, 2010; Saha *et al.*, 2011; Von Bruhl *et al.*, 2012).

A recent study demonstrated by intravital two-photon and epifluorescence microscopy, that reduction of blood flow induces a proinflammatory endothelial phenotype initiating the recruitment of neutrophils. Recruited neutrophils start fibrin formation via blood cell-derived tissue factor (TF), which is the decisive trigger to the massive fibrin deposition characteristic of DVT. Furthermore, platelets are

critical for DVT propagation, as they support neutrophils accumulation and promote neutrophil extracellular trap formation, which in turn triggers FXII dependent thrombus propagation (Von Bruhl *et al.*, 2012).

The interaction of the thrombus with the venous wall originates locoregional inflammatory response and cytokine release (Orra, 2002).

The relationship between inflammation and coagulation is bidirectional. Inflammation leads to the activation of coagulation, and coagulation also considerably affects inflammatory activity. Proinflammatory cytokines and other mediators are able to activate the coagulation system and reduce the regulatory pathways of natural anticoagulants (Levi & Van, 2010). Moreover, thrombin and factor Xa, by binding to receptors that can be activated by proteases present in endothelial cells and mononuclear cells are able to stimulate the production of several cytokines, causing an inflammatory response (Levi *et al.*, 2004).

Inflammation is closely linked to thrombosis (Roumen-klappe *et al.*, 2009; Van Aken *et al.*, 2000; Reitsma & Rosendaal, 2004; Esmon, 2004; Christiansen *et al.*, 2006; Levi & Van, 2010). Some clinical studies have demonstrated a significant impact of high cytokines levels on the risk of VTE (Van Aken *et al.*, 2000; Reitsma & Rosendaal *et al.*, 2004). However, the relationship between inflammation and coagulation previously described considers only the protein interactions between the pro-inflammatory cytokine and the coagulation cascade. Inflammatory cells such as circulating neutrophils have not been previously investigated in patients with thrombotic processes.

Therefore, in order to evaluate some of the properties of circulating neutrophils, erythrocytes and platelets during the acute episode and years after the

venous thromboembolic episode we analyzed the adhesive properties of these cells *in vitro* and correlated findings with markers of the systemic inflammatory response (IL-6, IL-8, TNF- α and CRP), presence of RVO on ultrasound with Doppler and quantification of DD.

Materials and Methods

Patients and controls

During the period of August 2010 to April 2012, 30 patients nominated as chronic VTE were selected from the Outpatient Clinic at the Hemostasis Blood Center of Campinas / UNICAMP after an acute episode of VTE (minimum 1 year, maximum 6 years after acute episode) and 10 patients with VTE at diagnosis (acute VTE) assisted at the Emergency room in the Hospital of UNICAMP were also selected for this study. All patients provided a written informed consent. The inclusion criteria were age under 18 years or over 70 years at the time of thrombosis, thrombosis at an unusual site, the presence of cancer, inflammatory diseases, severe liver or kidney diseases, autoimmune diseases, diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy, and patients taking anticoagulant medication (except the first dose of enoxaparin 1 mg/Kg in acute VTE), and/or antiplatelet medication within 10 days prior to collection. The healthy control subjects were matched for gender, age, ethnicity and geographic origin. Exclusion criteria for controls were the same as for patients.

Reagents

Fibronectin (FN) and human trombin (TB) were bought from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Human fibrinogen (FB) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Alexa Fluor anti-CD11b, anti-CD11a FITC and anti-CD18 PE were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA). IL-8 was purchased from BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA), IL-6 and TNF- α from Quantikine, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Isolation of neutrophils from peripheral blood

Neutrophils were isolated from fresh peripheral blood collected in heparin-containing tubes. Briefly, whole blood was placed over two layers of Ficoll-Paque of densities of 1.077 and 1.119 g/L, respectively. After separation of monocytes and granulocytes by centrifugation at 700g for 30 min, the granulocyte layer was washed once in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) before lysing contaminating red cells (10 min, 4°C, lysis buffer; 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃). Cells were washed once again in PBS before resuspending in RPMI medium for use in static adhesion assays and PBS for use in flow cytometry. Cells were counted using a Cell Dyn 1700 hematology analyzer (Abbott Laboratories, Illinois, USA), and were then cytospinned onto slides and a cell differentiation count performed. Neutrophil suspensions with purities of greater than 92% were used immediately in assays; contaminating cells were mainly lymphocytes and eosinophils. Control and patients were treated in the same manner and always run in parallel in neutrophil assays; thus, differences in properties of neutrophils reflect differences inherent to these neutrophils, and are not due to the separation/washing procedure.

Neutrophil adhesion assays

Ninety six-well plates were prepared by coating individual wells for 1h at 37°C with 60 µL of fibronectin solution (20µg/ml in PBS). Wells were washed three times with PBS before blocking nonspecific sites with 0.5% BSA (bovine serum albumin/PBS) for 60 min. at 37°C. Wells were washed three times again with PBS before allowing plates to dry. Neutrophils (50 µL of 2×10^6 cells/mL in RPMI medium) were added to wells and cells were allowed to adhere to fibronectin (FN) for 30 min at 37°C, 5% CO₂. Following incubation, non-adhered cells were discarded and wells washed three times with PBS. RPMI (50µl) was added to each well and varying concentrations of the original cell suspension (0-100 %) were added to empty wells to form a standard curve. Percentage cell adhesion was calculated by measuring the myeloperoxidase content of each well and comparing it with the standard curve for each individual study subject, determined with a microplate reader at 492 nm (Versamax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Flow cytometry

Isolated neutrophils (1×10^6 cells/mL) were incubated (30 min, 4°C) with a saturating concentration of Alexa Fluor 488-mouse anti-human CD11b (α chain of the MAC-1 integrin), FITC mouse anti-human CD11a (α chain of the LFA-1 integrin) and PE mouse anti-human CD18 (common β chain of the LFA-1 and MAC-1 integrin). Cells were washed once in PBS and then fixed in 1% paraformaldehyde, before analyzing on a FACScalibur (BD, New Jersey, NJ, USA). The mean fluorescence intensity of antibody binding to each cell was compared to that of isotype controls.

Preparation of washed platelets

Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (collected in EDTA or sodium citrate containing tubes) at 200 g at 20°C for 20 min. PRP was washed once in wash buffer (140 mmol/L NaCl, 5 mmol/l KCl, 12 mmol/L sodium citrate, 10 mmol/l glucose and 12.5 mmol/L sacarose, pH 6) and platelets were isolated from the PRP by centrifugation at 800 g at 20°C for 12 min. The platelet pellet was resuspended in O₂/CO₂ gassed Krebs solution (118 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaHCO₃, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.7 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 5.6 mmol/L D-(+)-glucose anhydrous ACS Reagent Grade, pH 7,4). Platelet counts were performed using a CellDyn 1700 (Abbott Laboratories, Illinois, USA) and adjusted to a concentration of 1x10⁸ platelets/mL in Krebs buffer in the presence of 1 mmol/L CaCl₂. Suspensions were utilized immediately in assays and the anticoagulant utilized did not affect assay results. Control and patients were treated in the same manner and always run in parallel in platelet assays.

***In vitro* platelet adhesion assay**

The static platelet adhesion assay employed was based on a previously reported method (Bellavite *et al.*, 1994). Ninety six-well microtiter plates were coated with 50 µg/mL fibrinogen (FB) and incubated for 1h at 37°C. Nonspecific sites were blocked afterwards with 1% bovine serum albumin/Krebs solution for 60 min at 37°C and plates were washed twice and dried. Optimal concentrations of ligands used to coat microplates were established previously in preliminary assays (data not shown). Platelet suspensions (50 µL of 1x10⁸ platelets/mL) were added to each well of the plate in triplicate in the presence or absence of thrombin (TB) (5

μL, 15 minutes at 37°C). Non-adherent platelets were removed (by gentle washing with Krebs solution) and remaining adherent platelets were quantified by the measurement of platelet acid phosphatase. Wells containing adherent platelets were incubated with acid phosphatase substrate solution (0.1 mol/L citrate buffer, pH 5.4, containing 5 mmol/l p-nitrophenyl phosphate and 0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature (RT). The reaction was stopped by the addition of 2 mol/L NaOH and p-nitrophenol production was determined with a microplate reader at 405 nm (Versamax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The percentage of adherent cells was calculated by comparing acid phosphatase activity to that of a standard curve with known numbers of platelets from the same individual. Platelet acid phosphatase activity is not affected by the functional state of the cell or by agonist stimulation (Bellavite et al, 1994). All experiments were performed in triplicate. The incubation of platelets with thrombin (50mU/ml) was used to stimulate adhesion assays. Platelet aggregation is probably of minor importance as the assay performed during conditions known to restrict aggregation, such as avoidance of shaking and presence of Mg^{2+} . (Santoro SA, 1986; Hwang *et al.*, 1992; Eriksson & Whiss, 2009). Thus, platelets quantified were deemed to be adhered platelets and not aggregated platelets.

Red cell separation

Peripheral blood was collected in sodium citrate-containing tubes and centrifuged at 500 g for 10 min at room temperature and the buffy coat and plasma removed red cells were washed thrice in phosphate-buffered saline (PBS) using centrifugations of 700 g, 600 g and 480 g, respectively. Red cells and reticulocyte count were performed utilising the Cell Dyn 1700 (Abbott Laboratories, Illinois,

USA) before cells were resuspended in Hank's buffered saline solution (HBSS) to a final concentration of 2×10^8 cells/mL. White cell contamination represented <0.2% of the total cell population. Control and patients were treated in the same manner and always run in parallel in red cell assays.

Red Cell Static adhesion assay

Ninety-six well plates were prepared by coating individual wells with 60 μ L FN (FN; 20 μ g/mL FN in PBS) for 60 min at 37°C. Wells were then washed thrice (PBS) and incubated with 1.0% (w/v) bovine serum albumin for 60 min at 37°C. Plates were washed three times again before allowing to dry. Red cells (50 μ L, 2×10^8 cells/mL, HBSS) were seeded in triplicates into the coated wells of the 96-well plates and cells were allowed to adhere for 30 min, 37°C, 5% CO₂ (optimal conditions for cell adhesion, time course not shown). Following incubation, non adherent cells were discarded and plates were washed thrice with PBS and 50 μ L HBSS were added to each well. Varying concentrations of the original cell suspension were added to empty wells to form a standard curve. Fifty microliters of Drabkin's solution (Sigma-Aldrich) were added to each experimental well and the wells of the standard curves, and absorbance was then measured at 540 nm (Versamax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), following incubation for 10 min at 37°C. Adherence was calculated by comparing absorbances of unknowns with those of the standard curve.

Evaluation of inflammatory biomarkers and D-dimer

Blood was obtained from participants at the time of their enrollment in the study. A citrate-containing tube (3.5ml) and serum (8ml) were collected and samples were immediately centrifuged. Serum and platelet-poor plasma obtained were aliquoted and stored at -80 °C.

Evaluation of DD

Plasma quantification of DD was performed by immunoturbidimetric analysis, as recommended by the manufacturer, with an automated BCS-XP coagulometer (Siemens Healthcare, Marburg, Germany), considering up to 0.55mg/L D-dimer as normal.

Serum levels of inflammatory biomarkers

Commercial ELISA was used to measure serum levels of IL-8, IL-6 and TNF- α in accordance with the manufacturers protocols. Serum high sensitivity CRP (hs-CRP) levels were measured by a nephelometric method, using a Siemens BN ProSpec analyzer. IL-6, IL-8, TNF- α and CRP were evaluated only in the chronic VTE patients.

Ultrasonographic assessment of RVO

Doppler assessment of RVO was performed on participants with a previous DVT. Vascular Doppler imaging was assessed by the same physician using a Siemens Sonoline G40 (Siemens Healthcare, Mountain View, Calif.), with a convex transducer of 3-5 MHz and linear 5-10 MHz. The incompressible venous segment without color flow was considered as presenting RVO.

Statistical analysis

All assays were performed in triplicate for individual samples and data are presented as median and range for each group (n refers to the number of individuals in each group). Data were compared between groups using the Mann-Whitney nonparametric test and Kruskal-Wallis nonparametric test. The Wilcoxon matched pairs test was used to compare groups before and after treatment with specific drugs. Categorical data were analyzed using the Chi-square test. Correlations were analyzed using the Spearman's test. Statistical significance was established as $p \leq 0.05$. Commercial statistical software (R Development Core Team version 2.0, 2011, Vienna, Austria) was used.

Results

Acute VTE patients and chronic VTE patients

Demographic and clinical data

Ten patients with acute VTE were included in the study. VTE was provoked in 4 patients and the risk factors identified were hormonal contraceptives ($n=2$), surgery ($n=1$) and travel ($n=1$). Patients' clinical data are summarized in tables 1 and 2. Thirty chronic VTE patients were included in the study, 20 of these had spontaneous VTE. In the 10 patients with associated risk factors, these included hormones (pregnancy, hormonal contraceptive, puerperium and hormone replacement therapy) ($n=7$), surgery ($n=1$), and travel ($n=2$) (Tables 3 and 4). Demographic parameters such as age, gender, and ethnicity were similar between patients and controls.

Erythrocytes from acute and chronic VTE patients did not demonstrate increased adhesion to FN *in vitro*

Results demonstrated that the *in vitro* adhesion of erythrocytes to FN from VTE patients was similar to that of controls (Fig. 1 and table 5). There was no difference between acute and chronic patients.

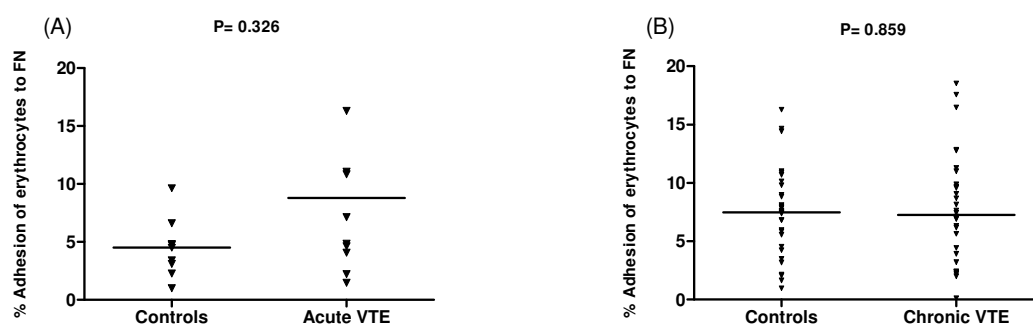


Figure 1. Basal static adhesion of erythrocytes to fibronectin (FN). Erythrocytes (2×10^8 cells/mL) were allowed to adhere to FN-coated plates ($20 \mu\text{g/mL}$) for 30 min at 37°C , 5% CO_2 . Erythrocytes were from healthy individuals (controls), VTE patients during an acute episode ($n=10$) (A) and chronic VTE patients ($n=30$) (B). Results are expressed as % of cells adhered to FN. Bars indicated median values. P= refers to Mann Whitney U test.

Platelets from acute and chronic VTE patients did not demonstrate increased adhesion to FB *in vitro*, before and after TB stimulation

Under static conditions, *in vitro* basal and TB-stimulated platelets adhesion of platelets to FB of patients with acute VTE (A) and chronic VTE (B) were similar to that of controls (Table 5). Platelet adhesion to FB was significantly increased after the TB stimulus (50mU/mL) in controls and in chronic VTE patients (D) (FIG. 2). The acute VTE group presented a tendency towards increased adhesion to FB after TB stimulation. It is important to point out that only 5 samples were analyzed in this group (C).

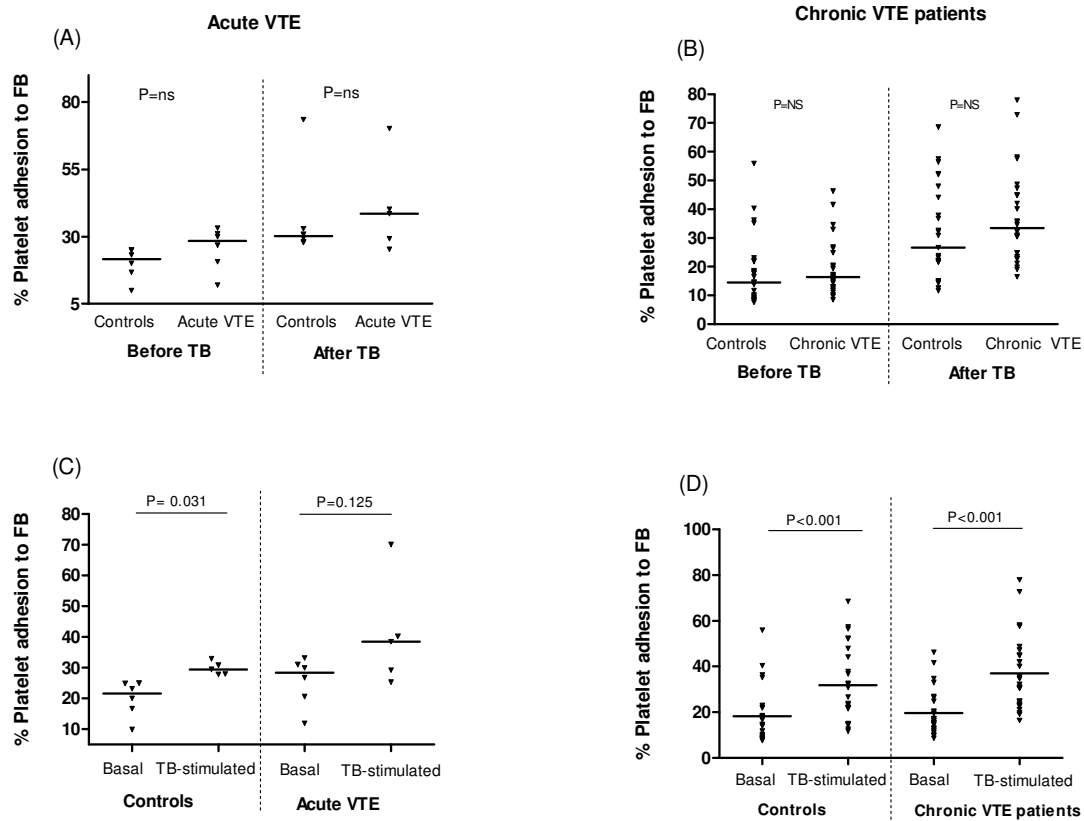


Figure 2. Adhesive properties of platelets from healthy controls and VTE patients: (A) platelet adhesion to FB in patients with acute VTE (n=5), before and after TB stimulation; (B) platelet adhesion to FB in patients after the acute episode (n=30), before and after TB stimulation. (C;D) increased platelet adhesion to FB after TB-stimulation in controls and patients. Platelet adhesion is expressed as percentage of platelets adhered. Bars indicate median values. P=ns (no statistically significant). FB= fibrinogen; TB= thrombin. (A) (B) P refers Mann Whitney U test, (C) (D) P refers to Wilcoxon test.

The adhesive properties of neutrophils are increased in chronic VTE patients with RVO and elevated DD levels

Results demonstrated that neutrophils from patients with acute VTE and chronic VTE presented similar adhesion to FN compared to the controls (Fig. 3 and table 5). Fifteen chronic VTE patients (50%) presented DD > 0.55mg/l and RVO. In this subgroup of patients, we observed that the adhesive properties of neutrophils were significantly increased, compared to controls (Fig. 3 and table 6).

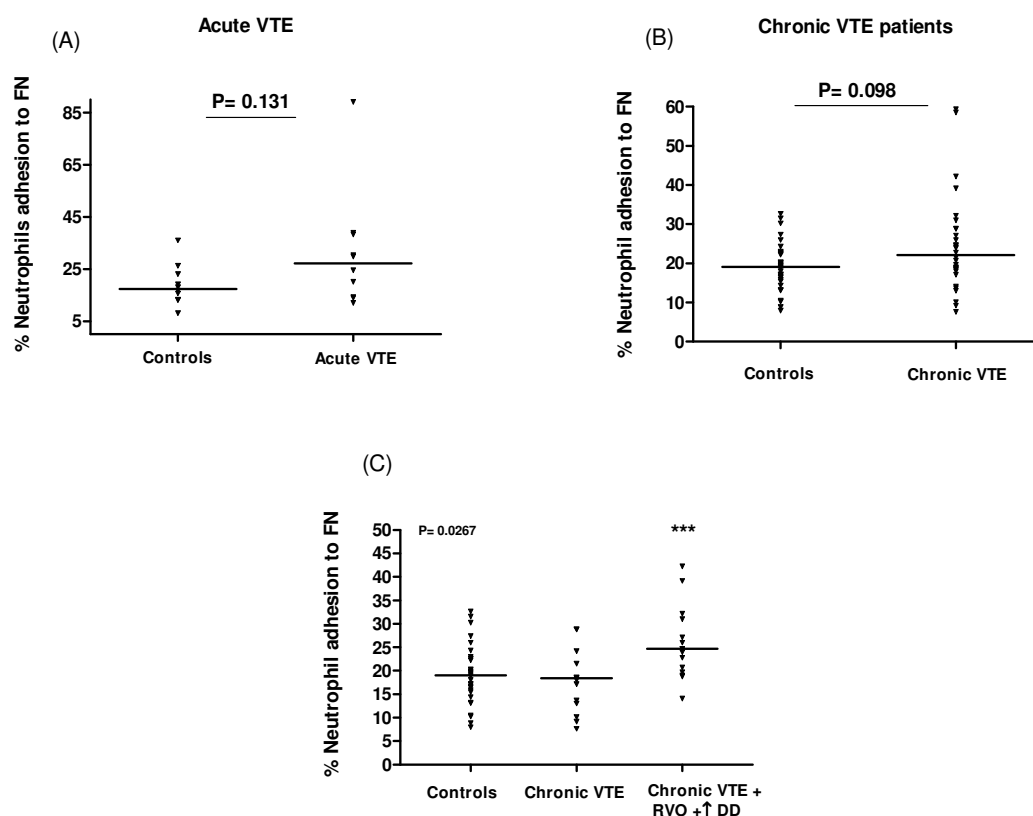


Figure 3. Adhesion of neutrophils to FN in healthy control and VTE patients. (A) neutrophil adhesion to FN; patients with acute VTE (n=10), (B) neutrophil adhesion to FN; patients after the acute episode (n=30), (C) neutrophil adhesion to FN; patients with higher risk of VTE recurrence (n=15) (VTE + RVO + ↑ DD) and patients with normal DD and without RVO (n=15). Neutrophil adhesion is expressed as the percentage of neutrophils adhered. Bars indicate median values. ***

P<0.05, FN= fibronectin; DD= D-dimer. (A) (B) P refers to Mann Whitney U test, (C) P refers to Kruskal-Wallis test.

Inflammatory markers are significantly increased in chronic VTE patients with RVO and high DD levels

Chronic VTE patients (50%) with D-dimer > 0.55mg/l and RVO presented significantly increased levels of IL-6, IL-8 and TNF- α , and slightly increased levels of CRP, when compared with patients with normal DD and without RVO (Table 7).

The adhesion of neutrophils to FN was positively correlated with IL-6 and DD in chronic VTE patients

There was a significant correlation between the adhesive properties of neutrophils to FN and levels of IL-6 ($r=0.3815$; $P=0.0375$), and DD= 0.3831 ; $P=0.0367$) in chronic VTE patients (Fig. 4)

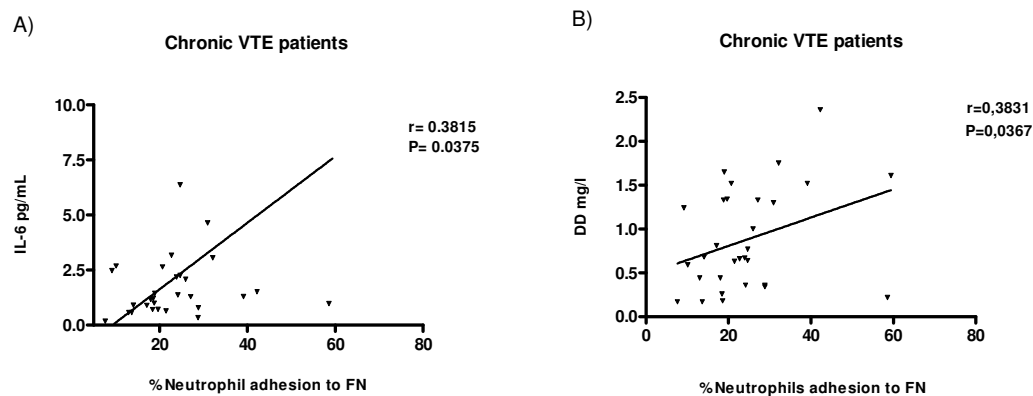


Figure 4. Correlation of the adhesion of neutrophils to FN with levels of IL-6 and DD in VTE patients after the acute episode (n=30). (A) Significant correlation of adhesive properties of neutrophils to FN with levels of IL-6 pg/mL; (B) Significant correlation of adhesive properties of neutrophils to FN with DD mg/l. DD= D-Dimer. Spearman's correlation.

Expression of adhesion molecules, LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18), on the surface of neutrophils in chronic VTE patients

The expression of LFA-1 and MAC-1 integrins were determined on the neutrophils of controls and VTE patients after the acute episode (n=30) by flow cytometry (Table 8). Data suggest that the LFA-1 and MAC-1 integrins were not differently expressed on the surface of VTE neutrophils when compared to controls. Data are presented as mean relative expression (MFI) on each cell as these integrin subunits are already highly expressed on the neutrophil surface (Patients: CD11a (95.5%), CD11b (93.4%), CD18 (98.7%); Controls: CD11a (96.6%), CD11b (92.5%), CD18 (98%)).

Table 1. Clinical details of controls and acute VTE patients participating in the study.

	Controls (n=10)	VTE (n=10)	P
Female/Male	4/6	4/6	ns
Caucasian/ Non Caucasian	7/3	7/3	ns
Age (years)	45 (30-69)	46 (28-69)	ns
Clinical features			
Proximal DVT	-	9 (90%)	-
Spontaneous VTE episode, number	-	6 (60%)	-
Provoked VTE episode, number	-	4 (40%)	-
Comorbidities			-
Hypertension, number	0	0	-
Dyslipidemia, number	0	0	-
Hypothyroidism, number	0	0	-
Diabetes, number	0	0	-
Other, number	0	0	-

VTE, patients with venous thromboembolism; data presented (except M/F value) are mean (median, min, max), ns (no statistic).

Table 2. Clinical details of controls and acute VTE patients participating in the study.

Laboratory features	Controls (n=10)	VTE (n=10)	P
Hemogram			
WBC (10 ³ /ul)	6.03 (5.50, 4.27, 10.30)	7.76 (6.49, 3.19, 14.10)	ns
NEU (%)	3.75 (3.49, 1.94, 6.47)	4.93 (3.97, 2.01, 10.10)	ns
LYM (%)	1.66 (1.51, 1.25, 2.88)	2.12 (2.09, 0.82, 2.99)	0.023
RBC 10 ⁹ /ul)	5.03 (5.00, 4.22, 6.23)	4.20 (4.24, 3.20, 5.15)	0.008
HGB (g/dl)	14.67 (14.95, 12.60, 17.10)	12.95 (12.60, 11.60, 14.90)	0.008
MCV (fl)	85.44 (85.20, 81.00, 90.00)	90.04 (87.40, 82.60, 111)	ns
MCH (pg)	29.25 (29.75, 26.50, 31.00)	31.05 (30.40, 28.50, 37.90)	ns
PLT (10 ³ /ul)	257 (250, 193, 342)	281.20 (275.50, 194, 410)	ns
MPV (fl)	7.97 (7.64, 6.70, 10)	7.67 (7.34, 6.00, 9.54)	ns

Table 3. Clinical details of controls and chronic VTE patients participating in the study.

	Controls (n=30)	VTE (n=30)	P
Female/Male	18/12	18/12	ns
Caucasian/ Non Caucasian	16/14	16/14	ns
Age (years)	43.43 (21-72)	44.60 (20-70)	ns
Time after VTE*	-	32.92 (12-72)	-
Clinical features			
Proximal DVT**	-	27 (90%)	-
Spontaneous VTE episode,	-	20 (66.6%)	-
Provoked VTE episode,	-	10 (33.3%)	-
RVO*** + ↑ DD****	-	15 (50%)	-
Comorbidities	5	12	
Hypertension,	4	6	
Dyslipidemia	1	1	
Hypothyroidism		1	
Diabetes		1	
Other		3	

Data are expressed as number of individuals. Time after VTE expressed as median months (range), * VTE , patients with venous thromboembolism; **DVT deep vein thrombosis; *** RVO, residual vein obstruction; ****DD, D-dimer levels. Data presented (except M/F value) are mean (median, min, max), ns (not statistically significant).

Table 4. Clinical details of controls and chronic VTE patients participating in the study.

Laboratory features	Controls (n=30)	VTE (n=30)	P
Familial thrombophilia		3 (10%)	-
Factor V Leiden	-	2 (6.66%)	-
FII G20210A	-	1 (3.33%)	-
Hemogram			
WBC (10 ³ /ul)	5.97 (5.78, 3.40, 9.68)	6.14 (5.71, 3.20, 9.30)	ns
NEU (%)	3.57 (3.51, 1.37, 5.90)	3.58 (3.47, 1.42, 6.38)	ns
LYM (%)	1.74 (1.58, 1.07, 3.69)	1.92 (1.86, 0.86, 3.87)	ns
RBC 10 ⁹ /ul)	4.77 (4.75, 4.03, 5.53)	4.90 (4.84, 3.79, 6.04)	ns
HGB (g/dl)	13.83 (13.95, 9.72, 16.60)	14.26 (14.10, 10.50, 18.80)	ns
MCV (fl)	85.75 (85.60, 65.60, 97.40)	85.36 (86.05, 73.80, 92.60)	ns
MCH (pg)	28.99 (29.10, 20.70, 32.90)	28.90 (29, 24, 32.60)	ns
PLT (10 ³ /ul)	274.73 (252.00, 163, 407)	259.50 (246, 178, 395)	ns
MPV (fl)	7.78 (7.23, 5.68, 12.10)	7.66 (7.48, 6.14, 10.30)	ns

Table 5. Comparative analysis of adhesive properties of the platelets, erythrocytes and Neutrophil in the acute VTE patients, chronic VTE patients and healthy controls

	Control (n=30)	Chronic VTE (n=30)	p	Control (n=5-10)	Acute VTE (n=5-10)	p
Platelets Basal	14.59 (7.60-55.94)	16.37 (8.50-46.31)	>0.05	21.63 (9.91-25.06)	28.36 (11.95-33.14)	>0.05
Platelets with TB-stimulus	26.62 (11.69-68.55)	33.45 (16.47-77.98)	>0.05	30.15 (27.84-73.48)	38.45 (25.32-70.10)	>0.05
Erythrocytes	7.49 (0.97-16.30)	7.28 (0.13-18.54)	>0.05	4.62 (1.01-19.93)	6.0 (1.48-25.30)	>0.05
Neutrophil	19.07 (7.99-32.66)	22.13 (7.63-59.39)	0.098	17.36 (8.08-36.04)	27.16 (12.03-89.14)	0.131

Data are expressed as median % (range). The p Value was calculated by Mann-Whitney test

Table 6. Comparative analysis of neutrophil adhesive properties in the subgroup of patients with RVO and high DD levels

	Controls (n=30)	Patients with normal DD and without RVO (n=15)	Patients with DD↑ and RVO (n=15)	p
Neutrophil	19.07 (7.98-32.66)	18.44 (7.63-59.39)	24.68 (14.1-42.24)	0.0267

Data are expressed as median % (range). The p Value was calculated by Kruskal-Wallis test.

Table 7. IL-6, IL-8, TNF- α and CRP in chronic VTE patients according to the normal DD and without RVO or increased DD and RVO

	Patients with normal DD and without RVO (n=15)	Patients with increased DD and RVO (n=15)	<i>P</i>*
IL-6 pg/mL	0.90 (0.18-19.49)	2.08 (0.71-6.37)	<0.05
IL-8 pg/mL	16.46 (5.88-40.96)	28.72 (12.60-191.1)	<0.05
TNF-α pg/mL	2.11 (1.20-6.98)	4.50 (2.03-13.76)	<0.05
CRP pg/mL	0.14 (0.001-1.77)	0.35 (0.02-1.05)	0.09

Data expressed as median (range); DD= D-dimer *p refers to Mann Whitney U test.

Table 8. Expressions of CD11a, CD11b and CD18 on the surface of neutrophils isolated from health controls and chronic VTE patients.

	Controls	VTE	<i>P</i>
CD11a (MFI)	884.0 (106 - 1591)	719.50 (338 - 1158)	>0.05
CD11b (MFI)	3676.0 (22 - 9274)	3526.0 (98.40 - 5360.0)	>0.05
CD18 (MFI)	2661.0 (1123 – 5296)	2451.5 (356-5399)	>0.05

Data expressed as median (range); Neutrophil surface expressions were determined under basal conditions. Surface expression is reported as mean fluorescence intensity (MFI) on neutrophils cells and results are presented as median (min-max) of *n* individuals. No significant differences were found between surface integrins expression between controls and chronic VTE patients (n=30).

Discussion

Static adhesion assay as a tool to evaluate the pathophysiology of VTE

As opposed to arterial occlusive disease, venous thromboembolism is normally formed under conditions of low shear force in relation to the blood vessel wall, and is morphologically characterized by a laminar structure comprised of layers of platelets, leukocytes, erythrocytes, and fibrin (Wakefield *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006; Wakefield *et al.*, 2008; Manfredi & Rovere-Querini, 2010; Saha *et al.*, 2011; Von Bruhl *et al.*, 2012). For this reason, *in vitro* static adhesion assays may be considered as physiologically relevant in the evaluation of pathophysiological elements involved in VTE.

Red Cell adhesion in VTE

Despite the common assumption that normal erythrocytes are relatively non-adhesive during coagulation, being passively entrapped in the fibrin network, recent studies point to a new concept. Adherence of erythrocytes to the endothelium was demonstrated in patients with sickle cell anemia and appears to be involved in the pathophysiology of vaso-occlusive processes (Kasschau *et al.*, 1996; Wojciak-Stothard *et al.*, 1997). In addition, through *in vitro* studies, Goel & Diamond (2002) demonstrated that normal erythrocytes may also adhere to activated neutrophils, activated platelets and polymerized fibrin in low flow conditions. We therefore evaluated red cell adhesion in patients with VTE. In our study, using static assay conditions, no significant difference was observed between patients and control subjects. We cannot, however, exclude the possibility that erythrocytes contribute to the thrombotic process by adhering to other cells or fibrin, because the ligand used in this study, which was fibronectin, does not allow

us to rule out this possibility. Accordingly, the evaluation of the interaction of red cells using addition methods should be further studied.

Platelet adhesion in VTE

The function of blood platelets is to arrest bleeding by the formation of stable platelet clots. Platelets also seem to contribute to the integrity of the endothelium and take part in inflammatory processes (Van Gils *et al.*, 2009). During inflammatory conditions, platelets roll along and adhere to activated endothelium, and their firm adhesion is mediated by P-selectin and the interactions of activated platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ with FB. FB molecules are, in turn, anchored to the intracellular adhesion molecule-1 and $\alpha_v\beta_3$ proteins expressed by activated endothelium (Tabuchi & Kuebler, 2008; Wagner & Frenette, 2008). We therefore evaluated platelet adhesion in our patients with VTE.

Our results did not demonstrate alterations in the adhesive properties of platelets to FB (with or without thrombin stimulation) by static adhesion assay in patients during both the acute episode and late VTE when compared to controls. The increase of adherence to FB in response to TB-stimulus in patients and controls confirmed TB as an important platelet agonist, inducing the platelet surface expression of the $GP_{IIb}III_a$ complex, the receptor for FB (Li *et al.*, 1996). One limitation of our assessment of platelet adhesion was the low number of individuals with acute VTE (only 5 were assayed for this parameter) included in the analysis. It seems fair to speculate that acute patients would be the ones with high levels of platelet activity. Therefore, our results of platelet adhesion regarding acute VTE patients should be analysed with caution.

Neutrophil adhesion in VTE patients and in patients with increased VTE recurrence risk

The relation between inflammation and VTE, in particular the role of neutrophil in the pathogenesis of this disease, has been studied in recent years in animal models (Saha *et al.*, 2011; Von Brühl *et al.*, 2012). However, neither the number nor the function of neutrophils were correlated with the pathogenesis of VTE in humans. We therefore evaluated neutrophil adhesion in a population of patients with acute and chronic VTE. When compared to healthy individuals, no significant difference in neutrophil adhesion could be observed. However, because of a possible trend towards increased adhesion in patients from the chronic VTE group, we decided to perform a subgroup analysis, with patients with known markers of hypercoagulability. Patients with high levels of D-dimer have been considered to have a higher risk of VTE recurrence when compared with patients with normal D-dimer levels (8.9 vs 3.55% annual risk) (Caim *et al.*, 2005; Vershovsek *et al.*, 2008; Tossetto *et al.*, 2012). In regard to RVO, despite some controversy, several authors consider that RVO may be also associated with a higher recurrence rate of thrombosis (Cosmi *et al.*, 2005; Siragusa *et al.*, 2008; Prandoni *et al.*, 2009; Cosmi *et al.*, 2010; Carrier *et al.*, 2011).

In our study, the subgroup of patients with high D dimer and with RVO presented increased neutrophil adhesion when compared to the control group. In addition, these patients also presented an increase of inflammatory markers (IL-6, IL-8 and TNF- α) when compared to patients with normal D-dimer and without RVO. Together, these findings corroborate the evidence of a strong relationship between

inflammation and coagulation (Pottier *et al.*, 2009), and point to neutrophils as a relevant mediator of this association.

According to Levi *et al* (2004), inflammation leads to activation of coagulation, and on the other hand coagulation also considerably affects inflammatory activity. Proinflammatory cytokines and other mediators are able to activate the coagulation system and reduce the regulatory pathways of natural anticoagulants (Levi & Van, 2010). Moreover, thrombin and factor Xa, by binding to receptors activatable by proteases present in endothelial cells and mononuclear cells are able to stimulate the production of several cytokines, causing an inflammatory response (Levi *et al.*, 2004), demonstrating thus a bidirectional relationship between inflammation and coagulation.

Under conditions of inflammation, the number of neutrophils in the circulating blood is substantially increased and neutrophils migrate into the inflamed sites by chemokines stimulus and interactions of adhesion molecules (Mihara *et al.*, 2012). Despite the absence of differences in neutrophil counts, we observed that the adhesive properties of these cells was increased in patients with a higher risk of VTE recurrence, and that this increase correlated with levels of IL-6. IL-6 augments the expression of adhesion molecules such as VCAM (vascular cell adhesion molecule-1) and ICAM-1(main ligand of integrin LFA-1 and MAC-1 expressed by neutrophils) in inflamed sites and endothelial cells, induces the production of chemokines such as IL-8, IL-6 itself, and acute phase proteins such as C-reactive protein (CRP) (Romano *et al.*, 1997; Mihara *et al.*, 2012; Ricon M, 2012). IL-6 receptor present in neutrophil promotes neutrophil recruitment and activation, which could change the expression of adhesion molecules (Mihara *et*

al., 2012). It is therefore possible that inflammation, evidenced by higher IL-6, could lead to increased adhesive properties of neutrophils, triggering a vicious circle involving inflammation, increased neutrophil adhesion and activation of coagulation.

In this study, no associations between increased adhesive properties of neutrophils with expression of LFA-1 and MAC-1 integrin subunits were observed. However, although the expression of these molecules was not changed, changes in the affinity of these adhesion molecules to their ligands can not be ruled out. In fact, the adhesive activity of integrins may be altered by conformational changes or lateral mobility (Hogg & Leitinger. 2001, Shimaoka *et al.*, 2002; Arnaout *et al.*, 2005; Hu & Luo, 2012; Montresor *et al.*, 2012). The affinity of MAC-1 for its ligand, for example, is dynamically regulated by inside-out signaling, producing a form of the integrin that binds to the substrate with a much greater affinity. (Shimaoka *et al.*, 2002). Recent structural and biophysical data predict that LFA-1 and MAC-1 exists in at least three conformational states, which differ both in their overall extension on the plasma membrane, as well as in the arrangement of their headpieces (Carman & Springer, 2003; Luo *et al.*, 2007; Springer & Dustin, 2012; Montresor *et al.*, 2012). Therefore, the increased adhesive properties of neutrophils in patients with a higher risk of recurrent VTE could be mediated by alterations in integrin affinity rather than expression.

In the present study, we could demonstrate that VTE patients with signs of hypercoagulability, characterized by an increase in D-dimer levels, showed not only an increase in inflammatory cytokines, but also an increase in adhesive properties of neutrophils. Thus, our hypothesis is that adhesive properties of

neutrophils are stimulated by the inflammatory process associated with hypercoagulability, or there may be a cause-effect relationship between activation of coagulation and inflammation in these patients. These findings not only support the hypothesis of an association between inflammation and hypercoagulability, but highlight neutrophils as a new element in this process.

Given the importance of the relationship between inflammation, hemostasis and thrombosis, more studies are needed to better understand the role of neutrophils in VTE, especially with the goal of providing new therapeutic approaches in disease prevention.

Conclusions

In conclusion, our study was not able to demonstrate differences in the adhesive properties of platelets, erithrocytes and neutrophils in patients with VTE, when compared to healthy individuals. However, when a subgroup of patients with known markers of hypercoagulability (high DD levels, and RVO) were evaluated, we were able to demonstrate increased neutrophili adhesion compared to controls. This subbroup also presented an increase in inflammatory cytokines. In addition, neutrophil adhesion correlated with IL-6 levels and DD. Our results corroborate the importance of the interplay between inflammation and hemostasis, and suggest that neutrophils might be a key player in these processes.

References

Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2878-87.

Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:381-410.

Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):547-56.

Carrier M, Rodger MA, Wells PS, Righini M, LE Gal G. Residual vein obstruction to predict the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with deep vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2011 Jun;9(6):1119-25.

Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges L, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santos DO. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006 out: v42 (5): 321-332.

Christiansen SC, Naess IA, Cannegieter SC, Hammerstrøm J, Rosendaal FR, Reitsma PH. Inflammatory cytokines as risk factors for a first venous thrombosis: a prospective population-based study. *PLoS Med*. 2006 Aug;3(8):e334

Cosmi B, Legnani C, Cini M, Guazzaloca G, Palareti G. D-dimer levels in combination with residual venous obstruction and the risk of recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 2005 Nov;94(5):969-74.

Cosmi B, Legnani C, Iorio A, Pengo V, Ghirarduzzi A, Testa S, Poli D, Tripodi A, Palareti G; PROLONG Investigators (on behalf of FCSA, Italian Federation of Anticoagulation Clinics). Residual venous obstruction, alone and in

combination with D-dimer, as a risk factor for recurrence after anticoagulation withdrawal following a first idiopathic deep vein thrombosis in the prolong study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Mar;39(3):356-65.

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):321-7.

Goel MS, Diamond SL. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3797-803. Epub 2002 Jul 5.

Hansson PO, Welin L, Tibblin G, Eriksson H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. 'The Study of Men Born in 1913'. *Arch Intern Med*. 1997 Aug 11-25;157(15):1665-70.

Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, Melton LJ 3rd. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Arch Intern Med*. 2002 Jun 10;162(11):1245-8.

Ho WK. Deep vein thrombosis--risks and diagnosis. *Aust Fam Physician*. 2010 Jul;39(7):468-74.

Hogg N, Leitinger B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):893-8.

Hu P, Luo BH. Integrin bidirectional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol*. 2012 Jul 5.

Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood*. 1996 Jan 15;87(2):771-80.

Levi M, Van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004; 109:2698-2704.

Levi M, Van der Poll T. Inflammation and coagulation. Crit Care Med. 2010 Feb;38(2 Suppl):S26-34.

Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, Michelson AD. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. J Surg Res. 1996 Mar;61(2):543-8.

Lippi Giuseppe; Gianfranco Cervelling, Massimo Franchini, Emmanuel J. Favaloro. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. J Thromb Thrombolysis (2010) 30:459-471.

López JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:439-56.

Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol. 2007;25:619-47.

Manfredi AA, Rovere-Querini P. Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets Norma Maugeri. Current Opinion in Hematology 2010.v.17:3–8

Montresor A, Toffali L, Constantin G, Laudanna C. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. Front Immunol. 2012;3:127.

Orra, Hussein Amin. Trombose Venosa Profunda. Trabalho Enviado Para A Obtenção Do Título De Membro Titular Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões, Abril 2002.

Pottier P, Fouassier M, Hardouin JB, Volteau C, Planchon B. D-dimers, thrombin-antithrombin complexes, and risk factors for thromboembolism in hospitalized patient. Clin Appl Thromb Hemost, 2009.15(6):p.666-75.

Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E, Pesavento R, Iotti M, Tormene D, Simioni P, Pagnan A. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute

proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):199-205.

Prandoni P, Prins MH, Lensing AW, Ghirarduzzi A, Ageno W, Imberti D, Scannapieco G, Ambrosio GB, Pesavento R, Cuppini S, Quintavalla R, Agnelli G; AESOPUS Investigators. Residual thrombosis on ultrasonography to guide the duration of anticoagulation in patients with deep venous thrombosis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):577-85.

Reitsma PH, Rosendaal FR. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. *J Thromb Haemost*. 2004 Apr;2(4):619-22.

Rosendaal, F.R. Risk factor for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost*, v.82, n.2, Aug, p.610-9.1999b.

Rosendaal, F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, v.353, n.9159, Apr 3, p.1167-73.1999a.

Roumen-Klappe EM, Janssen MC, Van Rossum J, Holewijn S, Van Bokhoven MM, Kaasjager K, Wollersheim H, Den Heijer M. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. *J Thromb Haemost*. 2009 Apr;7(4):582-7. Epub 2009 Jan 19.

Saha P, Humphries J, Modarai B, Mattock K, Waltham M, Evans CE, Ahmad A, Patel AS, Premaratne S, Lyons OT, Smith A. Leukocytes and the natural history of deep vein thrombosis: current concepts and future directions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Mar;31(3):506-12.

Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31:485-516.

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med*. 1998 Mar 23;158(6):585-93.

Siragusa S, Malato A, Anastasio R, Cigna V, Milio G, Amato C, Bellisi M, Attanzio MT, Cormaci O, Pellegrino M, Dolce A, Casuccio A, Bajardi G, Mariani G. Residual vein thrombosis to establish duration of anticoagulation after a first episode of deep vein thrombosis: the Duration of Anticoagulation based on Compression UltraSonography (DACUS) study. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):511-5.

Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Feb;24(1):107-15.

Tabuchi A, Kuebler WM. Endothelium – platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascular Pharmacology* 2008(49): 141-150.

Tosetto A, Iorio A, Marcucci M, Baglin T, Cushman M, Eichinger S, Palareti G, Poli D, Tait RC, Douketis J. Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH). *J Thromb Haemost*. 2012 Jun;10(6):1019-25.

Van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost*. 2000 Apr;83(4):536-9.

Van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2009;85:195-204.

Verhovsek M, Douketis JD, Yi Q, Shrivastava S, Tait RC, Baglin T, Poli D, Lim W. Systematic review: D-dimer to predict recurrent disease after stopping anticoagulant therapy for unprovoked venous thromboembolism. *Ann Intern Med*. 2008 Oct 7;149(7):481-90, W94.

Von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M,

Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819-35.

Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5271-81.

Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:387-391.

Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wroblewski SK, Burdick Md, Schmidt R, Kunkel SL, Greenfield LJ. Venous thrombosis associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995; 15:258-268.

Wójcik-Stothard B, Denyer M, Mishra M, Brown RA. Adhesion, orientation, and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. *In vitro Cell Dev Biol Anim*. 1997 Feb;33(2):110-7.

6. DISCUSSÃO GERAL

Ensaio de adesão estático como uma ferramenta para avaliar a fisiopatologia do TEV

Em oposição à doença arterial oclusiva, o tromboembolismo venoso é normalmente formado sob condições de baixa força de cisalhamento em relação à parede do vaso sanguíneo, e é caracterizada morfológicamente por uma estrutura laminar composta por camadas de plaquetas, leucócitos, eritrócitos e fibrina (Wakefield *et al.*, 1995; López *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006; Wakefield, 2008; Manfredi e Rovere-Querini, 2010; Saha *et al.*, 2011; Von Bruhl *et al.*, 2012). Por este motivo, o ensaio de adesão estática *in vitro* pode ser considerado fisiologicamente relevante na avaliação de elementos fisiopatológicos envolvidos no TEV.

Adesão dos eritrócitos no TEV

Apesar de comumente os eritrócitos normais serem relativamente não-adesivos durante a coagulação, sendo passivamente aprisionados na rede de fibrina, estudos recentes apontam para um novo conceito. A adesão de eritrócitos ao endotélio foi observada em doentes com anemia falciforme e parece estar envolvido na fisiopatologia dos processos vaso-oclusivo (Kasschau *et al.*, 1996; Wojciak-Stothard *et al.*, 1997). Além disso, por meio de estudos *in vitro*, Goel & Diamond (2002) demonstraram que os eritrócitos normais podem também aderir a neutrófilos ativados, plaquetas ativadas e fibrinas polimerizada em condições de baixo fluxo.

Nós, portanto, avaliamos a adesão de eritrócitos em pacientes com TEV. Em nosso estudo, usando condições de ensaio estático, não foi observada

diferença significativa entre pacientes e controles. Não se pode, no entanto, excluir a possibilidade de que os eritrócitos contribuam para o processo trombótico ao aderir a outras células ou a fibrina, uma vez que o ligante empregado no presente estudo (FB), não nos permite excluir esta possibilidade. Sendo assim, a avaliação da interação dos eritrócitos com outras células sanguíneas no TEV torna-se uma proposta interessante a ser avaliada em outras pesquisas.

Propriedades adesivas de plaquetas no TEV

A principal função das plaquetas é impedir o sangramento quando há lesão tecidual, através da adesão e agregação plaquetária e ativação da cascata da coagulação, formando um “tampão hemostático”. As plaquetas também contribuem para manter a integridade do endotélio e atuam nos processos inflamatórios (Van Gils *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas as plaquetas não aderem à superfície das células endoteliais, mas quando há lesão tecidual, proteínas da MEC são expostas e inicia-se o processo de ativação plaquetária. O rolamento e aderência de plaquetas ativadas ao endotélio é intermediado, principalmente, pela P-selectina e pela GPIb, mas as integrinas das plaquetas, como os receptores para FB, colágeno e FN e suas respectivas proteínas ligantes, propiciam uma adesão mais estável das plaquetas ao endotélio (Tabuchi e Kuebler, 2008; Wagner e Frenette, 2008; Van Gils, *et al.*, 2009). Portanto nós avaliamos a adesão das plaquetas em nossos pacientes com TEV.

Nossos resultados não demonstraram alterações nas propriedades adesivas das plaquetas ao FB em ensaio estático *in vitro* com e sem estímulo de TB em pacientes com TEV, tanto na fase aguda quanto tardia da doença, quando comparado aos indivíduos saudáveis.

Quando as plaquetas foram estimuladas com TB houve um aumento da adesão ao FB em relação à adesão basal, tanto no grupo de pacientes como de controles, demonstrando que a TB é um importante agonista na adesão plaquetária. A TB aumenta a expressão do complexo GPIIb/IIIa, que é o receptor para FB, na superfície da plaqueta. (Li *et al.*, 1996).

Uma limitação da nossa avaliação da adesão das plaquetas foi o baixo número de indivíduos com TEV agudo (apenas 5) incluídos na análise. Parece justo especular que pacientes agudos seria aqueles com níveis elevados de atividade plaquetária. Portanto, nossos resultados de adesão de plaquetas em relação aos pacientes com TEV aguda devem ser analisados com cautela.

Adesão de neutrófilos em pacientes TEV e em pacientes com maior risco de recorrência de TEV

A relação entre inflamação e TEV, em particular o papel dos neutrófilos na patogênese desta doença, tem sido atualmente estudada em modelos animais (Saha *et al.*, 2011; Von Brühl *et al.*, 2012). No entanto, nem o número e a função dos neutrófilos foram correlacionados com a patogênese do TEV em seres humanos. Nós, portanto, avaliamos a adesão de neutrófilos em uma população de pacientes com TEV agudo e crônico. Quando comparados aos indivíduos saudáveis, diferenças não significativas na adesão de neutrófilos pode ser observado. No entanto, por causa de uma possível tendência de adesão aumentada em pacientes do grupo TEV crônico, decidimos realizar uma análise de subgrupo, em pacientes com marcadores conhecidos de hipercoagulabilidade.

O aumento do DD é considerado um marcador de hipercoagulabilidade (Adam *et al.* 2009). Pacientes com níveis elevados de DD foram considerados de

maior risco de recorrência de TEV, quando comparados com os pacientes com níveis de DD normal (8.9 vs 3.55% risco anual) (Caim *et al.*, 2005; Vershovsek *et al.*, 2008; Tossetto *et al.*, 2012). Em relação ao TR, apesar da literatura ser controversa, muitos autores considera estar associado à recidiva da trombose (Cosmi *et al.*, 2005; Siragusa *et al.*, 2008; Prandoni *et al.*, 2009; Cosmi *et al.*, 2010; Carrier *et al.*, 2011).

Neste estudo, o subgrupo de pacientes com DD elevado e com TR apresentaram adesão de neutrófilos aumentada em comparação com o grupo controle. Além disso, estes pacientes também apresentaram um aumento dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-8 e TNF- α) quando comparados com pacientes com níveis normais de DD e sem TR. Juntos, esses achados corroboram as evidências de uma forte relação entre inflamação e coagulação (Pottier *et al.*, 2009), e colocam os neutrófilos como um relevante mediador desta associação.

De acordo com Levi *et al.*, (2004), a inflamação leva à ativação da coagulação e, por outro lado, também a coagulação afeta consideravelmente a atividade inflamatória. Citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores são capazes de ativar o sistema de coagulação e reduzir as vias regulatórias dos anticoagulantes naturais (Levi & Van, 2010). Além disso, a trombina e o fator Xa, por ligação a receptores ativáveis por proteases presentes em células endoteliais e células mononucleares são capazes de estimular a produção de várias citocinas, causando uma resposta inflamatória, demonstrando assim uma relação bidirecional entre inflamação e coagulação (Levi *et al.*, 2004).

Sob condições de inflamação, o número de neutrófilos no sangue circulante é substancialmente aumentado e os neutrófilos migram para os locais de

inflamação por estímulos de quimiocinas e interações das moléculas de adesão (Mihara *et al.*, 2012). Apesar de não haver diferenças nas contagens de neutrófilos, foi observado que as propriedades adesivas destas células foram aumentadas em pacientes com um risco aumentado de recorrência do TEV, e que este aumento está correlacionado com níveis de IL-6. A IL-6 aumenta a expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM (molécula de adesão celular vascular-1) e ICAM-1 (principal ligante da integrina LFA-1 e MAC-1 expressa pelos neutrófilos) nos sítios inflamados e células endoteliais, induz a produção de quimiocinas tais como IL-8, a própria IL-6 e proteínas de fase aguda, tais como a proteína C-reativa (PCR) (Romano *et al.*, 1997; Mihara *et al.*, 2012; Ricon M, 2012). O receptor da IL-6 presente em neutrófilos promove sua ativação e recrutamento, o que pode alterar a expressão de moléculas de adesão (Mihara *et al.*, 2012). Portanto, é possível que a inflamação, evidenciada por níveis elevados de IL-6, pode levar a um aumento das propriedades adesivas de neutrófilos, desencadeando um círculo vicioso que envolve inflamação, aumento da adesão de neutrófilos e ativação da coagulação.

Neste estudo, não houve associação entre o aumento das propriedades adesivas de neutrófilos com a expressão das moléculas de adesão LFA-1 e MAC-1. No entanto, embora a expressão destas moléculas não estava alterada, mudanças na afinidade destas moléculas aos seus ligantes não podem ser excluída. De fato, a atividade adesiva e afinidade destas moléculas podem ser alteradas por mudanças conformacionais e mobilidade lateral (Hogg e Leitinger, 2001; Shimaoka *et al.*, 2002; Arnaout *et al.*, 2005; Hu e Luo, 2012; Montresor *et al.*, 2012).

A afinidade da MAC-1 pelo seu ligante, por exemplo, é dinamicamente regulada por sinalizações 'inside-out', produzindo uma mudança conformacional da integrina que se liga ao substrato com uma maior afinidade (Shimaoka *et al.*, 2002). Recentemente, análises estruturais e biofísicas mostraram que a integrina β_2 existe em pelo menos três estados conformacionais, os quais diferem ambos na sua extensão sob a membrana plasmática, bem como no arranjo do seu 'headpiece' (Carman e Springer, 2003; Luo *et al.*, 2007; Springer e Dustin, 2012; Montresor *et al.*, 2012). Portanto, o aumento das propriedades adesivas de neutrófilos em pacientes com alto risco de recorrência do TEV observado neste estudo, pode ser mediado por alterações na afinidade, ao invés do aumento da expressão destas moléculas.

No presente estudo, pudemos observar que pacientes que tiveram TEV e mantinham sinais de hipercoagulabilidade, caracterizada pelo aumento do DD, apresentavam não apenas aumento das citocinas inflamatórias, mas também um aumento das propriedades adesivas dos neutrófilos. Assim, nossa hipótese é que essas alterações dos neutrófilos estejam sendo estimuladas pelo processo inflamatório associado à hipercoagulabilidade, ou ainda que possa haver uma relação de causa-efeito entre a ativação da coagulação e a inflamação nestes pacientes. Esses achados não apenas corroboram a hipótese da associação entre inflamação e hipercoagulabilidade, mas também inserem os neutrófilos como um novo elemento neste processo.

Tendo em vista a importância da relação entre inflamação, hemostasia e trombose, mais estudos são necessários para um melhor entendimento do papel

dos neutrófilos no risco de TEV, especialmente com o objetivo de proporcionar novas abordagens terapêuticas na prevenção da doença.

7. CONCLUSÃO

O aumento das propriedades adesivas de neutrófilos à FN em ensaio estático, em pacientes com DD aumentado e presença de TR sugere uma ativação dessas células, independente da expressão quantitativa das proteínas de superfície em sua membrana. O processo inflamatório associado à hipercoagulabilidade presente nessa situação clínica pode ser um fator que contribui para esse achado, uma vez que há uma relação bidirecional entre ativação da coagulação e a inflamação.

Os pacientes com TEV não apresentam aumento da adesão plaquetária mediada pelo FB, mesmo na presença de um ativador como a TB.

A adesão dos eritrócitos à FN não está aumentada em pacientes com TEV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2878-87.

Albuquerque, HPC; Vidal PC. Trombose venosa profunda: revisão dos conceitos atuais. *Rev Bras Ortop*.1996.v.31(10): 851-86.

Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:381-410.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta haematol*.2005;113(2):130-136.

Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, Lambrew CT, Dykstra G, Palmeri ST, Gibbons RJ, Borzak S, Sobel BE, Gourelay SG, Rundle AC, Gibson CM, Barron HV; Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Study Group. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2778-83.

Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem*. 1994 Feb 1;216(2):444-50.

Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Keen LJ, Laundry GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. *Eur J immunogenet* 1999;26: 135-223.

Burns AJ, Thomas BI, Hideo Y, Andrew CI. The $\alpha 4 \beta 1$ (Very Late Antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and $\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5, CD49e/CD29) Integrins Mediate $\alpha 2 \beta 1$ (CD11/CD18) Integrin-Independent Neutrophil Recruitment to Endotoxin-Induced Lung Inflammation¹. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 4644-4649.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF.. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008 Apr;93(4):605-9.

Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):547-56.

Carrier M, Le Gal G, Wells PS, Rodger MA. Systematic review: case-fatality rates of recurrent venous thromboembolism and major bleeding events among patients treated for venous thromboembolism. *Ann Intern Med*. 2010 May 4;152(9):578-89.

Carrier M, Rodger MA, Wells PS, Righini M, LE Gal G. Residual vein obstruction to predict the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with deep vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2011 Jun;9(6):1119-25.

Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges L, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santos DO. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006 out: v42 (5): 321-332.

Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007; 98: 756–764.

Coran N, Franco-Penteado C, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009; 33(1):1-16.

Cosmi B, Legnani C, Cini M, Guazzaloca G, Palareti G. D-dimer levels in combination with residual venous obstruction and the risk of recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 2005 Nov;94(5):969-74.

Cosmi B, Legnani C, Iorio A, Pengo V, Ghirarduzzi A, Testa S, Poli D, Tripodi A, Palareti G; PROLONG Investigators (on behalf of FCSA, Italian Federation of Anticoagulation Clinics). Residual venous obstruction, alone and in combination with D-dimer, as a risk factor for recurrence after anticoagulation withdrawal following a first idiopathic deep vein thrombosis in the prolong study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2010 Mar;39(3):356-65.

Criado, Paulo Ricardo; Evandro A. Rivittil; Cidia Vasconcellos II; Neusa Y. S. Valente; Jose Eduardo Costa Martins. Manifestações cutâneas das trombofilias. *An. Bras. Dermatol*. 2008 Nov./Dec. vol.83 n°6 Rio de Janeiro.

Denis CV, Wagner DD. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Apr;27(4):728-39.

Downing LJ, Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, Lundy FJ, Fowlkes JB, Hulin MS, Kadell AM, Wilke CA, Brown SL, Wroblewski SK, Burdick MD, Anderson DC, Greenfield LJ. Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis. *J Vasc Surg*. 1997 May;25(5):816-27.

Eischer L, Eichinger S, Kyrle PA. Age at first venous thromboembolism and risk of recurrence: a prospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2009 Nov;88(6):366-70.

Eriksson AC, Whiss PA. Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;v.52(3),p.356-365.

Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1343-8.

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):321-7.

Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F; HALT-MI Investigators. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 2;40(7):1199-204.

Finnegan EM, Turhan A, Golan DE, Barabino GA. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an *in vitro* flow model of vaso-occlusion. *Am J Hematol*. 2007;82(4):266-75.

Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, Conran N. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematol*. 2007 Feb;78(2):144-51.

Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Oct;17(5):509-16.

Goel MS, Diamond SL. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3797-803. Epub 2002 Jul 5.

Han L, Shen X, Pan L, Lin S, Liu X, Deng Y, Pu X. Aminobenzoic acid hydrazide, a myeloperoxidase inhibitor, alters the adhesive properties of neutrophils isolated from acute myocardial infarction patients. *Heart Vessels*. 2012 Sep;27(5):468-74.

Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med*. 2000 Mar 27;160(6):769-74.

Hansson PO, Welin L, Tibblin G, Eriksson H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. 'The Study of Men Born in 1913'. Arch Intern Med. 1997 Aug 11-25;157(15):1665-70.

Heit J, Cohen A, Anderson FJ. Estimated annual number of incident and recurrent, non-fatal and fatal venous thromboembolism (VTE) events in the US. Blood 2005; 106: 267A, Abst 910.

Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, Melton LJ 3rd. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. Arch Intern Med. 2002 Jun 10;162(11):1245-8.

Ho WK. Deep vein thrombosis--risks and diagnosis. Aust Fam Physician. 2010 Jul;39(7):468-74.

Hogg N, Leitinger B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. J Leukoc Biol. 2001 Jun;69(6):893-8.

Hu P, Luo BH. Integrin bidirectional signaling across the plasma membrane. J Cell Physiol. 2012 Jul 5.

Humphries J, McGuinness CL, Smith A, Waltam M, Poston R, Burnand KG. Monocyte chemotactic protein-(MCP-1) accelerates the organization and resolution of venous thrombi. J.Vasc Surg, 1999;30: 894-899.

Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3901-3.

Issekutz AC, Issekutz TB. The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11B/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leucocytes to inflammatory reactions in the rat. Immunology. 1992;76:655.

Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. Blood. 1996 Jan 15;87(2):771-80.

Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. Nat Rev Immunol. 2005 Jul;5(7):546-59.

Konstantopoulos K, McIntire LV. Perspective series: Cell adhesion in vascular biology. J Clin Invest. 1997;100:S19.

Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA; ASTIN Study Investigators. Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an

adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003 Nov;34(11):2543-8. Epub 2003 Oct 16.

Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. "A revised model of platelet aggregation" *J Clin Invest* 2000;105:783-91.

Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res*.1994;74:336.

Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*.1991;65:859

Levi M, Van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004; 109:2698-2704.

Levi M, Van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2 Suppl):S26-34.

Levi,M. " Platelets". *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S523-5.

Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, Michelson AD. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J Surg Res*. 1996 Mar;61(2):543-8.

Lippi Giuseppe; Gianfranco Cervelling, Massimo Franchini, Emmanuel J. Favaloro. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis* (2010) 30:459-471.

López JA, Kearon C, Lee AY. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:439-56.

Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:619-47.

Maffei, F. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: incidência, patologia, fisiopatologia e diagnóstico. Rio de Janeiro: Medsi. 1995.

Manfredi AA, Rovere-Querini P. Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets Norma Maugeri. *Current Opinion in Hematology* 2010.v.17:3–8

Michelson AD, Barnard MR. Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1673-8.

Montresor A, Toffali L, Constantin G, Laudanna C. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol*. 2012;3:127.

Myers DD Jr, Henke PK, Wroblewski SK, Hawley AE, Farris DM, Chapman AM, Knipp BS, Thanaporn P, Schaub RG, Greenfield LJ, Wakefield TW. P-selectin inhibition enhances thrombus resolution and decreases vein wall fibrosis in a rat model. *J Vasc Surg*. 2002 Nov;36(5):928-38.

Orra, Hussein Amin. Trombose Venosa Profunda. Trabalho Enviado Para A Obtenção Do Título De Membro Titular Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões, Abril 2002.

Poredos P, Jezovnik MK. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis. *Int Angiol*, 2007;v.26, n.4, Dec, p.306-11.

Pottier P, Fouassier M, Hardouin JB, Volteau C, Planchon B. D-dimers, thrombin-antithrombin complexes, and risk factors for thromboembolism in hospitalized patient. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2009.15(6):p.666-75.

Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E, Pesavento R, Iotti M, Tormene D, Simioni P, Pagnan A. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):199-205.

Prandoni P, Prins MH, Lensing AW, Ghirarduzzi A, Ageno W, Imberti D, Scannapieco G, Ambrosio GB, Pesavento R, Cuppini S, Quintavalla R, Agnelli G; AESOPUS Investigators. Residual thrombosis on ultrasonography to guide the duration of anticoagulation in patients with deep venous thrombosis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):577-85.

Proença-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for α IIb β 3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol*. 2010 Apr;149(2):280-8.

Reitsma PH, Rosendaal FR. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. *J Thromb Haemost*. 2004 Apr;2(4):619-22.

Robetorye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol*, v.68, n.4, Dec, p.256-68. 2001.

Rosencher J, Mirault T, Martinez I, Zhu T, Messas E, Emmerich J. [Risk factors for recurrent venous thromboembolism]. *Rev Mal Respir.* 2011 Apr;28(4):453-62.

Rosendaal, F.R. Risk factor for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost,* v.82, n.2, Aug, p.610-9.1999b.

Rosendaal, F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet,* v.353, n.9159, Apr 3, p.1167-73.1999a.

Roumen-Klappe EM, Janssen MC, Van Rossum J, Holewijn S, Van Bokhoven MM, Kaasjager K, Wollersheim H, Den Heijer M. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. *J Thromb Haemost.* 2009 Apr;7(4):582-7. Epub 2009 Jan 19.

Ruggeri ZM. "Plateletes in atherothrombosis". *Nat Med* 2002;8:1227-34.

Saha P, Humphries J, Modarai B, Mattock K, Waltham M, Evans CE, Ahmad A, Patel AS, Premaratne S, Lyons OT, Smith A. Leukocytes and the natural history of deep vein thrombosis: current concepts and future directions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Mar;31(3):506-12.

Schürpf T, Springer TA. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J.* 2011 Sep 23;30(23):4712-27

Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;31:485-516.

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998 Mar 23;158(6):585-93.

Siragusa S, Malato A, Anastasio R, Cigna V, Milio G, Amato C, Bellisi M, Attanzio MT, Cormaci O, Pellegrino M, Dolce A, Casuccio A, Bajardi G, Mariani G. Residual vein thrombosis to establish duration of anticoagulation after a first episode of deep vein thrombosis: the Duration of Anticoagulation based on Compression UltraSonography (DACUS) study. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):511-5.

Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and MAC-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. *J Clin Invest.* 1989;83:2008.

Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Feb;24(1):107-15.

Stvrtinova V, Jahnova E, Weisssova S, Horvathova M, Ferencik M. Inflammatory mechanisms involving neutrophils in chronic venous insufficiency of lower limbs. *Bratisl Lek Listy*. 2001;102(5):235-9.

Tabuchi A, Kuebler WM. Endothelium – platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascular Pharmacology* 2008(49): 141-150.

Thanaporn P, Myers DD, Wroblewski SK, Hawley AE, Farris DM, Wakefield TW, Henke PK. P-selectin inhibition decreases post-thrombotic vein wall fibrosis in a rat model. *Surgery*. 2003 Aug;134(2):365-71.

Tokarev AA, Butylin AA, Ataullakhanov FI. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J*. 2011 Feb 16;100(4):799-808.

Tosetto A, Iorio A, Marcucci M, Baglin T, Cushman M, Eichinger S, Palareti G, Poli D, Tait RC, Douketis J. Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH). *J Thromb Haemost*. 2012 Jun;10(6):1019-25.

Van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost*. 2000 Apr;83(4):536-9.

Van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2009;85:195-204.

Verhovsek M, Douketis JD, Yi Q, Shrivastava S, Tait RC, Baglin T, Poli D, Lim W. Systematic review: D-dimer to predict recurrent disease after stopping anticoagulant therapy for unprovoked venous thromboembolism. *Ann Intern Med*. 2008 Oct 7;149(7):481-90, W94.

Von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819-35.

Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5271-81.

Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:387-391.

Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wroblewski SK, Burdick Md, Schmidt R, Kunkel SL, Greenfield LJ. Venous thrombosis associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995; 15:258-268.

White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thromb Haemost.* 2003 Sep;90(3):446-55.

Wójcik-Stothard B, Denyer M, Mishra M, Brown RA. Adhesion, orientation, and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997 Feb;33(2):110-7.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia; Fundamentos e Práticas. São Paulo: Ed Atheneu, 2001; 739-748.

9. ANEXOS

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos adultos.

Projeto: “Avaliação das propriedades adesivas em eritrócitos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com TEV”.

Responsáveis pelo projeto: Prof^ª. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Kiara Cristina Senger Zapponi.

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

CEP: _____, Telefones _____,

e-mail _____,

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

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade : _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____, Residente à Rua/Av. _____, Telefone: _____.

Este estudo pretende avaliar as propriedades de adesão de algumas células sanguíneas, como eritrócitos, neutrófilos e plaquetas, em indivíduos que tenham tido trombose venosa profunda. Para tanto, coletaremos 3 tubos de 12ml de sangue do senhor (a) para realizarmos o ensaio de adesão destas células. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.
4. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
5. O material sanguíneo plasma colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. Sim Não

6. Caso seja realizado outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
7. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
8. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
9. Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Orientadora

Fone: (19) 3521-8601

Kiara Cristina S. Zapponi

Aluna de Pós-graduação

Fone: (19) 3521-8617

CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que minha amostra seja armazenada”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que minha amostra seja armazenada”.

☐ SIM, eu aceito que minha amostra seja armazenada

☐ NÃO, eu não aceito que minha amostra seja armazenada

Campinas ____/____/____

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos controles.

Projeto: “Avaliação das propriedades adesivas em eritrócitos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com TEV”

Responsáveis pelo projeto: Profª. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Kiara Cristina SEnger Zapponi.

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

CEP: _____, Telefones: _____,

e-mail: _____, concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade : _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____, Residente à Rua/Av _____,

Telefone: _____.

Este estudo pretende avaliar as propriedades de adesão de algumas células sanguíneas, como eritrócitos, neutrófilos e plaquetas, em indivíduos que tenham tido trombose venosa profunda. Entretanto, para termos confiança de que as alterações que por ventura encontraremos no sangue das pessoas acometidas por trombose estão diretamente relacionadas à doença que apresentam, precisamos estudar os mesmos fatores no sangue de pessoas saudáveis, como o(a) senhor(a). Para tanto, coletaremos 3 tubos de 12mL de sangue do senhor (a) para realizarmos o ensaio de adesão destas células. Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são: hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes. A participação nesse estudo contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa.

O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.

Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.

O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.

O plasma, material sanguíneo, colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. Sim Não

Caso seja realizado outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.

Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.

A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP, Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Orientadora

Fone: (19) 3521-8601

Kiara Cristina S. zapponi

Aluna de pós-graduação

Fone: (19) 3521-8617

CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine seu nome diante da opção “SIM, aceito que minha amostra seja armazenada”. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da opção “Não, não aceito que minha amostra seja armazenada”.

☐ SIM, eu aceito que minha amostra seja armazenada

☐ NÃO, eu não aceito que minha amostra seja armazenada

Anexo 3

Questionário – Data da Coleta: __/__/__

Nome do Paciente:	
HC:	Data de nascimento:
Idade:	Sexo: : Feminino Masculino
Origem étnica: Caucasóide Afro-descendente Obs.: _____	
História Pessoal de trombose venosa profunda (TVP), ou acidente vascular cerebral (AVC), ou infarto agudo do miocárdio (IAM): Sim Não. Qual?..... Fator de Risco Associado: História Familiar de TVP, ou AVC, ou IAM: Sim Não. Qual?..... Grau de parentesco e idade:	
Sofre de algumas destas doenças: Hipertensão arterial: Sim Não Diabetes: Sim Não Síndrome Convulsiva: Sim Não Hipotireoidismo: Sim Não Neoplasia: Sim Não Doença Renal Sim Não Doença Hepática Sim Não Síndrome do anticorpo antifosfolípido Sim Não Outras _____	
Fumo: Sim Não. Quanto tempo? Quantos cigarros?	
Faz uso de algum medicamento? Sim Não. Qual?	
Fez uso de AAS nos últimos dias?	
Faz uso de anticoncepcional? Sim Não. Qual? Quanto tempo? Via:	
Faz Terapia de Reposição Hormonal? Sim Não. Qual medicamento? Quanto tempo?	
Está grávida? Sim Não. Quantas semanas?	
Quantas gestações anteriores? Complicações: Sim Não. Qual?	
Abortos: Sim Não. Quantos? Presença de pré-eclâmpsia? Sim Não	
Puerpério: Sim Não Data do parto:	
Já passou por cirurgias?	

Anexo 4. Tabela com dados demográficos e clínicos dos pacientes crônicos

Pacientes	Grupos	Sexo	Idade	Etnia	US Normal	Refluxo	Espessamento	Seg. ocluídos
1	1	F	31	NC		x		
3	1	F	20	C				
4	1	F	46	C		x		
5	1	M	46	C		x		
6	1	F	47	NC		x		
7	1	F	49	NC	x			
8	1	M	28	NC				
9	1	F	55	C	x			
10	1	M	53	C	x			
26	1	M	47	NC	x			
28	1	M	41	NC	x			
29	1	F	21	NC	x			
30	1	M	57	C	x			
31	1	F	49	C	x			
32	1	F	38	C	x			
11	2	M	43	NC		x	x	
12	2	F	72	C		x	x	
13	2	F	38	C		x		
14	2	F	59	C		x	x	
15	2	F	53	NC			x	
16	2	F	65	C		x	x	x
17	2	F	67	NC		x	x	
18	2	M	40	C		x	x	x
19	2	M	26	NC		x	x	
20	2	M	45	NC		x	x	
21	2	F	30	C			x	x
22	2	M	31	NC		x	x	x
20	2	F	72	C			x	x
25	2	M	43	C		x	x	x
27	2	F	28	NC			x	

Grupos dos pacientes crônicos: 1 - DD normal e sem TR; 2 - DD aumentado e TR

Legendas: C – caucasóide; NC – não caucasóide

Anexo 5. Tabela com resultados laboratoriais dos pacientes crônicos

Crônicos		D-dimero	Marcadores inflamatórios				Adesão (%)				CD11a		CD11b		CD18	
Pacientes	Grupos		IL-6	TNF	IL-8	PCR	PlaQ Basal	PlaQ C/ TB	Hemácias	Neutrófilos	% cel	MIF	% cel	MIF	% cel	MIF
1	1	0,55	0,65	1,53	5,885	0,373	16,488	35,834	7,107	21,502	96,1	1059	85,8	7545	97,3	2766
3	1	0,34	0,35	1,21	7,378	0,002	12,226	24,900	2,423	28,813	99,4	968	93,9	3813	98,8	2311
4	1	0,29	2,69	6,65	20,48	1,77	14,988	23,533	9,713	10,137	98	761	93,8	5695	98,6	3650
5	1	0,18	1,21	5,65	27,48	0,19	12,900	72,800	6,178	18,617	99,5	1158	96,3	144	99,5	2009
6	1	0,33	19,5	6,98	17,73	13,5	17,075	22,682	3,207	59,388						
7	1		2,48	2,02	40,96	0,79	15,434	30,536	2,387	9,202	98,2	634	94	9712	99,6	4136
8	1	0,17	0,79	5,39	15,57	0,113			8,166	28,854	78,7	419	84,1	2771	90,6	3292
9	1	0,27	0,9	12,4	40,67	0,17	11,775	34,661	2,342	17,129	83,4	379	94,1	840	96,3	843
10	1	0,44	1,17	1,95	8,065	0,202	26,879	44,759	3,919	18,025	98	1011	82,9	2885	97,7	2592
26	1	0,44	0,57	1,83	15,74	0,066	19,394	19,830	11,27	13,038	97	636	96,2	8547	99,8	4304
28	1	0,17	0,58	4,39	20,49	0,036	24,893	44,947	11,011	13,682	49,3	432	88,8	1537	93,4	1662
29	1	0,36	1,38	1,63	8,103	0,058	26,336	77,983	6,311	24,177	98,5	884	92,9	5500	99,6	3369
30	1	0,17	0,18	2,2	10,65	0,043	46,311	48,684	12,787	7,632	93,9	855	75,3	3791	96,8	1483
31	1	0,22	0,98	1,86	42,9	0,075	20,137	57,656	6,981	58,548	92,9	827	89,2	3630	95,3	2140
32	1	0,26	0,71	2,32	17,19	0,309			9,877	18,436	94,9	893	90	4105	98,6	3800
11	2	1,33	1,3	4,97	23,13	0,578	34,688	40,125	9,567	30,962	99	908	94,7	6664	99,5	4673
12	2	0,77	2,27	3,63	15,63	0,078	10,147	35,568	7,624	23,949	91,2	458	92,6	1607	96,7	1742
13	2	1	2,09	1	6,863	1,05	15,470	58,178	2,202	18,827	94,1	613	84,5	5741	92,2	3752
14	2	2,36	1,52	1,15	16,91	0,331			0,133	20,705	94,5	514	93,2	464	95,9	375
15	2	0,64	6,37	2,36	70,61	0,94	13,009	32,246	17,582	32,164	97,8	937	93,6	6761	99,2	356
16	2	1,52	3,06	2,21	45,55	0,483	16,244	24,841	5,642	22,753	93	400	95,7	1235	98,9	974
17	2	0,66	3,18	4,5	28,72	0,75	17,245	30,966	12,838	24,681	94,4	416	95,9	2705	98,8	1189
18	2	0,68	0,91	9,58	47,84	0,412	33,054	42,056	4,448	25,981	98,4	877	94,8	7962	99,2	5399
19	2	1,52	1,31	6,59	31,84	0,07	11,110	22,941	9,082	27,112						
20	2	1,52	1	12,4	33,48	0,02	20,479	30,470	8,685	39,152	97,4	706	96	7214	98,8	2921
21	2	1,3	4,63	13,8	191,1	0,33	9,727	19,077	16,48	42,244	88,1	457	83,9	1878	95,8	1498
22	2	0,67	2,18	2,03	13,23	0,256	14,443	16,470	18,542	18,994	99,3	923	98,4	2453	99,3	1363
20	2	1,33	2,65	2,15	12,6	0,024	8,501	21,249	6,924	19,696	73,5	338	97,8	1829	98,8	910
25	2	1,34	0,72	5,08	20,92	0,067	41,609	47,304	2,014	14,113	21,3	487	53,6	238	67,5	2926
27	2	1,65	1,44	2,28	8,867	0,38			7,45	24,699	98,6	733	85,9	3422	99,6	3134

Anexo 6. Hemograma dos pacientes crônicos

Pacientes	Grupos	WBC 10 ³ /UL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	RBC 10 ⁶ /uL	HGB g/dL	HCT %	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	PLT 10 ³ /uL	MPV (fL)
1	1	4,74	2,51	1,67	0,448	0,62	0,053	5,3	12,7	39,1	73,8	24,0	32,5	14,4	250	7,32
3	1	6,30	4,11	1,90	0,196	0,68	0,32	4,32	13,4	38,1	88,3	31	35,1	11,5	178	7,79
4	1	4,65	3,07	1,18	0,27	0,05	0,04	4,15	13,5	38,5	92,6	32,6	35,2	13,5	260	7,8
5	1	7,54	4,52	2,2	0,438	0,279	0,096	6,03	18,8	52,4	86,8	31,1	35,8	10,6	258	6,24
6	1	6,38	4,01	1,67	0,524	0,127	0,049	4,41	11,7	36,2	82,2	26,5	32,2	21,5	235	7,13
7	1	7,96	4,29	3,12	0,26	0,11	0,05	4,57	11,3	35,4	77,4	24,8	32,1	13,5	306	6,7
8	1	5,67	2,49	2,25	0,666	0,208	0,058	4,85	14,5	41,5	85,5	30	35	11,1	225	8,73
9	1	4,8	2,75	1,73	0,363	0,282	0,026	3,79	10,5	31	81,7	27,6	33,7	15,7	326	7,64
10	1	8,63	4,68	2,66	0,729	0,483	0,81	5,09	15,1	45,6	89,6	29,8	33,2	12,3	279	7,54
26	1	5,37	2,68	2,08	0,33	0,1	0,06	5,69	16,3	46,5	81,7	28,7	35,1	12,5	213	8,1
28	1	3,91	2,3	1,22	0,19	0,06	0,04	5,42	15,2	45	83,1	28,1	33,8	12,4	186	10,3
29	1	5,86	3,49	1,83	0,378	0,07	0,083	4,47	12,2	37	82,7	27,4	33,1	12,9	348	7,24
30	1	9,3	4,72	3,87	0,352	0,244	0,125	5,11	16,5	45,4	88,8	32,2	36,2	11	277	6,14
31	1	3,44	1,98	0,98	0,24	0,13	0,03	4,9	13,3	40,4	82,5	27,2	33	13	199	8,5
32	1	7,75	4,11	2,92	0,396	0,189	0,132	4,51	14	39,9	88,5	31,2	35,2	11,5	305	6,93
11	2	3,2	1,42	1,22	0,2	0,21	0,04	5,12	14,2	42,3	82,6	27,7	33,5	13,9	235	6,5
12	2	6,83	3,82	2,09	0,582	0,286	0,049	4,22	13,2	38,4	91,1	31,3	34,3	11	296	7,01
13	2	5,68	3,26	2	0,17	0,16	0,04	4,39	12,9	38	86,6	29,3	33,9	14,5	278	6,9
14	2	5,25	2,32	2,29	0,26	0,26	0,05	4,55	13,1	40,2	88,4	28,8	32,6	13,2	215	8,1
15	2	8,90	5,04	2,82	0,848	0,186	0,013	4,83	13,2	38,9	80,5	27,3	33,9	12,8	395	8,03
16	2	5,74	3,84	1,24	0,45	0,134	0,065	4,76	14,2	42,3	89,1	29,9	33,5	11,9	235	9,49
17	2	8,84	6,38	1,88	0,464	0,05	0,068	5,97	16,2	52,5	87,9	27,1	30,8	13,8	288	7,82
18	2	6,21	3,93	1,55	0,34	0,2	0,06	5,46	14,9	44,5	81,6	27,3	33,4	13,8	179	10,2
19	2	8,12	5,4	2,11	0,512	0,57	0,046	6,04	16,9	50,4	83,4	27,9	33,5	12,3	218	9,7
20	2	5,49	3,44	1,48	0,474	0,051	0,051	4,89	15,5	45	92,1	31,8	34,5	11,2	352	7,27
21	2	8,48	5,27	2,34	0,543	0,295	0,039	4,37	13,5	38	86,9	30,8	35,4	11,7	327	6,5
22	2	4,56	3,02	0,86	0,21	0,35	0,05	5,78	15,2	48,7	84,2	26,3	31,2	13,1	242	6,2
20	2	3,99	2,38	1	0,53	0,67	0,014	4,69	13,7	40,1	85,6	29,2	34,1	12,2	215	7,42
25	2	5,53	3,14	1,81	0,33	0,06	0,07	4,99	15,4	44,4	89	31	34,8	13,9	224	7,6
27	2	4,99	2,96	1,6	0,2	0,1	0,04	4,32	16,6	37,4	86,5	29,2	33,7	14,1	241	6,9

Anexo 7. Tabela com dados demográficos e laboratoriais dos controles de pacientes crônicos

Características dos controles				Adesão (%)				CD11a		CD11b		CD18	
Controles	Sexo	Idade	Etnia	Plaqueta Basal	Plaqueta c/ TB	Neutrófilos	Hemácias	% cel +	MIF	% cel +	MIF	% cel +	MIF
1	F	28	NC	17,753	36,791	25,966	8,101	98,1	946	92,1	6613	98,5	2963
3	F	22	C	9,864	26,615	22,221	2,058	82,2	1500	69,6	4248	82,7	2565
4	F	44	C	9,425	12,586	19,535	5,965	97,6	857	96,1	6024	98	3063
5	M	44	C	23,058	32,227	22,536	6,832	95,9	106	92,5	5202	97,6	2243
6	F	43	NC	10,178	23,208	14,4	2,161	85,1	1268	81,5	493	84,6	3027
7	F	47	NC	14,588	32,658	13,086	5,578	6,6	386	92	3357	96,8	1565
8	M	27	NC			19,29	7,388	51,3	472	92,5	1444	96,2	1266
9	F	52	C	17,866	21,847	22,664	4,24	85,3	1281	83,2	3692	85,8	3747
10	M	53	C	7,603	22,135	15,436	3,493	13,1	391	94	977	96,7	1123
26	M	47	NC	13,861	14,392	8,862	7,986	86,3	884	78,1	4295	87	1742
28	M	39	NC	8,255	52,13	7,988	7,522	53,4	395	90,5	1546	99	2559
29	F	21	NC	36,26	56,459	20,173	10,702	97,2	939	90	3924	97,4	2322
30	M	53	C	18,268	68,549	10,466	14,442	97,6	780	92,6	3319	98,6	1727
31	F	51	C	55,94	57,403	10,213	7,866	93	649	91,2	2607	96,7	2570
32	F	30	C			17,164	10,868	96,6	933	88,8	4550	99,5	2941
11	M	42	NC	21,857	23,813	27,376	6,823	99,6	1009	98,5	8654	99,7	5296
12	F	67	C	8,304	14,649	22,973	7,458	99,6	1591	96,9	3504	99,7	2023
13	F	39	C	22,223	52,350	20,279	3,19	97,5	610	96,4	5338	98,3	4045
14	F	55	C	18,543	47,973	24,324	0,973	95,6	729	96,9	601	96,3	4695
15	F	56	NC	11,681	14,951	31,55	16,3	95,5	1047	92,2	9274	94	4491
16	F	63	C			13,218	4,548	99,1	1235	92,7	2699	99,2	2661
17	F	72	NC	8,293	21,564	30,227	10,143	95,9	106	92,5	5202	97,6	2246
18	M	40	C	14,540	22,022	16,392	5,862	99,3	1002	98,5	9229	99,5	4305
19	M	30	NC			18,032	9,8						
20	M	43	NC	8,637	11,694	19,816	14,667	98	1073	91,2	2616	98,1	2154
21	F	31	C	9,041	15,015	32,655	8,996	98,8	1082	95,6	8021	99,1	3386
20	M	34	NC	16,593	30,877	18,844	11,028	98	1073	91,2	2616	98,1	2154
22	F	69	C	35,202	37,892	16,688	8,846	97,3	761	94,5	3676	99	2986
25	M	39	C	40,356	44,138	15,842	1,659	25,8	375	58	22,000	51	3186
27	F	22	NC			17,137	7,63	99	816	93,6	3676	99,5	2954

Anexo 8. Hemograma dos controles de pacientes crônicos

Controles	WBC 10 ³ /UL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	RBC 10 ⁶ /ul	HGB g/dL	HCT %	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	PLT 10 ³ /uL	MPV (fL)
1	6,37	4,2	1,68	0,28	0,09	0,03	4,13	11,6	34,6	83,8	28,1	33,6	14,9	241	7,7
3	6,05	3,81	1,8	0,327	0,08	0,034	4,64	13,2	38,6	83,2	28,3	34	11,6	210	6,49
4	5,58	3,41	1,58	0,25	0,17	0,06	4,37	12,2	36	82,5	27,9	33,8	13,2	332	7,2
5	4,26	2,36	1,47	0,293	0,107	0,028	5,08	14,8	44,1	86,8	29,1	33,5	13,4	264	10,2
6	4,06	2,5	1,2	0,285	0,046	0,029	4,03	11,1	34,7	86,1	27,4	31,8	12,5	293	6,81
7	4,44	1,99	1,86	0,368	0,124	0,101	4,64	13,9	41,3	89	29,9	33,6	11,9	165	12,1
8	6,28	4,09	1,46	0,354	0,326	0,066	4,83	15,4	43,4	89,9	32	35,6	10,8	238	9,96
9	5,57	3,7	1,36	0,316	0,31	0,068	5,1	13,5	41,4	81,2	26,6	32,7	11,9	247	7,46
10	7,59	4,37	2,02	0,29	0,823	0,087	4,76	13,4	39,3	82,7	28,2	34,1	12,3	234	6,6
26	9,68	5,6	3,09	0,61	0,16	0,09	4,77	15	45,8	96,2	31,4	32,7	13,2	361	8,3
28	5,89	3,61	1,67	0,35	0,1	0,04	4,63	15,2	45,1	97,4	32,9	33,8	11,9	204	8,5
29	3,57	1,64	1,39	0,289	0,175	0,072	4,68	9,72	30,7	65,6	20,7	31,6	15,3	406	6,55
30	9,25	5	3,69	0,245	0,218	0,094	5,32	16,3	45,3	85,2	30,6	36	11	375	5,68
31	5,87	3,84	1,56	0,15	0,18	0,03	4,42	13,4	40,2	90,8	30,4	33,4	12	348	7,3
32	8,63	5,9	1,89	0,532	0,21	0,1	4,5	13,1	37,6	83,5	29,1	34,8	12,2	407	6,75
11	5,7	3,27	1,8	0,3	0,18	0,05	5,53	15,8	46,5	84	28,5	33,9	13,6	163	8,3
12	5,79	3,23	1,79	0,536	0,184	0,049	4,66	14,4	43	92,2	31	33,6	11,2	332	6,94
13	5,77	3,94	1,07	0,32	0,3	0,03	4,32	12,6	37,5	86,6	29,1	33,6	13,9	354	6,3
14	5,23	3,38	1,29	0,24	0,17	0,04	5,03	14	41,7	82,9	27,9	33,6	13,7	232	9,2
15	5,37	3,19	1,58	0,32	0,15	0,03	5,4	12,5	35,5	71,3	23,1	32,4	15,3	227	6,5
16	6,51	3,22	1,71	0,369	1,15	0,56	4,71	12,8	39,7	84,3	27,2	32,3	12,6	305	6,99
17	4,41	2,34	1,68	0,227	0,088	0,073	4,43	13,1	39,2	88,6	29,5	33,3	11,8	279	9,23
18	4,75	2,8	1,35	0,26	0,19	0,08	5,21	15,1	42,9	82,3	28,9	35,1	13,4	250	7
19	8,49	4,79	2,94	0,566	0,146	0,045	4,85	14,2	41	84,6	29,2	34,5	12,3	256	7,26
20	6,56	4,33	1,41	0,576	0,185	0,057	4,89	15,6	44,5	91	31,9	35	11,3	221	7,35
21	8,3	5,29	2,17	0,665	0,152	0,018	4,79	14,3	39,5	82,6	29,9	36,2	11,3	381	6,86
20	3,73	1,79	1,4	0,432	0,058	0,039	4,74	14,1	42,1	88,7	29,6	33,4	11,3	203	11
22	5,05	3,25	1,21	0,19	0,21	0,09	4,46	14,5	43	96,4	32,4	33,6	14,1	225	7,2
25	6,96	4,79	1,49	0,39	0,09	0,04	5,26	16,6	45,8	87,2	31,5	36,1	14,1	254	6,6
27	3,4	1,37	1,47	0,248	0,278	0,042	4,95	13,6	42,6	86	27,4	31,8	13,7	235	8,98

Anexo 9. Tabela com dados demográficos e laboratoriais dos pacientes com TEV agudo

Características dos pacientes Agudos				Adesão (%)			
Pacientes	Sexo	Idade	Etnia	Plaqueta Basal	Plaqueta com TR	Neutrófilos	Hemácias
1	F	50	C	33,138		12,032	2,229
2	F	28	NC			20,157	1,48
3	F	48	C			89,138	4,081
4	M	50	C	20,672	29,192	13,883	11,064
5	M	30	C	26,753	70,104	30,335	7,148
6	M	69	C	31,016	25,317	24,545	4,847
8	M	54	C			29,781	25,297
9	M	51	C	29,974	38,445	38,892	16,306
10	M	40	NC	11,952	40,194	14,284	10,836
11	F	42	NC			38,303	4,633

Pacientes	WBC 10 ³ /UL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	RBC 10 ⁶ /ul	HGB g/dL	HCT %	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	PLT 10 ³ /uL	MPV (fL)
1	6,4	3,81	2,05	0,414	0,072	0,057	4,28	13,3	40,1	93,7	31,1	33,2	11,4	247	9,54
2	5,39	2,41	2,4	0,441	0,1	0,033	3,67	11,9	34	92,9	32,6	35,1	11,6	194	8,68
3	14,1	10,1	2,99	0,591	0,353	0,094	4,19	12	35,3	84	28,5	33,9	12,7	325	8,28
4	3,19	2,01	0,822	0,205	0,106	0,053	3,2	12,1	35,6	111	37,9	34	15,1	223	7,35
5	5,28	2,65	2,11	0,408	0,075	0,039	5,15	14,9	42,6	82,6	28,9	35	11,1	232	7,33
6	10,5	7,16	1,93	0,698	0,639	0,097	3,86	11,6	34,2	88,7	30,1	33,9	12,3	232	9,42
8	6,22	3,97	1,66	0,34	0,12	0,03	4,3	12,8	36,9	85,9	29,8	34,7	13,1	304	7
9	6,58	3,96	2,07	0,35	0,09	0,04	4,39	13,8	37,7	85,9	31,4	36,6	13,3	324	6,6
10	9,72	6,18	2,46	0,606	0,391	0,082	4,8	14,7	43	89,6	30,7	34,2	11,1	321	6
11	10,2	7,01	2,66	0,295	0,12	0,071	4,2	12,4	36,2	86,1	29,5	34,3	11,8	410	6,54

Legendas: C – caucasóide; NC – não caucasóide

Anexo 10. Tabela com dados demográficos e laboratoriais dos controles de pacientes com TEV agudo

Características dos controles (Agudos)				Adesão (%)			
Controles	Sexo	Idade	Etnia	Plaqueta Basal	Plaqueta com TB	Neutrófilos	Hemácias
1	F	46	C			13,214	4,735
2	F	32	NC			19,108	1,01
3	F	50	C			26,239	2,294
4	M	49	C	25,059	27,84	18,043	4,819
5	M	30	C	23,192	27,972	23,048	4,5
6	M	69	C	24,894	73,479	15,649	3,411
8	M	42	C	20,071	30,823	8,079	9,636
9	M	53	C	16,719	32,905	36,041	19,928
10	M	43	NC	9,914	29,475	13,067	6,620
11	F	38	NC			16,669	3,104

Controles	WBC 10 ³ /UL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	RBC 10 ⁶ /ul	HGB g/dL	HCT %	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW %	PLT 10 ³ /uL	MPV (fL)
1	5,34	3,48	1,38	0,367	0,048	0,061	5,05	15,1	45	89,1	29,8	33,5	11,7	193	7,68
2	7,67	5,29	1,75	0,535	0,038	0,058	4,23	12,6	36,5	86,2	29,7	34,5	12	288	7,17
3	6,07	4,02	1,37	0,425	0,198	0,063	4,22	13,1	38	90	31	34,5	11,5	232	8,19
4	4,87	3,02	1,43	0,317	0,071	0,042	4,95	15,1	43,6	88,1	30,6	34,7	11,7	238	10
5	5,66	3,68	1,4	0,515	0,046	0,023	6,23	17,1	51,4	82,5	27,5	33,3	11,9	308	7,41
6	4,96	3,09	1,25	0,49	0,078	0,045	4,9	15,2	43,3	88,3	31	35	11,3	264	7,49
8	4,27	1,94	1,58	0,474	0,181	0,091	5,43	14,8	43,9	81	27,3	33,7	13,3	220	8,99
9	5,9	3,49	1,89	0,24	0,15	0,9	5,51	16	45,8	83,2	29	34,8	13,3	263	7,6
10	5,26	3,05	1,65	0,357	0,122	0,075	5,27	14	43,1	81,8	26,5	32,5	12,1	228	8,47
11	10,3	6,47	2,88	0,576	0,327	0,093	4,55	13,7	38,3	84,2	30,1	35,8	12	342	6,7

Legendas: C – caucasóide; **NC** – não caucasóide