



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**  
**Pós Graduação em Ciências da Saúde-Patologia Humana**

Gláucia Aparecida Domingos Resende

**EXPRESSÃO DE FATOR TECIDUAL POR MONÓCITOS EM**  
**PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME**

UBERABA – MG

2018

Gláucia Aparecida Domingos Resende

**EXPRESSÃO DE FATOR TECIDUAL POR MONÓCITOS EM  
PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em “Ciências da Saúde-Patologia Humana” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção de Título de doutor em Ciências da Saúde-Patologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins

Co-orientador: Sheila Soares Silva/Fernanda Bernadelli

UBERABA – MG

2018

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro

R341e Resende, Gláucia Aparecida Domingos  
Expressão de fator tecidual por monócitos em pacientes com  
doença falciforme / Gláucia Aparecida Domingos Resende. -- 2018.  
74 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018  
Orientador: Paulo Roberto Juliano Martins

1. Anemia falciforme. 2. Tromboplastina. 3. Trombose. 4. Mo-  
nócitos. 5. Hemólise. I. Martins, Paulo Roberto Juliano. II. Univer-  
sidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.155.194

Gláucia Aparecida Domingos Resende

**EXPRESSÃO DE FATOR TECIDUAL POR MONÓCITOS EM  
PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em “Ciências da Saúde-Patologia Humana” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção de Título de doutor em Ciências da Saúde-Patologia Humana.

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Juliano Martins  
**Orientador**  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Data da Aprovação** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Helio Moraes de Souza  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dra. Márcia Maria Ferreira  
Cursos Aprov

---

Prof. Dr. André Rolim Belisário  
Fundação Hemominas

---

Prof. Dr. Gilberto Pereira  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Uberaba/MG

2018

Dedico á minha família por acreditarem que eu poderia chegar tão longe, estando ao meu lado em todos os momentos, fazendo valer a pena cada passo dessa jornada.

## AGRADECIMENTO

---

Agradeço a Deus, que nos fortalece e ampara quando acreditamos não mais conseguir.

Ao meu orientador, Dr Paulo Roberto Juliano Martins, pelo apoio, pela dedicação e pela presteza no auxílio às atividades e discussões, sempre valiosas, colocando a disposição todos os quesitos necessários para que este trabalho fosse concluído.

À Prof. Dr. Sheila Soares Silva, pelo apoio e colaboração, participando da idealização deste projeto, redação e correção da tese.

Ao Dr Hélio Moraes de Souza, pela confiança em oferecer oportunidades que permitiram meu crescimento profissional, sempre contribuindo com ideias enriquecedoras.

À amiga Fernanda Bernadelli de Vito, pela amizade, empenho e colaboração na execução dos deste projeto.

À amiga, irmã Aline Menezes, companheira, parceira de todas as horas, pela colaboração, amizade e auxílio.

À amiga Alexandra Leal, pelo apoio, carinho e presteza sempre que necessário.

Aos colegas pós -graduandos do serviço de hematologia, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Gilberto de Araújo Pereira, por ter realizado as análises estatísticas.

Às estagiárias Bruna de Urzedo Silva e Camila Maria Crispim que colaboraram de forma significativa para a captação dos doadores, incluídos neste estudo.

Aos funcionários dos setores técnicos, administrativos, recepção, vigilância e limpeza do Hemocentro Regional de Uberaba, pela gentileza e pela colaboração sempre que se fez necessário.

Em especial, aos pacientes e doadores de sangue que aceitaram participar deste projeto.

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme é uma desordem hemolítica com frequentes alterações dos mecanismos pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos, com consequente risco trombótico. **Objetivo:** Quantificar a porcentagem de monócitos que expressavam fator tecidual em indivíduos com doença falciforme e correlacionar com marcadores de hemólise e coagulação. **Material e métodos:** Foram avaliados 46 indivíduos com doença falciforme Hb (SS, SC, SBeta Talassemia e SF), fora de crise, com e sem uso de hidroxiureia e 26 doadores de sangue Hb AA. Foram realizadas as análises dos monócitos fator tecidual positivo por citometria de fluxo, dos marcadores de hemólise (hemoglobina, desidrogenase láctica, reticulócitos, bilirrubinas) e coagulação (plaquetas, fibrinogênio, tempo de protrombina, tempo de trombolastina parcial ativada e D dímero). **Resultados:** A idade média da população estudada foi 32 anos. Observamos maior porcentagem de monócitos fator tecidual positivo nos pacientes comparados aos controles (16,4% versus 6,4%,  $p < 0,0001$ ). Verificamos também correlação deste fator com os marcadores de hemólise e coagulação, sendo negativa com os níveis de hemoglobina e positiva com a porcentagem de reticulócitos, níveis de desidrogenase láctica, tempo de protrombina, bilirrubina indireta, fibrinogênio, contagem de plaquetas, monócitos e níveis plasmáticos D dímero. **Conclusão:** Pacientes com doença falciforme apresentam um estado pró-trombótico mesmo fora de crise e as correlações deste fator com os marcadores de hemólise sugerem que este evento primário na doença falciforme pode estar relacionado à ativação e maior expressão de monócitos fator tecidual positivo, favorecendo o estado de hipercoagulabilidade, predispondo estes pacientes a complicações como síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial pulmonar, complicações comuns e graves na doença falciforme.

---

**Palavra chave:** Doença falciforme, fator tecidual, trombose, monócitos, hemólise

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell disease is a hemolytic disorder with frequent changes in the procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic mechanisms, with a consequent thrombotic risk.

**Objective:** To evaluate the percentage of tissue factor-positive monocytes in individuals with sickle cell disease (SCD) and to correlate with hemolysis and coagulation markers.

**Materials and methods:** We studied 46 individuals with sickle cell disease Hb (SS, SC, S $\beta$  and SF), in a steady state, with and without hydroxyurea treatment, and 26 donors of Hb AA blood. We evaluated tissue factor (CD142) expression on monocytes, hemolysis markers (hemoglobin, lactate dehydrogenase, reticulocytes, bilirubins) and coagulation (platelets, fibrinogen, prothrombin time, activated partial thromboplastin time and D dimer). **Results:** The mean age of the study population was 32 years. We observed a higher mean percentage of TF positive monocytes in patients compared to controls (16.4% versus 6.4%,  $p < 0.0001$ ). We also found a correlation of this factor with markers of hemolysis and coagulation, being negative with hemoglobin levels and positive with % of reticulocytes, levels of lactate dehydrogenase, ferritin, PT, indirect bilirubin, fibrinogen, platelet counting, monocytes and D dimer plasma levels. **Conclusion:** Patients with sickle cell disease have a prothrombotic state, even when out of crisis, and the correlations of this factor with markers of hemolysis suggest that this primary event in sickle cell disease may be related to activation and greater expression of TF in monocytes, favoring the hypercoagulability state, predisposing these patients to complications such as acute chest syndrome, stroke and pulmonary arterial hypertension as documented in these individuals, common and severe complications in the sickle cell disease

---

Key-words: Sickle cell disease, tissue factor, thrombosis, monocytes



## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Molécula de Hemoglobina.....	15
<b>Figura 2-</b> Representação dos diferentes tipos de hemoglobinas com seu período de desenvolvimento.....	16
<b>Figura 3-</b> Representação dos diferentes tipos de hemoglobinas e sítios de produção durante o desenvolvimento.....	17
<b>Figura 4:</b> Polimerização da Hemoglobina S.....	19
<b>Figura 5</b> – Vaso-oclusão.....	20
<b>Figura 6</b> – Modelo da cascata de coagulação baseada na superfície celular.....	23
<b>Figura 7</b> – Estrutura do fator tecidual.....	27
<b>Figura 8</b> - Estratégia de <i>gates</i> para seleção de monócitos que expressam fator tecidual. ....	37
<b>Figura 9</b> – Quantificação dos monócitos de pacientes e controles.....	42
<b>Figura 10</b> – Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo.....	43
<b>Figura 11</b> - Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo no grupo de pacientes com DF em relação à idade: .....	43
<b>Figura 12</b> - Monócitos fator tecidual positivo nos pacientes com DF, quanto ao sexo.....	44
<b>Figura 13:</b> Expressão de fator tecido por monócitos em relação ao genótipo.....	45
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de monócitos fator tecidual monócitos ao uso de hidroxiureia.....	45

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Dados laboratoriais referentes aos marcadores de hemólise dos grupos com doença falciforme (paciente) e controle (doadores de sangue saudáveis). ..... 41

**Tabela 2:** Dados laboratoriais referentes aos marcadores da coagulação dos grupos pacientes e controles..... 41

**Tabela 3.** Correlação da expressão de monócitos fator tecidual positivo (FT+) e marcadores de hemólise e coagulação ..... 46

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

**AVC** – Acidente vascular cerebral

**AVCh**- Acidente vascular cerebral hemorrágico

**AVCi** – Acidente vascular cerebral isquêmico

**CD 36** – Cluster of differentiation 36

**DF**- Doença Falciforme

**EP** – Embolia pulmonar

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**ET-1** - Endotelina 1

**FvW** - Fator de von Willebrand

**FII** – Fator II

**FIX** – Fator IX

**FIXa** – Fator IX ativado

**FT** – Fator tecidual

**FV** – Fator V

**FVa** – Fator V ativado

**FVII** – Fator VII

**FVIIa** – Fator VII ativado

**FVIII** – Fator VIII

**FVIIIa** – Fator VIII ativado

**HbA** – Hemoglobina A

**HbA1** – Hemoglobina A1

**HbA2** – Hemoglobina A2

**HbS/ $\alpha$  talassemia**- Hemoglobina S associada com alfa talassemia

**HbS/ $\beta$ + thalassemia** - Hemoglobina S associada com talassemia beta (+)

**HbS/ $\beta$ 0 thalassemia** - Hemoglobina S associada com talassemia beta (0)

**HbSC**- Hemoglobina SC

**HbSD**- Hemoglobina SD

**HbS**-Hemoglobina S

**HbSS** - Anemia falciforme em homozigose

**Hc** – Hemácias

**NO** – Nitric Oxído nítrico

**PS** - Fostidilserina

**TFPI** – Inibidor da via do fator tecidual

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 A HEMOGLOBINA HUMANA.....	14
1.2 DOENÇA FALCIFORME .....	16
1.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME.....	17
<b>1.3.1 Polimerização da Hemoglobina</b> .....	17
<b>1.3.2 Vaso-oclusão</b> .....	19
<b>1.3.3 Disfunção endotelial</b> .....	20
1.3.4 <b>Hemostasia</b> .....	22
<b>1.3.5 Hipercoagulabilidade na Doença Falciforme</b> .....	23
1.4 MONÓCITOS .....	25
1.5 FATOR TECIDUAL (FT).....	26
<b>2 OBJETIVO</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	32
<b>3.1.1. Aspectos éticos</b> .....	32
<b>3.1.2. Casuística</b> .....	32
<b>3.1.3. Critérios de inclusão</b> .....	32
<i>3.1.3.1 Pacientes</i> .....	32
<i>3.1.1.2 Controles:</i> .....	32
<b>3.1.4. Critérios de exclusão</b> .....	33
<i>3.1.4.1 Pacientes</i> .....	33
<i>3.1.4.2 Controles</i> .....	33
3.2 PROCEDIMENTOS GERAIS .....	33
<b>3.2.1. Coleta e processamento das amostras biológicas</b> .....	33
<b>3.2.2. Variáveis avaliadas</b> .....	34
<i>3.2.2.1 Variáveis demográficas</i> .....	34
<i>3.2.2.2 Variáveis laboratoriais</i> .....	34

<b>3.2.3 Análises dos parâmetros laboratoriais de hemólise coagulação</b> .....	34
<b>3.2.4 Análise da porcentagem de monócitos fator tecidual positivo</b> .....	35
<b>3.2.5 Análise estatística</b> .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	39
4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ESTUDADA .....	39
4.2. PARÂMETROS LABORATORIAIS .....	39
<b>4.2.1. Marcadores de hemólise</b> .....	39
<b>4.2.2. Marcadores de coagulação</b> .....	40
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL.....	41
4.4. PORCENTAGEM DE MONÓCITOS FATOR TECIDUAL POSITIVO .....	42
<b>4.4.1 Porcentagens monócitos fator tecidual positivo e sua correlação com a idade</b> .....	42
<b>4.4.2 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao sexo</b> .....	43
<b>4.4.3 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao subtipo</b> .....	44
<b>4.4.4 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao uso de hidroxiureia</b> .....	44
4.5. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATOR TECIDUAL COM MARCADORES DE HEMÓLISE E COAGULAÇÃO .....	45
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	56

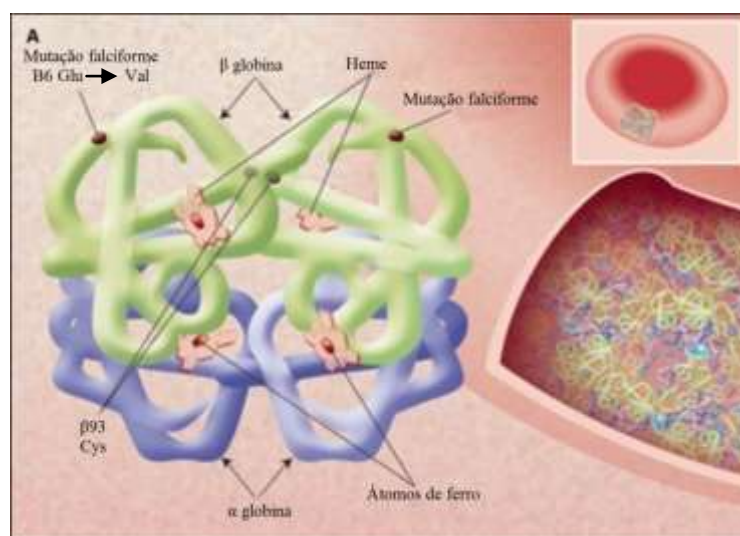
# *INTRODUÇÃO*



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A HEMOGLOBINA HUMANA

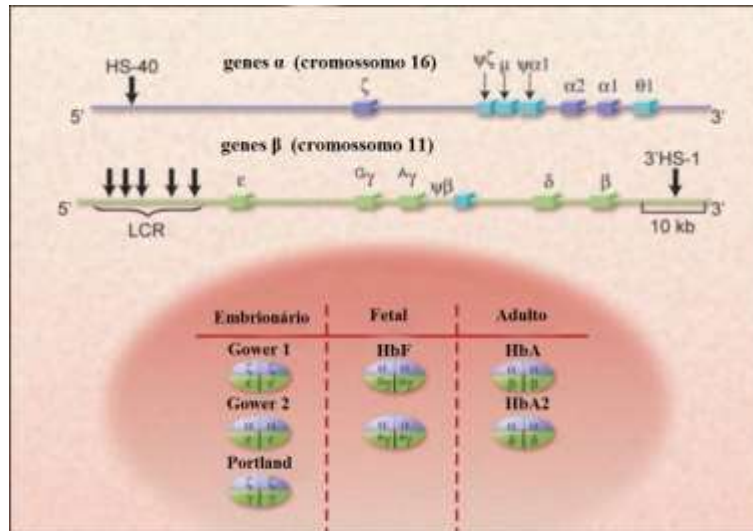
A hemoglobina (Hb) humana (Figura 1) presente no interior das hemácias (Hc) é uma proteína tetramérica, globular com peso molecular de 64.500 dáltons, constituídas por quatro cadeias globínicas polipeptídicas, sendo um par de cadeias do tipo alfa (alfa- $\alpha$  e zeta- $\xi$ ) e o outro do tipo não-alfa (beta- $\beta$ , delta- $\delta$ , gama- $\gamma$  e épsilon- $\epsilon$ ). Cada uma se une a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme), que tem como função principal receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos, mas também com capacidade de interagir especificamente com outros três gases: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), que desempenham papéis biológicos importantes ( GENTIL NETO et al, 2003).



**Figura 1:** Molécula de hemoglobina. Fonte: Adaptado de Schechter, 2008

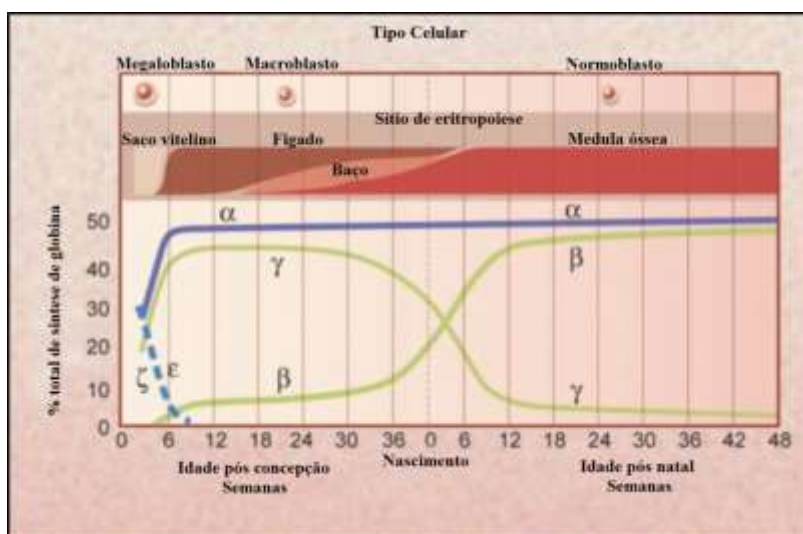
A globina é constituída por uma sequência de aminoácidos, onde as cadeias alfa possuem 141 aminoácidos e as não alfa 146, que se combinam entre si e dão origem a diferentes hemoglobinas: Gower-1 ( $\xi_2$  e  $\epsilon_2$ ), Portland ( $\xi_2$   $\gamma_2$ ) e Gower-2 ( $\alpha_2$   $\epsilon_2$ ) (**fase embrionária**), Hb Fetal ( $\alpha_2$   $\gamma_2$ ), HbA2( $\alpha_2$   $\delta_2$ ) (**fase fetal**), Hb A2 ( $\alpha_2$   $\delta_2$ ) e Hb A1( $\alpha_2$   $\beta_2$ ) (**pós nascimento**) (GENTIL NETO et al, 2003; SCHECHTER, 2008) (Figura 2).





**Figura 2:** Representação dos diferentes tipos de hemoglobinas com seu período de desenvolvimento. **Fonte:** Adaptado de Schechter, 2008.

No período fetal há o nítido predomínio da síntese de Hb fetal, seguida de pequena quantidade de HbA1. No adulto, esta Hb representa uma proporção de 97%, seguida de 2% de A2 e 1% de Fetal que perdura por toda a vida. (GENTIL NETO et al, 2003; SCHECHTER, 2008) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação dos diferentes tipos de hemoglobinas e sítios de produção durante o desenvolvimento. **Fonte:** Adaptado de Schechter, 2008.

## 1.2 DOENÇA FALCIFORME

Doença falciforme (DF) é o termo usado para definir alterações genéticas caracterizadas pela presença da hemoglobina S (HbS), decorrente de uma mutação pontual no sexto códon do cromossomo 11 no gene da  $\beta$  globina (Glu6Val,  $\beta$ S), onde a troca do ácido glutâmico por valina promove alterações estruturais e físico-químicas, acarretando a síntese dessa hemoglobina variante. (KIMURA et al 2008; ARDUINI et al, 2017; WARE et al, 2017). A anemia falciforme (SS) consiste em um estado de homozigose da HbS, sendo a forma mais comum e grave da doença, podendo ainda haver associação com outras variantes da Hb ( HbC, HbD, entre outras) e talassemias (HbS/ $\beta^0$  thalassemia, HbS/ $\beta^+$  thalassemia e HbS/ $\alpha$  thalassemia) (FIGUEIREDO, 2015; MIKOB et al., 2017; WARE et al, 2017).

Em condições de baixas concentrações de oxigênio, a HbS sofre alterações estruturais, modificando a morfologia discoide do eritrócito para forma de foice. A fisiopatologia da doença é complexa e multissistêmica, envolve células do sistema imune e cursa com estado inflamatório crônico, disfunção endotelial, hemólise e ativação da coagulação que culminam com quadros recorrentes de vaso oclusão, levando à isquemia/lesão de reperfusão e danos aos órgãos (BECHER et al, 2006; BARABINO et al , 2010; ODIEVRÈ et al, 2011). As principais manifestações clínicas incluem anemia, icterícia, crises algicas, síndrome torácica aguda (STA), osteonecrose, priapismo, hipertensão pulmonar, insuficiência renal, retinopatia, úlceras de perna, acidente vascular cerebral (AVC) e alterações cardíacas (STYPULKOWSKI et al, 2010).

Anualmente, cerca de 300.000 bebês nascem com DF por ano no mundo e há previsão de que 400.000 nascerão com a doença até 2050. A maioria dos casos está concentrada na África Subsaariana e na Índia, regiões de baixa renda, com altos índices de mortalidade e morbidade em crianças com esta hemoglobinopatia. Nos Estados Unidos, a doença afeta de 80.000 a 100.000 pessoas, com uma incidência de aproximadamente 1/500 na comunidade afro-americana (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017).

No Brasil há maior incidência na população afrodescendente, embora não seja exclusiva desta. Dados dos programas estaduais de triagem neonatal mostram que no estado da Bahia a incidência da DF é de 1:650, enquanto a do traço falciforme é de 1:17, entre os nascidos vivos. No Rio de Janeiro, 1:1300 para a doença e 1:20 de traço (MINISTERIO DA

SAÚDE, 2008) Em Minas Gerais, conforme dados do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) entre 1998 e maio de 2017, foram diagnósticas 3.472 crianças com DF, cerca de 180 casos por ano com incidência estimada em 1:1.400, cerca de 70 casos a cada 100 mil nascidos vivos (CEHMOB, 2017).

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME

#### 1.3.1 Polimerização da Hemoglobina

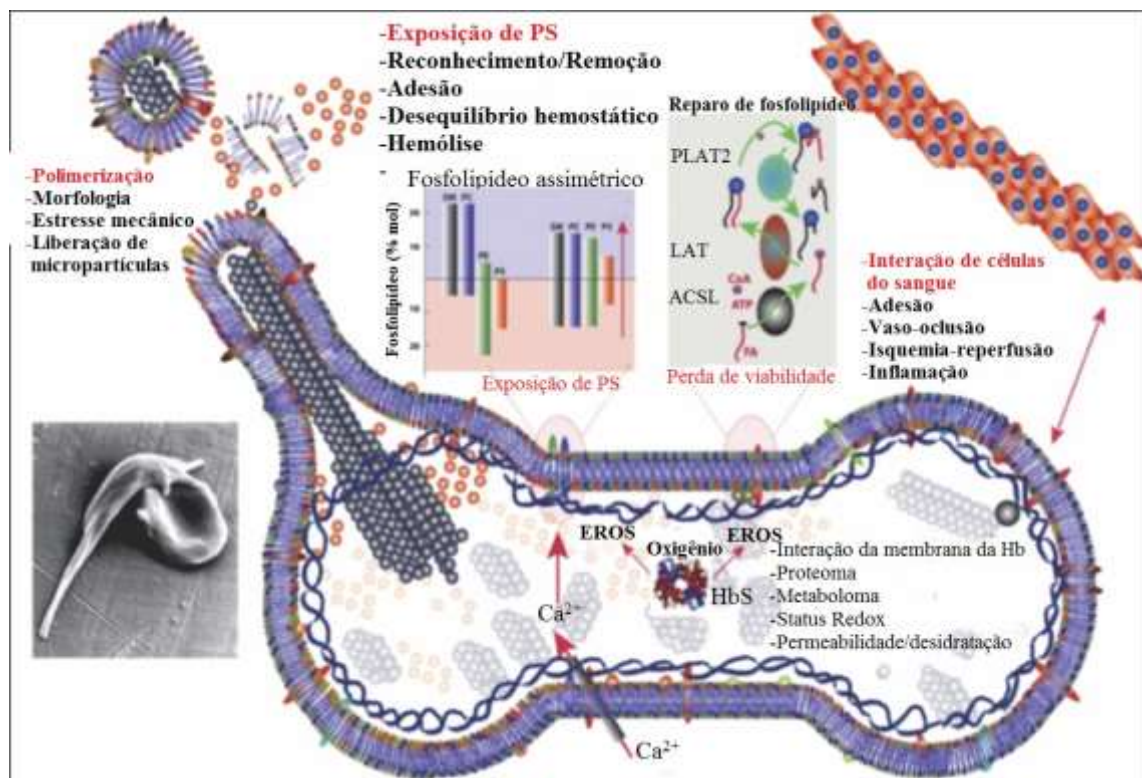
A síntese da hemoglobina S (HbS) é resultante de uma mutação pontual de uma base nitrogenada no DNA (GAC→GTC) no sexto códon, cromossomo 11. Em decorrência disso, surge uma troca de ácido glutâmico por valina na cadeia da  $\beta$  globina, (IGRAM, 1956). Esta mutação acarreta alterações físico-químicas na molécula de Hb, modificando sua estabilidade molecular e alterando a morfologia dos eritrócitos (FRENETTE and ATWEH, 2007; ODIEVRÈ et al, 2011).

O ácido glutâmico é hidrofílico e mais solúvel em água, enquanto a valina é hidrofóbica e menos solúvel. A troca destes aminoácidos provoca alteração da carga elétrica da Hb, ocasionando a formação de polímeros quando em baixa tensão de  $O_2$  (ODIEVRÈ et al, 2011). A valina interage com os receptores fenilalanina e leucina desencadeando a formação de polímeros, compostos formados por 14 fibras de desoxihemoglobinas enroladas entre si, constituindo uma estrutura alongada na forma de eixo axial no interior da célula (STEINBERG, 1998). Estas modificações fazem com que a hemácia perca sua forma de disco bicôncavo, adquirindo o formato de foice e reduzindo a meia vida, que é de 120 dias para aproximadamente menos de 20 dias (BARABINO et al, 2010). A formação destes polímeros acarreta uma sequência de outras anormalidades celulares, com papel chave na fisiopatologia da DF (GENTIL NETO et al, 2003 ; IQBAL et al, 2013).

O ciclo de polimerização e despolimerização provoca a desidratação da célula por alterar a permeabilidade da membrana. Estas alterações resultam em desregulação da bomba de sódio e potássio, com aumento de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) intracelular e efluxo de potássio ( $K^+$ ) e água, com conseqüente aumento da viscosidade do sangue e densidade no interior do

eritrócito. Como consequência, a Hb se torna desnaturada e a célula perde sua capacidade de deformabilidade, adquirindo a forma de foice, quando desoxigenada. Uma vez que a oxigenação é restaurada, a hemácia retorna à sua forma discoide. No entanto, os consequentes ciclos de formação e reversão dos polímeros podem acarretar a polimerização irreversível, tendo como consequência a hemólise intravascular (FRENETTE, ATWEH, 2007); BARABINO et al , 2010; VANDORPE et al, 2010).

Os polímeros podem ter impacto direto na membrana plasmática das hemácias, ocasionado instabilidade lipídica e exposição de epítomos de proteínas transmembrana, como a fosfatidilserina (PS) e CD36. A PS possui carga negativa, uma vez que é exposta ao meio extracelular, provocando alteração da capacidade adesiva das hemácias e contribui para as alterações hemostáticas e vaso-oclusão (ZAGO et al, 2007; FERRONE et al, 2013; SARAH et al, 2012) (Figura 3).



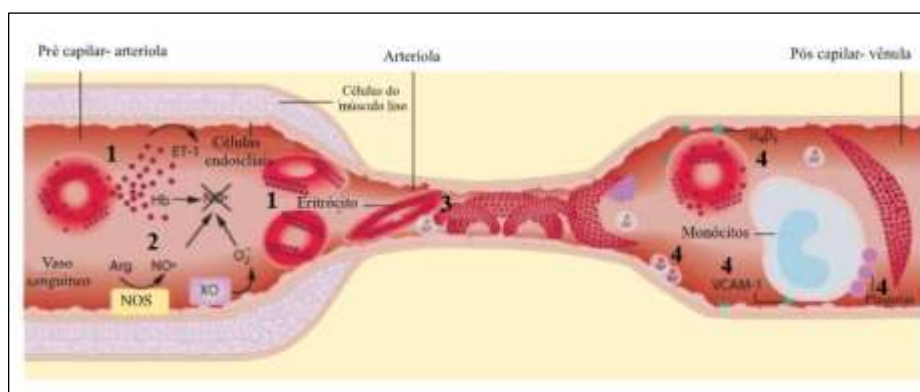
**Figura 4:** Polimerização da HbS – A formação de polímeros promove dano à membrana lipídica favorecendo a exposição da PS que resulta em reconhecimento e remoção de células falciformes, maior adesão das células ao endotélio, promovendo alterações da hemostasia e hemólise. As alterações da bicamada lipídica altera a permeabilidade da membrana, resultando na desregulação da bomba de sódio e potássio, com consequente aumento da viscosidade intracelular, desnaturação da Hb que perde a capacidade de deformabilidade, adquirindo a forma de foice. **Fonte:** Adaptado de Kuypers, 2014.

### 1.3.2 Vaso-oclusão

A vaso-oclusão é um processo complexo pelo qual ocorre a interrupção do fluxo de sangue dentro dos vasos por acúmulo de células e outros elementos que aderem ao endotélio.

Os fatores desencadeantes envolvem não apenas a polimerização, mas também vários outros eventos como: interação entre as hemácias falcizadas; aumento da viscosidade; diminuição do fluxo sanguíneo; ativação do endotélio, de mediadores inflamatórios, de neutrófilos, de monócitos e ativação/ agregação plaquetária. A adesão de células falciformes e neutrófilos ao endotélio tem sido citada como o passo inicial para a vaso-oclusão, contribuindo significativamente nas crises vaso-oclusivas (Figura 5) (BARABINO et al, 2010; ODIEVRÈ et al, 2011; MANWANI; FRENETTE, 2013).

A oclusão microvascular resulta em crises dolorosas agudas, podendo a oclusão macrovascular e microvascular ser a possível causa da falência de órgãos. A isquemia proveniente da oclusão cria de tal forma um feedback que amplifica todos os eventos, estimulando a ativação endotelial (MANWANI; FRENETTE, 2013; BARABINO et al, 2010).



**Figura 5:** Vaso-oclusão. (1) Polimerização da hemoglobina S e hemólise (2) Instabilidade vascular devido: Inativação de NO e indução de Endotelina-1 por hemoglobina livre, inativação de NO por superóxido gerado por xantina oxidase. (3) Obstrução vascular pré-capilar devido à rigidez dos eritrócitos, redução de fluxo, aumento da viscosidade (3) Inflamação induzida pela adesão de eritrócitos falcizados, leucócitos e agregação plaquetas-monócitos mediado por VCAM-1 e outras moléculas de adesão. **Fonte:** Adaptado de Hall et al, 2015.

### 1.3.3 Disfunção endotelial

O endotélio desempenha um papel importante na modulação do tonus vascular, liberando mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, regulando o fluxo de sangue dentro dos vasos. As células endoteliais produzem um importante vasodilatador, o óxido nítrico (NO) e vasoconstritores como endotelinas (CARDOSO et al, 1994; RAJEDRAN et al, 2013; SEPÚLVIDA et al, 2017).

Na DF, como consequência da hemólise intravascular ocorre a liberação de produtos como o heme livre, a bilirrubina e arginase do citosol para o plasma. A Hb livre no meio extracelular interage com o NO promovendo o seu consumo e redução. Simultaneamente, ocorre liberação de arginase com redução da biodisponibilidade da L-arginina, um precursor de NO, reduzindo as suas concentrações, deixando de agir na musculatura lisa, e causando diminuição da vasodilatação (GLADWIN; KATO 2008; RESS et al, 2010; GLADWIN; POTOKA, 2014).

A endotelina 1 (ET-1), potente vasoconstritor, se encontra em níveis elevados na DF, respondendo a estímulos como inflamação, estresse e hipóxia, potencializando a vasoconstrição, que tem papel importante na patogênese dos fenômenos vaso-oclusivos, estando envolvida em complicações clínicas como a hipertensão pulmonar, AVC e priapismo (ERGUL et al, 2004; KATO et al, 2006; THAKUR et al, 2014; SEPÚLVIDA et al, 2017).

A disfunção endotelial evidenciada pela ativação das células endoteliais é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície destas células, contribuindo para o desenvolvimento da patologia vascular. Na DF, as alterações das hemácias, do fluxo dentro do vaso e adesão de leucócitos são fontes potenciais de lesão endotelial. Além disso, as hemácias falcizadas produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), decorrente da presença da HbS instável, que contribui efetivamente para ativação endotelial (KAUL et al, 2002 ; RAJENDRAN et al, 2013; STEINBERG et al, 2016).

Após os eventos de isquemia-reperfusão ocorre a reoxigenação da área que sofreu hipoxia, aumentando também a geração de ERO. O ciclo repetido destes eventos afeta significativamente a função das células endoteliais, o que contribui para o dano de múltiplos órgãos (HEBBEL, 2014; STEINBERG et al, 2016).

A integridade do endotélio tem papel fundamental no controle hemostático, por sintetizar diversas substâncias que modulam a hemostasia, como função plaquetária, coagulação e fibrinólise (RAJEDRAN et al, 2013; SEPÚLVIDA et al, 2017). A perda desta integridade e consequente disfunção na DF provocam ativação de plaquetas, de mediadores inflamatórios, liberação de corpo de Weibel-Palade de von Willebrand, adesão de monócitos e neutrófilos. Além disso, os mediadores inflamatórios induzem os monócitos a sintetizar fator tecidual (FT), o iniciador da coagulação, contribuindo para um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (CERMAK et al, 1993; SHET et al, 2003; SEPÚLVIDA et al, 2017).

### **1.3.4 Hemostasia**

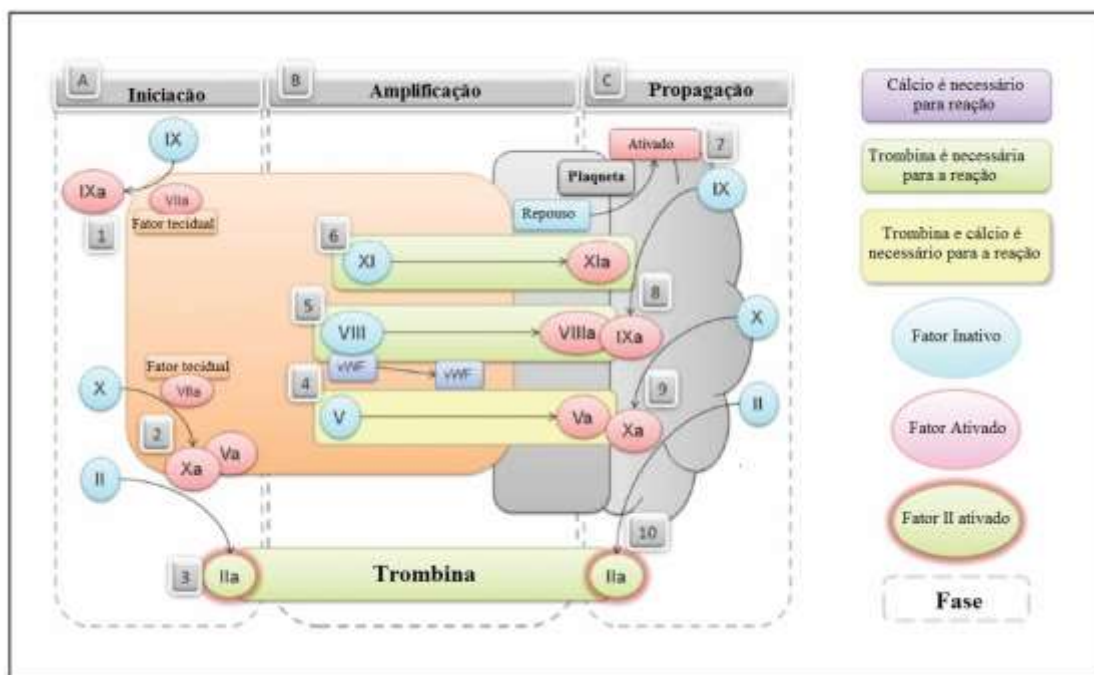
Hemostasia é um processo fisiológico complexo e dinâmico, que consiste em um equilíbrio entre as vias pro-coagulante e anticoagulante, com a finalidade de interromper o sangramento no local da lesão, mantendo o fluxo sanguíneo contínuo e inibir a propagação da coagulação (PAUTA et al, 2014; SWANEPOEL et al, 2015).

Após a lesão vascular e exposição do subendotélio, as plaquetas são ativadas, interagem entre si com neutrófilos e monócitos no vaso lesionado, se agregam através de receptores, ocasionando sua degranulação, liberando moléculas e proteínas que ativam novas plaquetas e participam também do reparo tecidual. O colágeno e a trombina presentes no local são também potentes ativadores de trombócitos, contribuindo com o aumento do pool na formação do tampão plaquetário (DOUGALD; HOFFMAN, 2003; SWANEPOEL et al, 2015).

Além da hemostasia primária mediada pelas plaquetas, a coagulação ocorre pela ativação sequencial de fatores plasmáticos em três fases (iniciação, amplificação e propagação) dependente de FT (Figura 6). Ao ser exposto, o FT se liga ao FVII e cliva-o em FVIIa, formando o complexo FT-FVIIa, que por sua vez, cliva os fatores FIX e FX em FIXa e FXa, respectivamente. O FXa na superfície celular associa-se ao FVa, formando o complexo protrombinase, que converte protrombina em trombina (DOUGALD, HOFFMAN 2006; VERSTEEG et al, 2013; PAUTA et al, 2014; SWANEPOEL et al, 2015). A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação ativa plaquetas que aderiram ao local da lesão. Simultaneamente, a trombina ativa o FV em FVa e FVIII em FVIIIa, que atuam como



cofatores do complexo protrombinase. Este complexo promove ativação dos fatores FII, FIX e FX em FIIa, FIXa e FXa, respectivamente na superfície das plaquetas, ocorrendo assim a amplificação da coagulação (FERREIRA et al, 2010; VERSTEEG et al, 2013; PAUTA et al, 2014). Finalmente, ocorre a fase de propagação, que é caracterizada pela produção de complexos tenases e protrombinases, que são agrupados na superfície das plaquetas ativadas, intensificando a geração de trombina e ativação plaquetária, culminando com a formação de fibrina e estabilização do coágulo (VERSTEEG et al, 2013; PAUTA et al, 2014).



**Figura 6: Modelo da cascata de coagulação:** **Fase de iniciação:** (1) o complexo FT-FVIIa converte o FIX em FIXa, (2) o complexo FT-FVIIa converte o FX em FXa, (3) o FXa combina com o FVa e converte o FII em FIIa (trombina); **Fase de amplificação:** (4) a trombina converte o FV em FVa na presença de cálcio, (5) a trombina participa da clivagem do FVIII-vWF para FVIIIa e vWF livre, (6) o FXI é ativado para XIa pela ação da trombina; **Fase de propagação:** (7) As plaquetas em repouso são ativadas, (8) o FIX é convertido em IXa através da ação do FXIa, (9) o FIXa combina com o FVIIIa e converte o FX em FXa, (10) o FXa combina com Va e converte o fator II em IIa (trombina).

**Fonte:** Adaptado de Swanepoel et al, 2016.

A ativação da coagulação é inibida por um conjunto de proteínas que incluem inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C, proteína S e anti trombina III, atuando como anticoagulantes específicos naturais, que evitam a geração, deposição maciça de fibrina e



oclusão vascular (PAUTA et al, 2014). O TFPI produzido por células endoteliais inibe o complexo FT/FVIIa. A proteína C ativada, além de potente anticoagulante, pró-fibrinolítica, também possui propriedade anti-inflamatória e em combinação com a proteína S, inibe a atividade dos fatores Va e VIIIa, necessários para sustentar a formação de trombina na coagulação. Outro inibidor é a anti trombina III, com maior importância na inibição da trombina, inativando também os fatores (FT, IXa, Xa, XIa e XIIa); adicionalmente, possui propriedades anti-inflamatórias e anti-angiogênicas (NORRIS, 2003; GALE, 2011; PAUTA et al, 2014).

A hemostasia ocorre em equilíbrio constante, permitindo que uma via promova a interrupção do sangramento, enquanto a outra remove o excesso de fibrina. Esta última consiste no sistema fibrinolítico, um processo enzimático altamente regulado que evita a acumulação desnecessária de fibrina intravascular, permitindo a fluidez do sangue. Fazem parte desse mecanismo, um precursor inativo do plasminogênio, a plasmina, que lisa a rede de fibrina, originando produtos de diferentes pesos moleculares. Entre estes, o de menor peso é o D Dímero, constituído de duas subunidades derivadas de duas moléculas de fibrina, enquanto a anti-plasmina inibe a plasmina, controlando a fibrinólise. (DAR et al, 2010; GALE, 2011;; PAUTA et al, 2014; CHAPIN et al, 2015; JEFFREY et al, 2017).

Pacientes com DF têm cronicamente níveis elevados de D dímero, demonstrando que a ativação da coagulação ocorre nestes pacientes mesmo fora de crise (FRANCIS, 1998; STYPULKOWSKI et al, 2010; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017).

### **1.3.5 Hipercoagulabilidade na Doença Falciforme**

Tem sido descrito que pacientes com DF cursam com um estado de hipercoagulabilidade crônica com maior risco de eventos trombóticos arterial e venoso, como acidente vascular cerebral (AVC), embolia pulmonar (EP) e necrose avascular, importantes causas de morbidade e mortalidade (LUCIA DE FRANCESCHI et al, 2011; ATAGA et al, 2012)

Alterações hemostáticas como disfunção plaquetária, dos mecanismos procoagulantes, anticoagulantes e fibrinolítico, são frequentemente observadas nestes pacientes. Outros mecanismos que também podem contribuir para este quadro é a disfunção endotelial e a

adesão dos eritrócitos falcizados à parede vascular lesada (ATAGA et al, 2007 RAJENDRAN et la, 2013).

O endotélio desempenha papel crucial no equilíbrio hemostático. A perda de sua integridade promove a ativação das células endoteliais, que são altamente procoagulantes e expressam moléculas de adesão ICAM 1 (molécula de adesão intra- celular 1), VCAM -1 (molécula de adesão vascular 1), E-selectina e P-selectina, que medeiam a adesão dos eritrócitos. Além disso, estas células também expressam FT (ATAGA et al, 2007 RAJENDRAN et la, 2013).

Os eritrócitos sofrem alterações na estrutura de sua membrana, decorrentes da falcização, tornando-se irreversivelmente falcizados, expondo de forma anormal a fosfatidilserina S (PS). Estudos tem descrito que a exposição da PS, além de alterar as propriedades adesivas destas células, promove exacerbação da anemia, decorrentes do reconhecimento dos eritrócitos pelo sistema fagocítico, maior adesividade destas células ao endotélio e também promovem a ativação da coagulação, por ativar expressão de FT. Além disso, a PS atua como co-fator do FXa, na conversão da protrombina em trombina, contribuindo para maior risco de eventos trombóticos (HELLEY et al, 1997; STYPULKOWSKI et al 2010; LIM et al, 2013; SPARKENBAUGH et al, 2013).

A hemólise é outro fator que contribui ativamente para ativação da coagulação em pacientes com doença falciforme. Estudo tem sugerido que tanto o heme quanto a hemoglobina podem modular a gravidade da doença em pacientes com DF. (RHEANI et ala, 2013; de SOUZA et al, 2017). A Hb livre leva ao consumo de óxido nítrico (NO), reduzindo sua biodisponibilidade, enquanto a liberação da arginase pelos eritrócitos lizados reduz a arginina, um importante substrato para síntese do NO, que tem papel fundamental na homeostase do endotélio. O NO desempenha funções importantes, como inibir a vasoconstricção vascular, liberação de proteínas pró-coagulantes, mediadores inflamatórios, fatores de proliferação, ativação e agregação plaquetária, expressão de FT e a geração de trombina. Assim, sua depleção promove disfunção endotelial, ativação de fatores procoagulantes e inibição de fatores anticoagulantes, contribuindo para o estado protrombótico (KATO; TAYLOR, 2010; NOURRAIE et al, 2013; CORAN; ALMEIDA, 2015).

O heme, outro produto da hemólise, exerce potencial atividade pró-trombótica que induz a ativação da coagulação. Relatos atuais demonstraram que o heme induz a liberação de Fator de Von Willebrand (UL-VWF) e P-selectina, que medeiam a adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio. A bilirrubina, outro produto da hemólise, que se encontra em níveis elevados nestes pacientes, é capaz de inibir a clivagem de UL-VWF, promovendo o aumento da atividade pró-trombótica no endotélio. Além disso, o heme induz a ativação e agregação plaquetária, se liga ao fator VIII e fibrinogênio da coagulação e induz a expressão do FT, tanto nas células endoteliais quanto em monócitos, contribuindo para maior geração de trombina (ROUMENINA et al, 2016).

A ativação da coagulação na DF é multifatorial. A disfunção endotelial, hemólise e a inflamação participam ativamente da geração de trombina por vários mecanismos, induzindo a um estado de hipercoagulabilidade, predispondo a um maior risco de complicações graves (LEVI, 2010; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

#### 1.4 MONÓCITOS

Os monócitos se originam de células estaminais mielomonocíticas na medula óssea. Estas células dão origem a monoblastos, que se desenvolvem em monócitos. Ao entrarem no sangue, permanecem por aproximadamente 1 a 3 dias e migram para os tecidos, passando a ser denominados como macrófagos (ZIEGLER-HEITBROCK et al, 1999; AUFFRAY et al, 2009; GORDON; MARTINEZ, 2010; BELGE et al 2015). A diferenciação e maturação destas células são dependentes da ligação do fator estimulador de colônia Csf-1, (conhecido como M-CSF, ao seu receptor de crescimento hematopoiético, Csf-1R (CD115) (AUFFRAY et al, 2009).

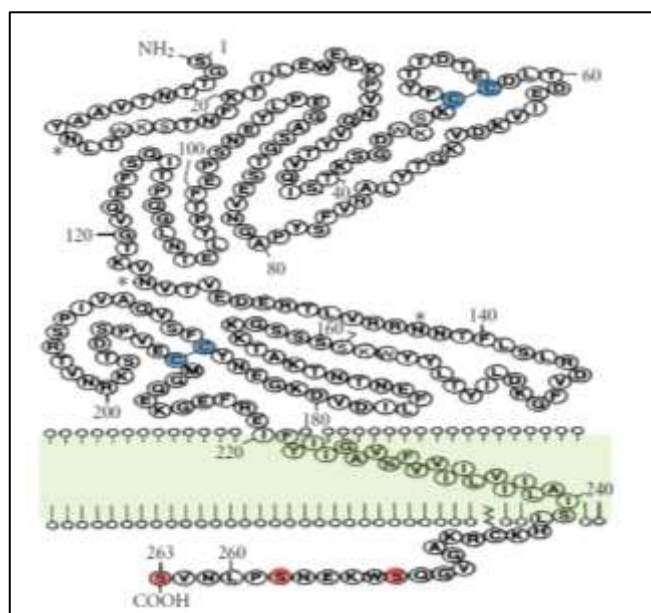
As células mononucleares desempenham papel importante entre a defesa inata e adaptativa, de grande relevância na homeostase, na remoção de células apoptóticas e compostos tóxicos; promovem reparo tecidual e produzem diferentes moléculas efetoras associadas à defesa contra microrganismos e processos inflamatórios em uma variedade de doenças, como aterosclerose, artrite reumatoide e doença falciforme, entre outras (SERBINA et al. 2008; AUFFAY et al, 2009; ZIEGLER-HEITBROCK et al, 2010; YANG et al, 2014).

No entanto, a participação dos monócitos não está restrita à imunidade inata e ao desenvolvimento de células dendríticas e macrófagos. Tem sido demonstrado que seu papel fisiológico vai além, pois são importantes fontes de FT, expressando quantidades significativas em resposta a uma variedade de estímulos, além de se ligar a plaquetas formando um complexo monócitos-plaquetas altamente pró-coagulante. Ainda, a participação dos monócitos em vários estados pró-trombóticos tem sido observada, como aterosclerose, coagulação intravascular disseminada (CIVD) e síndrome do anticorpo anti-fosfolípedes, ligando estas células a processos trombóticos. Na DF os monócitos estão altamente ativados, contribuindo para o estado inflamatório e pró-trombótico (ROUMENINA et al, 2016).

Tem sido, portanto sugerido que a expressão de FT por monócitos circulantes em várias situações pode induzir à trombose (SHANTSILA; GREGORY, 2009; ZHANG et al, 2014).

## 1.5 FATOR TECIDUAL (FT)

O FT (**Figura 7**) é uma glicoproteína ancorada à membrana plasmática, estruturalmente constituído por 263 aminoácidos em sua forma madura, sendo 219 em sua porção extracelular, 23 na cadeia trans-membrana e 21 em sua porção citoplasmática. Usualmente está presente nos fibroblastos da adventícia de vasos sanguíneos, cápsulas de órgãos, queratinócitos, mucosas do trato respiratório e gastrointestinal, células musculares cardíacas, glomérulos renais, endométrio e astrócitos (CARMELIETE; COLLEN, 1998; CHU, 2011; BUTENA et al, 2012).



**Figura 7:** Estrutura do Fator tecidual. **Fonte:** Chu et al, 2011.

O FT é o iniciador primário da coagulação, atuando como um cofator para o fator VII ativado (FVIIa), formando um complexo FT/FVIIa e iniciando a cascata de coagulação, que por proteólise ativa os fatores IX e X. Uma pequena quantidade de FT é suficiente para ativar a coagulação, enquanto a maior fração permanece na forma inativa, sendo referido como críptico, mas que em uma variedade de condições patológicas pode se transformar em funcional e procoagulante (SHANTSILA; GREGORY, 2009; FERREIRA et al, 2010; RAO et al, 2014). Células endoteliais e monócitos normalmente não expressam FT em condições fisiológicas, porém na vigência de lesão endotelial e estímulos específicos passam a expressar este fator (SOLOVEY et al, 1998).

Nível aumentado de FT tem sido descrito em uma variedade de intercorrências, como sepse, doença coronariana, síndrome antifosfolípedes e também na DF, desempenhando importante papel na trombogênese (SHANTSILA; GREGORY, 2009).

Estudos em modelos animais e raros poucos realizados em humanos têm sugerido que a DF cursa com um estado de hipercoagulabilidade, que parece estar associado a maior

expressão de FT e conseqüente maior geração de trombina (SETTY et al, 2012; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

A elevada expressão de FT conseqüentemente induz a maior geração de trombina. A conseqüência clínica deste estado pro-coagulante é uma tendência de eventos trombóticos, tanto arteriais quanto venosos, contribuindo para complicações como AVC e hipertensão pulmonar nestes pacientes (STYPULKOWSKI et al, 2010. SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

Evidências clínicas do estado de hipercoagulabilidade na DF com tendência ao tromboembolismo arterial e venoso têm sido relatadas (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013). Apesar de trabalhos em modelos animais e humanos relatarem evidências laboratoriais de um estado de hipercoagulabilidade na DF, ainda não está claro o papel da ativação de monócitos, aumento de fator tecidual e geração de trombina nesta doença (SETTY et al, 2012). Assim, autores sugerem novos estudos para o melhor entendimento da contribuição do estado de hipercoagulabilidade e as complicações trombóticas na DF, uma vez que o papel do FT de monócitos nesta condição ainda não foi completamente elucidado (MACKMAN, 2009, ATAGA et al, 2012) (SHANSILA; GREGORY, 2009; CHANTRATHAMMACHART et al, 2012; ATAGA; KEY, 2007; ATAGA, 2009).

Tendo em vista que a DF se caracteriza por um estado pró-inflamatório e múltiplas alterações pró-coagulantes (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013), acreditamos que o estudo da expressão do FT por monócitos é de grande importância em indivíduos com a doença, contribuindo para um melhor entendimento do estado de hipercoagulabilidade.

## *OBJETIVO*



# **1 OBJETIVO**

## **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão de fator tecidual de monócitos em pacientes com doença falciforme.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1 Avaliar possíveis diferenças entre indivíduos com doença falciforme e controles quanto aos níveis de:**

- Plaquetas, D dímero, TP, TTPA , fibrinogênio
- Hemoglobina, DHL, bilirrubinas, contagem de reticulócitos

**2.2.2 Avaliar a correlação da quantificação do fator tecidual com:**

- Gênero
- Idade
- Uso de hidroxiureia
- Genótipo
- Hemoglobina, bilirrubinas (direta, indireta, total), DHL, contagem de reticulócitos
- Plaquetas, TP, TTPA, D dímero, fibrinogênio



## *MATERIAL E MÉTODOS*



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

O estudo foi do tipo transversal, observacional, analítico em pacientes com DF atendidos no Ambulatório do Hemocentro Regional de Uberaba (HRU) e Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) no período de agosto de 2016 a maio de 2017.

##### **3.1.1. Aspectos éticos**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas, sob o parecer de número 55299016.2.0000.5118 (Anexo IV).

##### **3.1.2. Casuística**

Foram convidados a participar do estudo 46 pacientes com doença falciforme em seguimento ambulatorial. Os pacientes foram abordados durante seu atendimento de rotina no Ambulatório de Hematologia do HRU.

Também foram selecionados 26 doadores de sangue do HRU, que estivessem dentro da faixa etária dos pacientes com DF incluídos no estudo, para compor o grupo controle.

Os participantes receberam todas as informações referentes aos procedimentos da pesquisa e somente foram incluídos no estudo após o aceite e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles que faziam uso de hidroxiureia há mais de três meses e os que não faziam uso da medicação.

##### **3.1.3. Critérios de inclusão**

###### *3.1.3.1 Pacientes:*

1. Indivíduos com diagnóstico de DF (subtipo SS, SC, SF e Sβeta talassemia) maiores de 18 anos, de ambos os sexos, atendidos no Hemocentro Regional de

Uberaba/Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

2. Estar fora de crise (*steady state*).

#### 3.1.1.2 Controles:

1. Ser doador de sangue de repetição, apto nas triagens clínica e sorológica.
2. Ter eletroforese de hemoglobina normal.
3. Ter 18 anos ou mais.

### 3.1.4. Critérios de exclusão

#### 3.1.4.1 Pacientes:

1. Estar em uso de anticoagulante, esteroides e medicamentos anti-inflamatórios.
2. Ter sido hospitalizado e recebido transfusão nos últimos 90 dias.

#### 3.1.4.2 Controles:

1. Estar em uso medicamento anti-inflamatório.
2. Ter realizado atividade física intensa nas últimas 12 horas.

## 3.2. PROCEDIMENTOS GERAIS

### 3.2.1. Coleta e processamento das amostras biológicas

Foram coletados 15 mL de sangue de cada participante por punção venosa, sendo 5mL em tubo sem anticoagulante, 5 ml com citrato de sódio e 5 mL em EDTA. As amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram utilizadas para dosagens de lactato desidrogenase láctica (LDH), bilirrubinas (direta, indireta e total). Aquelas coletadas com citrato de sódio foram utilizadas para a realização dos testes de coagulação, como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), fibrinogênio e dímero D. As amostras coletadas em tubos com EDTA foram direcionadas para a realização do hemograma, contagem de reticulócitos e quantificação do fator tecidual.

As amostras de pacientes e controles foram encaminhadas ao Laboratório Clínico do Hospital de Clínicas da UFTM, onde foram realizados os exames: hemograma, contagem de reticulócitos, lactato desidrogenase (DHL), bilirrubina total e frações, D dímero, Tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e fibrinogênio. A quantificação da expressão dos monócitos FT positivo foi realizada no laboratório de Pesquisas Hematológicas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM.

### **3.2.2 Variáveis avaliadas**

#### *3.2.2.1 Variáveis demográficas*

- Idade: indivíduos maiores de 18 anos
- Sexo: masculino e feminino

#### *3.2.2.2 Variáveis laboratoriais*

Dosagem de Hb (g/dL), reticulócitos (%), leucócitos ( $\times 10^3$ ), contagem de plaquetas ( $\text{mm}^3$ ), TP (s), TTPA (s), fibrinogênio (mg/dL), D dímero (ng/mL), bilirrubina total (mg/dL), bilirrubina direta (mg/dL), bilirrubina indireta (mg/dL), DHL(u/L), quantificação da expressão de monócitos FT positivo (%).

### **3.2.3 Análises dos parâmetros laboratoriais de hemólise coagulação**

O hemograma foi realizado por método automatizado no aparelho XN 3000 (Sysmex, Japan), a contagem de reticulócitos pelo método de citometria de fluxo fluorescente no aparelho XN 1000 (Sysmex, Japan), a dosagem de bilirrubinas direta e indireta pelo método colorimétrico, a quantificação dos níveis de DHL pelo método cinético no aparelho Cobas 6000, (Roche Diagnostic, Esados Unidos). As análises de TP, TTPA e fibrinogênio foram realizadas por método semi-automatizado no coagulômetro Option 4 Biomerieux (Biomerieux, Rio de Janeiro, Brasil) e a quantificação de D dímero foi realizada por método automatizado de imunoensaio de fluorescência no equipamento *Destiny Plus* (Allere, Delaware, Estados Unidos).

### 3.2.4 Análise da porcentagem de monócitos fator tecidual positivo

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir dos 5mL de sangue coletado em tubo com EDTA, através do método de separação por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Foi utilizada a proporção de 1:1 (amostra/Ficoll), sendo a amostra centrifugada durante 30 minutos a 400 x g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as PBMC que formam um anel de densidade intermediária entre o plasma e o Ficoll, foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo de 50mL e lavadas três vezes com 40mL, 20mL e 10mL de PBS (tampão fosfato salino) 1X, nas mesmas condições de centrifugação, agora a 10°C.

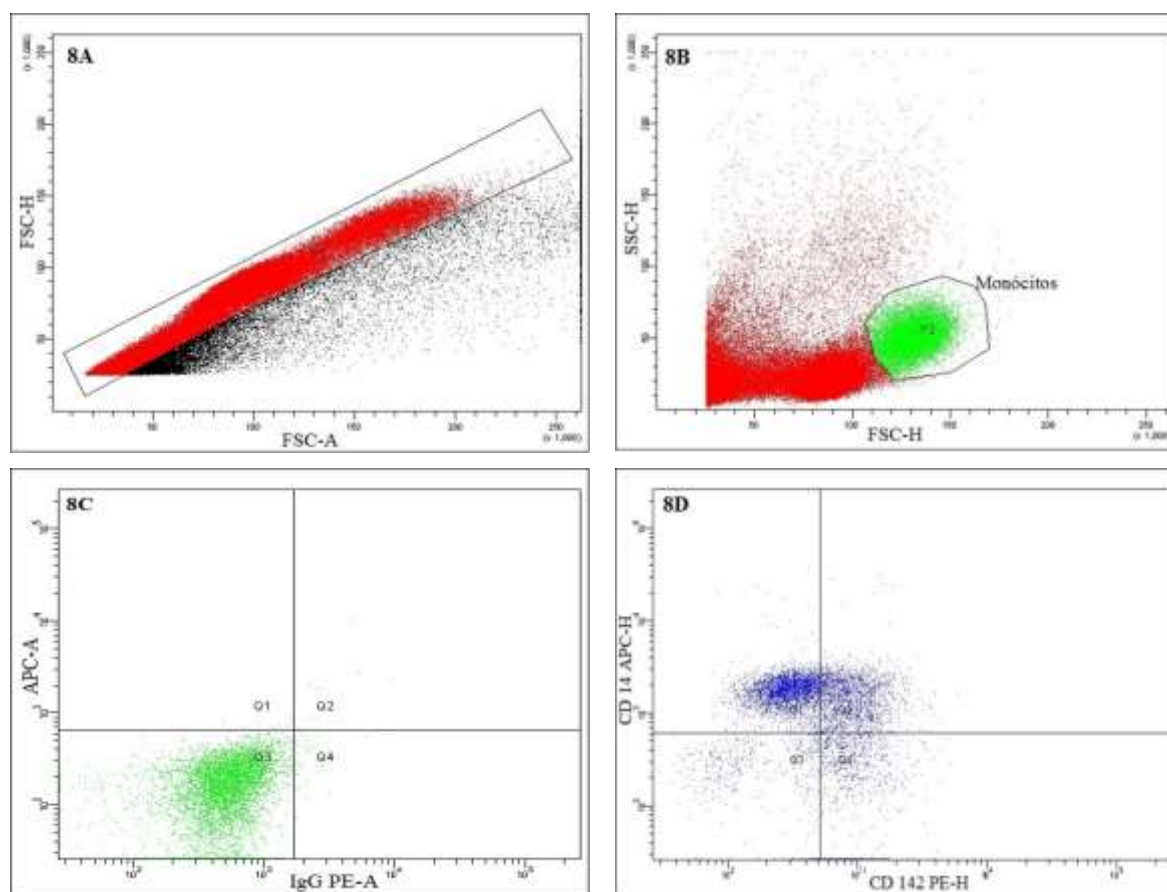
O sedimento celular foi ressuspensão em PBS (1x). Foram identificados 3 tubos (branco, isotipo e amostra), sendo transferido  $1 \times 10^6$  PBMCs para cada tubo. Inicialmente foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas, através da incubação com 1mL de PBS contendo soro bovino fetal 5% (v/v) durante 30 minutos em geladeira. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com a mesma solução e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos.

O sedimento celular foi homogeneizado, iniciando a marcação com 5µL de cada anticorpo. Foram utilizados os anticorpos anti- IgG1 (PE) isotipo controle, anti-HLA-DR (FITC), anti-CD142 (PE), anti-CD14 (PerCy-7), anti-CD16 (APC) (Becton Dickinson - BD Pharmingen, Califórnia, Estados Unidos) nos respectivos tubos (isotipo e paciente). As amostras foram incubadas por 30 minutos e em seguida foi realizada a lavagem e centrifugação por 2 vezes (1mL de PBMC + soro bovino fetal 5%, por 10 minutos, 10°C a 540 x g). O sedimento celular foi ressuspensão em 200µL de PBS contendo formaldeído 1% e levadas para leitura em citômetro de fluxo.

A aquisição das células foi realizada em citômetro FACSCanto II (BD, Califórnia, EUA). Foram adquiridos 50.000 eventos, sendo as células inicialmente adquiridas em função de FSC-H (tamanho-altura) versus FSC-A (tamanho-área) para eliminar doublets da análise (Figura 8A). Em seguida, a população celular de tamanho intermediário e baixa granulosidade, correspondente à população de monócitos, foi selecionada, utilizando-se os parâmetros FSC-A e SSC-A (granulosidade) (Figura 8B).

Em seguida, foram separadas as populações de monócitos que apresentassem CD14, CD16 e HLA-DR. A partir dessa população de interesse, foi quantificada a porcentagem de células marcadas o anticorpo anti-CD142, referente ao fator tecidual, diminuída a fluorescência obtida no tubo contendo isotipo marcado com PE (Figura 8C). Os resultados da quantificação de monócitos que expressam fator tecidual (Figura 8D) foram expressos em porcentagem.

A compensação do citômetro de fluxo foi realizada usando beads BD FACS Comp (BD Biosciences, Califórnia, Estados Unidos), sendo calculada automaticamente pelo software FACSDiva com base em nas fluorescências utilizadas, a compensação foi armazenada e utilizada em todos os experimentos.



**Figura 8:** Estratégia de *gates* para seleção de monócitos que expressam fator tecidual. 8A - gate em FSC-H vs. FSC-A para exclusão de *doublets*; 8B – gate em monócitos dentro da população de células mononucleares; 8C - isotipo (IgG) controle negativo; 8D – quantificação de monócitos em relação à expressão de fator tecidual (CD14 vs CD142).

### 3.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise descritiva a partir de frequências absolutas e percentuais (variáveis categóricas) e as variáveis numéricas a partir de medidas descritivas de centralidade (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, mínimo, máximo e coeficiente de variação).

A comparação das variáveis numéricas entre dois grupos foi realizada a partir do teste t-student quando suposição de normalidade e homogeneidade das variáveis satisfatórias ou Mann-Whitney caso contrário. Entre três ou mais grupos as variáveis numéricas foram comparadas a partir de ANOVA paramétrica, quando suposição de normalidade e homogeneidade satisfeitas ou ANOVA não paramétrica caso contrário.

A associação entre duas variáveis numéricas foram mensuradas a partir da correlação de Pearson.

## *RESULTADOS*





## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ESTUDADA

A idade dos pacientes variou de 18 a 52 anos, com média de  $32 \pm 9,69$  anos; 31 (67,40%) eram do sexo feminino e 15 (32,60%) masculino. Em relação à etnia 23 (50%) eram pardos, 20 (43,47%) negros e três (3,52%) eram brancos. Quanto ao subtipo 31 (67,39%) eram SS, oito (17,40) SC, 5(6,52%)  $S\beta^0$  e dois (4,34%) SF. Em relação ao uso de hidroxiureia, 58,70 % estavam em uso e 41,30 % não usavam. Em relação ao grupo controle, a idade variou de 18 a 53 anos, com media de  $31 \pm 11,14$ . Dezenove (73,07%) eram do sexo feminino e sete (26,93%) masculino, 17(65,38%) eram negros, cinco (19,23%) pardos e quatro (15,38%) brancos.

### 4.2. PARÂMETROS LABORATORIAIS

#### 4.2.1. Marcadores de hemólise

Quanto aos parâmetros laboratoriais referentes aos índices de hemólise, verificamos valores significativamente maiores da contagem de reticulócitos, níveis de bilirrubina direta, indireta, total e DHL nos pacientes em comparação aos controles, respectivamente. Quanto a taxa de hemoglobina, esta se mostrou significativamente inferior no grupo de pacientes (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados laboratoriais referentes aos marcadores de hemólise dos grupos com doença falciforme (paciente) e controle (doadores de sangue).

Grupo	Variáveis	n	Média (Desvio Padrão)	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p (Paciente x Controle)
<b>Paciente</b>							
	Hemoglobina (g/dL)	46	9,97±1,8	9,7	6,8	15,2	p < 0.0001**
	Reticulócitos (%)	46	6,0±4,3	5,7	0,6	27,9	p < 0.0001**
	Bilirrubina indireta (mg/mL)	46	1,67±0,9	1,6	0,3	4,26	p < 0.0001**
	Bilirrubina direta (mg/mL)	46	0,7±0,3	0,6	0,2	1,4	p < 0.0001*
	Bilirrubina total (mg/mL)	46	2,21±0,4	2,3	0,5	2,7	p < 0.0001**
	DHL U/L	46	459,9±187,0	459,5	7,9	971	p < 0.0001*
<b>Controle</b>							
	Hemoglobina (g/dL)	26	13,5±1,3	13,3	11	16	
	Reticulócitos (%)	26	1,7±0,4	1,6	0,9	2,7	
	Bilirrubina indireta (mg/mL)	26	0,3±0,2	0,3	0,1	0,9	
	Bilirrubina direta (mg/mL)	26	0,2±0,1	0,2	0,1	0,8	
	Bilirrubina total (mg/mL)	26	0,4±0,2	0,4	0,2	1	
	DHL U/L	26	184,8±19,3	181,5	145	243	

DHL: Lactato desidrogenase. Nota: Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão. A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste t-Student (\*) (dados normais) e/ou Mann-Withney (\*\*) (dados sem normalidade); p<0,05.

#### 4.2.2 Marcadores de coagulação

Com relação aos marcadores de coagulação, observamos média significativamente maior da contagem de plaquetas, níveis plasmáticos de D dímero elevados, tempo de protrombina (TP) prolongado, maior média da porcentagem de monócitos fator tecidual positivo nos pacientes em comparação aos controles, enquanto o fibrinogênio foi significativamente inferior. Quanto ao tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), não verificamos diferença significativa (Tabela 2).

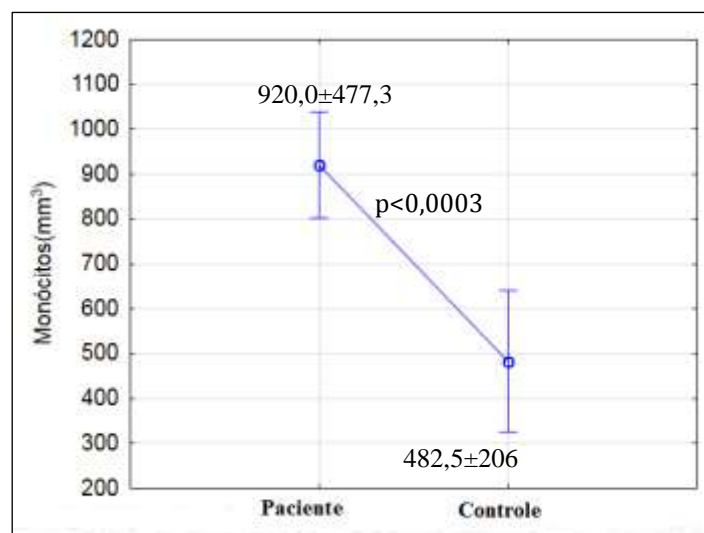
**Tabela 2:** Dados laboratoriais referentes aos marcadores de coagulação dos grupos com doença falciforme (paciente) e controle (doadores de sangue).

Grupo	Variáveis	n	Média (Desvio Padrão)	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p (Pacientes x Controles)
<b>Paciente</b>	Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	46	378.652,0±120.162,0	392.000,0	110.000	636.000,0	p< 0.0001*
	TP/s	46	16,2±2,9	15,8	12,6	32,7	p=0.0002**
	TTPA/s	46	29,6±4,6	29,1	21,6	42,9	p=0.9691*
	Fibrinogênio (mg/dL)	46	272,1±86,3	243,3	134,1	490,0	p = 0.0381**
	D dímero (ng/dL)	29	991,7±1.094,3	508,5	160,0	4.228,0	p< 0.0001**
	Monócito FT positivo(%)		<b>16,4±1,5</b>	13,8	3,8	47,0	<b>p&lt; 0.0001*</b>
<b>Controle</b>	Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	26	250.154,0±51.256,0	254.000,0	136.000,0	340.000,0	
	TP/s	26	13,6±0,7	13,4	12,4	15,3	
	TTPA/s	26	29,5±2,6	29,1	26,0	35,2	
	Fibrinogênio (mg/dL)	26	318,1±92,7	319,0	196,0	538,0	
	D dímero (ng/dL)	21	169,2±76,9	164,0	56,4	316,0	
	Monócito FT positivo(%)	26	<b>6,4 ±1,2</b>	6,0	1,3	11,8	

TP, tempo de protrombina; TTPA, tempo de tromboplastina ativada; FT, fator tecidual. Nota: Os valores foram apresentados como desvio padrão. A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste t-Student ( \*) (dados normais) e/ou Mann-Withney (\*\*) (normalidade); p<0,05.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE MONÓCITOS EM SANGUE TOTAL

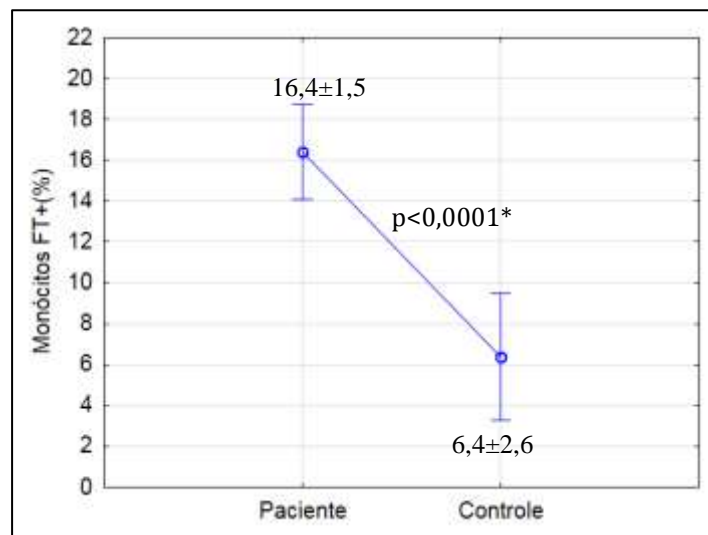
Verificamos contagem absoluta de monócitos significativamente maior nos pacientes comparados aos controles (Figura 9).



**Figura 9.** Quantificação dos monócitos de pacientes e controles. Os valores da contagem absoluta de monócitos esta representados no eixo y. A comparação entre os grupos foi obtida através do teste t-Student, \*diferença significativa.

#### 4.4. PORCENTAGEM DE MONÓCITOS FATOR TECIDUAL POSITIVO

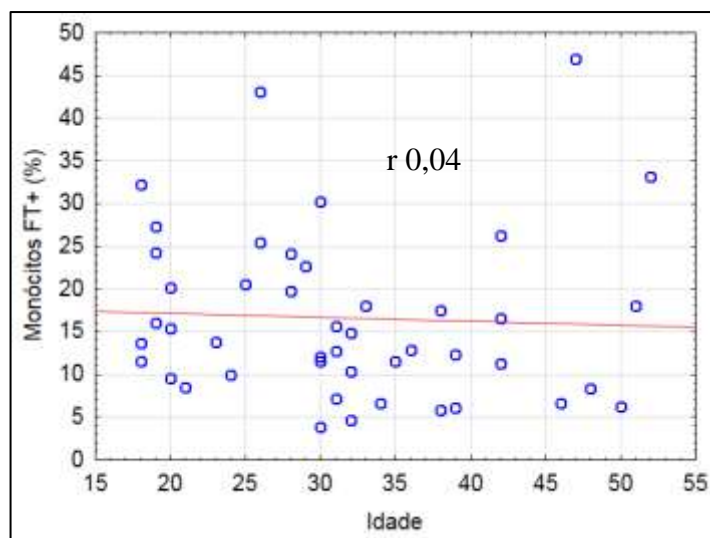
Verificamos maior média da porcentagem de monócitos fator tecidual positivo nos pacientes com DF comparados aos controles. (Figura 10).



**Figura 10.** Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo de pacientes e controles. Os valores de fator tecidual estão em porcentagens representados no eixo y. A comparação entre os grupos foi obtida através do teste t-Student, \*diferença significativa.

#### 4.4.1 Porcentagens de monócitos fator tecidual positivo e sua correlação com a idade

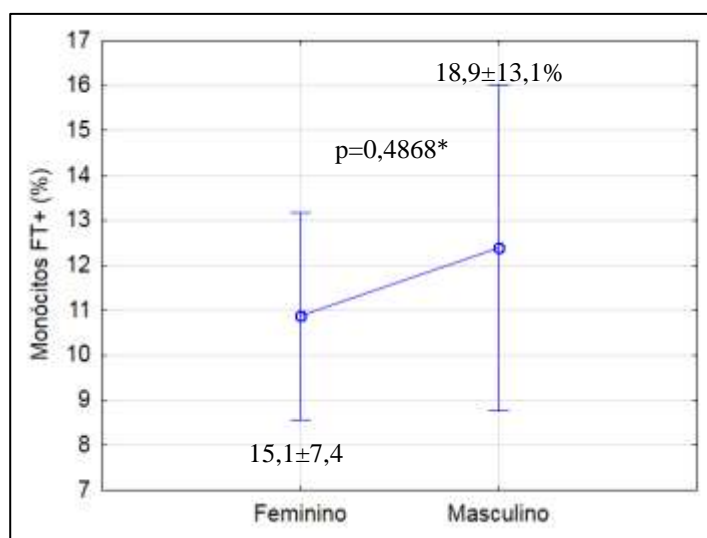
Quanto à porcentagem de monócitos FT positivo em relação à idade, não encontramos correlação linear significativa no grupo dos pacientes com doença falciforme (Figura 11).



**Figura 11:** Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo no grupo de pacientes com DF em relação à idade: A quantificação de fator tecidual está expressa no eixo y e a variação de idade no eixo x. A correlação da idade e porcentagem de monócitos FT positivo foi obtida através do teste de correlação de Person ( $r$  0,04).

#### 4.4.2 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao sexo

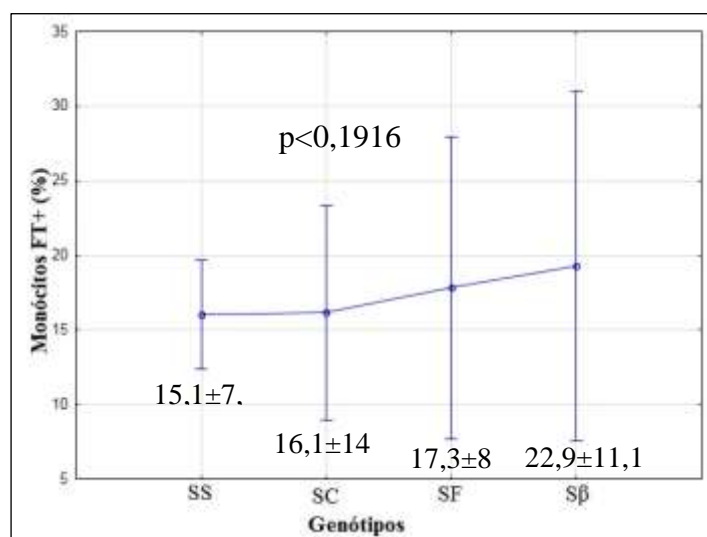
Quanto à comparação da porcentagem de monócitos FT positivo entre os sexos masculino e feminino no grupo de pacientes, verificamos maior média no sexo masculino, porém esta diferença não foi significativa (Figura 12).



**Figura12:** Monócitos fator tecidual positivo nos pacientes com DF, quanto ao sexo: A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste t-Student.

#### 4.4.3 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao subtipo de doença falciforme

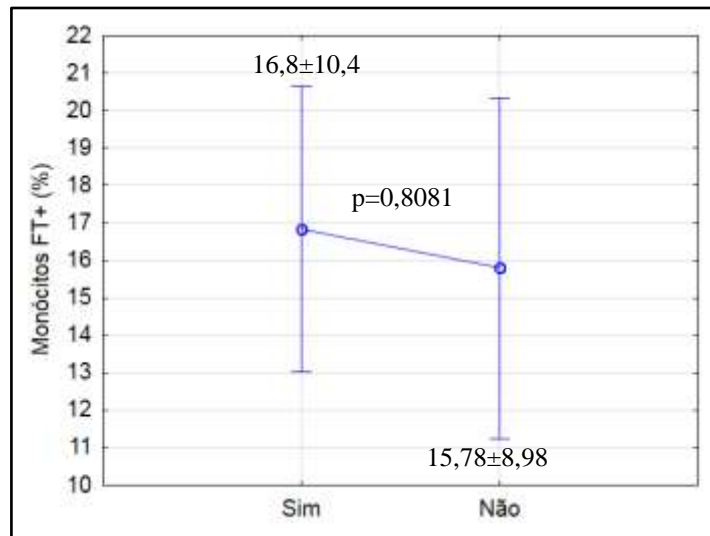
Quanto à porcentagem de monócitos FT positivo em relação aos subtipos (SS, SC, SF, S $\beta$ ), não encontramos diferença significativa (Figura 13).



**Figura 13:** Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo nos pacientes com DF em relação ao genótipo: A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *de* variância (ANOVA).

#### 4.4.4 Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo em relação ao uso de hidroxiuréia

Em relação ao uso de hidroxiureia e a porcentagem de monócitos FT positivo, não encontramos diferença entre o grupo que estava em uso e aqueles que não estavam (Figura 14).



**Figura 14:** Porcentagem de monócitos fator tecidual positivo quanto ao uso de hidroxiureia: A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste t-Student.

#### 4.5. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATOR TECIDUAL COM MARCADORES DE HEMÓLISE E COAGULAÇÃO

Quanto à correlação da porcentagem de monócitos FT positivo com os marcadores de hemólise, não verificamos correlação linear significativa com a taxa de hemoglobina, contagem de reticulócitos, DHL e bilirrubinas. Quanto aos marcadores de coagulação, não verificamos correlação linear significativa com a contagem de plaquetas, TP, TTPA e D dímero, enquanto fibrinogênio mostrou uma correlação linear fraca, positiva e significativa. (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação da porcentagem de monócitos fator tecidual positivo (FT+) e marcadores de hemólise e coagulação.

Variáveis	Monócitos FT+			
	Controle		Paciente	
	r	p	r	p
<b>Hemólise</b>				
Hemoglobina (g/dL)	-0,13	0,563	-0,13	0,480
Reticulócitos (%)	0,14	0,553	0,02	0,930
DHL (U/L)	0,04	0,872	0,08	0,696
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,04	0,862	0,31	0,10
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,06	0,811	0,02	0,934
Bilirrubina total (mg/dL)	0,16	0,413	0,30	0,11
<b>Coagulação</b>				
Plaquetas(/mm <sup>3</sup> )	0,11	0,626	0,16	0,401
TP (s)	-0,18	0,945	0,04	0,820
TTPA (s)	0,02	0,424	0,18	0,348
Fibrinogênio (mg/dL)	0,01	0,967	0,47	0,010*
D dímero (ng/dL)	0,05	0,827	-0,15	0,428

TP, tempo de protrombina; TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativada; LDH, Lactato desidrogenase. A quantificação de D-dímero foi realizada em 29 pacientes. A correlação entre a porcentagem monócitos fator tecidual e os parâmetros laboratoriais de hemólise e coagulação foi obtida através do teste de correlação de Pearson. \*diferença significativa



## *DISCUSSÃO*



## 5 DISCUSSÃO

A ativação da coagulação na DF é multifatorial, pois a doença cursa com hemólise, disfunção endotelial e inflamação, que participam ativamente da geração de trombina induzindo a um estado de hipercoagulabilidade, predispondo a um maior risco de complicações tromboembólicas graves (LEVI et al, 2010; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

Em nosso estudo as alterações hemolíticas, característica destes pacientes mesmo fora de crise, foram demonstradas pela redução da taxa de Hb, elevada contagem de reticulócitos e níveis elevados de bilirrubina indireta e DHL, similares aos encontrados por Taylor et al (2008), demonstrando que a hemólise é um achado comum na DF, estando relacionada a complicações vasculares. Resultados semelhantes foram observados por Kato et al (2010), em crianças, enquanto Parsons et al (2016), avaliando 715 pacientes adultos, verificaram níveis reduzidos de Hb, elevados de DHL e alta contagem de reticulócitos.

Quanto aos marcadores de coagulação, verificamos que os pacientes apresentaram contagem de plaquetas e tempos de TP significativamente maiores que os controles, níveis elevados de D dímero e aumento significativo de monócitos FT positivo, similares aos descritos por Ragab et al (2016) em crianças com DF. Quanto ao fibrinogênio, este se mostrou significativamente reduzido em relação aos controles, ainda que dentro dos padrões de normalidade. Ainda, outro estudo avaliando crianças verificou alta contagem de plaquetas e tempos TP e TTPA prolongadas (CHINAWA et al, 2013).

A elevada contagem e o aumento da ativação plaquetária são descritas na DF mesmo em pacientes clinicamente estáveis, contribuindo para a ativação da coagulação, favorecendo a expressão de FT de monócitos e, conseqüentemente, o estado de hipercoagulabilidade (ATAGA et al, 2012). Adicionalmente, estudos têm sugerido uma estreita relação entre a contagem de plaquetas e FT, uma vez as plaquetas ativadas expressam CD 40 ligante que se ligam aos monócitos também ativados, induzindo a expressão de FT, demonstrando que as plaquetas contribuem para o pool de FT de monócitos (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2012).

Além disso, Mekontson et al (2015), observaram elevada contagem de plaquetas, associando esta trombocitose a maior propensão de desenvolvimento de trombose pulmonar em pacientes com síndrome torácica aguda (STA).

Em relação ao prolongamento do TP e os níveis reduzidos de fibrinogênio, observados, acreditamos que tais fatores possam estar relacionados à disfunção hepatocelular, comum nestes pacientes e/ou consumo dos fatores de coagulação. Outros estudos sugerem que a lesão hepática subclínica resulta na redução da síntese dos fatores de coagulação e possivelmente disfunção da coagulação. Somados a este fato, a liberação de citocinas pode promover o consumo destes fatores (BUSSERI et al, 2017; CHINAWA et al, 2013).

Em relação ao aumento significativo de D dímero, verificamos que 51,74% dos 29 pacientes analisados, apresentaram níveis elevados deste marcador. Níveis elevados de D dímero foram também relatados em outros estudos: Francis et al (1999), verificaram níveis elevados em 92% dos pacientes assintomáticos e 100% durante a crise, enquanto Devine et al (1986), observou aumento em 10% dos pacientes assintomáticos, 80% nos sintomáticos e 97% naqueles em crise vaso oclusiva. Apesar da diferença dos níveis de D dímero observada nos estudos citados e os observados em nossos resultados ficam claro que, mesmo fora de crise, os pacientes com DF apresentam níveis significativamente elevados deste marcador. Adicionalmente, um estudo de Iacoviello et al (2015) demonstrou que o D dímero, por refletir interações complexas da parede do vaso e o sangue, pode representar um preditor de eventos vasculares que possivelmente possam conduzir a um acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), ou acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCh).

Quanto à porcentagem de monócitos FT positivo verificadas neste estudo, estes achados foram similares aos de dois estudos avaliando crianças com doença falciforme, os quais demonstraram níveis significativamente elevados de FT por monócitos (SETTY et al, 2012; RAGAB et al, 2016).

Em relação à porcentagem de monócitos FT positivo e idade, não encontramos uma correlação com a idade, similares aos encontrados por Vieira et al (2003), que também não verificaram correlação da porcentagem de monócitos FT positivo e esta variável. Em relação ao sexo, também não houve diferença significativa. No entanto, não encontramos na literatura trabalhos correlacionado a porcentagem de FT a estas variáveis.

Em relação à terapia com hidroxiureia e à porcentagem de monócitos FT positivo, não encontramos diferença entre o grupo em regime terapêutico com HU e aqueles que não estavam em uso do medicamento, diferente de relatos encontrados na literatura. Colella et al (2012), demonstram que a hidroxiureia foi capaz de reduzir os níveis de FT de monócitos. Acreditamos que o fato de não termos encontrado correlação da expressão de FT de monócitos e uso de hidroxiureia pode ser devido ao pequeno número da amostra, somados à dificuldade de adesão de muitos pacientes ao uso correto da medicação em nosso serviço, ou ainda a porcentagem de monócitos FT positivo elevada nos pacientes que tomavam hidroxiureia, possivelmente poderia estar associado ao tempo de tratamento, que não foi suficiente para reduzir à níveis inferiores aos que não tomavam.

Quanto ao subtipo, não verificamos diferença significativa da porcentagem de monócitos FT positivos. Outros autores encontraram maiores níveis de FT em indivíduos com genótipo SS comparados aos SC (MOHEN et al, 2005; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013; SETTY et al, 2012). Acreditamos que o fato de não termos encontrado diferença de monócitos FT positivo nos diferentes genótipos de DF, possa ser explicado pela heterogeneidade do grupo e tamanho da amostra.

Verificamos ainda que a porcentagem de monócitos FT positivo se correlacionou com a menor taxa de Hb e maiores níveis DHL, bilirrubinas, contagem de plaquetas e TP prolongados, similares ao estudo de Ragab et al, (2016) em crianças. No entanto, não encontramos na literatura estudos em adultos. Outros estudos têm associado os baixos níveis de Hb a maior risco de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) em pacientes com DF (De BAUN et al, 2012; DAMANHOURI et al, 2014). Ainda, estudos em indivíduos com genótipos AA, demonstraram que a aumento de FT circulante é um importante fator de risco para AVCi em jovens (IACOVIELLO et al, 2015). Assim, acreditamos que a significativa correlação da taxa de Hb e a maior porcentagem de monócitos FT+ verificadas neste estudo, pode ser um fator de risco agravante para complicações como o AVCi comum nestes pacientes.

Os níveis elevados dos marcadores de hemólise, sabidamente observados nestes pacientes, promove maior liberação de produtos como: bilirrubina, Hb plasmática e do heme livre, uma molécula tóxica com potencial capacidade de promover aumento da expressão de fator tecidual e atividade pró-coagulante (ROUMENINA et al, 2016).

Estudos em modelos experimentais consolidam estes achados: Souza et al (2017), verificaram em um estudo *ex vivo*, que o heme induziu a maior expressão de FT em células hematopoiéticas e que a ativação da coagulação foi FT dependente, demonstrando que o heme contribui significativamente para o estado pró-coagulante. Sparkenbaung e Pawlinski (2013), verificaram em um estudo com camundongos que o heme induz a ativação da coagulação FT dependente e que este foi capaz de aumentar a expressão de FT de leucócitos. Adicionalmente, outro estudo também em camundongos demonstrou que o FT foi o responsável por ativar a coagulação, uma vez que sua inibição reduziu o complexo trombina/antitrombina (Chantrathammachart et al, 2012).

Quanto aos marcadores de hemólise não encontramos correlação linear significativa com a porcentagem de monócitos FT positiva, similares aos resultados encontrados por Ragab et al, (2016) em crianças.

Em relação marcadores de coagulação, verificamos correlação linear positiva fraca e significativa da porcentagem de FT apenas com o fibrinogênio, que embora dentro dos parâmetros de normalidade se mostrou significativamente superior comparado aos controles. Os resultados obtidos evidenciam um estado pró-trombótico, porém mudanças significativas dos parâmetros da coagulação podem ser encontradas na doença falciforme (Adan et al, 2008).

Outro fator relevante foi a elevada contagem de monócitos, um fator de risco trombótico pelo fato destas células ativadas, além de secretar citocinas inflamatórias, são a principal fonte de FT, como observado no presente estudo, contribuindo para o aumento do risco de eventos trombóticos (SHANTSILA et al, 2009; LEVI et al, 2010; SWANEPOEL et al, 2015).

Um estudo de Wongtong et al (2010), incluindo 70 crianças com DF, relatou alta contagem de monócitos, que correlacionou com os marcadores de hemólise, supondo que a monocitose seria secundária a hemólise.

Vários estudos têm descrito que o tromboembolismo é uma complicação comum na DF com alta incidência de trombose venosa profunda (TVP), trombose endovenosa (TEV) e embolia pulmonar (EP), relatando alta morbidade e mortalidade (PARSON et al, 2015; BRUNSON et al, 2017). Um estudo de NAIKE et al (2013), relataram a presença de trombos em pacientes com STA, enquanto Mekontson et al (2011), observaram que aproximadamente

17% de pacientes com STA, apresentavam trombose arterial pulmonar ao exame de imagem. Ainda, a relação entre hipercoagulabilidade e hipertensão pulmonar (HP), aumento da pressão da artéria pulmonar e resistência vascular pulmonar também tem sido descrita nestes pacientes, onde a HP foi observada em aproximadamente 30% de pacientes adultos com DF, sendo uma importante causa de morte. Estudos de autópsia demonstraram que 75% dos pacientes apresentaram evidências de HP, sugerindo que o tromboembolismo possa ser uma complicação da HP (RAHIMI; PARSIAN, 2011).

É sabido que os pacientes com DF apresentam alterações da hemostasia, o que pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos. No entanto o papel do FT de monócitos no estado de hipercoagulabilidade nesses pacientes ainda não foi completamente elucidado (MACKMAN, 2009, ATAGA et al, 2012). Assim baseado em estudos que relataram a alta morbidade e mortalidade de pacientes com DF decorrentes de alterações hemostáticas, acreditamos que este estudo, demonstrando a correlação do aumento do FT, com hemólise e coagulação, seja de significativa relevância.

A principal contribuição deste estudo foi demonstrar em adultos com DF o aumento significativo de monócitos FT positivo, o que pode estar relacionado à ativação crônica da coagulação nestes pacientes. Tendo em vista que o FT já é descrito como um fator de risco para complicações trombóticas, contribuindo para a formação do trombo em outras condições como: aterosclerose, diabetes, CIVD, AVCi e outras (CHU, 2011; GERRITS et al, 2011; Iacoviello et al, 2015), acreditamos, portanto, que os monócitos FT positivo possa ser fator de risco para os pacientes com DF, uma vez que estes apresentam um quadro hemolítico crônico, capaz de induzir o aumento de FT e promovendo maior geração de trombina.

## *CONCLUSÃO*



## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluímos que:

- 1) Houve um aumento significativo da porcentagem de monócitos FT positivo, demonstrando que os pacientes adultos com DF avaliados, cursam com um estado pró-trombótico.
- 2) A contagem absoluta de monócitos foi significativamente maior nos pacientes comparados controles.
- 3) Os pacientes apresentaram níveis significativamente menores da taxa de hemoglobina, níveis elevados de DHL, bilirrubinas e maior contagem de reticulócitos.
- 4) A análise dos marcadores de coagulação evidenciaram maior contagem de plaquetas, tempo prolongado de protrombina e níveis elevados de D dímero.
- 5) Não houve diferença signnificativa quanto a porcentagem de monócitos FT positivo em relação aos que faziam uso de hidroxiureia e aqueles que faziam uso, quanto ao subtipo de doença falciforme e em relação ao sexo.
- 6) Não encontramos correlação linear significativa com a taxa de hemoglobina, contagem de reticulócitos, DHL e bilirrubinas, contagem de plaquetas, TP, TTPA e D dímero, enquanto fibrinogênio mostrou uma correlação linear fraca e significativa.



## *REFERÊNCIAS*



## 7 REFERÊNCIAS

1. Adan SS, Zaher G, Ibrahim M, Ataga KI, De Castro LM et al. Markers of Coagulation Activation and Inflammation in Sickle Cell Disease and Sickle Cell Trait. **Blood**. 112(11):4813, 2008.
2. ARDUINI GAO, RODRIGUES LP, TROVÓ DE MARQUINI ABR. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Bras Hematol Hemoter**, 39(1): 52–56, 2017.
3. ATAGA, K. Thrombotic Complications In Hemolytic Anemias. **Haematologica**, 94(11): 1481-1484, 2009.
4. ATAGA, KI, KEY, NS. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: New Approaches to an Old Problem. **Hematology**, 1: 91-96, 2007.
5. ATAGA. KI, BRITAIN. JE, DESAI. P, MAY. R, JONES.S et al. Association of Coagulation Activation with Clinical Complications in Sickle Cell Disease. **PLoS ONE**. 7(1): e29786, 2012.
6. AUFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol**. 27: 669-92, 2009.
7. BARABINO GA, PLATT MO, KAUL DK. Sickle cell biomechanics. **Annu Rev Biomed Eng**. 15(12):345-67, 2010.
8. BECHER, JD, JOHN D. BELCHER, MAHASETH, H, WELCH, TE, OTTERBEIN, LE, et al. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **J Clin Invest**, 116(3): 808-816, 2006.
9. BELGE KU, DAYYANI F, HORELT A, SIEDLAR M, FRANKENBERGER M, FRANKENBERGER B et al The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNFJ. **Immunol**, 168:3536-3542, 2002.
10. BRUNSON A, LEI A, ROSENBERG AS, WHITE RH, KEEGAN T, WUN T. Increased incidence of VTE in sickle cell disease patients: risk factor, recurrence and impact on mortality. **Br J Haematol**, 178(2):319-326, 2017.
11. BUSERI FI, SHOKUNBI WA, JEREMIAH ZA. Plasma fibrinogen levels in Nigerian homozygous (Hb SS) sickle cell patients. **Hemoglobin**.31(1):89-92, 2007.
12. BUTENAS S. Tissue Factor Structure and Function. **Scientifica**, 1-15, 2012.

13. CARDOSO FA, Campos ER, Matos EC, Miguel Junior A. Endotélio Vascular: Função e Propriedades. **Rev Ciênc Med- PUC-CAMP**, 3(3): 76-84, 1994.
14. CARMELIET P, COLLEN D. Molecules in focus Tissue factor. **Int J Biochem Cell Biol**, 30(6): 661-667, 1998.
15. CEHMOB - MG (Centro de Educação e Apoio para Hemoglobinopatias de Minas Gerais)- Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (Nupad). ministério da saúde, 2017.
16. CERMAK BJ, KEY NS, BACH RR, BALLA J, JACOB HS, VERCELLOTTI GM. C- Reative Protein Induced Human Peripheral Blood Monocytes to Synthesize Tissue Factor. **Blood**, 82(2): 513-520, 1993.
17. CHANTRATHAMMACHART P, MACKMAN N, SPARKENBAUGH. E, WANG. JIAN-GUO, PARISE. LV et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse of sickle cell disease. **Blood**, 120(3): 636-646, 2012.
18. CHAPLIN JC, HAJJAR K. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood**, 29(1): 17-24, 2015.
19. CHEE YL. Coagulation. **J R Coll Physicians Edinb**. 44(1):42-45, 2014.
20. CHINAWA JM, EMODI IJ, IKEFUNA AN, OCHENI S. Coagulation profile of children with sickle cell anemia in steady state and crisis attending the university of Nigeria teaching hospital, Ituku-Ozalla Enugu. **Niger J Clin Pract**. 16(2): 159-163, 2013.
21. Chu. A. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. **I J Inflamm**, 11:1-30, 2011.
22. COLELLA MP, DE PAULA EV, CONRAN N, MACHADO-NETO JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF, Saad STO, Traina F. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **J Thromb Haemost**, 10(9):1967-1970, 2012.
23. CORAN N, ALMEIDA CB. Hemolytic vascular inflammation: an update. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 38(1): 55-57, 2016.

24. DAMANHOURI GD, JARULLAH J, MAROUF S, HINDAWI SI, MUSHTAQ G, KAMAL MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi J Biol Sci**, 22(1):24-31,2014.
25. DAR J, MUGHAL I, HASSAN H, AL MEKKI TE, CHAPUNDUKA Z et al. Raised D-dimer levels in acute sickle cell crisis and their correlation with chest X-ray abnormalities. **Ger Med Sci**. v 8: 1-4, 2010.
26. DE BAUN MR, SARNAIK SA, MARK J. R, MINNITI CP, THOMAS H. HOWARD TH et al .Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, sex, and relative high systolic blood pressure. **Blood**. 119(16): 3684–3690, 2012.
27. DE FRANCESCHI L, CAPPELLINI MD, OLIVIERI O. Thrombosis and sickle cell disease. **Semin Thromb Hemost**. 37(3):226-36, 2011.
28. DE SOUZA GR, HOUNKPE BW, FIUSA MML, COLELLA MP, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, TRAINA F, COSTA FF, DE PAULA EV. Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. **PLoS ONE**. 12(4): e0176505, 2017.
29. DEVINE DV, KINNEY TR, THOMAS PF, ROSSE WF, GREENBERG CS. Fragment D-dimer levels: an objective marker of vaso-occlusive crisis and other complications of sickle cell disease. **Blood**. 68(1):317–319, 1986.
30. DOUGALD MM, HOFFMAN M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? **Atheroscler Thromb Vasc Biol**. 26: 41-48, 2006.
31. ERGUL S, BRUNSON CY, HUTCHINSON J, TAWFIK A, KUTLAR A, et al. Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. **Am J Hematol**. 76(3):245-51, 2004.
32. FERREIRA CN, SOUSA MO, DUSSE LM, CARVALHO MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 32(5): 416-421, 2010.
33. FERRONE FA, APRELEV A. Ratchets, red cells, and metastability. **Biophys Rev**. 2013 Jun; 5(2): 217–224.
34. FIGUEIREDO ME. The compound state: Hb S/beta-thalassemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2015, 37(3): 150–152, 2015.

35. FRANCIS Junior RB. Elevated fibrin D-dimer fragment in sickle cell anemia: evidence for activation of coagulation during the steady state as well as in painful crisis. **Haemostasis**, (19):105–111, 1989.
36. FRENETTE PS, ATWEH GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**. 117(4): 850–858, 2007.
37. GALE AJ. Current Understanding of Hemostasis. **Toxicol Pathol**. 39(1): 273–280, 2011.
38. GENTIL NETO CG, PITOMBEIRA MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J Bras Patol Med Lab**, 39(1): 51-56, 2003.
39. GERRITS AJ, KOEKMAN CA, VAN HAEFTEN TW, AKKERMAN. Increased tissue factor expression in diabetes mellitus type 2 monocytes caused by insulin resistance. **J Thromb Haemost**. 9: 873-875, 2011
40. GLADWIN, MT. AND KATO, GJ. KATO. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens!" *Haematologica*, 93(1): 1-3, 2008.
41. GORDON S, MARTINEZ FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**. 28;32(5):593-604, 2010.
- 
42. HALL, JB; SCHMIDT, AG; KRESS, JP. **Principles of critical care**. 2015. 4ª edição. 902 p Disponível em: <www.accessmedicine.>. Acesso em: 23 mar. 2018.
43. HEBBEL RP. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. **Hematol Oncol Clin North Am**. 2014 (2):181-98.
44. HELLEY D, GIROT R, GUILLIN MC, BEZAUD A. Sickle cell disease: relation between procoagulant activity of red blood cells from different phenotypes and in vivo blood coagulation activation. **Br J Haematol**, 99(2):268-72, 1997.
45. IACOVIELLO L, DI CASTELNUOVO A, CURTSI A, AGNOLI C, FRASCA G, MATTIELLO A et al. Circulation Tissue Factor Levels and Risk of Stroke Findings From the EPICOR. **Stroke**, 46(6):1501-1507, 2015.
46. IGRAN VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature**, 178(4537):792-794, 1956.
47. IQBAL Z, LI, M, MCKENDRY, R, HORTON, M, CARUANA, DJ. Investigation of Sickle-Cell Haemoglobin Polymerisation under Electrochemical Control. **Chem Phys Chem**, 14: 2143–2148, 2013.

48. KATO GJ, TAYLOR JG. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. **Br J Haematol**. 148(5):690-701, 2010.
49. KAUL DK, EILEEN FE, BARABINO GA. **Microcirculation**. Sickle Red Cell - Endothelium Interactions. 16(1): 97–111, 2009.
50. KIMURA EM, OLIVEIRA DM, JORGE SED, ABREU CF, ALBUQUERQUE DM, COSTA FF et al. Identificação e caracterização de variantes novas da hemoglobina humana. **Rev Bras Hematol**, 30(4): 316-319, 2008.
51. KUYPERS FA. Hemoglobin S Polymerization and Red Cell Membrane Changes. **Hematol Oncol Clin N Am**, 28(2): 155–179, 2014.
52. LEVI M. Disseminated intravascular coagulation or extended intravascular coagulation in massive pulmonary embolism. **J Thromb Haemost**, 8(7): 1475–1476, 2010.
53. LIM MY, ATAGA KI, KEY NS. Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**, 20(5):472-477, 2013.
54. MACKMAN N. The role of tissue factor and factor VII in hemostasis. **Anesth Analg**, 108(5): 1447-1452, 2009.
55. MANWANI D, FRENETTE PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**. 5;122(24):3892-8, 2013.
56. MEKONTSON DA, DEUX JF, ABIDI N, LAVENU-BOMBLED C, MELICA G, RENAUD B, et al. Pulmonary artery thrombosis during acute chest syndrome in sickle cell disease. **Am J Respir Crit Care Med**. 184(9):1022-1029, 2011.
57. MIKOBİ TM, LUKUSA PT, ALONI MN, LUMAKA A, AKILIMALI PZ, DEVRIENDT K et al.. Association between sickle cell anemia and alpha thalassemia reveals a high prevalence of the  $\alpha 3.7$  triplication in congolese patients than in worldwide series. **J Clin Lab Anal**, e22186, 2017.
58. MINISTERIO DA SAÚDE. Manual de Educação em Saúde: Autocuidado na Doença Falciforme, Brasília, Brasil, Editora do Ministério da Saúde, 2008.
59. MOHEN JS, LIP GYH, WRIGHT J, BAREFORD D, BLANN AD. Plasma levels of tissue factor and soluble E selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 16(3): 209-214, 2005.

60. NAIKI RP, SREIFF MB, HAYWOOD JR C, NELSON JA, LANZKRON S. Venous thromboembolism in adults with sickle cell disease: A serious and under-recognized complication. **Am J Med**, 126(5): 443-449, 2013.
61. NORRIS LA. Blood coagulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. 17(3):369-83, 2003.
62. NOURAIIE M, LEE JS, ZHANG Y, KANIAS T, ZHAO X, XIONG et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, 98(3): 464-472, 2013.
63. ODIEVRE, M.H; VERGER E, SIVA-PINTO AC, ELION J et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, 134: 532-537, 2011.
64. PALTA S, SAROA R, PALTA. A Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth**. 58(5): 515–523, 2014.
65. PARSONS VVH, GARDNER K, PATEL R, THEIN. Venous thromboembolism In adults with sickle cell disease: experience of a single centre in the UK. **Am Haematol**, 95(2):227-232, 2016.
66. POTOKA KP, GLADWIN MT. Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 308(4):L314-24, 2015.
67. RAGAB SM, SOLIMAN MA. Tissue factor positive monocytes expression in children with sickle cell disease: Clinical implication and relation to inflammatory and coagulation markers. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 27(8):862-869, 2016.
68. RAHIMI Z, PARSIAN A. Sickle cell disease and Venous Thromboembolism. **Mediterr J Hematol Infect Dis**. 2011; 3(1): e2011024
69. RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, THANGAVE J, NISHIGAKI Y, SAKTHISEKARAN D, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. **I J Biol Sci**. 9(10):1057-1069, 2013.
70. RAO LVM, KOTARI H, PENDURTHI UR. Tissue Factor: Mechanisms of Decryption. **Front Biosci**, v 4: 1513-1527, 2014.
71. REES DC, WILLIAMS TN, GLADWIN MT. Sickle-cell disease. **Lancet**. 11;376(9757):2018-2031.

72. REHANI, T., K. MATHSON, J. D. BELCHER, VERCELLOTTI GM; SLUNGAARD A. Heme Potently Stimulates Tissue Factor Expression by peripheral blood monocytes: A novel mechanism for thrombosis in vascular hemolytic diseases. **Blood**, 21(122): 2215, 2013.
73. ROUMENINA LT, RAYES J, LACROIX-DESMAZES S, DIMITROV JD. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. **Trends Mol Med**. 22(3):200-213, 2016.
74. SCHECHTER AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, 112(10):3927-3938, 2008.
75. SEPÚLVEDA C, PALOMO I, Fuentes E. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. **Elsevier**. 164: 91-99, 2017.
76. SERBINA NV, CHERNY M, SHI C, BLEAU SA, COLLINS NH et al. Distinct Responses of Human Monocytes Subsets to *Aspergillusfumigatus* Conidia. **J Immunol** 183: 2678-2687, 2009.
77. SETTY BNY, KEY NS, RAO AK, GAYEN BETAL S, KRISHNAN.S et al. Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. **Br J Haematol**, (157) 370–380, 2012.
78. SHANTSILA EL, GREGORY YH. The role of monocytes in thrombotic disorders. **Thromb haemost**, (102): 916–924, 2009.
79. SHET AS, ARAS O, GUPTA K, HASS MJ, RAUSCH DJ, SABA N, KOOPMEINERS L, et al. "Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. **Blood**, 102(7): 2678-83, 2003.
80. SOLOVEY A, GUI L, NIGEL S, HEBBEL RP. Tissue Factor by endothelial Cell in Sickle Cell Anemia. **J Clin Invest**. 101(9): 1899–1904, 1998.
81. SPARKENBAUGH, E, PAWLINSKI R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **Brit J Haematol**. 162(1):3-14, 2013.
82. STYPULKOWSKI. JB, MANFREDINI. V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, (32) 56-62, 2010.
83. SWANEPOEL AC, VANCE G. NIELSEN VG. PRETORIUS E. Viscoelasticity and Ultrastructure in Coagulation and Inflammation: Two Diverse Techniques, One Conclusion. **Inflammations**, 38(4):1707-26, 2015.



84. TAYLOR JG VI, NOLAN VG, MENDELSON L, KATO GJ, GLADWIN MT, STEINBERG MH. Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasocclusive Pain. **PLoS ONE**. 3(5): e2095, 2008.
85. THAKUR TJ, GUINDO A, CULLIFER LR, LI Y, IMUMORIN IG, Diallo DA, Thomas BN. Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sickle Cell Disease in Africa. **Gene Regul Syst Bio**, 25(8):119-126, 2014.
86. VANDORPE DH, XU C, SHMUKLER, BE, LEO E. OTTERBEIN LE, TRUDEL M et al. Hypoxia Activates a Ca<sup>2+</sup>-Permeable Cation Conductance Sensitive to Carbon Monoxide and to GsMTx-4 in Human and Mouse Sickle Erythrocytes. **Plos ONE**, 5(1): e8732, 2010.
87. VERSTEEG HH, HEEMSKERK JW, LEVI M, REITSMA PH. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**. 93(1):327-358, 2013.
88. VIEIRA LM, DUSSE LMS, MARTINS FILHO AO, CARVALHO MG. Otimização da técnica de citometria de fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 25 (3): 141-147,2003.
89. WARE RE, MONTALENBERT M, TSHILOLO L, ABOUD MR. Sickle cell disease. **The Lancet**, 390(10091): p311–323, 2017.
90. WEITZ JI, FREDENBURGH JC, EIKELBOOM JW. A Test in Context: D-Dimer. **J Am Coll Cardiol**. 70(19):2411-2420, 2017.
91. WONG.LK; YEAP. WH; JING YI TAI. J; ONG. SM; DANG. TM et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunol Res**, 53(1-3): 41-57, 2012.
92. WONGTONG N, JONES S, DENG Y, CAI J, ATAGA K. Monocytosis is associated with hemolysis in sickle cell disease. **Hematology**. 20(10): 593-597, 2015.
93. YANG J, ZHANG L, YU C,1 XIAO-FENG Y, WAN H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**. 2: 1-9, 2014.
94. ZAGO MA, PINTO ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 29(3): 207-214, 2007.

95. ZHANG D, XU C, MANWANI D, FRENETTE S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, 127( 7):801-809, 2016.
96. ZIEGLER-HEITBROCK. L, ANCUTA. A, CROWE. S, DALOD. M, GRAU. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, 116(16):74-80, 2010.

# *ANEXOS*



## Anexo I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(Controle)

(No caso do maior de 18 anos)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **Expressão de Fator Tecidual por Monócitos em Pacientes com Doença Falciforme**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor assine ao final deste documento. Caso não concorde, você tem direito a se recusar a participar,

Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Neste estudo serão incluídos dois grupos: Controle (constituído por indivíduos saudáveis) e pessoas que tenham doença falciforme. Caso aceite participar e preencha todos os requisitos para se necessários, você será incluído ao grupo controle. O objetivo deste estudo é **Avaliar a Expressão de Fator Tecidual por Monócitos em Pacientes com Doença Falciforme** e caso você participe será necessário a coleta de 15 mL de sangue periférico que será obtido no momento da doação de sangue, de modo que não haverá necessidade de uma nova punção (picada com agulha). Este procedimento poderá lhe causar desconfortos inerentes à coleta como: (trauma físico e psicológico). Os profissionais que realizarão a punção venosa agirão de forma cuidadosa e atenciosa para minimizar os possíveis desconfortos decorrentes da coleta.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade (transporte e alimentação quando necessária). Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados da expressão do fator tecidual permitirá sabermos o risco que os pacientes com anemia falciforme têm de ter uma trombose, por isto sua participação é importante. O senhor (a) será informado quanto aos resultados dos seus exames. Solicitamos também a sua autorização para guardar este material, que futuramente poderá ser utilizado para outras pesquisas. Caso autorize, o soro e o material genético ficarão guardados em tubos, congelados em freezer na temperatura de -30°C e -80°C respectivamente por cinco anos, no laboratório de Pesquisa em Hematologia, localizado a rua Getúlio Guaritá 250, 4º piso, sob os cuidados do pesquisador. Caso este material venha a ser utilizados para pesquisas futuras, nós entraremos em contato para solicitar sua autorização. Uma nova pesquisa utilizando sua amostra somente será realizada, quando novamente aprovado pelo comitê de ética.

Ao final da pesquisa, o material biológico humano armazenado poderá: a) permanecer armazenado por até cinco anos ou prorrogado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde; b) ser descartado, conforme

normas vigentes de órgãos técnicos competentes, respeitando-se a sua confidencialidade e autonomia. Você será informado sobre o descarte deste material e de como ele será feito depois de finalizado o projeto. O descarte dos materiais será feito seguindo um protocolo onde os tubos serão descartados depois de colocados em solução desinfetante e a solução descartada na pia. Os tubos serão encaminhados para o lixo hospitalar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu concordo em participar do estudo.

### **Declaração de consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, portador(a) do documento de Identidade \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
com idade de \_\_\_\_\_ anos\*, prontuário \_\_\_\_\_, residente no endereço  
(Rua/Av) \_\_\_\_\_ Nº.

\_\_\_\_\_ complemento \_\_\_\_\_ Bairro

\_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

(MG), fone de contato ( ) \_\_\_\_\_ fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei desistir de minha participação, se assim o desejar.

Declaro que concordo participar do estudo. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Participante do estudo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

Cômite de Ética em Pesquisa Hemominas

Telefone:(31) 3768-4587

Email: cep@hemominas.mg.gov.br

Contato dos pesquisadores:

Gláucia Aparecida domingos Resende:

(34) 3321-8254/glauciarresende@hotmail.com

Paulo Roberto Juliano Martins: (34)3074-3200

Paulo.martins@hemominas.mg.gov.br

## **Anexo II**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(Paciente)**

(No caso do maior de 18 anos)

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: Expressão de Fator Tecidual por Monócitos em Pacientes com Doença Falciforme

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, por favor assine ao final deste documento. Caso não concorde, você tem direito a se recusar a participar,

Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é Avaliar a Expressão de Fator Tecidual por Monócitos em Pacientes com Doença Falciforme e caso você participe será necessário a coleta de 15 mL de sangue periférico que será obtido no momento da coleta de sangue para exames de rotina, de modo que não haverá necessidade de uma nova punção (picada com agulha). Este procedimento poderá lhe causar desconfortos inerentes à coleta como: (trauma físico e psicológico). Os profissionais que realizarão a punção venosa agirão de forma cuidadosa e atenciosa para minimizar os possíveis desconfortos decorrentes da coleta.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade (transporte e alimentação quando necessária). Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Em relação aos benefícios deste projeto podemos citar: os resultados da expressão do fator tecidual permitirá sabermos o risco que o senhor (a) tem de ter uma trombose, os resultados serão anexados ao seu prontuário para que o médico tenha acesso a estes dados. De forma indireta estes resultados da pesquisa poderão beneficiar outras pessoas. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada a pesquisa.

Para este projeto adotaremos os seguintes procedimentos: a partir do prontuário do participante nós iremos coletar os dados pessoais, e exames de laboratório já realizados e montar banco de dados para facilitar as análises.

Solicitamos também a sua autorização para guardar este material, que futuramente poderá ser utilizado para outras pesquisas. Caso autorize, o soro e o material genético ficarão guardados em tubos, congelados em freezer na temperatura de -30°C e -80°C respectivamente por cinco anos, no laboratório de Pesquisa em Hematologia, localizado a rua Getúlio Guaritá 250, 4º piso, sob os cuidados do pesquisador. Caso este material venha a ser utilizados para pesquisas futuras, nós

entraremos em contato para solicitar sua autorização. Uma nova pesquisa utilizando sua amostra somente será realizada, quando novamente aprovado pelo comitê de ética.

Ao final da pesquisa, o material biológico humano armazenado poderá: a) permanecer armazenado por até cinco anos ou prorrogado por até 10 anos, após autorizado do CEP e se em conformidade com as normas pertinentes do Conselho Nacional de Saúde; b) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, respeitando-se a sua confidencialidade e autonomia. Você será informado sobre o descarte deste material e de como ele será feito depois de finalizado o projeto. O descarte dos materiais será feito seguindo um protocolo onde os tubos serão descartados depois de colocados em solução desinfetante e a solução descartada na pia. Os tubos serão encaminhados para o lixo hospitalar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu concordo em participar do estudo.

Declaração de consentimento

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, portador(a) do documento de Identidade \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
com idade de \_\_\_\_\_ anos\*, prontuário \_\_\_\_\_, residente no endereço  
(Rua/Av) \_\_\_\_\_ Nº.  
\_\_\_\_\_ complemento \_\_\_\_\_ Bairro  
\_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

(MG), fone de contato ( ) \_\_\_\_\_ fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei desistir de minha participação, se assim o desejar.

Declaro que concordo participar do estudo. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Participante do estudo

Assinatura do(a) Pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:



Cômite de Ética em Pesquisa Hemominas

Telefone:(31) 3768-4587

Email: cep@hemominas.mg.gov.br

Contato dos pesquisadores:

Gláucia Aparecida domingos Resende:

(34) 3321-8254/glaucioresende@hotmail.com

Paulo Roberto Juliano Martins: (34)3074-3200

Paulo.martins@hemominas.mg.gov.br

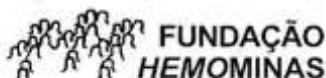
## Anexo III



### TERMO DE CONSTITUIÇÃO DE BIORREPOSITÓRIO

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa "Expressão Tecidual por monócitos em pacientes com Doença Falciforme" a ser gerenciado pelos pesquisadores Paulo Roberto Juliano Martins e Glaucia Aparecida Domingos Resende com participação do Hemocentro Regional de Uberaba da Fundação Hemominas (Av. Getúlio Guaritá, 250 - Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, 38025-440) e da(o) (Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM - autarquia federal - Av. Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia CEP: 38025-180 Uberaba/MG), conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto na Resolução CNS 441/11 e na Resolução CNS 466/12.

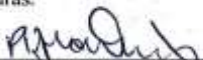
1. O Biorrepositório, constituído por (soro e material genético), atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado no(a) Laboratório de Pesquisa em Hematologia/UFTM, inscrito(a) no CNPJ sob o nº 25.437.484/0001-61 e situado(a) em Av. Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia CEP: 38025-180 Uberaba/MG.
2. O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer marca Sanyo, à temperatura de -80 °C, acondicionadas em eppendorfs.
3. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.
4. As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto.
5. A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo projeto de pesquisa e mediante aprovação da análise ética.




12. Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da cláusula 10.

13. Os casos não contemplados pelo presente Termo serão submetidos à análise conjunta dos acordantes e resolvidos de comum acordo pelas partes envolvidas.

Assinaturas:

  
Pesquisador Principal do Projeto

  
Representante Legal Fundação Hemominas

  
Daniel Gonçalves Chaves  
Chefe do Serviço de Pesquisa  
M.A.S.P. 1263172-7 CRB 04832-6  
Fundação Hemominas

  
Profa. Ana Lúcia de Assis Simões  
Reitora da UFTM  
Responsável Legal pela Instituição Acordante

## Anexo IV

### TERMO DE APROVAÇÃO CEP HEMOMINAS

22/11/2016

Plataforma Brasil

Saúde  
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Informe o E-mail   Informe a Senha   LOGIN


[Esqueceu a senha?](#)   [Cadastre-se](#)   v3.0

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

#### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

**- DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título Público:** Expressão de Fator Tecidual por monócitos em pacientes com Doença Falciforme  
**Pesquisador Responsável:** Paulo Roberto Juliano Martins  
**Contato Público:** Gláucia Aparecida Domingos Resende  
**Condições de saúde ou problemas estudados:**  
**Descritores CID - Gerais:**  
**Descritores CID - Específicos:**  
**Descritores CID - da Intervenção:**  
**Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP:** 10/10/2016



**- DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE**

**Nome da Instituição:** FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS  
**Cidade:** BELO HORIZONTE

**- DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Comitê de Ética Responsável:** 5118 - Fundação Hemominas-MG  
**Endereço:** Alameda Ezequiel Dias, 321  
**Telefone:** (31)3768-4587  
**E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br

**- CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA**

**- CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA**

[Voltar](#)

DATASUS  
Departamento de Informática da Saúde

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior) ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

SUS  
Ministério da Saúde

GOVERNO FEDERAL  
BRASIL  
PÁTRIA EDUCADORA