

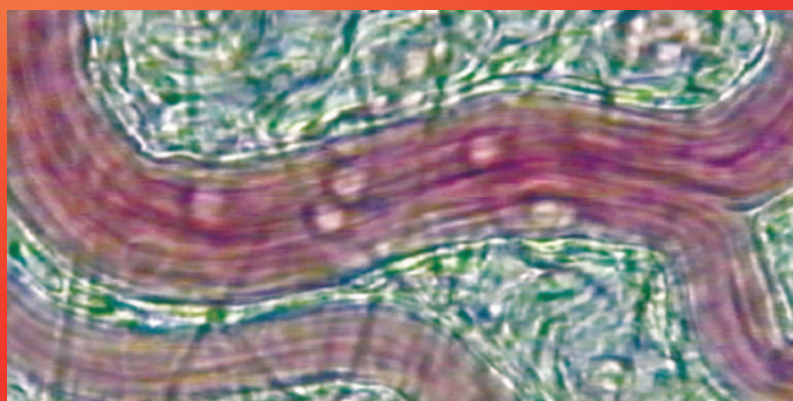


publicação semestral

Janeiro-Junho

vol. 32 n.º 1 2017

BSPHM



www.hemorreologia.com

Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation

BOLETIM

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation

Editor Principal/Editor-in-Chief: Carlota Saldanha **Editor Associado/Associated Editor:** Henrique Luz Rodrigues **Conselho Editorial Internacional/International Editorial Board:** PORTUGAL: José Pereira Albino, J. M. Braz Nogueira, Vítor Oliveira, Luís Mendes Pedro, Fausto J. Pinto, João Martins e Silva | OUTROS PAÍSES: Jean-Frederic Brun (França), Greet Schmid-Schoenbein (Estados Unidos), Nadia Antonova (Bulgária), Yukihide Isogai (Japão). **Coordenador Editorial:** João Martins e Silva.

Vol. 32 n.º 1 Janeiro-Junho 2017

Sumário / Summary

NOTA DE ABERTURA/EDITORIAL

- Deformabilidade eritrocitária 3
Carlota Saldanha

ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

- Impact of direct oral anticoagulants on hemostasis testing 5
- Impacto dos anticoagulantes orais diretos nos testes da hemostase
Maria Manuel Campos, Volodymyr Pishchanskyy, Maria José Marques

ATUALIZAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS/ARCHIVE

- Nitric oxide: what's new to NO? 12
- Clinical disorders responsible for plasma hyperviscosity and skin complications 13
- Pentoxifylline for vascular health: A brief review of the literature 14

NOTÍCIAS/NEWS AND INFORMATION

15

Política Editorial: O “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” fica a deter o direito de propriedade sobre todo o material publicado e difundido (artigos ou vídeos), após concordância expressa, por escrito, dos respetivos autores. O material eventualmente recusado não será devolvido.

Publication Policy of Material Presented: The “Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação” has the copyright ownership of all published and diffused material (articles or videos) conveyed, upon expressed and signed agreement of their Authors. The material eventually rejected will not be returned.

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Presidente Honorário: Prof. Doutor João Alcindo Martins e Silva

ÓRGÃOS SOCIAIS DA SPHM / BOARDS (2014-2016)

Direção / Executive Committee	Assembleia Geral / General Assembly	Conselho Fiscal / Finance and Audit Committee
<i>Presidente</i> Prof. ^a Doutora Maria Carlota Saldanha Lopes	<i>Presidente</i> Prof. Doutor José Manuel Braz Nogueira	<i>Presidente</i> Prof. Doutor João Eurico Fonseca
<i>Vice-Presidente</i> Dr. José António Pereira Albino	<i>1.º Secretário</i> Prof. Doutor Luís Mendes Pedro	<i>1.º Vogal</i> Dr. ^a Maria Helena Baptista Manso Ribeiro
<i>Secretário-Geral</i> Prof. Doutor Flávio Nelson Fernandes Reis	<i>2.º Secretário</i> Prof. Doutor Henrique Sobral do Rosário	<i>2.º Vogal</i> Dr. Carlos Manuel dos Santos Moreira
<i>Tesoureiro</i> Dr. ^a Ana Santos Silva Herdade	<i>1.º Secretário Suplente</i> Dr. ^a Sandra Maria Maurício Hilário Pires	Comissão de Delegados / Committee of Delegates
<i>Secretários-Adjuntos</i> Prof. ^a Doutora Alice Santos Silva Dr. Mário Manuel M. G. Marques Dr. Luís Sargento	<i>2.º Secretário Suplente</i> Dr. Paulo Ferreira da Silva	<i>Delegado da Região Norte</i> – Dr. Manuel Campos <i>Delegado da Região Centro</i> – Dr. João Morais <i>Delegado da Região Sul e Regiões Autónomas</i> – Dr. Mário Marques

MEMBROS CONSULTIVOS, HONORÁRIOS E CORRESPONDENTES / / CONSULTIVE, HONORARY AND CORRESPONDENT MEMBERSHIP

Conselho Científico / / Scientific Council

Axel Pries (Alemanha)
David Lominadze (Estados Unidos)
Friedrich Jung (Alemanha)
Gregório Caimi (Itália)
J. Braz Nogueira (Portugal)
J. Fernandes e Fernandes (Portugal)
Jean Frederic Brun (França)
Jerard Nash (Reino Unido)
João Morais (Portugal)
José M. Ferro (Portugal)
Nadia Antonova (Bulgária)
Sayon Roy (Estados Unidos)

Individualidades / / Distinguished Members

A. Diniz da Gama (Portugal)
A. M. Ehrly (Alemanha)
Carlos Ribeiro (Portugal)
Fernando Lacerda Nobre (Portugal)
Helbert J. Meiselman (Estados Unidos)
Helena Saldanha Oliveira (Portugal)
J. Esperança Pina (Portugal)
J.M.G. Toscano Rico (Portugal)
Jean François Stoltz (França)
Joaquim Silva Carvalho (Portugal)
John A. Dormandy (Grã-Bretanha)
John Edward Tooke (Grã-Bretanha)

Luís Providência (Portugal)
Luís Teixeira Diniz (Portugal)
M. Freitas e Costa (Portugal)
Manuel Carrageta (Portugal)
Mário Andreia (Portugal)
Michel Boisseau (França)
Políbio Serra e Silva (Portugal)
Rafael Ferreira (Portugal)
Ricardo Seabra Gomes (Portugal)
Sandro Forconi (Itália)
Sayon Roy (Estados Unidos)
Yukihide Isogai (Japão)

FILIAÇÃO INTERNACIONAL

EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL HEMORHEOLOGY
EUROPEAN SOCIETY FOR MICROCIRCULATION

Referência da capa: Vénula pós-capilar (diâmetro aproximado: 30 mm) de rede microvascular em mesentério de rato (*Rattus norvegicus*), observada por microscopia intravital de transiluminação. No interior do vaso sanguíneo visualizam-se leucócitos a interagir com a parede vascular. Imagem obtida por Henrique Sobral do Rosário (Instituto de Biopatologia Química – Prof.^a Doutora Carlota Saldanha, Faculdade de Medicina de Lisboa; Unidade de Biopatologia Vascular, Instituto de Medicina Molecular)

Esta publicação foi subsidiada por:

FCI: Fundação para a Ciência e Tecnologia (Ministério da Educação e Ciência – Portugal),
ao abrigo do: **Apoio do Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III.**

O **Boletim (ISSN 2182-6005)** é publicado semestralmente pela Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação. **Depósito Legal** 30 525/89. **Tiragem** 100 exemplares **Distribuição** sócios, sociedades científicas afins, entidades oficiais e privadas de âmbito médico e áreas de educação da ciência. Todos os direitos estão reservados. **Preço de cada número avulso:** 5 €, a que acresce 2,5 € para portes de correio. **Editor, Proprietário, Administração e Secretariado:** Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, a/c Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. **Endereço do Secretariado:** Apartado 4098, 1501-001 Lisboa, Portugal. **Telefone** 217 985 136; **Fax:** 217 999 447 **Execução Gráfica:** Publicações Ciência e Vida, Lda. **Telef.:** 214 787 850; **Fax:** 214 020 750. **E-mail:** pub@cienciaevida.pt

DEFORMABILIDADE ERITROCITÁRIA

E... voltamos ao sangue, não por saudosismo dos anos 1445 a.C., mas, sim, porque sem ele não teríamos vida. A manutenção de uma vida saudável, a prevenção da doença e o aumento da longevidade exigem que cuidemos do regular fluxo sanguíneo na microcirculação. Entupimentos a ocorrer na microcirculação serão desastrosos, geradores de anoxia local e, se não tratada, propagar-se-á conduzindo a isquemia, conducente a necrose tecidual, falência interna de órgãos e das extremidades corporais exigentes de amputações.

Em situações específicas, os glóbulos vermelhos apresentam diversos tipos de forma, com destaque para os equinócitos, estomatócitos e esferócitos; originam exovesículas e podem ser suscetíveis à hemólise. Nos microvasos, em particular nas arteríolas, observa-se o maior alongamento da forma elipsoide do eritrócito em relação à de discócito existente na macrocirculação. Defeitos na composição molecular ou estrutural dos componentes membranares ou da hemoglobina (hemoglobinopatias) afetam a forma de eritrócito e a capacidade deste em alterá-la de forma reversível, a que se denomina deformabilidade eritrocitária (DE).

A deformabilidade eritrocitária é um fator determinante para a normal perfusão sanguínea e oxigenação celular, dependente da velocidade de cisalhamento do fluxo sanguíneo e das forças de cisalhamento nas superfícies globulares. Alterações das propriedades mecânicas associadas à viscosidade da camada externa membrana passível de dobrar e “flutuar” (o volume do eritrócito é inferior à sua área) e ao meio interno viscoelástico em contacto com as proteínas do citoesqueleto de comportamento elástico repercutem-se em alterações da DE.

Subpopulações de eritrócitos com tempos de semivida variável, reconhecidos em gradiente de densidade, entre novos e velhos apresentam relação inversa com a deformabilidade eritrocitária. Daqui resulta que amostras de sangue obtidas de doentes com insuficiência renal em hemodiálise ou de doentes com diabetes *mellitus* ou, ainda, de doentes com drepanocitose apresentam percentagem diferente de eritrócitos novos ou velhos, o que explica a discordância entre os artigos publicados quanto aos valores quantificados para a DE efetuados em estudos de corte. Verificou-se em amostras de sangue, obtidas de doentes portadores de transplante renal, de doentes com hipertensão e de doentes com hipercolesterolemia diminuição dos valores da DE que se associavam inversamente com os valores do efluxo do monóxido de azoto. Nestas patologias, o eritrócito comporta-se como um protetor das espécies reativas de azoto.

Foi verificada diminuição da DE em amostras de doentes com artrite reumatoide e de doentes com lúpus eritematoso e nas situações de remissão ou de reatividade da doença reumática. A manutenção da diminuta DE é um fator determinante para distúrbios da microcirculação que se observa nestes doentes.

Na esclerose lateral amiotrófica, a DE aparece aumentada, o que pode constituir um elemento para o equilíbrio da oxigenação tecidual, favorecido pela retenção do monóxido de azoto no eritrócito.

O estado redox do eritrócito, quando mantido pela presença do ditiotreitol, não apresenta variações na deformabilidade, e compostos endógenos como a acetilcolina aumentam a DE.

Na membrana do eritrócito, as interações que se estabelecem entre as proteínas intrínsecas e as que compõem o citoesqueleto são moduladas pela proteína cinase C (PKC), que, pela ação de compostos ativadores ou inibidores, aumentam ou diminuem a DE. A PKC, ao fosforilar as proteínas do citoesqueleto, permite a dissociação entre as mesmas aumentando a DE. A fosforilação das proteínas da membrana do citoesqueleto dos eritrócitos é considerada como um fator de estabilidade mecânica, por aumentar a DE. Apesar de o grau de fosforilação da proteína band3 não interferir com a DE, a inibição do canal de efluxo da adenosina trifos-

fato (ATP) por inibidor específico aumenta a DE, o que reforça a contribuição da fosforilação das proteínas do citoesqueleto para melhorar a capacidade do eritrócito se deformar reversivelmente.

No modelo de experimentação da inflamação aguda *in vivo* em ratinhos verificou-se que a diminuição da deformabilidade eritrocitária facilitava o rolamento e a adesão dos glóbulos brancos às vénulas pós-capilares do cremaster. A resposta inflamatória é favorecida pela presença de eritrócitos de diminuta deformabilidade.

A deformabilidade eritrocitária influencia a hemólise, a viscosidade sanguínea e é um biomarcador da inflamação aguda e crônica.

REFERÊNCIAS

- Levítico 17, 11 (ca. 1445 a.C.) “The life of the flesh is the blood”
Cabrales P, Jani V. *The FASEB J* 2017; 31: 860-863
Fisher T, Stöhr-Liesen M, Schmid-Schönbein H. *Science* 1978; 202: 894-896
Mohandas N, Chasis J. *Semin Hematol* 1993;3: 171-192
Olim G, Marques S, Saldanha C, Santos D, Barroca P, Martins e Silva J. *Acta Med Port.* 1985; 6:137-41
Bor-Kucukatay M, Meiselman HJ, Başkurt OK. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;33:363-7.
Larden e col, *Nature* 1985; 294:667-668
Johnson e Tang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1107:314-318
Carvalho FA, Maria AV, Braz Nogueira JM, Guerra J, Martins-Silva J, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1-2):341-7
Saldanha C, Silva AS, Gonçalves S, Martins-Silva J. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007
Lopes de Almeida JP, Freitas-Santos T, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;50(3):213-9
Santos MJ, Pedro LM, Canhão H, Fernandes E Fernandes J, Canas da Silva J, Fonseca JE, Saldanha C. *Atherosclerosis.* 2011 Dec;219(2):821-6
Lima C, Pinto S, Napoleão P, Pronto-Laborinho AC, Barros MA, Freitas T, de Carvalho M, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016 Oct 5;63(4):423-437.
Silva-Herdade AS, Freitas T, Almeida JP, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;59(2):155-
Almeida JP, Carvalho FA, Freitas T, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;40(2):99-11162
de Oliveira S, Silva-Herdade AS, Saldanha C. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39(1-4):363-73
Silva-Herdade AS, Andolina G, Faggio C, Calado Â, Saldanha C. *Microvasc Res.* 2016 Sep;107:34-38.

IMPACT OF DIRECT ORAL ANTICOAGULANTS ON HEMOSTASIS TESTING**IMPACTO DOS ANTICOAGULANTES ORAIS DIRETOS NOS TESTES DA HEMOSTASE**

Maria Manuel Campos¹, Volodymyr Pishchansky², Maria José Marques³

RESUMO

O inibidor direto da trombina (dabigatran) e os inibidores diretos do fator Xa (rivaroxabano, apixabano e edoxabano) foram aprovados para prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso. Estes fármacos não necessitam de monitorização anticoagulante de rotina, mas podem causar efeitos em vários testes da hemostase.

Estudos específicos são atualmente usados para avaliação quantitativa destes novos anticoagulantes orais. Por outro lado, falsos resultados em testes da hemostase podem ser obtidos devido a interferência.

O objetivo desta revisão é comentar estes resultados falseados em testes de rotina ou especiais, de modo a evitar diagnósticos errados. Contudo, são também referidos alguns testes específicos que podem medir a atividade anticoagulante. Estes últimos podem ser úteis no contexto de hemorragia grave, potenciais interações farmacológicas, insuficiência renal e hepática, indicação para procedimentos invasivos emergentes e trombose no doente anticoagulado.

Os níveis destes anticoagulantes orais diretos podem ser medidos em pico e vale, proporcionando informação proativa e rigorosa acerca do risco de hemorragia ou trombose.

Interferências significativas na hemostase são óbvias nos testes coagulométricos, ao contrário do verificado nos estudos cromogénicos e imunológicos.

Este artigo pretende expor um conjunto de ferramentas para a interpretação de alguns cenários particulares relativamente à prática clínica e laboratorial no mundo real.

Termos-chave: anticoagulantes orais diretos, hemostase, interferência, testes específicos

ABSTRACT

Direct thrombin inhibitor (dabigatran) and direct factor Xa inhibitors (rivaroxaban, apixaban and edoxaban) are approved for venous thromboembolism prevention and treatment. These drugs don't need routine monitoring of anticoagulant activity, but they can cause effects on several hemostasis tests.

Specialized assays are currently used for quantitative assessment of these novel oral anticoagulants. On the other hand, false results of hemostasis tests can be obtained by interference.

This review intends to comment factitious results in routine or specialized assays to avoid misdiagnosis. However, some dedicated tests which can measure the anticoagulant activity are also mentioned. The last can

¹ Médica – Consultora de Imuno-Hemoterapia

² Médico – Interno do Internato Complementar de Imuno-Hemoterapia

³ Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública (2.ª Classe)

be useful in the context of major bleeding, potential drug interactions, liver and renal failure, emergent indication for invasive procedures and thrombosis in anticoagulated patients.

The levels of these direct oral anticoagulants can be measured in peak and through providing reliable and proactive information about the risk of bleeding or thrombosis.

Significant interferences in hemostasis are obvious on clot-based tests, in opposite to chromogenic and immunological assays.

This article aims to disclose an interpretation toolkit of some particular scenarios concerning the real-world laboratory and clinical practice.

Keywords: direct oral anticoagulants, hemostasis, interference, dedicated tests

CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS E FARMACODINÂMICAS DOS ANTICOAGULANTES ORAIS DIRETOS

O estado da arte, relativamente à medição da atividade anticoagulante dos anticoagulantes orais diretos (ACOD) e à interferência nos testes de rotina e especiais da hemostase, é apresentado com base numa estratégia de pesquisa incidindo em artigos produzidos entre 2012 e 2016.

Estes trabalhos científicos descrevem estudos próprios além de ensaios e revisões com elegível impacto internacional, pelo que podem ser ferramentas sólidas quando surgem dúvidas específicas ou resultados inesperados na prática diária.

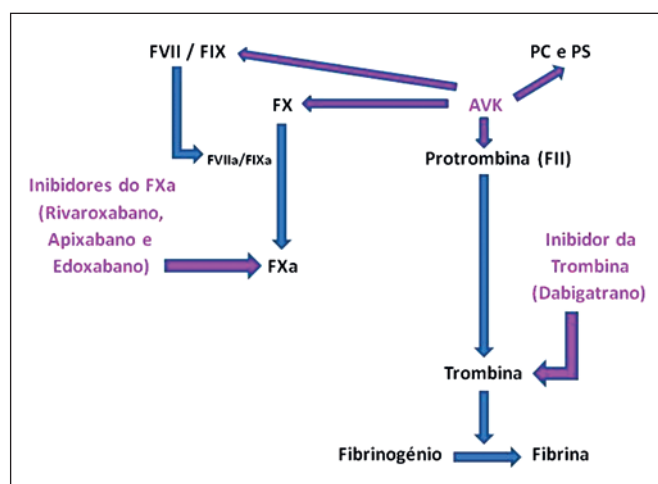
Destacam-se esquematicamente (Fig. 1) os locais de ação dos antagonistas da vitamina K (AVK) e dos

ACOD, concretamente dabigatrano, rivaroxabano, apixabano e edoxabano^{1,2,3}.

Em circunstâncias especiais, pode ser útil a avaliação da atividade anticoagulante (Quadro I)^{1-3,4,5,6,7,8}.

Quadro I. Utilidade do doseamento da atividade anticoagulante dos ACOD

Circunstâncias Especiais
Hemorragia grave (espontânea ou traumática)
Emergência cirúrgica
Diminuição da função renal/ insuficiência hepática grave
Suspeita de sobredosagem/ acumulação do fármaco
Potenciais interações farmacológicas
Trombose sob terapêutica
Extremos ponderais
Mudança de anticoagulante
Dúvidas sobre absorção em doentes com antecedentes de cirurgia intestinal



F = Fator; PC = Proteína C; PS = Proteína S

Figura 1. Alvos dos AVK e dos ACOD. As setas com preenchimento rosa indicam alvos terapêuticos e as setas com preenchimento azul representam a sequência fisiológica do processo da coagulação.

Algumas interações de natureza farmacológica e fitoterápica encontram-se sumarizadas no Quadro II^{2,3,9,10,11} e as contraindicações no Quadro III^{2,3,8-10}.

As principais características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos ACOD e AVK (varfarina) são apresentadas no Quadro IV^{1-5,9-11}, sendo interessante correlacionar o efeito máximo e a semivida com os valores obtidos em pico e em vale.

As interações com outros fármacos e produtos naturais decorrem da competição pela glicoproteína-P (gp-P) e pelos citocromos (CYP3A4, CYP2J2, CYP2C9 e CYP1A2) de acordo com o metabolismo e a absorção gastrointestinal^{2,3,9-10}. A eliminação renal é considerada relativamente ao fármaco não modificado^{2,3,9-11}.

Quadro II. Interações dos ACOD

Dabigatrano	Rivaroxabano	Apixabano	Edoxabano
Cetoconazol, Itraconazol, Posaconazol, Voriconazol			
Rifampicina			
–	Claritromicina		Eritromicina
Quinidina	–	–	Quinidina
Amiodarona	–	–	Amiodarona
Verapamil	–	–	Verapamil
Ritonavir			
Ciclosporina, Tacrolimus	–	–	Ciclosporina, Tacrolimus
Antiagregantes plaquetários	–	–	–
-	–	Naproxeno	–
Antiácidos	–	–	–
Carbamazepina, Fenobarbital, Fenitoína, Hypericum perforatum			

Quadro III. Contraindicações dos ACOD

Dabigatrano	Rivaroxabano	Apixabano	Edoxabano
Ciclosporina, Tacrolimus	–	–	–
Cetoconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol			
Ritonavir			

Quadro IV. Farmacocinética e farmacodinâmica dos ACOD e AVK (varfarina)

Características	Dabigatrano	Rivaroxabano	Apixabano	Edoxabano	Varfarina
Efeito máximo	1,30 – 2h	2 – 4h	3 – 4h	1 – 2h	5 dias
Semivida	12 – 17h	5 – 9h 11 – 13h*	8 – 15h	9 – 14h	36 – 48h
Biodisponibilidade	3 – 7%	66% (sem alimentos) 100% (com alimentos)	50%	62%	100%
Ligação a proteínas plasmáticas	35%	92 – 95%	87%	40 – 59%	99%
Eliminação renal	80%	33 – 35%	25 – 27%	35 – 50%	0%
Interações	gp-P	gp-P; CYP3A4; CYP2J2	gp-P; CYP3A4	gp-P; CYP3A4 (<5%)	CYP2C9; CYP1A2
Efeito dos alimentos	Absorção retardada	Requeridos (↑ absorção)	Não reportado	Não	Vegetais verdes
C _{máx.} em Pico**	126 – 175	290	123 – 171	250	–
C _{vale} em Vale**	65 – 91	32	79 – 103	25	–

*Se ≥75 anos; **Concentração (C) expressa em ng/mL (variações de ensaios clínicos)⁴

INTERFERÊNCIA NOS TESTES DA HEMOSTASE E IMPLICAÇÕES DE ORDEM PRÁTICA

A revisão da literatura selecionada focou-se no efeito dos ACOD nos testes da hemostase de rotina e especiais^{8,12,13,14,15}.

Alguns pormenores sobre estes estudos laboratoriais são fornecidos para explicar melhor as principais diferenças entre eles¹¹⁻¹⁵. A avaliação do impacto nos resultados obtidos é importante para evitar diagnósticos errados e abordagens terapêuticas desnecessárias^{13,14}.

Os laboratórios processam um número elevado de amostras e muitas vezes a falta de informação acerca

da medicação do doente pode estar na origem de falsos resultados^{13,14}.

1. Efeitos da atividade anticoagulante e decorrentes de interferência:

Os efeitos dos ACOD nos testes da hemostase são apresentados no Quadro V^{8,12,13} relativamente a três ACOD e nos Quadros VI^{1,5,8,12-15} e VII^{5,13-15} para o inibidor direto do Fator IIa, enquanto o Quadro VIII^{5,9,14} é dedicado aos inibidores diretos do Fator Xa. Abordam-se testes básicos e especiais.

Apesar da ausência de monitorização mandatória dos ACOD, são realizados, em muitos laboratórios, testes usando calibradores apropriados para os fármacos^{4,11-13,15}.

A cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa de alta resolução é o *gold stan-*

dard em termos analíticos, mas é realizada sobretudo em laboratórios farmacêuticos^{1,4-7}.

Alguns estudos como o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), tempo de trombina (TT), TT diluído, tempo de coagulação da ecarina e ensaio cromogénico da ecarina têm carácter informativo acerca da ação anticoagulante^{1,4,5,11,12}.

Estudos de geração da trombina, tromboelastografia e tromboelastometria rotacional são outros métodos também descritos na literatura para determinar esse efeito anticoagulante^{1,4,15}.

A determinação quantitativa do dabigatrano através do TT diluído e de um calibrador, em amostras de plasma citratado e a determinação da atividade anti-Xa (método cromogénico) adaptada ao rivaroxabano/apixabano em amostras de plasma citratado são abordagens que permitem determinar a concentração de cada um destes ACOD^{4,5,9,14}.

Quadro V. Estudos coagulométricos e cromogénicos sensíveis aos ACOD

Teste	Dabigatrano	Rivaroxabano	Apixabano
TP/INR	Valores normais não excluem efeito anticoagulante*	Valores normais não excluem efeito anticoagulante*	Valores normais não excluem efeito anticoagulante*
APTT	Valores normais podem não excluir efeito anticoagulante*	Valores normais não excluem efeito anticoagulante*	Valores normais não excluem efeito anticoagulante*
TT	Valores normais excluem efeito anticoagulante*	-	-
Teste do Inibidor Direto da Trombina (Dabigatrano)	Pico/ Vale**	-	-
Atividade Anti-Xa (Calibradores de Rivaroxabano/Apixabano)	-	Pico/ Vale**	Pico/ Vale**

INR = Razão normalizada internacional

Os testes para doseamento anti-Xa são cromogénicos, ao contrário dos restantes (coagulométricos)

*Podem indicar efeito anticoagulante se aumentados; **Variações específicas para cada ACOD

Quadro VI. Efeitos do inibidor direto do Fator IIa nos testes da hemostase (Parte I)

Teste	Efeito nos Resultados
Fatores da coagulação baseados no TP	Falsamente baixos: Fatores II, V, VII, X
Fatores da coagulação baseados no APTT	Falsamente baixos: Fatores VIII, IX, XI
Fator VIII (cromogénico)	Sem efeito
Fibrinogénio Clauss (baixa concentração de trombina/alta concentração de trombina)	(Ligeiramente diminuído/Sem efeito)
Heparina (baseado no Fator Xa/ Fator IIa)	(Sem efeito/Falsamente aumentado)
Pesquisa de inibidores da coagulação (estudos de mistura – TP e APTT)	Correção incompleta (falsa presença de inibidor)
Titulação de inibidor (método de Bethesda)	Título falsamente elevado

Quadro VII. Efeitos do inibidor direto do FIIa nos testes da hemostase (Parte II)

Teste	Efeito nos Resultados
Atividade da Antitrombina III (baseada no FXa/ FIIa)	(Sem efeito/ Falsamente elevada)
Atividade da Proteína C (coagulométrico/ cromogénico)	(Falsamente elevada/ Sem efeito)
Atividade da Proteína S (coagulométrico)	Falsamente elevada
Proteína S livre:Ag (método imunológico)	Sem efeito
D-Dímeros (método imunológico)	Sem efeito
APCR* (baseado no APTT com plasma deficiente em FV)	Falso negativo (razão aumentada)
Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (dRVVT**)	Falsos positivos
Plasminogénio (método cromogénico)	Sem efeito
Tempo de Reptilase	Sem efeito
Fator von Willebrand: Ag e Cofator da Ristocetina (métodos imunológicos)	Sem efeito

*Teste de resistência à proteína C ativada; **Tempo do veneno de víbora Russell diluído

Quadro VIII. Efeitos dos inibidores diretos do Fator Xa nos testes da hemostase

Teste	Efeito nos Resultados
TP (Pico/ Vale)	Razão: 1,3 – 1,6/ Normal
APTT (Pico/ Vale)	Razão: 1,4 – 1,6; prolongado (5 – 10 seg.)/ Normal
TT	Sem efeito
Fibrinogénio Clauss (alta concentração de trombina e/ou elevadas diluições do plasma-teste)	Sem efeito
Fibrinogénio derivado do TP	Falsamente elevado
D-Dímeros (método imunológico)	Sem efeito
FII, V, VII e X (TP); FVIII, IX e XI (APTT); FVIII cromogénico	Falsamente baixos
Estudos de mistura (TP e APTT)	Correção incompleta (falsa presença de inibidor)
Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (dRVVT)	Falsos positivos
APCR	Falsos negativos
Antitrombina III (métodos baseados FXa/ FIIa)	(Falsamente elevada/ Sem efeito)
Proteínas C e S (métodos coagulométricos)	Falsamente elevadas

Nos Quadros VII e VIII são referidos métodos imunológicos, que concretamente são de imunoturbidimetria (aglutinação com partículas de látex)^{5,9,13-15}.

2. Vantagens, desvantagens e implicações dos ACOD no mundo real:

2.1. Comparativamente aos AVK, os ACOD são vantajosos nas seguintes situações^{2,4,6,7,11-14}:

- Profilaxia de curta duração do tromboembolismo venoso (TEV) em doentes submetidos a artroplastia da anca e do joelho (edoxabano não indicado)

- Tratamento a longo prazo do TEV
- Prevenção de acidente vascular cerebral isquémico e tromboembolismo pulmonar em doentes com fibrilhação auricular não valvular
- Síndrome coronária aguda (apenas o rivaroxabano está indicado).

2.2. Algumas características dos ACOD incluem início rápido, manuseio no peri-operatório menos complicado, pois a semivida é muito menor que a dos dicumarínicos, embora ligeiramente maior que a das heparinas de baixo peso molecular, menos interações, posologia previsível e menor risco de hemorragia intracraniana⁹⁻¹¹.

2.3. Mencionam-se alguns potenciais problemas dos ACOD^{2,10}:

- Doseamento do fármaco em situações de emergência
- Existência de antídoto apenas para o dabigatrano
- Eliminação dependente da função renal
- Adesão variável à terapêutica
- Regime não uniforme no tratamento do TEV com o rivaroxabano e o apixabano
- Interferência em vários estudos da hemostase.

2.4. A hemoglobina e parâmetros da função renal e hepática devem ser avaliados periodicamente (anual/ semestralmente se ≥ 75 -80 anos e sobretudo sob dabigatran-

no ou edoxabano; intervalos menores justificam-se quando *clearance* da creatinina ≤ 60 mL/minuto e se surgirem intercorrências com impacto renal/ hepático)^{2,3,10}.

2.5. O idarucizumab (anticorpo monoclonal humano) pode ser disponibilizado para reversão, após o doseamento do dabigatrano, pois é o seu antídoto^{1,2}. Quando outros agentes, como o andexanet alfa (análogo do FXa humano recombinante) e a aripazina (molécula sintética de largo espectro), estiverem acessíveis poderão também necessitar de monitorização prévia dos anticoagulantes em causa^{2,11}.

2.6. As abordagens devem ser individualizadas face a diferentes *perfis hemorrágicos*^{2,9-11}.

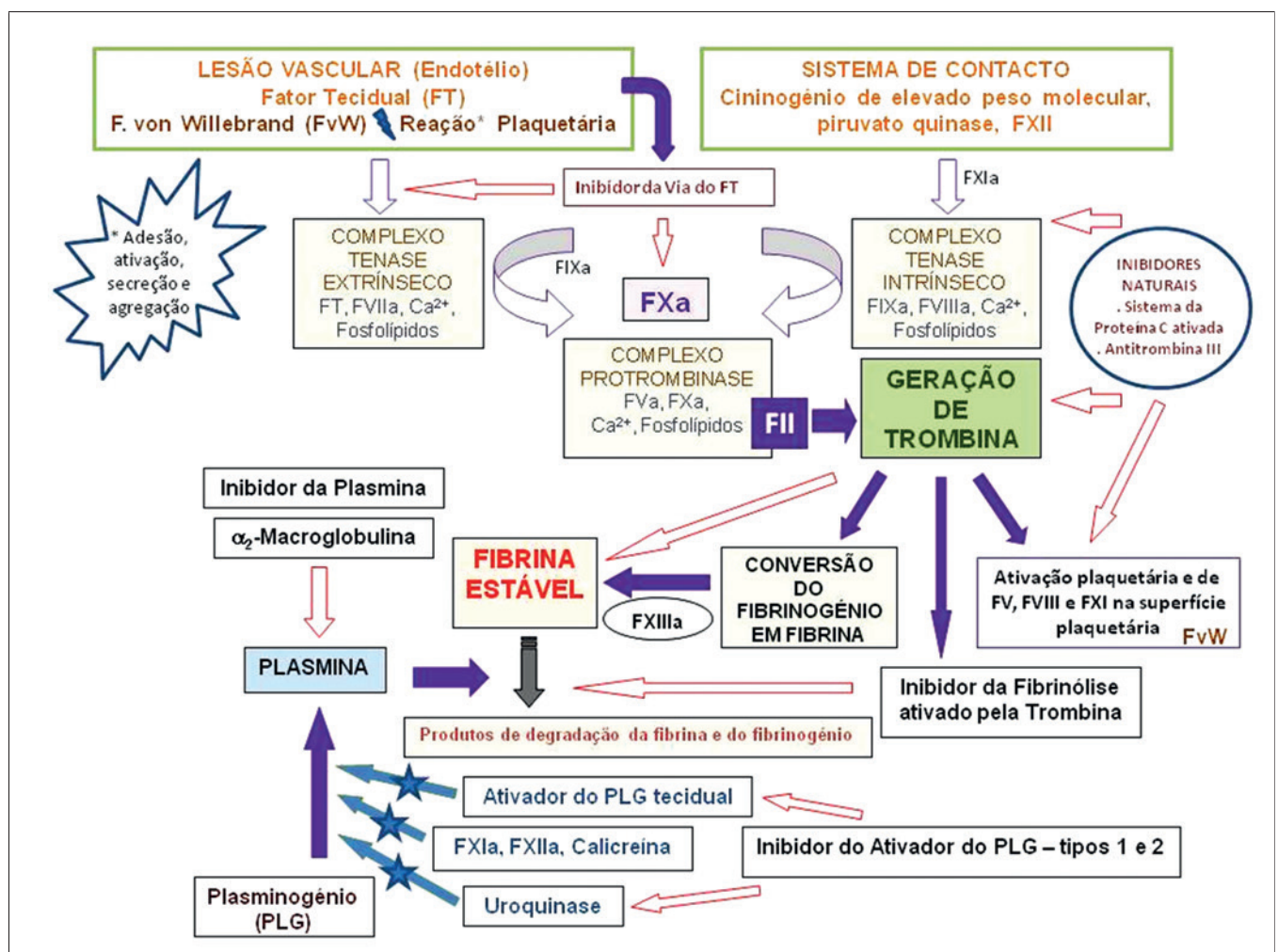


Figura 2. Hemostase primária, coagulação e anticoagulação. As setas púrpura não preenchidas e preenchidas representam a sequência das proteases de serina, glicoproteínas e transglutaminase (FXIII), marcando a interação nas vias extrínseca, intrínseca e comum da coagulação e na fibrinólise; as setas vermelhas não preenchidas simbolizam inibição; as setas azuis com estrelas indicam estimulação; e seta cinzenta evoca a fibrinólise; os fosfolípidos aniônicos estão presentes na membrana plaquetária.

A prática no mundo real necessita de técnicas laboratoriais de doseamento específico dos ACOD^{11,12} e de recursos para atuação em contexto hemorrágico^{2,9,11}, bem como de uma atitude crítica na interpretação de testes da hemostase, passíveis de interferências bem definidas¹³⁻¹⁵.

2.7. A ilustração (Fig. 2) representa a hemostase^{16,17}, muito delineada ao estilo *in vitro*, mas estabelecendo uma ponte com o modelo da coagulação baseado nas superfícies celulares – em que o fator tecidual (proteína transmembrana) atua como recetor e cofator do fator VII, encontrando-se em fibroblastos e células do músculo liso (expostos na lesão vascular), bem como em micropartículas na circulação sanguínea – visto como o novo paradigma *in vivo* dos processos de hemorragia e trombose¹⁶.

REFERÊNCIAS

1. Konkle BA. Direct oral anticoagulants – Monitoring anticoagulant effect. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2016;30:995-1006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2016.05.004>.
2. Heidbuchel H, Verhamme P, Alings M, Antz M, Diener H-C, Hacke W, et al. Updated european heart rhythm association practical guide on the use of non-vitamin K antagonist anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Europace*. 2015;17:1467-507. Doi:10.109/europace/euv309.
3. Vornicu O, Iarock A-S, Douxfils J, Mullier F, Dubois V, Dogné J-M, Gourdin M, Lessire S, Dincq A-S. Minimisation of bleeding risks due to direct oral anticoagulants. *EMJ Hematol*. 2016;4(1):78-90.
4. Dale BJ, Chan NC, Eikelboom JW. Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants. *Br J Haematol*. 2016;172: 315-36. Doi: 10.1111/bjh.13810.
5. Kitchen S, Gray E, Mackie I, Baglin T, Makris M. Measurement of non-coumarin anticoagulants and their effects on tests of haemostasis: Guidance from British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2014;166:830-41.
6. Samama MM, Contant G, Spiro TE, Perzborn E, Flem L, Guinet C, Gourmelon Y, Rohde G, Martinoli J-L. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thromb J*. 2013;11:11. <http://www.thrombosisjournal.com/content/71171/11>.
7. Harenberg J, Krämer S, Du S, Zolfaghari S, Schulze A, Krämer R, Weiss C, Wehling M, Lip GYH. Measurement of rivaroxaban and apixaban in serum samples of patients. *Eur J Clin Invest*. 2014;44:743-52. Doi: 10.1111/ecl.12291.
8. Baglin T, Keeling D, Kitchen S. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2012;159:427-9.
9. Baglin T. Clinical use of new oral anticoagulant drugs: dabigatran and rivaroxaban. *Br J Haematol*. 2013;163:160-7.
10. Schulman S. Advantages and limitations of the new anticoagulants. *J Intern Med*. 2014;275:1-11. Doi:10.1111/joim.12138.
11. Levy JH, Spyropoulos AC, Samama CM, Douketis J. Direct oral anticoagulants – New drugs and new concepts. *JACC*. 2014;7(12):1333-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcld.2014.06.014>.
12. Curvers J, Kerkhof D, Stroobants AK, Dool E-J, Scharnhorst V. Measuring direct thrombin inhibitors with routine and dedicated coagulation assays. *Am J Clin Pathol*. 2012;138:551-58.
13. Adcock DM, Gosselin R, Kitchen S, Dwyre DM. The effect of dabigatran on select specialty coagulation assays. *Am J Clin Pathol*. 2013;139:102-9.
14. Adcock DM, Gosselin R. Direct oral anticoagulants (DOACs) in the laboratory: 2015 Review. *Thromb Res*. 2015;136:7-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.05.001>.
15. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné J-M. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. *Thromb Haemost*. 2012;107. Doi:10.1160/TH11-11-0804.
16. Pendleton RC, Rodgers GM. Thrombosis and antithrombotic therapy. In: 13rd ed. Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM (editors). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2014: p. 1218-57.
17. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29:17-24.

NITRIC OXIDE: WHAT'S NEW TO NO?

Ghimire K¹, Altmann HM¹, Straub AC^{1,2}, Isenberg JS^{2,3,4}

Abstract

Nitric oxide (NO) is one of the critical components of the vasculature, regulating key signaling pathways in health. In macrovessels, NO functions to suppress cell inflammation as well as adhesion. In this way, it inhibits thrombosis and promotes blood flow. It also functions to limit vessel constriction and vessel wall remodeling. In microvessels and particularly capillaries, NO, along with growth factors, is important in promoting new vessel formation, a process termed angiogenesis. With age and cardiovascular disease, animal and human studies confirm that NO is dysregulated at multiple levels including decreased production, decreased tissue half-life, and decreased potency. NO has also been implicated in diseases that are related to neurotransmission and cancer although it is likely that these processes involve NO at higher concentrations and from nonvascular cell sources. Conversely, NO and drugs that directly or indirectly increase NO signaling have found clinical applications in both age-related diseases and in younger individuals. This focused review considers recently reported advances being made in the field of NO signaling regulation at several levels including enzymatic production, receptor function, interacting partners, localization of signaling, matrix-cellular and cell-to-cell cross talk, as well as the possible impact these newly described mechanisms have on health and disease. [**Am J Physiol Cell Physiol. 2017; 312(3):C254-C262**]. PMID: 27974299

¹ Heart, Lung, Blood and Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania.

² Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania; and.

³ Heart, Lung, Blood and Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania; jsi5@pitt.edu.

⁴ Division of Pulmonary, Allergy and Critical Care Medicine, Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania.

CLINICAL DISORDERS RESPONSIBLE FOR PLASMA HYPERVISCOSITY AND SKIN COMPLICATIONS

SCaimi G¹, Carlisi M², Urso C², Lo Presti R², Hopps E²

Abstract

In this brief review, we have examined some clinical disorders which are associated to an altered hemorheological profile and at times accompanied by skin ulcers. This skin condition may be, in fact, observed in patients with primary plasma hyperviscosity such as multiple myeloma, Waldenstrom macroglobulinemia, cryoglobulinemia, cryofibrinogenemia, dysfibrinogenemia and connective tissue diseases. It must be underlined that the altered hemorheological pattern is not the only responsible for this skin complication but, as it worsens the microcirculatory flow, it contributes to determine the occurrence of the skin ulcers. [**Eur J Intern Med.** 2017 Jul;42:24-28.]. PMID: 28390781

¹ Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università di Palermo, Italy. Electronic address: gregorio.caimi@unipa.it.

² Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università di Palermo, Italy.

PENTOXIFYLLINE FOR VASCULAR HEALTH: A BRIEF REVIEW OF THE LITERATURE

McCarty MF¹, O'Keefe JH², DiNicolantonio JJ²

Abstract

Pentoxifylline is a methylxanthine derivative that has been used for several decades in the symptomatic management of intermittent claudication. For reasons that remain fairly obscure, this drug benefits blood rheology in a number of complementary ways: decreasing blood and plasma viscosity, lowering plasma fibrinogen while promoting fibrinolysis, and improving blood filterability by enhancing erythrocyte distensibility and lessening neutrophil activation. Anti-inflammatory effects on neutrophils and macrophage/monocytes—some of them attributable to pentoxifylline metabolites—appear to play a mediating role in this regard. Although clinical trials with pentoxifylline have often been too small in size to reach statistically significant findings regarding impacts on hard end points, a review of the existing literature suggests that pentoxifylline may have potential for slowing the progression of atherosclerosis, stabilising plaque, reducing risk for vascular events, improving the outcome of vascular events, dampening the systemic inflammatory response following cardiopulmonary bypass, providing symptomatic benefit in angina and intermittent claudication, enhancing cerebral blood flow in patients with cerebrovascular disease while slowing progression of vascular dementia, improving prognosis in congestive heart failure, and aiding diabetes control. This safe and usually well-tolerated drug works in ways quite distinct from other drugs more commonly used for cardiovascular protection, and hence may confer complementary benefit when used in conjunction with them. Major clinical trials of adequate statistical power are now needed to confirm the scope of benefits that pentoxifylline can confer; studies evaluating hard end points in acute coronary syndrome, stroke/transient ischaemic attack and systolic heart failure might be particularly valuable. [**Open Heart**. 2016 Feb 8;3(1):e000365]. PMID: 26870389

¹ Catalytic Longevity, Encinitas, California, USA.

² Saint Luke's Mid-America Heart Institute, Kansas City, Missouri, USA.

XI. International Conference on Hemorheology and Microcirculation

3–5 July 2017 Yaroslavl, Russia

International Society of Clinical Hemorheology (ISCH)

Russian Society of Hemorheology and Microcirculation

Moscow State University

Yaroslavl State Pedagogical University

Yaroslavl State Medical Academy



XI INTERNATIONAL CONFERENCE ON HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION

3-5 July 2017 Yaroslavl, Russia

Casein Kinase 2 Effects on Nitric Oxide Metabolism and Deformability of Human Erythrocytes

Saldanha C, Silva-Herdade, AS.

Instituto de Bioquímica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

Abstract

Introduction – Erythrocytes are blood components that scavenge and deliver oxygen and nitric oxide (NO). These physiological functions are dependent of erythrocyte membrane integrity and interaction with endothelial cells, white blood cells, platelets and lipoproteins. Membrane enzyme acetylcholinesterase and CD47 function as receptors on the signal transduction pathways of NO. CD47 protein belongs to the Rh complex and is the receptor of soluble fibrinogen (Fib). Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates proteins with serine residues like band 3 protein, and others implicated in malaria of parasite adhesion. Our aim was to study the effects of casein kinase 2 inhibitor, CX4945, in erythrocyte NO metabolism and deformability. Blood samples are collected from 10 blood donors at Lisbon National Institute of Blood, and from each one, samples aliquots were done and incubated without and with high [Fib], CX4945, adenylyl cyclase inhibitor (MDL) and PI3K inhibitor (WORT). NO efflux was quantified with sensor amino-IV coupled with inNO-Tm software, and nitroso-glutathione (GSNO), nitrite and nitrate levels inside erythrocyte by spectrophotometric analysis. Erythrocyte deformability (EEI) was quantified using Rheodyn SSD laser diffractometer. Our results showed that CX4945: (i) increased significantly the amounts of GSNO and of nitrate inside erythrocytes being reinforced simultaneously either in presence of Fib plus MDL or by Fib plus WORT (ii) maintained the concentration of NO, and nitrite inside erythrocytes independent of the simultaneously presence of Fibrinogen, or Fib plus MDL or Fib plus WORT (iii) did not change erythrocyte membrane deformability. However when CX4945 is in presence of Fib plus MDL increase EEI values either in relation to control aliquots or in relation to CX4945 aliquots.

In conclusion CKII inhibition maintained (i) the need of band 3 protein phosphorylation for NO efflux, (ii) the GSNO as a reservoir of NO and reinforce the erythrocyte deformability when in presence of soluble fibrinogen and the adenylyl cyclase inhibitor

Casein Kinase 2 Effects on Nitric Oxide Metabolism and Deformability of Human Erythrocytes



Carlota Saldanha, Ana Silva-Herdade*

*Instituto de Bioquímica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Centro Académico de Medicina, Lisboa –Portugal

*anarmls@medicina.ulisboa.pt

Introduction

Biophysiological Properties of Human Erythrocyte

Preserves nitric oxide (NO) bioavailability.

Presents membrane CD47 protein a soluble fibrinogen receptor which participate in the signal transduction pathways of NO and its derivative molecules under different fibrinogen concentrations.

Participates in NO efflux through Band 3 protein phosphorylation, in dependence of high fibrinogen concentration and low cAMP levels.

Effects of Casein Kinase 2 (CK2) in Human Erythrocyte

CK2 is a cytosol protein which phosphorylate serine residues of erythrocyte membrane band 3 protein

CK2 protein reduce membrane redox system

CK 2 inhibitors present anti-cytoadherence properties that becoming indicated as antimalarial drug to be explored

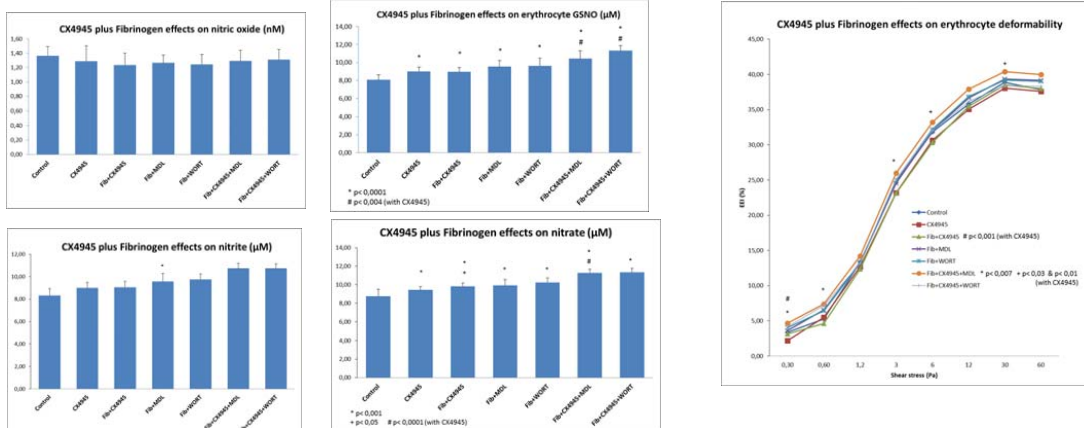
Aim

The aim of this work was to evaluate *ex-vivo* the effect of CK2 on NO efflux from human healthy erythrocytes and NO molecules derivatives and in erythrocyte deformability

Methods

Experimental design: whole blood samples were gathered from 10 healthy volunteers from Instituto Português de Sangue de Lisboa. Amounts of NO efflux from erythrocytes and S-nitrosoglutathione (GSNO), nitrite and nitrate levels inside erythrocytes were quantified after incubation of blood samples aliquots (obtained from each original blood samples) in absence and presence of CK2 inhibitor CX4945 10^{-5} M. **Methods:** NO was determined by amperometric method and GSNO, NO^{-3} and NO^{-2} were measured using the spectrophotometric Griess reaction. Erythrocyte deformability was quantified using the Rheodyn SSD laser diffractometer. **Statistical analysis:** Data are expressed as means \pm SD. Student's paired t-test were applied to assess statistical significance amongst samples. Statistical significance was set at a $p < 0.05$.

Results



Conclusions

CK2 inhibition increase the amount of GSNO and of nitrate concentrations inside erythrocytes being reinforced simultaneously either in presence of Fib plus MDL or by Fib plus WORT

CK2 inhibition maintains the concentration of NO, and nitrite inside erythrocytes independent of the simultaneously in presence of soluble Fib, or Fib plus MDL or Fib plus WORT.

CK2 inhibition did not change erythrocyte membrane deformability. However when in presence of Fib plus MDL increase it either in relation to control aliquot or in relation to inhibitor itself aliquots.

CK2 inhibition maintained (i) the need of band 3 protein phosphorylation for NO efflux, (ii) the GSNO as a reservoir of NO and reinforced the erythrocyte deformability when in presence of soluble fibrinogen and the adenylyl cyclase inhibitor.

References

Nitric Oxide Biol Chem 2000; 4:177-313-4; Biosens Bioelectron 2004; 20: 505-8; Hemorheol Microc. 2011; 49:407-16; Bioch Bioph Acta 2012; 1818: 481-90; Korea-Australia Rheology J 2014; 26:1-7

Acknowledgments

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSISSO SUPERIOR

Changes in Erythrocyte Nitric Oxide Metabolism Induced by Fibrinogen

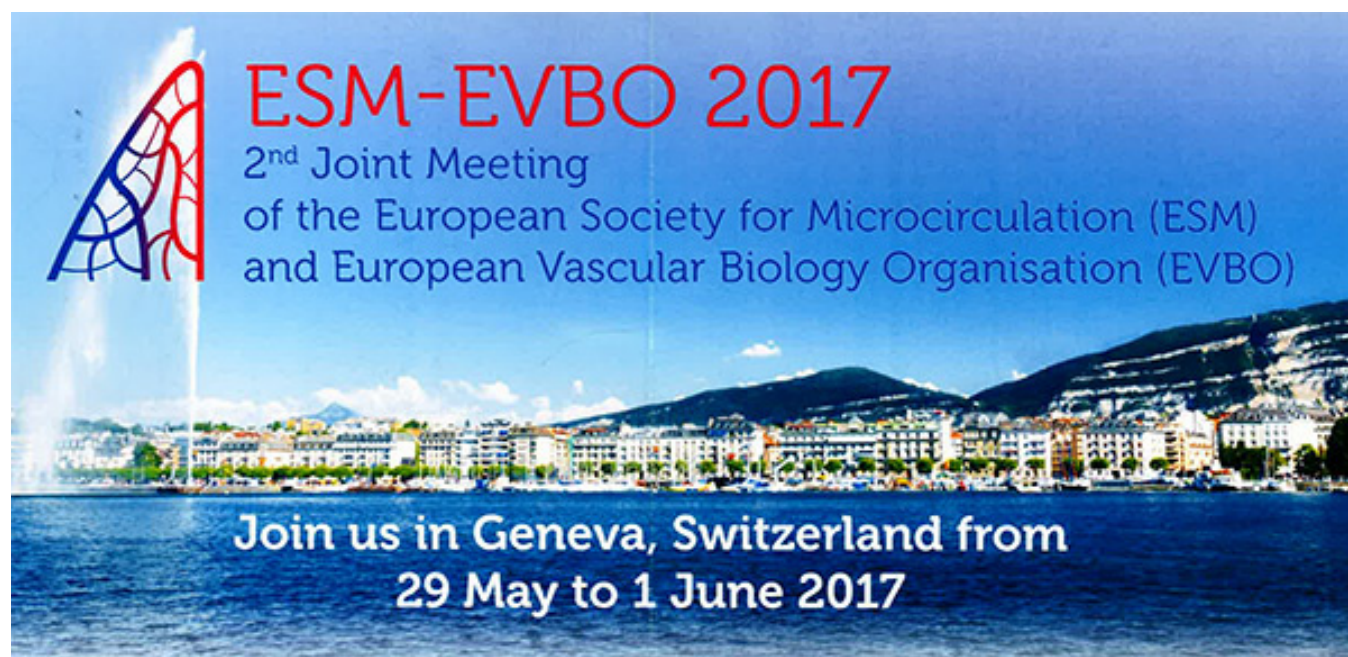
Carlota Saldanha, Ana Silva-Herdade*

Instituto de Bioquímica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal. Email: anarmsilva@medicina.ulisboa.pt

Mini Review

Fibrinogen is a plasma protein which participate in hemostasis and inflammatory mechanisms. It behaves as a hemorheological factor, contributing to plasma viscosity values and to the formation of reversible erythrocyte aggregates. The erythrocyte hyperaggregation induced by high fibrinogen levels takes place in several metabolic and cardiovascular diseases confirmed in vivo by ultrasonography and ex vivo by laboratory methodologies in venous blood samples. We have showed that erythrocyte aggregation is an independent predictor of recurrent cardiovascular events in humans following their transmural myocardial infarction.

An alternative view is that the eventual fibrinogen-cardiovascular disease association may be a consequence of the disease process, perhaps due to an inflammatory response to progressive endothelial damage. Endothelium-derived nitric oxide (NO) could be delivered to smooth muscles or to the vessel lumen. NO lowers blood pressure by stimulating the release of calcium from vascular smooth muscle cells, thereby causing the blood vessels to dilate. Following its passage into red blood cells through band3 protein, NO may be stored interacting with hemoglobin generating nitrosylhemoglobin at low oxygen arterial pressure (PaO₂) or S-nitrosohemoglobin in lower PaO₂. The major stable metabolites resulting from NO oxidation, include nitrites and nitrates. NO furthermore reacts with superoxide anion to yields peroxynitrite, which may either originate nitrate or damage proteins, lipids and carbohydrates via oxidation and nitration reactions. Glutathione, an antioxidant molecule with a thiol group, binds to NO forming S-nitrosothiol (GSNO), a secondly important storage NO molecule. We have showed that the erythrocyte membrane CD47 protein is the target of soluble fibrinogen. CD47 is a component of Rh group associate with G_{ai} which inhibits the adenylyl cyclase (AC) to produce cAMP. We have showed that the ability of erythrocyte to scavenger NO is potentiated in presence of soluble fibrinogen, at physiological concentrations, with consequently decrease of NO efflux. When hyperfibrinogenemia is mimicked in vitro erythrocyte NO efflux increased in dependence of band3 protein phosphorylation returning to normal levels when in presence of either acetylcholine (ACh) or timolol, respectively substrate and inhibitor of acetylcholinesterase. However if the AC is completely inhibited by the specific inhibitor MDL, in presence of high fibrinogen levels plus either timolol or plus 4N1K (a binding peptide of CD47) an increase of erythrocyte NO efflux is verified. The levels of NO efflux return to normal with increased cAMP concentration achieved either by PDE3 enzyme dephosphorylated in inactive state (resulting from inhibition of PI3-K by worthamin) or by the AC activation by forskolin. Those results allows us to conclude that in acute or chronic inflammation where soluble fibrinogen concentration are above the normal range, the erythrocyte ability to scavenger maintaining NO or deliver it is dependent of band 3 protein phosphorylation degree, low cAMP levels and AChE enzyme molecule conformations. It is very interesting that the activation of AC enzyme by forskolin, which normalize the levels of NO efflux from erythrocytes in hyperfibrinogenaemia, is nowadays used for lower body weight in obese human and to alleviate patients with glaucoma. Obesity and glaucoma are inflammatory diseases where erythrocytes from patients with these diseases showed increase NO efflux. So, one explanation for the forskolin success in both inflammatory diseases could be the ability of the erythrocytes capture the NO avoiding the oxygen and nitrogen reactive species formation.



2ND JOINT MEETING ESM-EVBO, 2 *

May – 1 June 2017, Geneva, Switzerland

Biophysiological Role of Red Blood Cells in Microcirculation

Vasc Res 2017, 54 (Sup 1): 67

Carlota Saldanha, Inês Oliveira, Patricia Napoleão, António Messias*,

Instituto de Bioquímica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal. Email: anarmsilva@medicina.ulisboa.pt

*Hospital Beatriz Ângelo

Abstract

Introduction- Red Blood Cells (RBCs) are blood components that scavenge and deliver oxygen and nitric oxide (NO). These physiological functions, at microcirculatory vessel network are dependent of RBCs membrane integrity and normal interaction with endothelium and white blood cells and platelets. Membrane enzyme acetylcholinesterase and CD47 function as receptors on the signal transduction pathways of NO. Our aim was to evaluate in vitro the insulin participation on NO efflux from erythrocytes of patients with shock septic (SS) and highlight the in vivo inflammatory situation where RBCs are associated with hemodynamics parameters in microcirculation. Blood samples are collected from 20 patients with SS and from each one, erythrocyte suspensions were done and incubated without and with insulin 31mU/mL or acetylcholine (ACh 10-5M) or both (4 aliquots from each patients). NO efflux was quantified with sensor amino-IV coupled with inNO-Tm software, and nitrosogluthatione (GSNO) level inside RBCs by spectrophotometric analysis. Sublingual hemodynamics evaluation were made in same day of blood collection. Our results shown that inn SS patients insulin significantly ($P < 0.05$) increased the RBCs [GSNO], did not influence the efflux of NO from erythrocytes. However a significantly ($p = 0.03$) positive correlation was showed between NO efflux amount and levels of perfused vessel density (PVD). In conclusion insulin maintained the ability of erythrocytes from septic shock patients to scavenge NO.



Biophysiological Role of Red Blood Cells in Microcirculation

Carlota Saldanha*, Inês Oliveira*, Patricia Napoleão*, António Messias**

*Instituto de Bioquímica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Centro Académico de Medicina, Lisboa – Portugal

** Hospital Beatriz Ângelo

E-mail: carlotasaldanha@fm.ul.pt

Introduction

Erythrocyte Properties

Preserve nitric oxide (NO) bioavailability.

Present membrane enzyme AChE (a GPI protein) acting as receptor on signal transduction pathways of NO in dependence of its active or less active or inactive complex states and biomolecular conformations.

Participate in NO efflux through Band 3 protein phosphorylated by PTK (activated by PKC) associated to AChE – ACh enzyme active complex dependent of Gai protein, independent of cAMP levels.

Aim

The aim of this work was to evaluate *ex-vivo* the effect of insulin on NO efflux from erythrocytes of patients with septic shock and the association with hemodynamic parameters obtained *in vivo* in sublingual microcirculation.

Insulin Effects in Erythrocyte

- Insulin receptor are situated near erythrocyte membrane GPI protein family.
- Insulin receptors present heterogeneity dependent of erythrocyte age
- Insulin receptors down-regulation depends of its own concentration
- Insulin activation of erythrocyte insulin receptor kinase is not influenced by hiperglycemia and is not impaired in NIDDM.
- Insulin inhibits human erythrocyte cAMP accumulation and ATP release

Methods

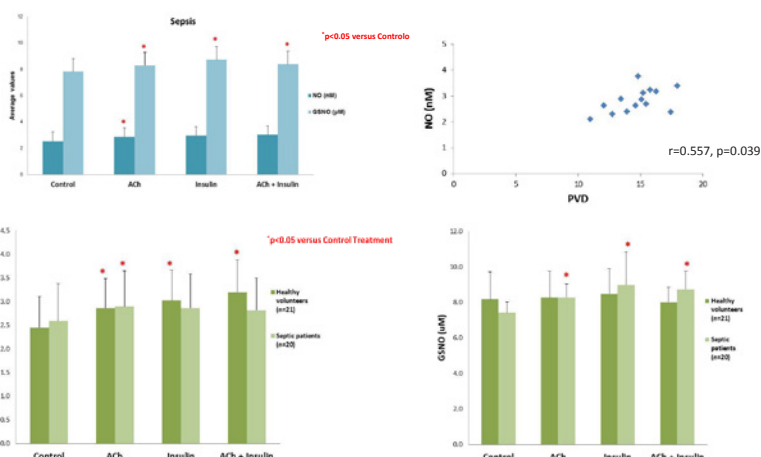
Experimental design: whole blood samples were gathered from 20 patients with septic shock in the Intensive Care Unit of Hospital Beatriz Ângelo and from 21 healthy volunteers. Amounts of NO efflux from erythrocytes and S-nitroglutathione (GSNO) inside erythrocytes levels were quantified, after incubation of erythrocytes suspensions in absence and presence of insulin 31mU/mL (180nM) with or without ACh 10-5M. **Methods:** NO was determined by amperometric method and S-nitrosoglutathione (GSNO) were measured using the spectrophotometric Griess reaction. **Statistical analysis:** Data are expressed as means ± SD. Student's paired t-test were applied to assess statistical significance amongst samples. Statistical significance was set at a $p < 0.05$.

Results

Table 1 - Demographic and Clinical Characteristics of Patients with Septic Shock

	Septic Shock (n=20)
Sex (f/m)	11/9
Age (y)	72 (60 - 82)
Body mass index (Kg/m ²)	23 (20 - 26)
Mean arterial pressure	72 (67 - 82)
Heart frequency (bpm)	87.5 (78.5 - 105)
Temperature (°C)	36.8 (36.2 - 37.3)
Glycaemia	175 (136 - 202)

Data expressed as median and inter-quartiles (Q25-Q75), except when otherwise indicated.



Conclusions

- Insulin increase the amount of GSNO inside erythrocytes from patients with septic shock
- Insulin maintains the concentration of NO inside erythrocytes from patients with septic shock
- A positive Association was observed between [NO efflux] and perfused vessel density at sub-lingual microcirculation
- The effect of insulin in erythrocytes from healthy persons increase NO efflux and unchanged the [GSNO]

References

Nitric Oxide Biol Chem 2000; 4:177-313-4; Biosens Bioelectron 2004; 20: 505-8, Hemorheol Microc. 2011; 49:407-16, Biach Bioph Acta 2012; 1818: 481-90 Korea-Australia Rheology J 2014; 26:1-7

Acknowledgments

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Red Blood Cells Properties in Human Microcirculation

J Vasc Res 2017, 54 (Sup 1): 39-40

Saldanha C, Oliveira I, Napoleão P, Messias, A, Silva-Herdade A

Abstract

The physiological role of Red Blood cells (RBCs) in microcirculation will be highlight in this minireview. RBCs can elongate and can undergo aggregation in dependence of several factors like glucose metabolism and several signal transduction mechanisms. RBCs is a component of blood and has ability to scavenger and delivery oxygen and nitric oxide (NO) to all tissues. For the estimation of the oxygenation of tissue's status it is necessary the quantification of the affinity of haemoglobin to oxygen. It was found increase of P50 in hypertensive patients with diastolic pressure higher or equal to 130mm Hg. In a group of diabetic patients high plasma glucose levels and decrease values of P50 were obtained Erythrocytes scavenges NO from endothelium that bound to the heme of deoxygenate hemoglobin forming nitrosyl haemoglobin and tied to the cysteine of oxyhemoglobin beta chain originating S-nitrosohemoglobin. It was verified higher NO release from erythrocyte samples obtained from patients with diseases related with hypoxia and inflammatory states, namely sickle cell disease, hypercholesterolemic and hypertensive patients, besides the fact that they sustain impaired erythrocyte deformability. In patients with amyotrophic lateral sclerosis erythrocyte NO content is preserved and was verified an inverse association between respiratory function and NO efflux from the erythrocyte. The results of the present study indicate that NO efflux from erythrocyte should be further explored as a potential biomarker for ALS. Sepsis patient before dead at 24 in IUC showed higher efflux of NO from erythrocytes that worsening the blood circulation as verified by high unequal blood flow and high microvascular flow index observed in sub lingual microcirculation. The in vivo mice model of inflammation evidenced that the NO efflux from erythrocyte decrease with acute phase response development. The in vivo Wistar rats model of hypertension showed that the NO efflux from erythrocytes decrease and up to normal at parallel with the blood pressure normalization.

CONVITE

A Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação (SPHM) aceita para publicação no seu BOLETIM artigos de curta extensão. O Boletim é editado duas vezes por ano em formato electrónico (www.hemorreologia.com).

INSTRUÇÕES

1. Todos os textos enviados para publicação estão sujeitos a apreciação editorial e aprovação. A decisão é baseada no mérito científico e cultural dos trabalhos.
 2. São aceites somente os trabalhos preparados em versão *PDF* ou *Microsoft Word*.
 3. Os textos devem ser redigidos em Português ou Inglês.
 4. Os manuscritos com o pedido de publicação devem ser enviados por *e-mail* ao Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt).
- Comunicações Originais (artigos curtos) – Os textos serão considerado para publicação rápida, com a seguinte estrutura: Sumário (50-70 palavras), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. O(s) autor(es) são estimulados a englobar em conjunto os resultados, discussão e conclusões.
(Extensão máxima do texto: 5 a 6 páginas a um espaço (letra de corpo 11), incluindo figuras tabelas e quadros (e respetivas legendas), agradecimentos e até 30 referências bibliográficas).
 - Artigos de Revisão – O BOLETIM terá a maior satisfação em acolher curtas revisões sobre assuntos de particular interesse, no âmbito da Hemorreologia, Microcirculação ou assuntos de âmbito médico ou de outras áreas científicas afins, que sejam submetidos diretamente para publicação ou mediante convite especial do Editor.
(Extensão máxima do texto: 8 a 10 páginas (letra de corpo 11) incluindo figuras, tabelas, quadros, fotos (e respetivas legendas), agradecimentos e até 60 referências bibliográficas).

INVITATION

The Portuguese Society on Hemorheology and Microcirculation (Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, SPHM) is pleased to welcome short papers for publication in its BOLETIM. This online publication (www.hemorreologia.com), is distributed two times a year.

INSTRUCTIONS

1. All submitted manuscripts are subjected to editorial review and approval. The decision to publish is dependent on the scientific and cultural merit of the papers.
 2. Only contributions prepared and submitted as *PDF* or *Microsoft Word* will be accepted.
 3. Texts must be written in Portuguese or in English.
 4. All scientific contributions, including manuscript submission and further correspondence should be addressed by *email* to the Editor (carlotasaldanha@fm.ul.pt)
- Original Communications – Manuscripts may be considered for rapid processing as short communications. All manuscripts should be arranged in the following sections: Abstract (50-70 words), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. The author(s) may combine some of the sections normally included in a full paper, namely the results, discussion and conclusions.
(Maximum communication length – 5-6 single spaced typed pages, including figures, tables, legends, acknowledgments and up to 30 references).
 - Short Reviews – The BOLETIM will publish reviews on subjects of particular interest in its field, either following a special invitation or a submission by the author, and in the latter case only after approval by an Editorial Board member. Further information can be obtained from the editor.
(Maximum review length – 8-10 full pages, including figures, tables, photos, legends, acknowledgments and up to 60 references)



CIÊNCIA&VIDA
P U B L I C A Ç Õ E S

29 ANOS

A PUBLICAR O QUE A CIÊNCIA NOS DITA

Centro Empresarial de Famões, Fracção BO 1685 - 253 Famões
Tel. 21 478 78 50 Fax 21 478 78 59 E-mail: pubcienciaevinda@sapo.pt