

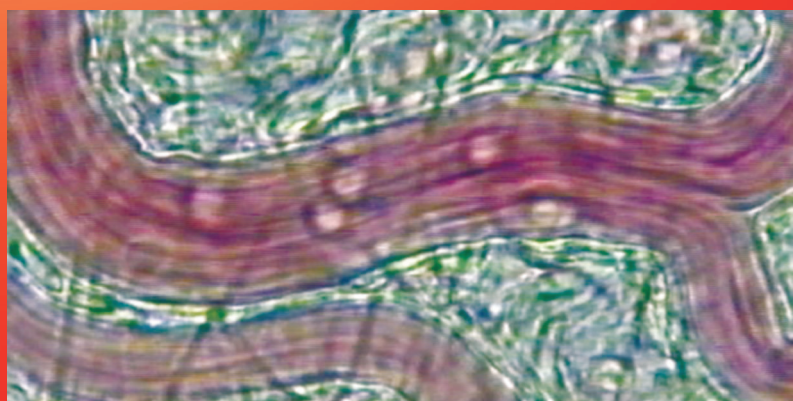


publicação semestral

Janeiro-Junho

vol. 34 n.º 1 2019

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, Victor 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. 34 n.º 1 Janeiro-Junho 2019

Sumário / Summary

NOTA DE ABERTURA / EDITORIAL

- Estase sanguínea na microcirculação 3
Carlota Saldanha

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

- Efeito da toma de citrulina, um precursor da arginina sobre as atividades de enzimas eritrocitárias em ratos 5
Ângela Inácio, Laura Aguiar, Ângela Gil, Manuel Bicho

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

- Tempo de tromboplastina parcial ativada prolongado – árvore de decisão laboratorial 10
- **Prolonged activated partial thromboplastin time – laboratory decision tree**
Maria Manuel Campos, João Filipe Almeida, Maria José Marques

NOTÍCIAS / NEWS AND INFORMATION

17

ATUALIZAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS / ARCHIVES

- How Long can we Store Blood Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis 19
Dong-wenWu, Yu-meng Li, FenWang
- Exercise and Chronic Wound Healing 20
Bolton L

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 (2017-2019)

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 J. M. Braz Nogueira	<i>Presidente</i> Dr. Carlos Manuel dos Santos Moreira
<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 Reis	<i>2.º Secretário</i> Prof. Doutor Henrique Sobral do Rosário	<i>2.º Vogal</i> Dr. Paulo Farber
<i>Tesoureira</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>Delegado da Região Norte</i> – Dr. Manuel Campos
<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 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

Åkos Koller (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. M. Ehrly (Alemanha)
Carlos Ribeiro (Portugal)
Fausto Pinto (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 transluminação. 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 **NÃO FOI SUBSIDIADA NEM EM 2018 NEM EM 2019 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. **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

ESTASE SANGUÍNEA NA MICROCIRCULAÇÃO

As alterações do fluxo sanguíneo na microcirculação diferem consoante a doença vascular e a localização corporal na mesma patologia. Na doença vascular os fatores de risco conhecidos afetam de modo específico cada região microvascular originando efeitos dissemelhantes consoante o tipo e duração da patologia, o género e a ocorrência súbita de outro quadro clínico. No que refere à duração da patologia o espessamento da parede vascular e o número de ramificações influenciam a distribuição do gradiente de pressão sanguínea e o aparecimento de graus distintos de estase do fluxo de sangue. A existência de shunts facilita a passagem dos glóbulos brancos e vermelhos com redução da resistência ao fluxo sanguíneo. A autorregulação miogénica dificulta a avaliação precoce das alterações da microcirculação composta por arteríolas, capilares e vénulas. A metodologia aplicada para a observação e quantificação foi inicialmente e durante meia década muito invasiva, evoluindo para a utilização de radioisótopos com sensores de Xénon, angiografia com fluoresceína a nível da microcirculação retiniana, e posteriormente para técnicas não invasivas como a utilização de pletismógrafos e aparelhos com detetores a laser até à utilização de um fino sensor manual ligado a microscópio espectral de polarização ortogonal. Este aparelho tem a particularidade de ser móvel e fornece imagens da microcirculação sublingual, sendo de grande utilização nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Essas imagens, após avaliação por programação computadorizada, facultam os valores dos parâmetros hemodinâmicos tais como índice de fluxo microvascular (IFM), densidade de perfusão vascular (DPV) entre outros. As amostras de sangue obtidas na região do sangrador fornecem uma panóplia de valores de fatores de diagnóstico e de risco entre os quais os hemorreológicos tais como viscosidade sanguínea, deformabilidade (ED) e agregação eritrocitária (AE), hematócrito, viscosidade plasmática, fibrinogénio e ainda a capacidade do glóbulo vermelho de libertação ou retenção em monóxido de azoto (NO). Por exemplo no caso de doentes com sepsis que ao fim de 2 dias de internamento na UCI não sobreviveram, observou-se na microcirculação sublingual estase sanguínea com diminuição do valor de IFM e DPV desigual. Na circulação periférica verificou-se aumento da AE, diminuição da ED e aumento da capacidade dos eritrócitos em libertar NO, o qual poderia interferir como mecanismo compensatório, induzindo a vasodilatação que facultaria o aumento do fluxo sanguíneo e a oxigenação celular. No entanto a estase mantida na microcirculação sublingual, como uma janela de observação extensível à globalidade da microcirculação desses doentes não beneficiou das intervenções para reposição da homeostasia metabólica e da hemodinâmica macrocirculatória.

É, pois, preciso deixar muito claro, que é uma situação patofisiológica caótica com alterações súbitas da glicémia e insulinémia com disfunção de múltiplos órgãos, que pode ocorrer em qualquer idade e situação nomeadamente após uma cirurgia, ou uma infeção bacteriana hospitalar ou após um qualquer desastre.

A monitorização da microcirculação pelo sistema sublingual é essencial para fornecer indicações precisas ao método a aplicar para o controlo da macrocirculação de modo a evitar que ajustes nesta possam danificar a correta oxigenação e libertação de NO a nível dos tecidos corporais. Muitas das vezes ao corrigir os defeitos dos parâmetros hemodinâmicos da macrocirculação aumenta a formação das espécies reativas de oxigénio e de azoto nocivas para o organismo, já de si em estado inflamatório

Ainda a propósito da sepsis, tivemos o infortúnio da mesma instituição nos ter recusado três projetos, o último dos quais contava com a supervisão de peritos das áreas afins.

Recentemente, neste ano de 2019, o grupo de Michael Kirsch coloca a questão de saber se há causalidade ou coincidência entre a hemólise e a estase na microcirculação. O grupo conclui que a causalidade é bidirecional com influência nefasta nas propriedades hemorreológicas. Os autores propuseram a percentagem de hemólise como marcador da estase microvascular no intestino delgado, pela rapidez da quantificação deste parâmetro sanguíneo, nos doentes com sepsis ou com inflamação sistêmica.

A estase por si, sem hemólise, ajuda ao recrutamento dos leucócitos, adesão e transmigração endotelial, favorecendo a resposta anti-inflamatória.

A propriedade vasodilatadora do NO pode ser induzida de modo não invasivo e sem terapêutica medicamentosa, submetendo os doentes a uma plataforma de vibração de baixa frequência e amplitude. Da acessível e fácil aceitação a este tipo de tratamento resulta aumento do fluxo sanguíneo na pele concomitante ao aporte de NO. Esta terapia não farmacológica é aconselhada para diminuir os sintomas da polineuropatia simétrica distal.

Aguardamos mais desenvolvimentos
Boas Férias

Carlota Saldanha
Presidente da SPHM

APOIO

J Inflamm 2019; 12: 109-111

Curr Opin Crit Care 2016; 2:444-452

Clin Hemorrh Microcirc 2016; 64:965-970

J Diab Sci Technol 2014;8: 889-894

EFEITO DA TOMA DE CITRULINA, UM PRECURSOR DA ARGININA SOBRE AS ATIVIDADES DE ENZIMAS ERITROCITÁRIAS EM RATOS

Ângela Inácio^{1,2}, Laura Aguiar¹, Ângela Gil¹, Manuel Bicho^{1,2}

RESUMO

A suplementação oral com citrulina promove a biodisponibilidade do NO. Neste estudo testou-se o efeito da suplementação oral de citrulina em ratos *wistar*, em enzimas eritrocitárias com diferentes localizações celulares – 2 citoplasmáticas e 1 transmembranar. Apenas a redutase transmembranar apresentou alterações na sua atividade. A limitante capacidade que o NO apresenta em se difundir através da membrana eritrocitária poderá explicar este resultado.

INTRODUÇÃO

Baixos níveis circulantes de óxido nítrico (NO) têm sido associados ao desenvolvimento de fatores de risco para várias patologias, incluindo a hipertensão arterial, a aterosclerose, a diabetes e as doenças cardiovasculares¹. As células endoteliais produzem NO por intermédio da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) a partir da arginina². Logo, o aumento dos níveis deste aminoácido em circulação representa um potencial mecanismo terapêutico por promover uma maior biodisponibilidade do NO. Contudo, este procedimento revelou-se pouco eficiente por não estar associada aos níveis espectáveis em circulação. De facto, após ingestão, a arginina é transformada em ornitina por ação da arginase presente nas células gastrointestinais e é extensamente metabolizada no fígado no decurso do ciclo da ureia através da arginase³. A acrescentar, a arginina é um aminoácido com papel fundamental na eliminação de amónia, o que levanta questões sobre a segurança da sua suplementação, pois esta é suscetível de causar ureogénese excessiva. Em alternativa, a suplementação oral com citrulina tem

vindo a ser associada, de forma consistente, com o aumento de arginina em circulação e conseqüente aumento de biodisponibilidade de NO⁴. Tal se deve ao facto de a citrulina, depois de ingerida e absorvida no intestino, ser transportada até aos rins onde é convertida em arginina pelas argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liases e libertada na corrente sanguínea. O rim é por isso, o principal órgão responsável pela manutenção dos níveis plasmáticos de arginina. Ao chegar às células endoteliais, a arginina através da eNOS é convertida em citrulina e NO, o qual não só vai atuar nas células musculares induzindo a vasodilatação, como também, uma vez capturado pelos eritrócitos, sob a forma de nitrito (NO₂) entra em circulação podendo atuar em zonas mais distantes⁵. Assim, dependendo do estímulo interno conferido pela pressão parcial de oxigénio ou outros estímulos oriundos da presença de doenças vasculares inflamatórias, o NO pode ser transportado pelos eritrócitos e entregue noutras localizações⁶. No eritrócito humano, a biodisponibilidade do NO atua de forma a compensar os níveis de disfunção endotelial que resultam de condições inflamatórias agudas ou crónicas⁷.

¹ Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral, Lisboa, Portugal

² Laboratório de Genética, Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Os eritrócitos estão bem equipados com sistemas antioxidantes, que essencialmente contribuem para a sua função e integridade impedindo a eriptose. Nestes, a membrana celular é uma estrutura metabolicamente ativa, onde um conjunto de proteínas intrínsecas e extrínsecas de membrana desempenha importantes papéis no metabolismo celular. Algumas destas proteínas funcionam como sistemas redox, transportando elétrons do interior da célula para o exterior. Várias desidrogenases, que utilizam nucleótidos de piridina (NADH ou NADPH) como coenzimas, fazem parte de uma cadeia de transportadores redox, ligados estruturalmente à membrana e atuam como dadores de elétrons para aceitadores externos, no metabolismo do controlo celular⁸. A adição de aceitadores de elétrons impermeáveis, como o ferricianeto, a uma suspensão de eritrócitos humanos intactos, induz a síntese de ATP intracelular, sem contactar diretamente com o sistema glicolítico, através da redutase transmembranar (RTM)⁹. Para além desta NADH ferricianeto redutase, foram identificadas outras desidrogenases intrínsecas. A NADH cit c redutase constitui um outro sistema redox do eritrócito, embora muito pouco ativo. O transporte de elétrons é efetuado através da NADH citocromo b5 redutase e da citocromo b5. Está localizada na face interna da membrana e tem a capacidade de reduzir a meta-hemoglobina (HbFe³⁺), através da cit b5. Este sistema redox da membrana é considerado o precursor da redutase da meta-hemoglobina (RMHb) do citoplasma¹⁰⁻¹⁴. No eritrócito, em cada 24h, 3% da hemoglobina auto oxidase, produzindo metahemoglobina (HbFe³⁺) e anião radical superóxido (O₂⁻), sendo esta a principal via responsável pela geração de Espécies Reativas de Oxigénio (ERO). Contudo, apenas 1% da hemoglobina se mantém na forma HbFe³⁺, pois esta pode ser novamente reduzida pela RMHb¹⁵. A RMHb é assim, uma enzima importante na manutenção dos níveis reduzidos de stresse oxidante intracelular no eritrócito, aumentando também a capacidade de transporte de oxigénio.

A fosfatase ácida do eritrócito (FA) é uma enzima citoplasmática de baixo peso molecular que pertence a uma grande família enzimática das fosfotirosina proteína fosfatases. Tem funções de inibição da resposta a fatores de crescimento nomeadamente ao fator de crescimento derivado das plaquetas¹⁶. Outras ações são a regulação da glicólise, através da defos-

forilação da proteína de banda 3 (inibe a glicólise) e a transdução de sinais de mecanismos bioquímicos diversos intracelulares¹⁷. Estudos indicam associação entre as atividades da RTM e da FA sugerindo um papel nas reações redox de transdução de sinal¹⁶. A sua função é modulada por ERO¹⁸.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação oral de citrulina e do seu incremento em ratos *wistar*, na atividade de três enzimas eritrocitárias – RTM, RMHb e FA – relacionadas com o equilíbrio redox do eritrócito.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Foram utilizados 36 ratos albinos *wistar*, nascidos e mantidos no Biotério do Instituto Bento da Rocha Cabral. Ao longo do estudo, vigorou um ciclo claro-escuro de 12 h. Os ratos foram mantidos à temperatura de 21-23 °C com água e ração permanentemente disponíveis num rácio de 2 ratos/gaiola. Trinta e seis ratos foram sujeitos a um protocolo experimental baseado no suplemento alimentar com malato de citrulina (DYNERGUM 2000 mg/10 ml Solução oral): 12 foram mantidos sem suplemento, outros 12 com suplemento diário de 0,1 g de citulina/Kg peso e outros 12 ratos com suplemento de 1g citrulina/kg peso.

Determinação dos marcadores eritrocitários

Ao fim de 243 ou 291 dias foram efetuadas as colheitas de sangue por punção cardíaca em tubo com EDTA. Após uma centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente os eritrócitos foram separados do plasma e lavados 3 vezes com NaCl a 0.9%. Depois, parte (200 µl) foi usado para determinar a RTM. O restante foi diluído numa solução preservativa e hemolizante de mercapto-etanol a 1/40, para posterior determinação da hemoglobina (Hb, 100µl), das atividades da FA (50µl) e da RMHb (50µl). A atividade da RTM foi determinada por espectrofotometria pela da conversão de ferricianeto em ferrocianeto pela RTM e medida num espectrofotómetro¹⁹. A atividade da RMHb foi determinada por espectrofotometria (340 nm) através da redução de ferricianeto de potássio e oxidação da dinucleotídio reduzido da nicotinamida adenina (NADH)²⁰. A atividade da

FA foi determinada por método espectrofotométrico (405 nm) seguindo o método descrito por Dissing e Svansmark²¹.

Tratamento estatístico

A avaliação do efeito da suplementação com citrulina nos parâmetros estudados foi efetuada através do teste paramétrico ANOVA e pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa estatísticos SPSS 24.0, sendo o nível de significância estatística estabelecido para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram estudados os parâmetros: atividades enzimáticas da RTM, da RMHb e da FA no final da toma de citrulina e a diferença de peso entre o início e o final da toma de citrulina. Observou-se uma diferença significativa relativamente à atividade da RTM, verificando-se uma diminuição da atividade com o aumento da dosagem (1g de citrulina/kg peso ($p=0,002$)) (Figura 1 e Tabela 1). Tal como indicado na tabela 1, nos outros parâmetros avaliados, não foram verificadas diferenças significativas.

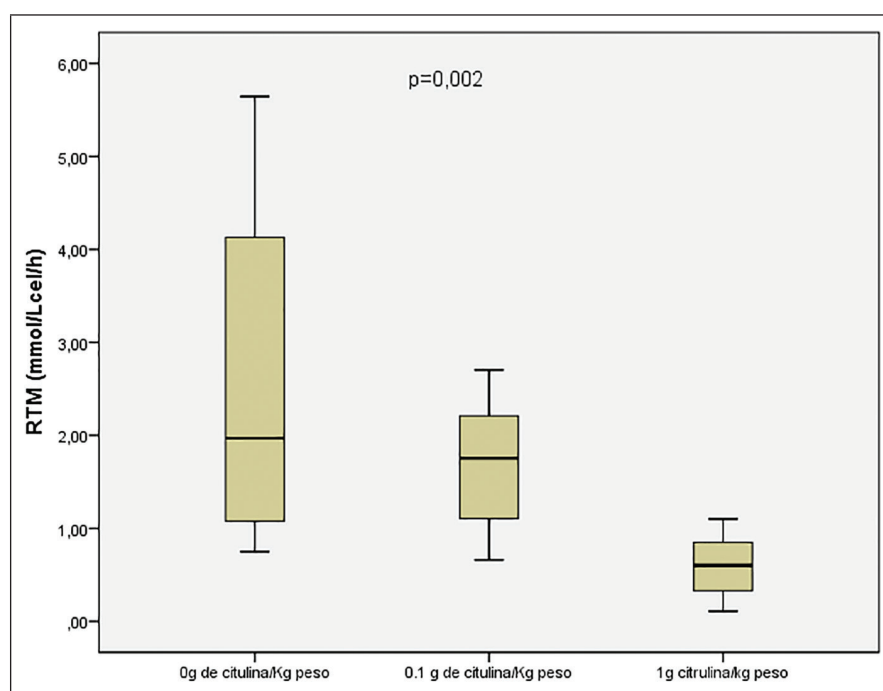


Figura 1. Efeito da toma de citrulina e aumento da sua dosagem na atividade da RTM eritrocitária

Tabela 1. Comparações dos parâmetros diferença de peso, RTM, RMHb e ACP1 entre os grupos com toma de diferença de concentração de citrulina

Parâmetro	0 g de citulina/Kg peso	0.1 g de citulina/Kg peso	1 g de citulina/Kg peso	Valor p*
Diferença de peso (g)	139,08± 28,16 (12)	157,83± 22,43 (12)	141,17 ± 20,91 (12)	0,128 ¹
RTM (mmol/L cel/h)	2,59 ± 1,84 (8)	1,69 ± 0,71 (8)	0,60 ± 0,35 (11)	0,002 ¹
RMHb (µmol/g Hb/min)	30,68; 8,83-69,40 (12)	26,43; 19,24-64,82 (10)	27,07; 9,42-58,35 (11)	0,786 ²
FA (µmol/g Hb/h)	939,15 ± 364,37 (12)	984,33 ± 291,03 (10)	855,41± 210,64 (11)	0,605 ¹

* Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos

¹ Teste ANOVA – as medidas estatísticas consideradas são: médio ± desvio-padrão (n – número de indivíduos)

² Teste *Kruskal-Wallis* – as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo (n – número de indivíduos)

DISCUSSÃO

O NO é uma molécula sinalizadora gasosa produzida endogenamente que atua em recetores específicos interferindo em determinados processos fisiológicos, é também um potente vasodilatador e como tal tem sido estudado o seu papel farmacológico em diferentes situações patológicas. O NO é produzido a partir da arginina, por essa razão esta tem sido utilizado como suplemento alimentar no tratamento de doenças vasculares. Contudo, os efeitos benéficos apenas se verificam em indivíduos com acentuada disfunção endotelial ou em doentes identificados como tendo quantidades insuficientes de arginina²². De facto, a suplementação oral de arginina é largamente ineficaz devido à sua eliminação gastrointestinal e hepática²³. Alternativamente a suplementação oral de citrulina aumenta consistentemente os níveis plasmáticos e tecidulares de arginina e a biodisponibilidade de NO⁴.

Os eritrócitos, devido à sua função de transporte de O₂ e dióxido de carbono (CO₂), encontram-se continuamente expostos a ERO, para se defenderem da eriptose possuem enzimas com funções antioxidantes, localizadas quer na membrana celular quer no citoplasma. São estas enzimas que permitem garantir a integridade celular à sobrecarga do estado redox²⁴. Uma destas enzimas é a RTM, que permite a transferência dos eletrões para o exterior da célula, reduzindo deste modo os aniões não permeantes²⁴. A RTM é um dos componentes de um sistema redox transmembranar presente em todas as células, exprimindo-se no eritrócito as atividades mais elevadas por célula. A RTM é ativada por agentes oxidantes extracelulares. Os nossos resultados mostram que a introdução de suplemento de citrulina na dieta dos ratos *wistar* juntamente com o incremento na dosagem encontra-se associada a uma diminuição da atividade da RTM. No nosso entender, estes resultados poderão dever-se a uma maior biodisponibilidade de NO resultante do suplemento de citrulina, o qual, por reagir facilmente com ERO, reduz o stresse oxidante em circulação e consequentemente a necessidade de ativação da RTM pelos eritrócitos²⁵. Sabe-se hoje que as reações oxidativas promovidas pela hemoglobina extracelular resultante da hemólise dos eritrócitos, não são completamente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes

²⁶. A suplementação alimentar de ratos com um outro precursor da arginina, o N-carbamilglutamato mostrou aumentar a resposta antioxidante no plasma²⁷.

Os nossos resultados não mostram alterações na atividade do RMHb dos eritrócitos com a toma de citrulina ou aumento na sua dosagem. Sendo esta uma enzima responsável pela redução da metahemoglobina (HbFe³⁺) no citoplasma, o nosso estudo parece indicar que a citrulina tem pouco efeito ao nível da resposta anti-oxidante intracelular.

A outra enzima em estudo, a FA é também uma enzima citoplasmática que não sofreu alterações na sua atividade com a suplementação de citrulina ou aumento na dosagem. Muitas vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação/desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção de grupos fosfato pode gerar novos locais de reconhecimento, ter efeitos na estabilidade molecular ou mesmo modular atividades enzimáticas²⁸. A oxidação do resíduo de cisteína no domínio ativo pelo H₂O₂ tem sido identificada como um processo de regulação negativo em fosfotirosina proteína fosfatases²⁹. Diferentes tipos destas proteínas podem ser inibidas através da radiação UV em células intactas. A geração de espécies reativas de oxigênio induzida por UV e subsequente oxidação reversível destas proteínas foi já proposta como um mecanismo de regulação da sua atividade³⁰. Os nossos resultados mostram que a toma de citrulina às concentrações estudadas não tem efeito na atividade desta enzima, possivelmente por a variação de NO ao nível intracelular não ser significativa a ponto de aliviar um stresse oxidante que já por si se encontrava a um nível basal. De facto sabe-se que a membrana eritrocitária apresenta uma resistência intrínseca à difusão do NO de forma a preservar a biodisponibilidade do NO para funções na parede vascular e região intraluminal²⁵.

Por fim, os resultados não mostram variações no peso dos ratos com a toma ou aumento na dosagem de citrulina, o que indica não existirem grandes implicações fisiológicas nos organismos ao longo do estudo.

CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostram um padrão diferencial nas atividades das enzimas eritrocitárias, quando se promove um incremento de NO em circulação.

Estas diferenças relacionam-se com a localização celular, verificando-se alterações na atividade apenas na enzima com localização membranar (RTM). Apesar de o NO produzido pela eNOS entrar em circulação e depois poder atravessar a membrana citoplasmática por difusão, essas quantidades serão certamente menores que as existentes no plasma, justificando assim a inexistência de alterações enzimáticas ao nível intracelular. Contudo, a diminuição na atividade da RTM é indicadora de um decréscimo de ERO no plasma, o que se torna relevante em várias patologias cujo stress oxidante é um impulsionador do desenvolvimento da disfunção endotelial, como a hipertensão, a aterosclerose, a diabetes e a anemia das células falciformes. No nosso entender, a citrulina é um suplemento a ser equacionado na terapêutica destas situações patológicas.

REFERÊNCIAS

- Brandes, R. P., Fleming, I. & Busse, R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res.* **66**, 286–294 (2005).
- Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708–1714 (2006).
- Curis, E. *et al.* Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* **29**, 177–205 (2005).
- Schwedhelm, E. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: Impact on nitric oxide metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 51–59 (2008).
- Kaore, S. N., Amane, H. S. & Kaore, N. M. Citrulline: Pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 35–50 (2013).
- Saldanha, C., de Almeida, J. P. L. & Silva-Herdade, A. S. Application of a nitric oxide sensor in biomedicine. *Biosensors* **4**, 1–17 (2014).
- Simmonds, M. J., Detterich, J. A. & Connors, P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology* **51**, 121–134 (2014).
- Crane, F. L., Sun, I. L., Clark, M. G., Grebing, C. & Löw, H. Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *BBA Rev. Bioenerg.* **811**, 233–264 (1985).
- Mishra, R. K. & Passow, H. Induction of intracellular ATP synthesis by extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J. Membr. Biol.* **1**, 214–224 (1969).
- Passon, P. G. & Hultquist, D. E. Soluble cytochrome b5 reductase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 62–73 (1972).
- Kant, J. A. & Steck, T. L. Cation-impermeable inside-out and right-side-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Nat. New Biol.* **240**, 26–28 (1972).
- Choury, D., Wajcman, H., Boissel, J. P. & Kaplan, J. C. Evidence for endogenous proteolytic solubilization of human red-cell membrane NADH-cytochrome b 5 reductase. *FEBS Lett.* **126**, 172–174 (1981).
- Kitajima, S., Yasukochi, Y. & Minakami, S. Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b5 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 330–339 (1981).
- Borgese, N. & Pietrini, G. Distribution of the integral membrane protein NADH-cytochrome b5 reductase in rat liver cells, studied with a quantitative radioimmunoblotting assay. *Biochem J* **239**, 393–403 (1986).
- Eder, H. A. *et al.* CLINICAL AND BIOCHEMICAL STUDY OF A Find the latest version : **28**, 265–272 (1949).
- Silva, A. P. *et al.* Actividade de duas enzimas associadas à apoptose e envelhecimento celular na hipertensão arterial. *Rev. Port. Cardiol.* **25**, 2006 (2006).
- Silva, A. P. *et al.* Polimorfismo genético da Fosfatase Ácida do eritrócito e risco cardiovascular em crianças e adolescentes saudáveis. *Rev. Port. Cardiol.* **21**, 65–71 (2001).
- Guerra, A. *et al.* Tensão Arterial, Marcadores Genéticos e Biológicos numa População Pediátrica. *Rev. Port. Cardiol.* **21**, 23–36 (2002).
- Orringer, E. & Roer, M. An ascorbate-mediated transmembrane-reducing system of the human erythrocyte. *J. Clin. Invest.* **63**, 53–58 (1979).
- Board, P. G. & Pidcock, M. E. Methaemoglobinaemia Resulting from Heterozygosity for Two NADH-Methaemoglobin Reductase Variants: Characterization as NADH-Ferricyanide Reductase. *Br. J. Haematol.* **47**, 361–370 (1981).
- Dissing, J., Dahl, O. & Svensmark, O. Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *BBA – Enzymol.* **569**, 159–176 (1979).
- Ströhle, A., H. V. B. & Hahn, A. L-Arginine and vascular health. *Med Monatsschr Pharm.* **39**, 2016 (2016).
- Kastillo, L. *et al.* Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **265**, E532–539 (1993).
- Cruz, A. S. *et al.* Sistemas enzimáticos eritrocitários e seu potencial antioxidante nas grávidas submetidas a indução do trabalho de parto com PGE2 intracervical. *Acta Med. Port.* **8**, 263–266 (1995).
- Kejing Chen & Aleksander, P. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma. *Biorheology* **45**, 107–119 (2009).
- Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., Nagababu, E., Salgado, M. T. & Cao, Z. Potential modulation of vascular function by nitric oxide and reactive oxygen species released from erythrocytes. *Front. Physiol.* **9**, 1–7 (2018).
- Xiao, L. *et al.* Dietary arginine and: N-carbamylglutamate supplementation enhances the antioxidant statuses of the liver and plasma against oxidative stress in rats. *Food Funct.* **7**, 2303–2311 (2016).
- Zhang, Z. P. ROYALTY FREE P. TYROSINE PHOSPHATASES: Structure and Function, Substrate Specificity. (2002).
- Lee, S., Kwon, K., Kim, S. & Goo, S. Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor *. **273**, 15366–15372 (1998).
- Östman, A. & Böhmer, F. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. **11**, 258–266 (2001).

TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA PROLONGADO – ÁRVORE DE DECISÃO LABORATORIAL

PROLONGED ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME – LABORATORY DECISION TREE

Maria Manuel Campos¹, João Filipe Almeida², Maria José Marques³

RESUMO

O tempo de tromboplastina parcial ativada é o segundo estudo da coagulação mais solicitado. Quando prolongado suscita dúvidas em termos de repercussões hemorrágicas, mas também trombóticas, que importa esclarecer. Esta pertinência é maior em contexto peri-operatório, diátese hemorrágica, terapêutica anticoagulante, ou como alteração laboratorial não associada a manifestações clínicas.

Assim, pretende-se neste artigo, evocar conceitos básicos da coagulação, fornecer algoritmos e soluções que agilizem as práticas laboratoriais e a abordagem clínica.

Sempre que o tempo de tromboplastina parcial ativada estiver prolongado, é necessário proceder a outras determinações, para investigar a deficiência de fatores da coagulação, ou seus inibidores, tendo presente que a heparina pode ser também uma das várias causas desse resultado.

Termos-chave: Tempo de tromboplastina parcial ativada, prolongamento, algoritmo, risco hemorrágico e trombótico

ABSTRACT

The activated partial thromboplastin time is the second most often requested coagulation assay. When prolonged, it provokes doubts about hemorrhagic, but also thrombotic effects, which need to be understood. This suitability is stressed in perioperative context, bleeding diathesis, anticoagulant therapy or in the absence of related clinical manifestations.

Therefore, the goal of this article is to discuss the basic concepts of blood coagulation, provide algorithms and solutions that help on the laboratory practices and clinical approach.

Ever this assay was prolonged, it is necessary to make other determinations to clarify factor deficiencies or their inhibitors, taking in mind that heparin can be also one of many reasons for this result.

Key words: Activated partial thromboplastin time, prolongation, algorithm, risk of bleeding and thrombosis

¹ Médica Assistente Hospitalar Graduada de Imuno-hemoterapia do Serviço de Imuno-hemoterapia do Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, EPE

² Médico Interno de Formação Específica de Imuno-hemoterapia do Serviço de Medicina Transfusional do Hospital Garcia de Orta, EPE

³ Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública de 2.^a Classe do Serviço de Imuno-hemoterapia do Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, EPE

Email para contacto: maria.campos5@chlc.min-saude.pt

A HEMOSTASE: PRISMA CLÍNICO-LABORATORIAL

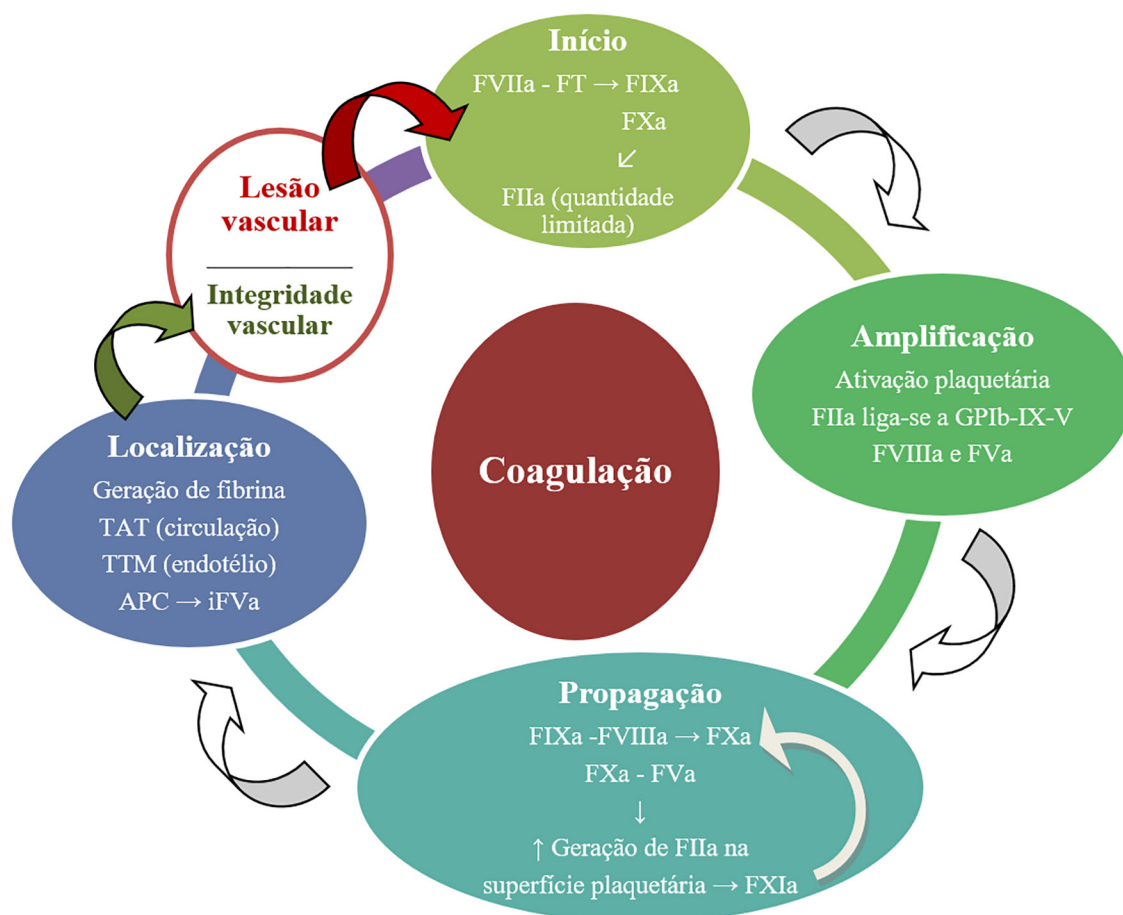
O tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) é um teste da coagulação solicitado na rotina, só superado em frequência pelo tempo de protrombina (TP)¹. Ambos são considerados testes básicos na avaliação da hemostase, sendo a razão normalizada internacional (*International Normalized Ratio* - INR), obtida através do TP, usada na monitorização da anticoagulação oral clássica (varfarina e acenocumárol). Relativamente ao APTT é o teste que permite inferir a eficácia da terapêutica anticoagulante com heparina não fracionada (HNF) e orientar o ajuste da sua posologia^{1,2}.

São testes que, embora não monitorizem a administração dos anticoagulantes orais diretos, revelam

alterações (prolongamento variável) sob ação destes fármacos (dabigatrano, rivaroxabano, apixabano e edoxabano). Assume-se que um alongamento do TP pode decorrer do efeito do rivaroxabano e, de modo insignificante, do edoxabano e do apixabano, enquanto valores prolongados do APTT e do tempo de trombina (TT) se enquadram no efeito do dabigatrano. Aliás, um TT normal exclui ação deste último anti-coagulante^{2,3}.

Os laboratórios fornecem os resultados do APTT em segundos e razão, definindo o valor de referência e a variação da normalidade relativamente a essas unidades².

Quando ocorre um prolongamento do APTT é necessário compreender a causa do mesmo, já que as implicações clínicas podem ser diferentes. Muitas vezes, essa alteração está associada a tendência ou fenó-



FVIIa (fator VII ativado); FT (fator tecidual); FIXa (fator IX ativado); FXa (fator X ativado); FIIa (trombina); GPIb-IX-V (complexo de glicoproteínas Ib-IX-V na membrana plaquetária); FVIIIa (fator VIII ativado); FVa (fator V ativado); FXIa (fator XI ativado); iFVa (FVa inativado); TAT (complexo trombina-antitrombina III); TTM (complexo trombina-trombomodulina); APC (proteína C ativada)

Figura 1. Representação esquemática da coagulação (modelo das superfícies celulares)²

menos hemorrágicos, mas pode também estar relacionada com predisposição trombótica ou até não ter repercussão, apesar de ser justificada por doseamentos anormais de alguns fatores do sistema de contacto^{2,4,5,6}.

Na Figura 1 está representado, de forma esquemática, o processo da coagulação, baseado no modelo das superfícies celulares².

APTT PROLONGADO: ESCLARECIMENTO POR ETAPAS

Sempre que seja detetado um prolongamento do APTT, é necessário confirmar o resultado, recorrendo a uma segunda amostra, se necessário. A informação clínica, conjugada com valores deste parâmetro obtidos anteriormente, bem como avaliação de outros dados analíticos, são fundamentais para proceder a um estudo correto^{2,7,8}. A visualização de uma curva coagulométrica normal, obtida por turbidimetria, é explanada na Figura 2, através de quatro fases (latência, início, formação de fibrina e estabilização)⁸.

No Quadro 1 constam diversas causas de prolongamento isolado do APTT (sem associação a prolongamento do TP, podendo ocorrer alteração de outros parâmetros como TT, atividade anti-Xa, doseamento de fatores)^{2,4-7,9,10,11}.

Quadro 1. Causas de prolongamento do APTT – Diagnóstico diferencial baseado no risco hemorrágico^{2,4,7,9,10,11}

Causas de prolongamento isolado do APTT	
Sem associação a diátese hemorrágica	Com associação a diátese hemorrágica
Anticoagulante lúpico	Deficiência de fator VIII
Deficiência de fator XII	Deficiência de fator IX
Deficiência de fator XI (≥ 3UI/dL)	Deficiência de fator XI (< 3UI/dL)
Deficiência de PK	Inibidores contra fatores VIII, IX e/ou XI
Deficiência de HMWK	HNF (sobredosagem e/ou trombocitopenia)
HNF	HBPM (sobredosagem e/ou trombocitopenia)
HBPM	IDT (sobredosagem)
IDT	DVW (expressão variável)
Artefacto (excesso de citrato)	SvWA (expressão variável)

PK (pré-caliceína – *prekallikrein*); HMWK (cininogénio de alto peso molecular – *high molecular weight kininogen*); HNF (heparina não fracionada); HBPM (heparina de baixo peso molecular); DVW (doença de von Willebrand); SvWA (síndrome de von Willebrand adquirida); IDT (inibidores diretos da trombina)

De modo a agilizar a investigação laboratorial, apresentam-se dois algoritmos que mostram a sequência analítica e as possíveis explicações para os resultados obtidos. A Figura 3 corresponde ao fluxograma descritivo dos estudos para esclarecimento de um

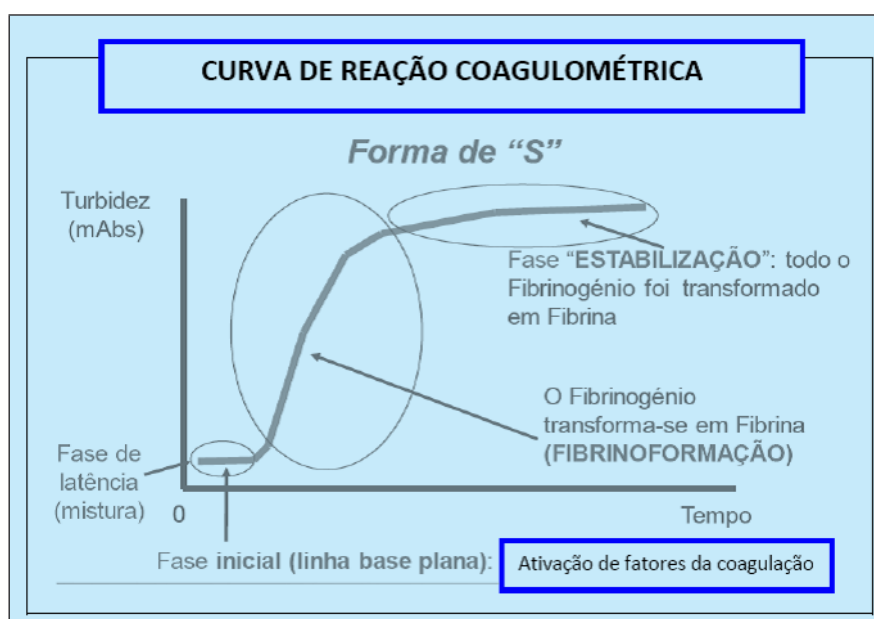


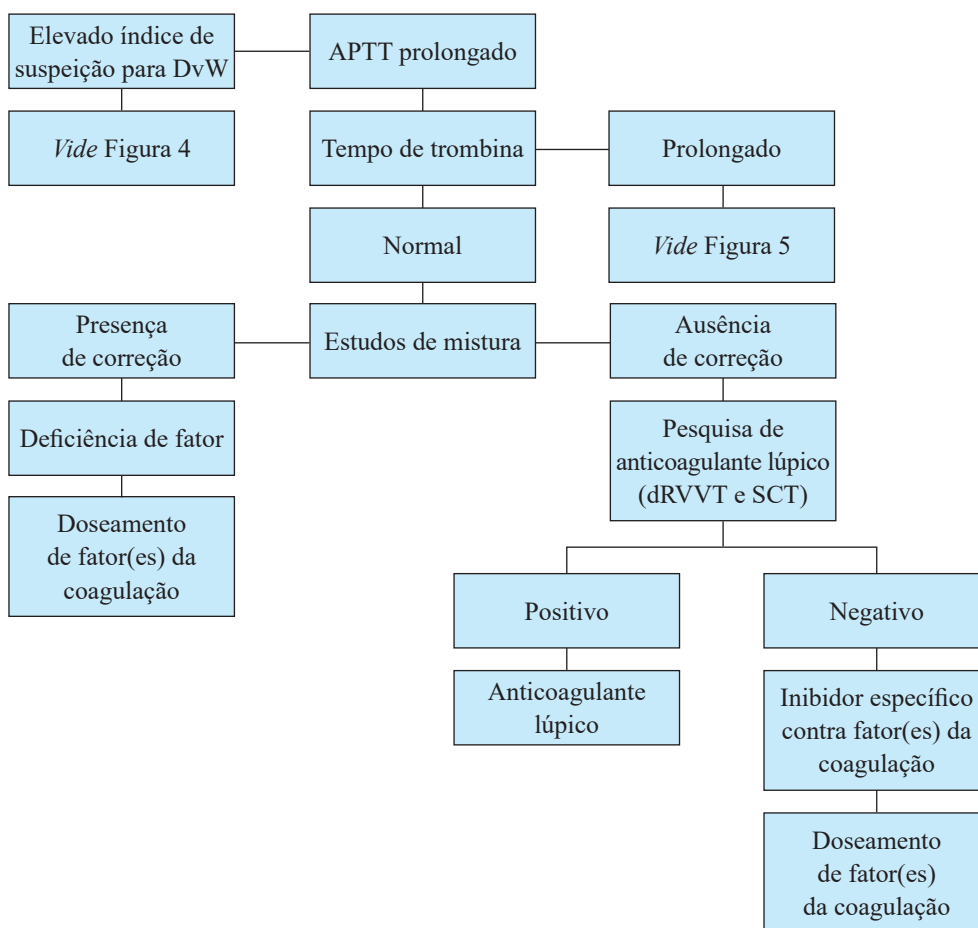
Figura 2. Aspeto de uma curva normal de APTT⁸

resultado prolongado de APTT². Devido à relevância clínica e de acordo com a história pessoal e familiar, deriva-se para um segundo algoritmo (Figura 4), condensando os principais estudos para investigação de DvW e SvWA⁹⁻¹¹. Se o tempo de trombina (TT) também estiver prolongado, há necessidade de avançar com outros estudos, evidenciando-se, na Figura 5, um terceiro fluxograma^{2,12}.

Relativamente aos estudos de mistura, estes são efetuados com plasma do doente e plasma normal (em partes iguais) e contemplam a determinação imediata e após incubação, que geralmente deve ser de 2 horas a 37°C para os fatores da coagulação dependentes do tempo e da temperatura (absolutamente necessária para os fatores VIII e V). No caso do fator IX, basta incubar a mistura durante 10 minutos^{2,7}. Para outros fatores, é correto proceder-se a uma incubação de 60 minutos⁵.

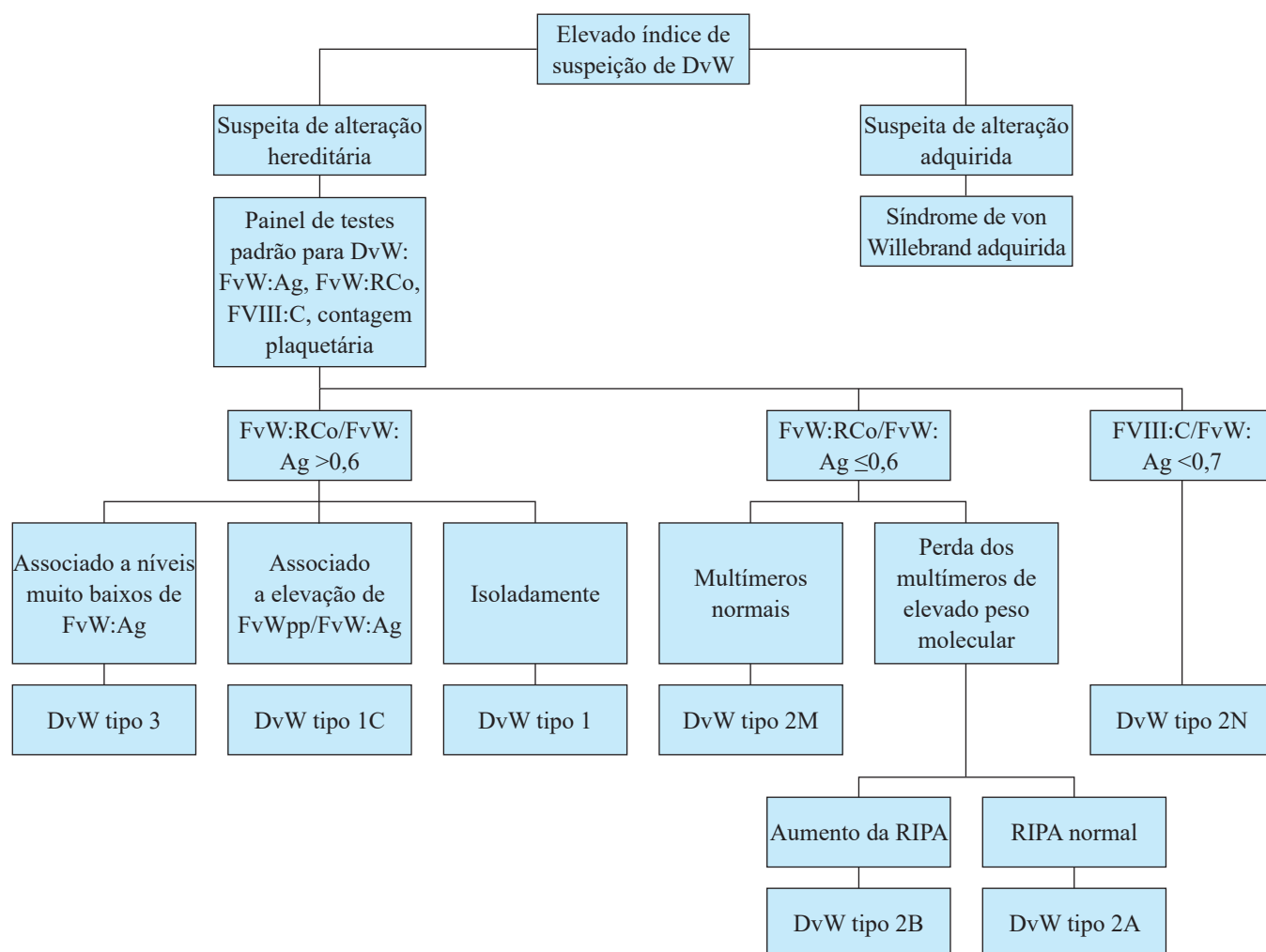
O cálculo do índice de Rosner, através do quociente entre a diferença do valor do APTT da mistura e do controlo normal sobre o valor da amostra do doente, é uma ferramenta adicional na interpretação destes estudos (ver Figura 6)⁶.

No caso da suspeita de deficiência de PK, a determinação inicial aos 3 minutos deve ser repetida aos 10 minutos (incubação a 37°C). Verifica-se um APTT prolongado aos 3 minutos, que é corrigido após 10 minutos, no caso desta deficiência, o que não acontece se existir uma deficiência de HMWK, que não pode ser despistada por este método laboratorial^{5,7}. Alguns autores preconizam tempos de incubação progressivamente maiores, que conduzem ao encurtamento correspondente do APTT, na deficiência de PK. Trata-se de um fenómeno *in vitro*, contornado pelo maior tempo de incubação antes da recalcificação e adição do ativador (sílica);



dRVVT (tempo de veneno de víbora Russell diluído); SCT (tempo de coagulação da sílica coloidal)

Figura 3. Algoritmo diagnóstico para esclarecimento de APTT prolongado²



FvW:Ag (fator de von Willebrand: antígeno); FvW:RCo (fator de von Willebrand: cofator da ristocetina); FvWpp (propéptido do fator de von Willebrand); FVIII:C (fator VIII coagulante); RIPA (agregação plaquetária induzida pela ristocetina em baixa concentração)

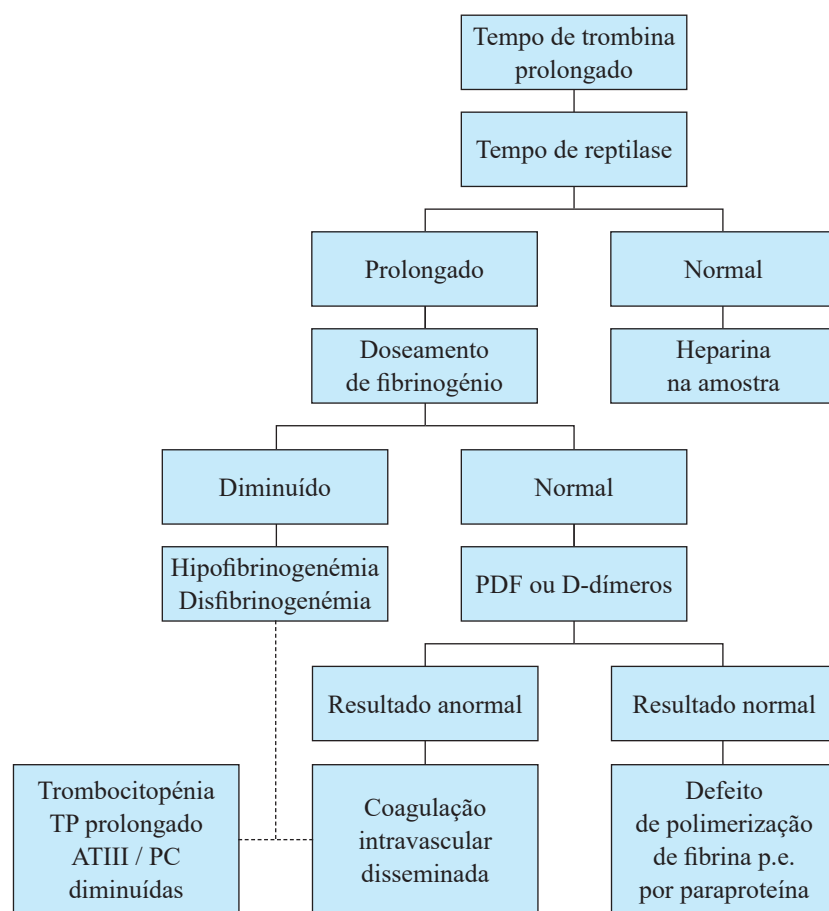
Figura 4. Algoritmo diagnóstico para esclarecimento de DvW e SvWA⁹⁻¹¹

corresponde a uma auto-ativação do fator XII na ausência de PK. A confirmação desta deficiência requer outros métodos e não existe expressão *in vivo* no sentido de hemorragia, verificando-se até propensão trombótica, pois os fatores de contacto, como o fator XII, intervêm na ativação do sistema fibrinolítico⁵.

No que concerne à pesquisa de anticoagulante lúpico, é importante considerar recomendações recentes da *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH), compartilhadas por outras organizações como *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que se aplicam a procedimentos de modificação do dRVVT, de modo a evi-

tar falsos positivos. Essencialmente, remetem para a diluição do plasma a testar com plasma controle lúpico negativo (em partes iguais) e subsequente execução do teste, quando resultado inicialmente positivo, num indivíduo com prolongamento do TP (INR > 1,5 ≤ 3,0). Resultados negativos são interpretados como tal e não carecem de adaptação do método. Se INR ≤ 1,5, o resultado é fiável e não exige modificação do teste; se INR > 3,0, a realização do estudo deve ser protelada^{13,14,15}.

Um comentário sucinto sobre os reagentes usados no APTT, considerando-se que existe diferença nos ativadores, bem como na composição e concentração em fosfolípidos. A sensibilidade e a especificidade dos reagentes, comercialmente disponíveis, contemplam



PDF (produtos de degradação da fibrina e do fibrinogénio); ATIII (antitrombina III); PC (proteína C)

Figura 5. Algoritmo diagnóstico para esclarecimento de TT prolongado^{2,12}

Índice de Rosner:
$\frac{\text{Mistura - controlo normal}}{\text{Doente}} \times 100$
Interpretação:
> 15% (Inibidor) < 12% (Deficiência) ≥ 12% e ≤ 15% (Duvidoso)
Valores de APTT do doente, controlo normal e mistura expressos em segundos.

Figura 6. Índice de Rosner aplicado ao APTT⁶

propriedades dirigidas para a deteção de anticoagulante lúpico, o estudo da deficiência de fatores da coagulação da via intrínseca e a monitorização da heparina, entre outras situações^{2,6,14,15}:

- 1) Reagentes sensíveis aos fosfolípidos são preferidos no caso de despiste da presença de anticoagulante lúpico, sendo o ativador sílica preponderante na escolha.
- 2) Reagentes não sensíveis aos fosfolípidos, tendo o ácido elágico como ativador, revelam interesse na suspeita de deficiência de fatores da via intrínseca (VIII, IX, XI e XII).
- 3) No caso do despiste da deficiência de PK, usa-se a sílica como ativador.
- 4) O caulino é outro ativador utilizado na determinação do APTT.
- 5) Existem diferentes fontes de fosfolípidos (cefalina e sintéticos, por exemplo).
- 6) É necessária a adição de Cloreto de Cálcio para a execução do teste.
- 7) A sensibilidade deve ser mencionada pelo fabricante, no que respeita à monitorização da heparina não fracionada^{2,6,14,15}.

Se a proporção entre o anticoagulante (citrato de sódio a 3,2%) e o sangue total no tubo coletor não for respeitada (relação correta é respetivamente 1:9), existindo excesso do primeiro, podemos ter um APTT falsamente prolongado e sem significado clínico. É sempre uma boa atitude, repetir a colheita da amostra, em caso de dúvida^{2,8}.

HORIZONTE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO

Sendo um conceito prático afirmar que o TP permite avaliar a via extrínseca e o APTT a via intrínseca da coagulação, podemos também estabelecer o paralelo de que a fase de início da coagulação corresponde ao TP e a fase de propagação ao APTT no modelo das superfícies celulares. Esta correlação tem o intuito de orientar na seleção dos parâmetros para investigação das alterações dos testes básicos^{2,13,14}.

Na presente e breve revisão teórica, com propósitos pragmáticos, focaram-se aspetos comuns e outros mais raros, com maior ou menor gravidade, relacionados com risco hemorrágico/ trombótico, estudos que devem ser realizados e como facilitar essa decisão no fluxo de trabalho quotidiano^{2,5-7,15}.

Um aspeto marcante é que nem todas estas deficiências de fatores ou presença de inibidores se associam a hemorragia; é isto que acontece na deficiência de fator XII, PK, HMWK e anticoagulante lúpico^{4,5,15}. A presença deste último (inibidor) predispõe a eventos de natureza trombótica, estando associado com complicações obstétricas, neurológicas e dermatológicas, integrando o grupo dos anticorpos antifosfolipídicos^{6,15}.

A utilidade destes algoritmos como instrução de trabalho é valiosa e, com mais ou menos variantes, estes esquemas com a sequência dos testes e as hipóteses diagnósticas fazem parte dos manuais de procedimentos dos laboratórios de hemostase².

A evolução em termos dos mecanismos fisiopatológicos, a inovação farmacológica, o aperfeiçoamento de métodos, técnicas e reagentes e a globalização dos recursos, transformam de modo contínuo estes temas correntes, atualizando-os e preparando-nos para desafios permanentes.

REFERÊNCIAS

1. Capoor MN, Stonemetz JL, Baird JC, Ahmed FS, Awan A, Birkenmaier C, et al. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time testing: a comparative effectiveness study in a million-patient sample. *PLoS ONE* 2015;10(8):e0133317. doi: 10.1371/journal.pone.0133317.
2. Kitchen S, Makris M. Laboratory tests of hemostasis. In: Key NS, Makris M, Lillicrap D (editors). *Practical hemostasis and thrombosis*. 3rd ed. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell; 2017. p 12-26.
3. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, et al. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost* 2018;16:209-19. doi: 10.1111/jth13912.
4. Schindhelm RK, Wondergem MJ, Admiraal J, Nap G, Boekel E, Hani L. A patient with a prolonged activated thromboplastin time and a deep intracerebral haemorrhage. *Case Rep Neurol* 2012;4:131-6. doi: 10.1159/000342193.
5. Patel N, Conley GW, McElroy LA, Refaai MA. Isolated prolonged activated partial thromboplastin time and contact factor deficiencies: case series and management review. *Anesthesiol Open J* 2016;1(1):19-23. <http://dx.doi.org/10.17140/AOJ-1-105>.
6. Ratzinger F, Panic T, Haslacher H, Perkmann T, Schmetterer KG, Belik S, et al. Testing lupus anticoagulants in a real-life scenario – a retrospective cohort study. *Biochem Med (Zagreb)* 2017;27(3):030705. <https://doi.org/10.11613/BM.2017.030705>.
7. Münster M. SEED Coagulation – The activated partial thromboplastin time test (APTT), heparin and its mechanism of action. *Sysmex Educational Enhancement and Development / June 2012*.
8. Girbau M (Werfen). Teoria da coagulação (Fisiologia da hemostase). In: *Curso de Hemostase da APTAC, Évora, 9 de fevereiro de 2019*.
9. Ng C, Motto DG, Di Paola J. Diagnostic approach to von Willebrand disease. *Blood* 2015;125(13):2029-37.
10. Castaman G, Tosi A, Rodeghiero F. Von Willebrand disease. In: Key NS, Makris M, Lillicrap D (editors). *Practical hemostasis and thrombosis*. 3rd ed. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell; 2017. p 94-112.
11. Baldeo CM, Rivera CE, Tun HW, Vishnu P. Pharmacokinetics-based clinical management of acquired von Willebrand syndrome: a case report. *J Blood Med* 2018;9:9-13.
12. Kasthuri RS, Key NS. Disseminated intravascular coagulation. In: Key NS, Makris M, Lillicrap D (editors). *Practical hemostasis and thrombosis*. 3rd ed. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell; 2017. p 172-82.
13. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* 2014;40:163-71. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1364185>.
14. Moore GW. Current controversies in lupus anticoagulant detection. *Antibodies* 2016, 5(4), 22. <https://doi:10.3390/antib5040022>.
15. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. *J Thromb Haemost* 2012;10:2338-43. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04906.x.

PRÉMIO MALPIGHI DA EUROPEAN SOCIETY OF MICROCIRCULATION

O **Professor Ákos Koller** foi galardoado na ESM- ESVBO que decorreu em Maastricht, NL, 15-18 April 2019, com o Prémio Malpighi da European Society of Microcirculation. Como é habitual, nesta solenidade, proferiu a lição intitulada “Going with the flow in microcirculation”.

Na ESM-ESVBO Carlota Saldanha e Ana Santos Silva- Herdade apresentaram respetivamente “Involvement of fibrinogen in microcirculation” e “Effects of diabetes in non-ocular tissues insights into hemodynamic alterations in diabetic retinopathy”.

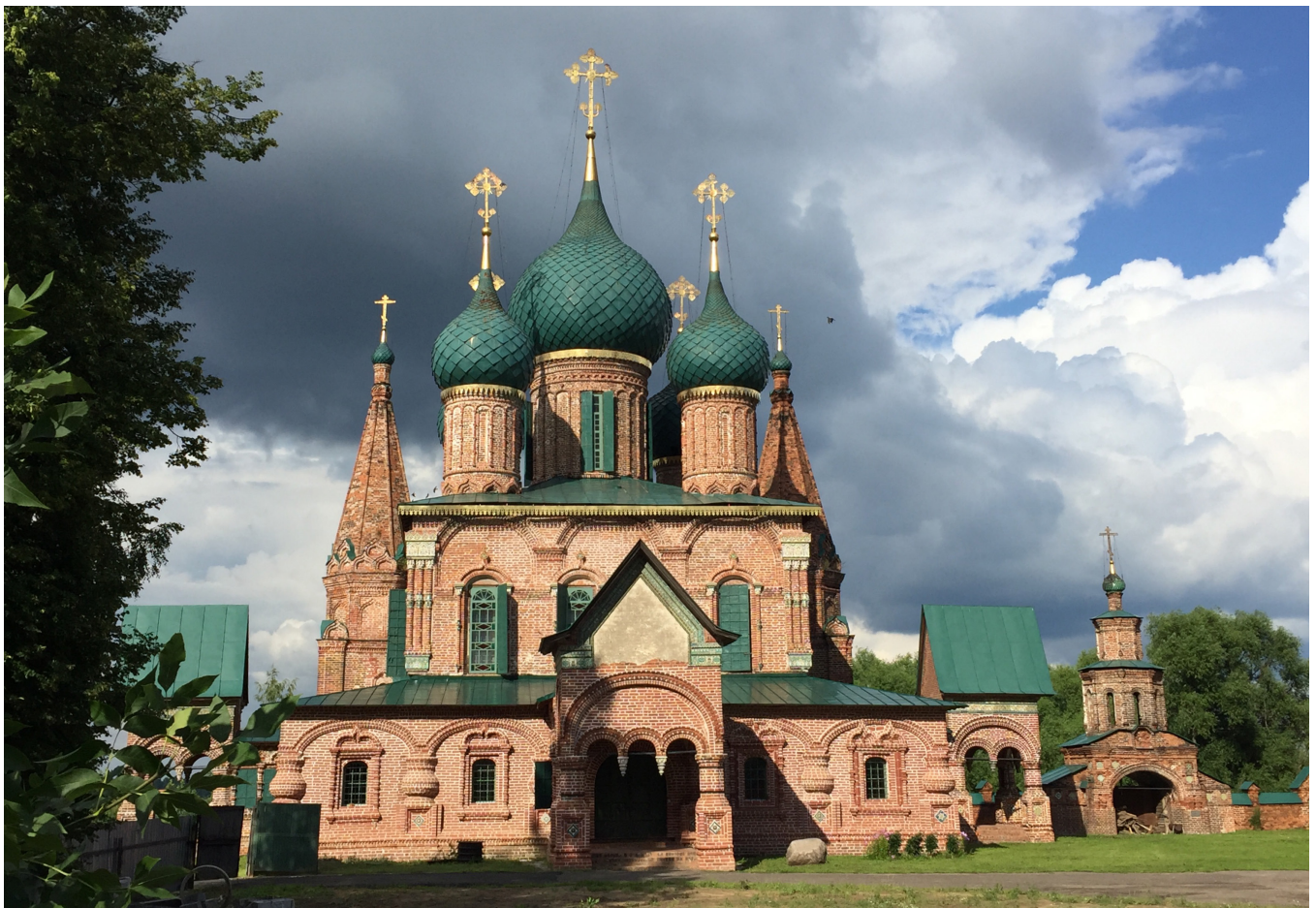


**12th INTERNATIONAL CONFERENCE ON HEMORHEOLOGY
AND MICROCIRCULATION
1-3 July 2019, Yaroslavl, Russia**

The Organizing Committee invites you to attend the **12th International Conference on Hemorheology and Microcirculation** that will be held on **1-3 July, 2019** in the center of Russia, in the ancient Russian town Yaroslavl situated on the bank of the great river Volga and is part of the cities of the “Golden Ring of Russia”.

SPHM was represented by its President, who presented a communication.

SPHM congratulates the organizing committee for excellence at 12th International Conference on Hemorheology and Microcirculation.



HOW LONG CAN WE STORE BLOOD SAMPLES: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Dong-wenWu , Yu-meng Li, FenWang

Abstract

Objective: To assess the effect of storage time and temperature on complete blood count (CBC) and comprehensive metabolic panel (CMP) testing. **Methods:** PubMed, EMBASE, the Cochrane Library of Systematic Reviews, Web of Science (WOS), China National Knowledge Infrastructure (CNKI), WanFang databases and SinoMed databases were searched up to May 2017. Clinical trials with adult whole blood samples were identified. Paired reviewers independently screened, extracted data and evaluated the quality of evidence (MINORS tool). Analyses were conducted using Revman 5.3 and Stata 14.0. **Results:** A total of 89 studies were confirmed. For CBC, except MPV, most parameters were stable at least for 24 h. Some indices, such as WBC, PLt, HCT, HGB and MCH were stable up to 3 d. However, stable CMP test results could only be acquired within 12 h. at 4 °C, including GLU, AST, ALT, Na, ALB, Cl, DBIL, TC, TG and ALP. Values were less stable when stored at RT. **Conclusions:** Specimens stored N12 h. for CMP may generate unreliable results. For CBC, samples could reliably be stored for 24 h. For longer storage, refrigeration (at 4 °C) would be a better choice. [EBioMedicine 2017;24:277-85]

EXERCISE AND CHRONIC WOUND HEALING

Bolton L

Abstract

The calf muscles have been called the body's "second heart," improving blood circulation when exercised, usually by walking. Structured exercise training (SET) increases calf muscle pump function, lower limb circulation, and walking capacity for those with limited ambulation due to peripheral arterial disease (PAD)¹ or venous insufficiency.² This resulted in the Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS) decision to reimburse up to thirty-six 30- to 60-minute, properly supervised hospital outpatient or office-based SET sessions over 12 weeks to treat intermittent claudication for patients with PAD. Exercise improves acute wound healing in diabetic mice³ and healthy elderly humans,⁴ but insufficient evidence supports its healing efficacy on ischemic ulcers,¹ venous leg ulcers (VLUs),⁵ and diabetic foot ulcers (DFUs).⁶ This month's Evidence Corner examines 2 recent randomized controlled trials (RCTs) testing the effects of foot exercises that activate calf muscles on chronic VLUs⁷ and DFUs.⁸ [**Wounds 2019;31:65-7**]

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)

