

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aline Klein Mastella

IMPACTOS DA CARBAMILAÇÃO E DA ICTERÍCIA INDUZIDAS *IN VITRO* SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS ASSOCIADOS À COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Santa Maria, RS
2023

Aline Klein Mastella

**IMPACTOS DA CARBAMILAÇÃO E DA ICTERÍCIA INDUZIDAS *IN VITRO*
SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS ASSOCIADOS
À COAGULAÇÃO SANGUÍNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Vargas Bochi

Santa Maria, RS
2023

Mastella, Aline
IMPACTOS DA CARBAMILAÇÃO E DA ICTERÍCIA INDUZIDAS IN
VITRO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS
ASSOCIADOS À COAGULAÇÃO SANGUÍNEA / Aline Mastella.- 2023.
48 p. ; 30 cm

Orientador: Rafael Moresco
Coorientador: Guilherme Bochi
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. Hemostasia 2. Interferentes 3. Carbamilação 4.
Parâmetros da coagulação I. Moresco, Rafael II. Bochi,
Guilherme III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo
autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca
central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt satta cm 10/1728.

Declaro, ALINE MASTELLA, para os devidos fins e sob as penas da lei,
que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese)
foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de
consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas.
Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado
anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando
ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na
anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências
legais.

Aline Klein Mastella

**IMPACTOS DA CARBAMILAÇÃO E DA ICTERÍCIA INDUZIDAS *IN VITRO*
SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS ASSOCIADOS
À COAGULAÇÃO SANGUÍNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 17 de janeiro de 2023:

Rafael Noal Moresco, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

José Edson Paz da Silva, Prof. Dr. (UFSM)

Clóvis Paniz, Prof. Dr. (UFSM)

Fabio Vasconcellos Comim, Prof. Dr. (UFMG)

Mariela Granero Farias, Dra. (HCPA/UFRGS)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

Esta longa trajetória do doutorado não seria possível sem que eu tivesse contado com o apoio de diversas pessoas.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que permitiram minha formação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Noal Moresco, por me receber e aceitar me guiar durante este período, pelo aprendizado imenso e paciência.

Agradeço ao coorientador, Prof. Dr. Guilherme Vargas Bochi, pela colaboração com a realização deste trabalho.

Minha gratidão aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica que auxiliaram na realização de experimentos.

Agradeço aos professores da banca, Prof. Dr. José Edson Paz da Silva, Prof. Dr. Clóvis Paniz, Prof. Dr. Fabio Vasconcellos Comim e à Dra. Mariela Granero Farias, que se dispuseram a ler, avaliar e contribuir para o aperfeiçoamento desta tese.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Márcia, que sempre foram apoio e incentivo no meu crescimento profissional e pessoal. Esta simples referência não faz jus à importância que eles possuem em minha vida.

Por último agradeço à minha madrinha, dinda Esther, que infelizmente nos deixou no último ano, mas sempre esteve presente em minha vida, acompanhando e auxiliando a cada etapa.

Para mim, é muito melhor compreender o universo como ele realmente é do que persistir no engano, por mais satisfatório e tranquilizador que possa ser.
(SAGAN, 1996, p.27)

RESUMO

IMPACTOS DA CARBAMILAÇÃO E DA ICTERÍCIA INDUZIDAS *IN VITRO* SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS ASSOCIADOS À COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

AUTORA: Aline Klein Mastella

ORIENTADOR: Rafael Noal Moresco

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Guilherme Vargas Bochi

A hemostasia é um processo altamente regulado por proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes com a finalidade de manter a fluidez sanguínea dentro dos vasos e capaz de promover a coagulação quando há dano vascular. Alterações em diferentes etapas da hemostasia predis põem a doenças que levam a hemorragias, como nas hemofilias, ou a eventos trombóticos e podem ser diagnosticadas através da análise de parâmetros que avaliam a coagulação do indivíduo. Para que os resultados provenientes dos testes de coagulação sejam realizados de forma correta, fatores de erro devem ser evitados. Interferentes como lipemia, icterícia e hemólise são possíveis fontes que podem gerar resultados incompatíveis com a realidade por causarem alteração na análise. Outro fator que pode afetar o resultado de análises laboratoriais é a alteração estrutural de proteínas da coagulação. Uma dessas alterações é proveniente da reação da carbamilação que ocorre em aminoácidos, peptídeos e proteínas, afetando a sua função e predispondo a algumas patologias. A carbamilação ocorre no organismo principalmente pela presença de cianato decorrente do metabolismo da ureia e da ação da mieloperoxidase em processos inflamatórios sobre o tiocianato e pode afetar proteínas envolvidas na hemostasia. Apesar de alguns estudos já terem sido desenvolvidos, pesquisas que avaliem melhor a possível interferência da icterícia na determinação de D-dímero e da carbamilação de proteínas na avaliação de parâmetros da coagulação ainda são necessários para uma melhor avaliação do paciente e entendimento de interferentes na hemostasia. Neste primeiro estudo, foi avaliada a interferência da icterícia na análise de D-dímero através da adição de controle comercial de D-dímero e de diferentes concentrações de bilirrubina (0, 0,9, 1,9, 3,8, 7,5, 15 e 30 mg/dL) a amostras de pool de plasma humano, seguida da quantificação do D-dímero por ensaio imunoturbidimétrico. A carbamilação, por sua vez, foi analisada através da exposição de controles da hemostasia e *pools* de plasma a diferentes concentrações de cianato de potássio (0, 150 nm, 150 μ M e 150 mM) e ureia (0, 20, 100 e 500 md/dL) com posterior análise dos parâmetros da coagulação: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) e dosagem de fibrinogênio. Através dos estudos realizados pode-se verificar que a icterícia não parece interferir na análise de D-dímero. Os experimentos de carbamilação com KOCN demonstraram aumento significativo do TP e TTPa e redução do fibrinogênio nos controles comerciais, enquanto que no plasma as alterações nos testes ocorreram na concentração mais elevada de cianato, exceto para o TP, que também elevou na concentração de 150 μ M KOCN. A incubação com concentrações crescentes de ureia prolongou o TP e o TTPa nos controles comerciais. No plasma, tal evidência só ocorreu na concentração mais elevada de ureia. O fibrinogênio não mostrou ser afetado pela incubação com ureia. As alterações observadas podem indicar que pacientes com processos inflamatórios e doença renal crônica poderiam desenvolver desordens hemostáticas.

Palavras-chave: Hemostasia. Interferentes. Carbamilação. Parâmetros da Coagulação.

ABSTRACT

IMPACTS OF IN VITRO-INDUCED CARBAMYLATION AND ICTERUS ON THE QUANTIFICATION OF LABORATORY PARAMETERS ASSOCIATED WITH BLOOD COAGULATION

AUTOR: Aline Klein Mastella

ADVISOR: Rafael Noal Moresco

COADVISOR: Prof. Dr. Guilherme Vargas Bochi

Hemostasis is a process highly regulated by pro-coagulant and anticoagulant proteins with the purpose of maintaining blood flow within the vessels and capable of promoting coagulation when there is vascular damage. Changes in different stages of hemostasis predispose to diseases that lead to hemorrhage, as in hemophilia, or to thrombotic events and can be diagnosed through the analysis of parameters that evaluate the individual's coagulation. For the results from the coagulation tests to be carried out correctly, error factors must be avoided. Interferents such as lipemia, icterus and hemolysis are possible sources that can generate results that are incompatible with reality because they cause changes in the analysis. Another factor that can affect the result of laboratory tests is the structural alteration of coagulation proteins. One of these changes comes from the carbamylation reaction that occurs in amino acids, peptides and proteins, affecting its function and predisposing to some pathologies. Carbamylation occurs in the body mainly due to the presence of cyanate due to urea metabolism and the action of myeloperoxidase in inflammatory processes on thiocyanate and can affect proteins involved in hemostasis. Although some studies have already been developed, research that better evaluates the possible interference of icterus in the determination of D-dimer and protein carbamylation in the evaluation of coagulation parameters are still necessary for a better evaluation of the patient and understanding of interferences in hemostasis. In this first study, the interference of icterus in the D-dimer analysis was evaluated through the addition of commercial D-dimer control and different concentrations of bilirubin (0, 0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15 and 30 mg/dL) to human plasma pools, followed by D-dimer quantification by immunoturbidimetric assay. Carbamylation was analyzed by exposing commercial controls and plasma pools to different concentrations of potassium cyanate (0, 150 nm, 150 μ M, and 150 mM) and urea (0, 20, 100, and 500 md/dL) with subsequent analysis of coagulation parameters: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aTTP), and fibrinogen. Through the studies performed, it can be verified that icterus does not seem to interfere in the analysis of D-dimer. The carbamylation experiments with KOCN showed a significant increase in TP and aTTP and reduction in fibrinogen in the commercial controls, while in plasma the changes in the tests occurred at the highest concentration of cyanate, except for TP, which also elevated at the 150 μ M KOCN concentration. Incubation with increasing concentrations of urea prolonged the PT and aTTP in the commercial controls. In plasma, such evidence occurred only at the highest urea concentration. Fibrinogen was not shown to be affected by incubation with urea. The observed changes may indicate that patients with inflammatory processes and chronic kidney disease could develop hemostatic disorders.

Keywords: Hemostasis. Interferents. Carbamylation. Coagulation Parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata da coagulação sanguínea	16
Figura 2 - Fibrinólise	17
Figura 3 - Representação da reação não enzimática de carbamilação de uma aminoácido primário ou um grupo sulfidril livre de uma proteína, peptídeo ou aminoácido com ácido isociânico (cianato), resultando em ligação covalente irreversível.....	23
Figura 4 - Resultados obtidos na avaliação de D-dímero após incubação com KOCN nas concentrações de 0, 25, 50 e 100 mM.....	40

PARTE I – INTERFERÊNCIA DA ICTERÍCIA NOS NÍVEIS DE D-DÍMERO PLASMÁTICO ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOTURBIDIMÉTRICO

Figure 1. Effects of bilirubin at different concentrations of plasma D-dimer levels. Data are expressed as mean \pm SD. SD, standard deviation	31
---	----

LISTA DE TABELAS

Table 1. PT, aPTT, and fibrinogen values after the carbamylation induced with potassium cyanate.....	38
Table 2. PT, aPTT, and fibrinogen values after the carbamylation induced with urea.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Antitrombina
DD	D-dímero
DRC	Doença renal crônica
FB	Fibrinogênio
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de von Willebrand
FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V da coagulação ativado
FVII	Fator VII da coagulação
FVIIa	Fator VII da coagulação ativado
FVIII	Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII da coagulação ativado
FIX	Fator IX da coagulação
FIXa	Fator IX da coagulação ativado
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X da coagulação ativado
FXI	Fator XI da coagulação
FXIa	Fator XI da coagulação ativado
KOCN	Cianato de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Proteína C
PDF	Produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio
PS	Proteína S
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
TT	Tempo de trombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	13
3.2	AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA	15
3.3	PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES NA HEMOSTASIA ..	17
3.4	IMPACTO DOS INTERFERENTES E VARIÁVEIS PRÉ-ANALÍTICAS SOBRE OS PARÂMETROS LABORATORIAIS DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	19
3.5	CARBAMILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	21
4	RESULTADOS	26
4.1	PARTE I – INTERFERÊNCIA DA ICTERÍCIA NOS NÍVEIS DE D-DÍMERO PLASMÁTICO ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOTURBIDIMÉTRICO.....	27
4.2	PARTE II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO <i>IN VITRO</i> INDUZIDA PELA INCUBAÇÃO DE CONTROLES COMERCIAIS E <i>POOL</i> DE PLASMA COM CIANATO DE POTÁSSIO E UREIA SOBRE OS PARÂMETROS LABORATORIAIS DA COAGULAÇÃO.	32
4.3	PARTE III – RESULTADOS ADICIONAIS: CARBAMILAÇÃO DE D-DÍMERO	39
4.3.1	Metodologia	39
4.3.1.1	Modelo Experimental da Carbamilação in Vitro.....	39
4.3.1.2	Efeitos da Carbamilação Sobre D-Dímero	39
4.3.1.3	Análise Estatística.....	39
4.3.2	Resultados	40
5	DISCUSSÃO	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo altamente regulado por proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes com a finalidade de manter a fluidez sanguínea dentro dos vasos e capaz de promover a coagulação quando há dano vascular (FERREIRA, 2010; RATTO, 2021). Alterações em diferentes etapas da hemostasia predisõem a doenças que levam a hemorragias, como nas hemofilias, ou a eventos trombóticos. As coagulopatias e as trombofilias podem ter causa hereditária ou adquirida (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016) e podem ser diagnosticadas através da análise de parâmetros que avaliam a coagulação do indivíduo (HAYWARD et al, 2012; NAIR, 2021; SAHLI et al, 2020; SILVA et al, 2016).

Diversos testes podem ser realizados a fim de avaliar a hemostasia do paciente, como o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), considerados testes de *screening*, uma vez que não são testes que indicam alteração em um determinado fator da coagulação e justificam a necessidade de uma pesquisa mais específica (HOFFBRAND et al, 2008; MIJOVSKI, 2019; SILVA et al, 2016). A etapa final da coagulação pode ser avaliada pelo tempo de trombina (TT) e pela dosagem de fibrinogênio (MIJOVSKI, 2019; SAHLI et al, 2020).

Após a formação do coágulo, a etapa da fibrinólise inicia com a finalidade de restabelecer a fluidez sanguínea nos vasos e uma forma de avaliá-la é através da dosagem de D-dímero, um produto de degradação da fibrina formado na coagulação (FAVRESSE et al, 2018; LINKINS, 2017; STANG, 2013).

Para que os resultados provenientes dos testes de coagulação sejam realizados de forma correta, fontes de erro devem ser evitadas, uma vez que serão utilizados para diagnóstico de doenças, acompanhamento e tratamento de pacientes. Interferentes como lipemia, icterícia e hemólise são possíveis fontes que podem gerar resultados incompatíveis com a realidade por causarem alteração em leitura de absorvância, sobreposição de espectro ou dispersão da luz (CAKIRCA, 2018; DIMESKI, 2008; FAVALORO, 2012; LIPPI, 2019; SAIBABA, 1998).

Outro fator que pode afetar o resultado de análises laboratoriais é a alteração estrutural de proteínas da coagulação. Uma dessas alterações é proveniente da reação da carbamilação que ocorre em aminoácidos, peptídeos e proteínas, afetando a sua função e predispondo a algumas patologias. A carbamilação ocorre no organismo principalmente pela presença de cianato decorrente do metabolismo da ureia e da ação da mieloperoxidase de processos

inflamatórios sobre o tiocianato (DELANGHE et al, 2017; JAISSON et al, 2011). Assim, pacientes com doenças inflamatórias e com doença renal crônica, que eleva a uremia, são mais susceptíveis a reações de carbamilação de proteínas, como as proteínas envolvidas na hemostasia (BINDER et al, 2017; DELANGHE et al, 2017).

Apesar de alguns estudos já terem sido desenvolvidos sobre a influência de interferentes sobre alguns parâmetros da coagulação, a maioria avalia presença de hemólise e lipemia, sem haver evidências suficientes da possível interferência de níveis elevados de bilirrubina na determinação de D-dímero. Além disso, ainda são necessários mais estudos acerca de quanto a carbamilação pode afetar os testes que avaliam parâmetros da coagulação utilizados atualmente nos laboratórios clínicos para um melhor entendimento da interferência na hemostasia e interpretação dos resultados do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar, por metodologia *in vitro* envolvendo controles comerciais e amostras de plasma humano, se interferentes endógenos como icterícia e modificações proteicas apresentam potencial de afetar a determinação de parâmetros da coagulação sanguínea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se diferentes concentrações de bilirrubina indireta causam interferência na avaliação laboratorial de D-dímero mensurado pelo método imunoturbidimétrico

Verificar se a incubação de plasma controle e plasma humano com cianato de potássio, um conhecido agente carbamilante, produz alterações nas dosagens de tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativado e fibrinogênio.

Verificar se a incubação de plasma controle e plasma humano com ureia produz alterações nas dosagens de tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativado e fibrinogênio

Verificar se a exposição de controles comerciais de D-dímero ao cianato de potássio é capaz de promover alteração na sua quantificação laboratorial por método imunoturbidimétrico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A hemostasia tem como função a manutenção da fluidez sanguínea em condições normais e a estimulação da coagulação quando há dano vascular. É um processo altamente regulado, com fatores pró-coagulantes e anticoagulantes para garantir seu funcionamento perfeito, sem que ocorra sangramentos ou eventos trombóticos espontâneos (FERREIRA, 2010; RATTO, 2021).

Os fatores envolvidos na coagulação podem ser classificados como zimogênios, cofatores e proteína estrutural. Os zimogênios exercem sua atividade enzimática após ativação proteolítica. Os cofatores atuam juntamente com os zimogênios e são divididos em solúveis ou celulares. O fibrinogênio é a proteína estrutural a partir da qual a fibrina é formada, dando origem ao coágulo (SILVA et al, 2016). O Quadro 1 mostra os fatores da coagulação e suas características.

A estimulação da coagulação provém de dano vascular, com exposição do fator tecidual (FT), uma proteína transmembrana expressa em células próximas ao leito vascular. O FT atua como receptor do fator VII, ativando-o e formando o complexo FT-FVIIa, que ativa o fator X e o fator IX. O FXa associa-se ao fator Va, formando o complexo protrombinase na superfície de células que expressam o FT. O complexo protrombinase é capaz de estimular a formação de pequena quantidade de trombina a partir da protrombina. Essas etapas constituem a fase de iniciação da coagulação (RATTO, 2021; SILVA et al, 2016; SMITH, 2009)

A trombina gerada na fase de iniciação liga-se a plaquetas, ativando-as, levando a liberação de grânulos e a formação de uma superfície pró-coagulante. Além disso, a trombina ativa os fatores XI e V na superfície plaquetária. Outra função da trombina é a liberação do fator de von Willebrand (FvW), que circula ligado ao fator VIII. Assim, o FvW promove funções plaquetárias de adesão e agregação. O FVIII liberado acaba sendo ativado pela trombina. Essas etapas que ocorrem pela trombina gerada na fase de iniciação compreendem a fase de amplificação do processo hemostático (FERREIRA, 2010; HOFFBRAND, 2008; SILVA et al, 2016; SMITH, 2009).

Uma vez que as plaquetas são ativadas na fase de amplificação, inicia-se a fase de propagação, na qual mais plaquetas são recrutadas ao local da lesão vascular para continuar o processo. Nessa etapa há a formação do complexo tenase quando o FIXa liga-se ao FVIIIa na superfície das plaquetas, promovendo a ativação de maior quantidade de FXa, que associa-se

ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, formando mais complexo protrombinase. Assim é possível uma maior formação de trombina a partir de protrombina. A trombina gerada, agora em maior quantidade, quebra o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam e formam o coágulo hemostático (FERREIRA, 2010; HOFFBRAND, 2008; SILVA et al, 2016; SMITH, 2009).

Quadro 1 – Fatores da coagulação sanguínea e suas características

Fator	Característica	Ação na Coagulação sanguínea
Fator I (fibrinogênio)	Proteína estrutural	Ativação
Fator II (FII) (protrombina)	Zimogênio	Ativação
Fator III (fator tecidual)	Cofator celular	Ativação
Fator V (FV)	Cofator solúvel	Ativação
Fator VII (FVII)	Zimogênio	Ativação
Fator VIII (FVIII)	Cofator solúvel	Ativação
Fator IX (FIX)	Zimogênio	Ativação
Fator X (FX)	Zimogênio	Ativação
Fator XI (FXI)	Zimogênio	Ativação
Fator XII (FXII)	Zimogênio	Ativação
Fator XIII (FXIII)	Zimogênio	Ativação
Fator de von Willebrand (FvW)	Cofator solúvel	Ativação
Proteína C	Cofator solúvel	Inibição
Proteína S	Cofator solúvel	Inibição
Trombomodulina	Cofator celular	Inibição
Antitrombina (AT)	Glicoproteína	Inibição

Fonte: autoria própria

Para que a coagulação esteja restrita ao local da lesão, anticoagulantes naturais devem fazer esse controle. Tais anticoagulantes são as proteínas C (PC) e S (PS) e antitrombina (AT). A PC tem a capacidade de inativar os fatores Va e VIIa após ser ativada pela trombina e sua ação ocorre em maior extensão nas células endoteliais que nas superfícies das plaquetas. A PS atua como cofator da PC nessa etapa de controle da coagulação. A AT exerce inibição dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa e sua rápida ação é possível pela sua ligação a receptores glicosaminoglicanos nas células endoteliais (FERREIRA, 2010; SMITH, 2009).

Após a formação do coágulo, sua remoção é feita pelo sistema fibrinolítico. Nessa etapa o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) é liberado de células endoteliais, liga-se à fibrina

formada na coagulação e estimula a conversão do plasminogênio ligado ao trombo em plasmina. A plasmina atua na fibrina, formando produtos de degradação de fibrina, como o D-dímero (DD). Além disso, a plasmina consegue digerir o fibrinogênio, FV, FVIII e outras proteínas, assim, tem importância na limitação da extensão do trombo em formação. A PC também estimula a fibrinólise (HOFFBRAND, 2008; SILVA et al, 2016).

A fibrinólise também necessita de regulação, a qual é feita pelo Inibidor do ativador de fibrinogênio (PAI) e pelos inibidores de plasmina: α -2-antiplasmina e α -2 macroglobulina (HOFFBRAND, 2008; SILVA, 2016).

3.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA HEMOSTASIA

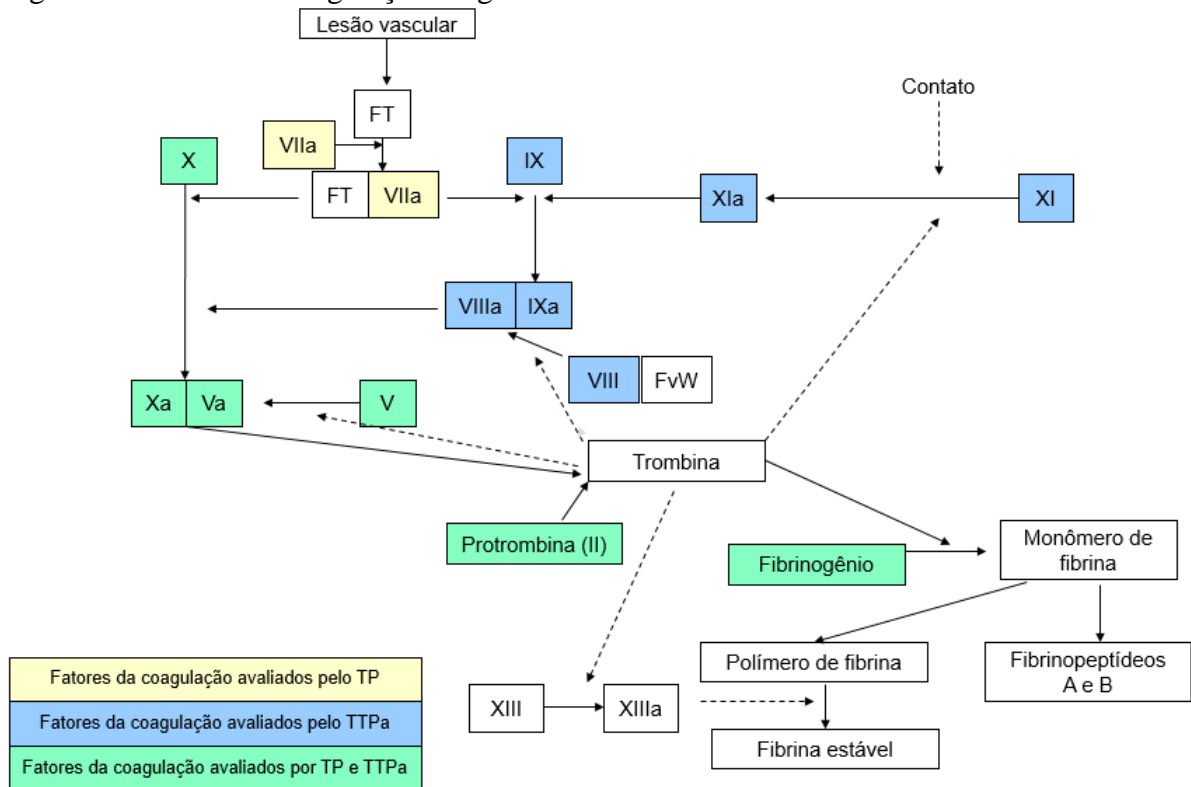
A avaliação laboratorial da hemostasia é realizada em pacientes com distúrbios hemorrágicos hereditários ou adquiridos, para fazer acompanhamento de pacientes com eventos trombóticos e situações pré-operatórias, por exemplo. Dentre os testes utilizados, pode-se citar tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), tempo de trombina (TT), dosagens de fibrinogênio (FB) e D-dímero (HAYWARD et al, 2012; NAIR, 2021; SAHLI et al, 2020; SILVA et al, 2016). A Figura 1 representa a cascata da coagulação sanguínea com os respectivos fatores da coagulação avaliados pelo TP e TTPa.

O TP e o TTPa são considerados testes de *screening* para avaliar o sistema hemostático. Resultados fora dos valores de referência indicam alteração que deve ser melhor investigada para o correto diagnóstico. O TP avalia os fatores de coagulação I, II, V, VII e X enquanto o TTPa avalia os fatores da coagulação I, II, V, VIII, IX, X, XI e XII (HOFFBRAND et al, 2008; MIJOVSKI, 2019; SILVA et al, 2016).

O TT avalia a última etapa da cascata da coagulação, que é a formação da fibrina e pode ser utilizado para detectar deficiência de fibrinogênio e presença de anticoagulante como heparina e inibidores da trombina (MIJOVSKI, 2019; SAHLI et al, 2020; SILVA et al, 2016).

O fibrinogênio, uma proteína estrutural produzida no fígado e com meia-vida de quatro dias é o fator da coagulação mais abundante no plasma, com concentração que varia de 100 a 400 mg/dL e o aumento da sua concentração pode ser relacionado a risco cardiovascular e processos inflamatórios (ARIENS, 2013). Sua avaliação é importante em coagulopatias de consumo dos fatores da coagulação ou ativação do sistema fibrinolítico (SILVA et al, 2016).

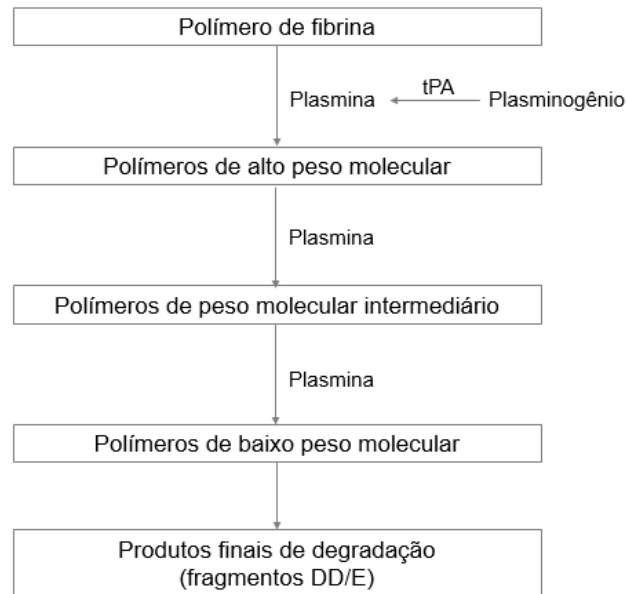
Figura 1 - Cascata da coagulação sanguínea



Fonte: autoria própria (adaptado de Ferreira et al, 2010)

A ação da plasmina sobre a fibrina gera diversos produtos de degradação (fragmentos X, D, Y e E), com massas moleculares variáveis. O D-dímero é um dos produtos de degradação da fibrina e possui meia-vida plasmática de oito horas (Figura 2). É considerado como marcador de fibrinólise, pois é o mais reconhecido pelos reagentes laboratoriais em uso atualmente. É utilizado principalmente para avaliar coagulação intravascular disseminada, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (FAVRESSE et al, 2018; LINKINS, 2017; STANG, 2013). Atualmente a avaliação do D-dímero foi relacionada ao prognóstico da COVID-19, sendo que a piora do estado de saúde do paciente é acompanhada pelo aumento de D-dímero (LIPPI, 2020; HUANG, 2020; ZHANG, 2020; TERPOS, 2020; TANG, 2020). Além disso, estudos sugerem que a determinação de D-dímero antes do tratamento de câncer possa ser utilizada como preditor de prognóstico em cancer de pulmão (DENG et al, 2021; MA et al, 2021), digestivo (LIN et al, 2018) e outros tumores sólidos (LI et al, 2018), uma vez que células tumorais propiciam um ambiente pró-trombótico (PALUMBO et al, 2000) aumentando a chance de eventos como tromboembolismo venoso e trombose arterial (HISADA, 2017).

Figura 2 - Fibrinólise



Fonte: adaptado de Favresse et al, 2018

Tendo em vista a grande utilização dos parâmetros que avaliam a coagulação em diversas situações e a possibilidade de que as proteínas envolvidas no processo sofram reação de carbamilação, torna-se necessário uma maior avaliação das consequências nos resultados obtidos nos testes TP, TTPa, FB e D-dímero.

3.3 PRINCIPAIS DOENÇAS ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES NA HEMOSTASIA

Doenças hemorrágicas, também chamadas de coagulopatias, são de origem hereditária ou adquirida e ocorrem pela deficiência de um ou mais fatores da coagulação, ocasionando hemorragias espontâneas ou após trauma (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016).

Dentre as doenças hemorrágicas hereditárias, as mais comuns são a doença de von Willebrand e as hemofilias A e B. Na doença de von Willebrand o FvW está alterado qualitativamente e/ou quantitativamente e pode ocorrer alteração da atividade do FVIII, levando a apresentação variada nos quadros hemorrágicos, havendo indivíduos assintomáticos e casos de epistaxe, equimose, sangramento mucocutâneo e hemorragia pós-parto e menorragia em mulheres (KALOT et al, 2022; KONKLE, 2016; SILVA et al, 2016). O diagnóstico da doença pode ser difícil de elucidar (KALOT et al, 2022), pois muitos fatores afetam a síntese, liberação, função e depuração do FvW (KONKLE, 2016), mas baseia-se na avaliação de FvW,

agregação plaquetária (diminuída), contagem de plaquetas (normal ou diminuída), TTPa (pode estar alterado) e TP (normal) (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016).

As hemofilias A e B ocorrem pela deficiência dos fatores VIII e IX, respectivamente. São doenças ligadas ao cromossomo X e atingem principalmente homens com mãe portadora, sendo pouco comum acometer mulheres. O quadro dos pacientes é variado e relacionado ao grau de perda de atividade dos fatores da coagulação atingidos, ocorrendo hemorragias espontâneas ou pós-trauma. O diagnóstico das hemofilias é realizado pela dosagem do FVIII e do FIX após uma suspeita com TTPa alterado, TP e contagem de plaquetas normais (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016).

Outras coagulopatias hereditárias são menos comuns e exigem determinação específica de fatores da coagulação para o diagnóstico da alteração, como deficiência de FII, FVII, FX, FV, FXI e FXII, por exemplo (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016).

As coagulopatias adquiridas podem estar relacionadas à presença de auto-anticorpos contra fatores da coagulação (FRANCHINI et al, 2013), doenças linfoproliferativas, gestação, doença hepática, coagulação intravascular disseminada, fibrinogénólise, coagulopatias induzidas por medicamentos e síndrome antifosfolípídeo. A avaliação e diagnóstico de cada caso deve ser feita com base em exames hemostáticos, imunológicos e relacionando com as demais condições do paciente (REZENDE, 2010; SILVA et al, 2016). Um exemplo de doença hemorrágica se deve à presença de inibidores de fatores da coagulação, como a presença de auto-anticorpos contra o FXIII, que podem surgir espontaneamente, devido a doenças linfoproliferativas ou medicamentos (FRANCHINI et al, 2013).

Ao contrário das coagulopatias, as trombozes são alterações hereditárias ou adquiridas que estimulam a coagulação e levam à formação de trombos nos vasos sanguíneos, sejam venosos ou arteriais. Diminuição do fluxo sanguíneo, lesão vascular e estados de hipercoagulabilidade são situações que predispõem à trombose (SILVA et al, 2010; HOFFBRAND, 2008; SILVA et al, 2016). A ativação plaquetária, trombocitose, aumento da concentração de fatores da coagulação (VII, VIII, IX, XI, II), fator V de Leiden, deficiência de inibidores fisiológicos da coagulação e alterações no sistema fibrinolítico também se relacionam ao maior risco de desenvolvimento de eventos trombóticos (SILVA et al, 2016). A trombose arterial geralmente iniciam devido à lesão endotelial ou local de turbulência sanguínea, levando ao acidente vascular encefálico ou infarto agudo do miocárdio e a trombose venosa relaciona-se mais à estase, causando principalmente trombose venosa profunda envolvendo membros inferiores ou embolia pulmonar (HOFFBRAND, 2008; KAFEZA, 2016; WENDELBOE, 2016).

As trombofilias primárias são aquelas de caráter hereditário. Possuem alta relação com eventos trombóticos, principalmente venosos (CHIASAKUL et al, 2019; CROLES et al, 2018). São causadas pela deficiência de anticoagulantes naturais (PC, PS, antitrombina III), hiperhomocisteinemia, desfibrinogenemias, resistência à PC ativada e FV de Leiden e mutação do gene da protrombina (CHIASAKUL et al, 2019; SILVA et al, 2010). Casos de trombose sem associação hereditária são classificadas como trombofilias secundárias. A principal causa é a síndrome de anticorpos antifosfolípeos, mas existem outros fatores de risco, como traumas e cirurgias, idade avançada, neoplasias malignas, uso de contraceptivos orais ou terapia hormonal de substituição, hiperviscosidade, dentre outros (SILVA et al, 2010; HOFFBRAND, 2008). O diagnóstico laboratorial das trombofilias envolvem a avaliação de protrombina, PC, PS, antitrombina, plasminogênio, pesquisa de anticoagulante lúpico e anticardiolipina e análise genética para verificar mutações no FV e FII, dependendo de características clínicas de cada indivíduo (SILVA et al, 2010; HOFFBRAND, 2008; SILVA et al, 2016).

3.4 IMPACTO DOS INTERFERENTES E VARIÁVEIS PRÉ-ANALÍTICAS SOBRE OS PARÂMETROS LABORATORIAIS DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os resultados provenientes de laboratórios clínicos são utilizados para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de doenças. Desta forma, todas as etapas envolvidas no processo laboratorial devem ter critérios estabelecidos para erradicar erros que possam afetar a saúde do paciente (CAKIRCA, 2018; DIMESKI, 2008; GUDER, 2013) e a viabilidade econômica do sistema de saúde (FAVALORO, 2012).

Os testes que avaliam a hemostasia são frequentes e importantes para avaliar trombofilias, acompanhar pacientes em terapia com anticoagulantes e como testes pré-operatórios (RAO, 2000; ZHAO, 2018) e servirão como base para decisões clínicas (ZHAO, 2017). Portanto, resultados errôneos causam consequências deletérias aos pacientes (LINSKENS, 2018).

Dentre as etapas pré-analítica, analítica e pós-analítica, a primeira é a que possui maiores relatos com ocorrência de erros laboratoriais (CAKIRCA, 2018; FAVALORO, 2012; GUDER, 2013; LIPPI, 2019). Tal fase inclui desde a identificação correta do paciente e dos exames a serem realizados até a fase analítica. As principais causas de erro na fase pré-analítica incluem preparo do paciente, coleta, transporte, armazenamento e preparo das amostras (CAKIRCA, 2018; FAVALORO, 2012; LIPPI, 2019).

Outra característica que pode afetar os resultados laboratoriais é a presença de interferentes na amostra. Tais interferentes são classificados como exógenos e endógenos. Os interferentes exógenos que afetam os resultados laboratoriais são aquelas substâncias que não são provenientes do próprio paciente e podem ser citados tratamentos farmacológicos e imunoterápicos e aditivos (como anticoagulantes). Os interferentes endógenos mais comuns são lipemia, icterícia e hemólise (DIMESKI, 2008; SAIBABA, 1998).

Os interferentes endógenos como hemólise, icterícia e lipemia, dependendo de seu grau, podem afetar os resultados dos testes de avaliação da hemostasia por alterarem a transmissão da luz nos equipamentos utilizados (LIPPI, 2013). Devido a isso, muitas amostras são rejeitadas, sendo necessário realizar nova coleta para análise (HARNANINGSIH, 2017; LIPPI, 2006; LIPPI, 2013).

A hemólise causa alterações nas amostras pela liberação de hemoglobina livre, moléculas citoplasmáticas e da membrana plasmática, afetando a análise através de absorvância em analisadores ópticos. A interferência de hiperbilirrubinemia ocorre principalmente por sobreposição espectral, enquanto a presença de lipemia gera dispersão da luz e interferência direta na hemostasia pelas partículas lipídicas (LIPPI, 2013).

Evidências prévias apontam que a hemólise afeta algumas análises que avaliam a coagulação. A presença de hemólise crescente (até 9,1%) em amostras de plasma causou aumento de cerca de 20% no TP e de 15% na avaliação de D-dímero. Houve decréscimo de 5% do TTPa e de 15% na determinação de fibrinogênio, indicando que resultados seguros são obtidos apenas em amostras não hemolisadas (LIPPI, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Harnaningsih et al (2017), que confirmaram um significativo decréscimo no TTPa com o aumento do nível de hemólise. O mesmo estudo evidenciou leves alterações no TT, sendo que baixas concentrações de hemoglobina ($<0,8$ g/dL) devido à hemólise diminuíram um pouco, mas significativamente, o tempo para formação da fibrina, e concentrações plasmáticas de hemoglobina acima de 8 g/dL promoveram um aumento no TT.

De acordo com D'Angelo et al (2015), o descarte de amostras hemolisadas deve ser avaliado, pois nem sempre causarão consequências clínicas aos pacientes. Apesar do TP ser afetado pela presença de hemólise quando realizado de forma automatizada, o estudo demonstrou que método manual não é afetado pela presença de tal interferente. Da mesma forma, o TTPa mostrou não ser afetado pela hemólise quando realizado manualmente. Para as determinações de fibrinogênio houve decréscimo de 40% em mostra hemolisada (4 g/dL) comparado com plasma controle, enquanto a determinação de D-dímero aumentou em 50% na avaliação de amostra hemolisada (≥ 8 g/dL).

A presença de hemólise, lipemia e icterícia como interferentes nos resultados de TP, TTPa e determinação de fibrinogênio foi verificada por diferentes metodologias em um estudo realizado por Woolley et al (2016). De acordo com os pesquisadores, não houve consequências na avaliação de TP e fibrinogênio, enquanto para o TTPa, algumas amostras hemolisadas demonstraram resultados significativamente diminuídos, com diminuição do tempo de formação da fibrina de 2,9% a 4%, dependendo do teste utilizado.

As dosagens de TTPa mostraram aumento de 8,6%, enquanto a determinação de D-dímero mostrou níveis diminuídos (65%) em amostras hemolisadas em um estudo multicêntrico realizado por Novelli et al (2018). O mesmo estudo, baseando-se em seus resultados, sugeriu que amostras hemolisadas ainda podem ser utilizadas para realizar o TP, apesar de leve aumento, sem afetar a qualidade do resultado. Montaruli et al (2020) demonstraram que a hemólise espontânea pode afetar os resultados de TTPa, fibrinogênio e D-dímero, mas parece não afetar o TP.

Os estudos que avaliam a interferência da hiperbilirrubinemia nos testes de coagulação mostram resultados diversos que variam de acordo com a metodologia, equipamento utilizado e grau de icterícia. Tempo de protrombina e tempo de trombina parecem ser mais afetados pela icterícia, enquanto o TTPa mostra não sofrer alteração. A dosagem de fibrinogênio é afetada quando em valores mais elevados de bilirrubina plasmática ($> 21,9$ mg/dL) (LIPPI, 2013; WOOLEY, 2016). Para Montaruli et al (2020), a hiperbilirrubinemia não afetou significativamente o ensaio de D-dímero nas condições testadas em ensaio imunoturbidimétrico.

Apesar de vários estudos terem sido realizados na tentativa de verificar a influência da presença de interferentes, grande parte deles avalia o impacto da hemólise nas análises, sendo poucos os que pesquisaram a influência de níveis elevados de bilirrubina, sem mencionar se a hiperbilirrubinemia seria total, direta ou indireta. Além disso, ainda não há dados conclusivos sobre os efeitos de concentrações elevadas de bilirrubina, compatíveis com hiperbilirrubinemia na análise de D-dímero.

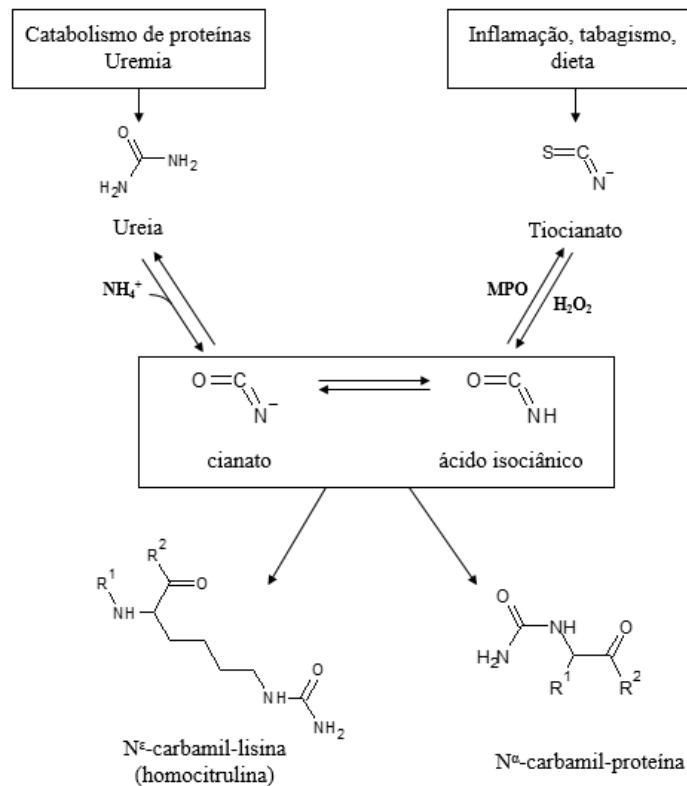
3.5 CARBAMILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A reação de carbamilação afeta proteínas, aminoácidos e peptídeos através da interação irreversível do cianato com grupos amino terminais de proteínas ou resíduos de lisina em cadeias polipeptídicas, gerando α -carbamil aminoácidos e ϵ -carbamil-lisina (homocitrulina) (BINDER, 2017; DELANGHE *et al*, 2017; JAISSON, 2011; JELKMANN, 2008; WANG et

al, 2007). Desta forma, a homocitrulina atua como um biomarcador da carbamilação no organismo (BINDER, 2017; DELANGHE *et al*, 2017). As proteínas carbamiladas possuem desestabilização nas suas estruturas secundária e terciária devido à neutralização da carga positiva do grupamento amino, que afeta as interações intramoleculares proteicas. A consequência observada relaciona-se a alterações de conformação, estabilidade, em funções enzimáticas e hormonais (LONG *et al*, 2018), além de disfunções em respostas celulares (BINDER, 2017; DELANGHE *et al*, 2017; JAISSON, 2011; JELKMANN, 2008; LONG *et al*, 2018; WANG *et al*, 2007).

O cianato, não reativo, é convertido rapidamente em ácido isociânico, que caracteriza-se como um eletrófilo reativo com afinidade por nucleófilos de cadeia peptídicas (LAU, 2016). No organismo, o cianato envolvido na reação é originado a partir da ureia ou é resultante da oxidação do tiocianato pela mieloperoxidase (Figura 3) de neutrófilos, monócitos e macrófagos presentes em processos inflamatórios e em placas ateroscleróticas (DELANGHE *et al*, 2017). A concentração fisiológica do ácido isociânico é de cerca de 0,05 mM e em pacientes com DRC avançada pode atingir 0,150 mM (BADAR *et al*, 2018; LAU, 2016). Dessa forma, pacientes com DRC com hiperuremia ou com condições inflamatórias são mais susceptíveis à carbamilação de proteínas (DELANGHE *et al*, 2017; JAISSON *et al*, 2011). Assim, a ocorrência de carbamilação em excesso pode predizer eventos clínicos em pacientes com doença renal (BINDER *et al*, 2017).

Figura 3 - Representação da reação não enzimática de carbamilação de um aminoácido primário ou um grupo sulfidríla livre de uma proteína, peptídeo ou aminoácido com ácido isocianico (cianato), resultando em ligação covalente irreversível



Fonte: adaptado de Delanghe et al, 2017.

A ureia pode atuar como agente de toxicidade direta em alguns tecidos, como o trato digestório, lesando o epitélio e alterando a microbiota; nos vasos, atingindo diretamente as células endoteliais e afetando a apoptose de células musculares lisas e também pode levar a resistência à insulina devido à disfunção causada em adipócitos. A carbamilação foi relatada como uma consequência indireta causada pela ureia (LAU, 2016).

Na doença renal crônica, a carbamilação relaciona-se com a fisiopatologia da doença, estando envolvida em características como fibrose renal, aterosclerose e anemia, por afetar diretamente a eritropoetina (LAU, 2016). Além disso, a reação de carbamilação acaba afetando proteínas com meia-vida mais longa, como o colágeno, estando ligado ao processo de envelhecimento ou à catarata ao atingir o cristalino (DELANGHE et al, 2017; LONG et al, 2018). A carbamilação já demonstrou estar envolvida na patogenia da doença arterial coronariana (WANG et al, 2007), insuficiência cardíaca, diabetes *mellitus* (DRESCHLER et al, 2015; JAISSON et al, 2011), eritropoiese ineficaz e doenças autoimunes (LONG et al, 2018). Alterações funcionais decorrentes da carbamilação na insulina, na eritropoetina, em atividades

enzimáticas, na lipoproteína de baixa densidade (LDL), no fibrinogênio (BINDER et al, 2017), dentre outras, já foram descritas (DELANGHE et al, 2017; JAISSON et al, 2011; WANG et al, 2007). A carbamilação de proteínas também foi sugerida como estando envolvida no processo de alterações estruturais e funcionais de tecidos relacionado ao envelhecimento (GORISSE et al, 2016).

A carbamilação do fibrinogênio já foi demonstrada em pacientes com doença renal. Os dados do estudo sugerem que a carbamilação esteja associada com uma formação anômala no coágulo de fibrina e possa estar envolvida com as desordens hemostáticas em doenças inflamatórias crônicas. O coágulo de fibrina mostrou-se com morfologia alterada, aumento de resistência à fibrinólise e uma menor resistência mecânica, com maior chance de desprendimento da parede vascular, podendo levar a embolia ou isquemia (BINDER et al, 2017; DELANGHE et al, 2017). Além disso, o fibrinogênio carbamilado liga-se menos aos receptores plaquetários, desestabilizando o tampão plaquetário, o que leva a uma maior tempo de sangramento (DELANGHE et al, 2017). O fibrinopeptídeo A, quando carbamilado, mostrou-se com maior característica quimioatrativa a neutrófilos, podendo aumentar a quantidade de células inflamatórias em locais com depósito de fibrina (BINDER et al, 2017).

Um estudo de Hilgartner (1975) avaliou alterações em proteínas da coagulação após incubação até sessenta minutos com concentrações crescentes de cianato de sódio (10, 50 e 100 mM), pois o composto estava sendo avaliado quanto à falcização da hemoglobina em pacientes com anemia falciforme. Seus resultados demonstraram aumento do tempo de formação da fibrina nos testes: tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial e tempo de trombina, conforme a concentração de cianato de sódio e o tempo de incubação plasmático foram maiores. Seus resultados foram provenientes de ensaios de TTPa com ativação por kaolin e TP utilizando tromboplastina a partir de cérebro de coelho. No estudo foi evidenciado decréscimo das atividades dos fatores da coagulação V, X, VII, IX, X e XI.

Ensaios que avaliam proteínas carbamiladas geralmente empregam metodologias como eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ou não à espectrometria de massas, e enzimaimunoensaio (ELISA) (BINDER et al, 2017; DELANGUE et al, 2017; DOLSCHEID-POMMERICH et al, 2015; LONG et al 2018).

Embora o estudo de Binder et al (2017) tenha avaliado o impacto da carbamilação do fibrinogênio na formação e estabilidade da fibrina, e o estudo de Hilgartner (1975) tenha verificado algumas alterações em proteínas da coagulação, ainda faltam relatos consistentes acerca da influência da carbamilação nos testes da coagulação atuais, utilizando kits com reagentes padronizados e equipamentos automatizados utilizados em laboratórios de análises

clínicas. Uma vez que indivíduos com doença renal crônica ou com condições inflamatórias prolongadas possuem maior probabilidade de sofrer reações de carbamilação e possíveis alterações na sua hemostasia, estudos que evidenciem e esclareçam tais processos devem ser realizados para melhor interpretação do resultados e manejo do paciente.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram separados em três partes: PARTE I - INTERFERÊNCIA DA ICTERÍCIA NOS NÍVEIS DE D-DÍMERO PLASMÁTICO ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOTURBIDIMÉTRICO, PARTE II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* INDUZIDA PELA INCUBAÇÃO DE CONTROLES COMERCIAIS COM CIANATO DE POTÁSSIO SOBRE OS PARÂMETROS LABORATORIAIS DA COAGULAÇÃO e PARTE III – RESULTADOS ADICIONAIS: CARBAMILAÇÃO DE D-DÍMERO

4.1 PARTE I – INTERFERÊNCIA DA ICTERÍCIA NOS NÍVEIS DE D-DÍMERO PLASMÁTICO ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOTURBIDIMÉTRICO

Os experimentos para a avaliação da interferência da icterícia na avaliação laboratorial de D-dímero através de metodologia imunoturbidimétrica geraram resultados que foram organizados num artigo no formato “*Letter to the editor*” que foi publicado no periódico Blood Coagulation & Fibrinolysis, volume 32, número 2, páginas 162-163 em 2021.

Letter to the Editor

Interference of icterus on plasma D-dimer levels measured using immunoturbidimetric assays

Aline K. Mastella^a, José A. M. de Carvalho^{a,b}, Carolina S. Stein^a, Guilherme V. Bochi^c, Rafael N. Moresco^a

^aLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bUniversity Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence: Rafael Noal Moresco, Ph.D., Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Predio 26, Sala 1401, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941, E-mail: rnmoresco@ufsm.br

To the Editor,

D-dimer is a soluble degradation product of cross-linked fibrin polymers [1]. Since D-dimer is an indicator of coagulation activation and fibrinolysis, it is an important marker for the diagnosis of deep venous thrombosis, pulmonary embolism, and disseminated intravascular coagulation [1-3]. Currently, D-dimer levels are related to the prognosis of coronavirus disease due to the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Worsening health status is accompanied by an increase in plasma D-dimer levels [4-8]. Evidence has revealed that errors in pre-analytical processes may contribute to 60% to 80% of laboratory errors [9]. Hemolysis, lipemia, and icterus are among the most common causes of interference. Thus, studies to investigate the impact of pre-analytical variables on D-dimer levels are of interest.

We have read with interest the article written by Montaruli et al. [10] recently published in *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. The authors assessed the influence of spurious hemolysis, icterus, and lipemia on different coagulation tests, including that for D-dimer. The investigators assayed D-dimer levels on a Cobas t 511 coagulation analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). D-dimer concentrations were found to be affected by hemolysis but not significantly affected by lipemia and icterus.

In the present study, we explored the influence of icterus on plasma D-dimer levels in other experimental conditions, as the presence of some endogenous interferences may alter the light transmission in the equipment used for analysis [11,12]. Initially, five pools of citrated plasma were obtained from healthy volunteers who underwent routine examinations at the Clinical Analysis Laboratory at the University Hospital of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. The study was approved by the local research ethics committee (number 11559119.4.0000.5346).

The in vitro experiments were conducted for each pool as follows: 200 μ L of plasma was incubated with 30 μ L of D-dimer standard (Liatest[®], Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France). The samples were then spiked with 50 μ L of bilirubin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain final concentrations of 0, 0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15, and 30 mg/dL. In the blank, 50 μ L of TRIS HCl (pH 8.4) was added [13]. To reach a final volume of 300 μ L, 20 μ L of saline was added. All samples were homogenized and immediately analyzed. For bilirubin concentrations of 0, 0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15, and 30 mg/dL, the final concentrations and standard deviations of D-dimer in the pools were 802 ng/mL (219.5), 788 ng/mL (170.8), 696 ng/mL (207.9), 736 ng/mL (139.1), 774 ng/mL (120.1), 672 ng/mL (167.7), and 718 ng/mL (105.7), respectively.

Plasma D-dimer concentrations were measured based on immunoturbidimetric assays performed using an STA Compact analyzer (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) according to the manufacturer's instructions. One-way analysis of variance for repeated measures followed by Dunnett's multiple comparisons test were performed to evaluate the influence of icterus on plasma D-dimer levels. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism[®] version 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). No significant changes were observed among the D-dimer concentrations in the pools containing bilirubin at final concentrations of 0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15, and 30 mg/dL, as shown in Figure 1. D-dimer concentrations were 1.8% to 16.2% lower than the baseline value. However, these differences were not statistically significant ($P = 0.185$). Thus, the results of the present study corroborate the findings of Montaruli et al. [10] and indicate that the presence of bilirubin in concentrations of up to 30 mg/dL do not significantly affect the determination of D-dimer levels using the immunoturbidimetric method through the Stago assay. Therefore, D-dimer may be used as a marker of fibrinolysis even in patients with liver disease without the risk of its results being influenced by the presence of high concentrations of bilirubin.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

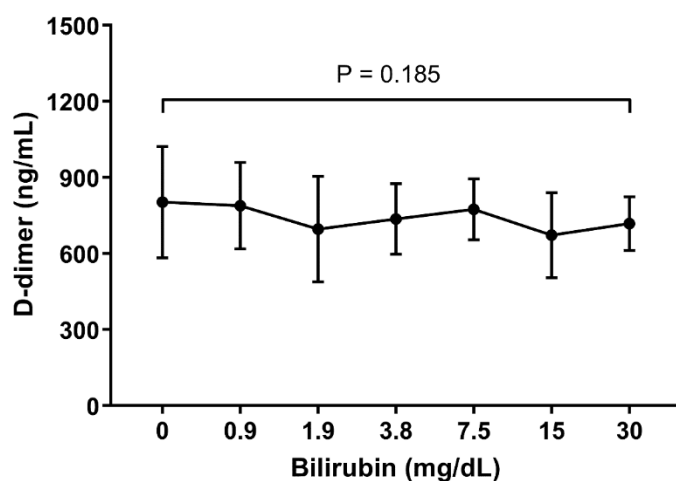
References

1. Weitz J, Fredenburg JC, Eikelboom JW. A test in the context: D-Dimer. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70:2411-2420.
2. Favresse J, Lippi G, Roy P-M, Chatelain B, Jacqmin H, Cate HT *et al.* D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018; 55:548-577.
3. Linkins L-A, Lapner S T. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *Int J Lab Hem* 2017; 39:98-103.
4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu L, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395:497-506.
5. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020; 58:1131-1134.

6. Tang N, Li, D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020; 18:844-847.
7. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis T N, Politou M, *et al.* Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* 2020; 95:1-14.
8. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, *et al.* D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost* 2020; 18:1324-1329.
9. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: Types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007; 53:1338-1342.
10. Montaruli B, Guiotto C, Cossedù D. Influence of hemolysis, icterus and lipemia on coagulation tests as performed on Cobas t511 new analyzer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2020; 31:48-54.
11. Linskens E A, Devreese K M J. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hem* 2018; 40:292-303.
12. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39:258-266.
13. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem.* 1986; 32:470-475.

Figure Caption

Figure 1. Effects of bilirubin at different concentrations of plasma D-dimer levels. Data are expressed as mean \pm SD. SD, standard deviation



4.2 PARTE II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* INDUZIDA PELA INCUBAÇÃO DE CONTROLES COMERCIAIS E *POOL* DE PLASMA COM CIANATO DE POTÁSSIO E UREIA SOBRE OS PARÂMETROS LABORATORIAIS DA COAGULAÇÃO.

Os experimentos para a avaliação do impacto da carbamilação *in vitro* induzida pela incubação de controles comerciais e *pool* de plasma com cianato de potássio e ureia geraram resultados que foram organizados num artigo no formato “*Letter to the editor*” que será submetido para publicação sob o título: *Potential effects of carbamylation on the prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen.*

Potential effects of carbamylation on the prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen

Aline Klein Mastella^a, José Antonio Mainardi de Carvalho^{a,b}, Karla Nunes Pereira^a, Yasmin Sudatti das Neves^a, Carolina dos Santos Stein^a, Guilherme Vargas Bochi^c, Rafael Noal Moresco^{a,b,*}

^aGraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^bDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding Author: Prof. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Phone: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Keywords

Protein Carbamylation

Prothrombin Time

Activated Partial Thromboplastin Time

Fibrinogen

Urea

1. Introduction

Carbamylation is an irreversible non-enzymatic post-translational modification that occurs especially from the reaction between isocyanic acid, which is formed from urea dissociation or thiocyanate oxidation by myeloperoxidase, and amino groups found in proteins and peptides [1,2]. Carbamylation can occur in the blood and kidneys, and is involved in some pathologies such as chronic kidney disease (CKD), cardiovascular disease, diabetes mellitus, and autoimmune diseases [1,3,4,5,6]. Patients with CKD and hyperuremia or with inflammatory conditions are more susceptible to protein carbamylation, and excess carbamylation may predict clinical events in these patients [1,2].

With regard to blood clotting, carbamylation of fibrinogen was evaluated in patients with CKD, and the study suggested that carbamylation is associated with abnormal formation of fibrin clots and may be involved in hemostatic disorders in chronic inflammatory diseases. The fibrin clot was shown to have altered morphology, increased resistance to fibrinolysis, and lower mechanical resistance, with a greater chance of detachment from the vascular wall, possibly leading to embolism or ischemia [1,7]. Furthermore, carbamylated fibrinogen binds less to platelet receptors, destabilizing the platelet buffer and leading to a longer bleeding time [1]. These findings allowed us to infer that carbamylation can affect different proteins involved in hemostasis, influencing the results of associated laboratory tests. Although there is evidence of the potential effect of carbamylation on clotting proteins, the data and information available are still incipient. Therefore, new studies should be developed to verify the influence of carbamylation on coagulation parameters. Hence, our study investigated the effects of carbamylation induced by potassium cyanate (KOCN), a well-established carbamylating agent used in *in vitro* models, and urea on prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), and fibrinogen measured in commercial controls and pooled normal human plasma.

2. Methods

The commercial controls STA Coag Control N and STA Coag Control P (Diagnostica Stago, Asnieres Sur Seine, France) and the plasma pool obtained from healthy subjects presenting normal coagulation parameters were used in this study. All tests were conducted in triplicates. *In vitro* carbamylation was induced by the use of potassium cyanate (KOCN) or urea (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). KOCN solutions were prepared in PBS (0.1 mol/L, pH 7.4) to obtain final concentrations of 150 nM, 150 μ M, and 150 mM [8]. The urea solutions were tested at concentrations of 20, 100, and 500 mg/dL to reproduce a wide range of values

associated with healthy and severe conditions. After adding these solutions to the commercial controls and to the pool of human plasma, the samples were incubated at 37°C for 6 h to promote *in vitro* carbamylation. Subsequently, the prothrombin PT, aPTT, and fibrinogen were determined using the STA Compact Max analyzer (Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France) using the STA-NeoPTimal, STA-PTT Automate 5, and STA-Liquid Fib assays (Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France), respectively. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 11559119.4.0000.5346). The influence of *in vitro* carbamylation on PT, aPTT, and fibrinogen was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism[®] software, version 6.00; Windows Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

The results of PT, aPTT, and fibrinogen obtained after *in vitro* carbamylation induced with KOCN in commercial controls and the human plasma pool are shown in Table 1. In commercial controls, incubation with KOCN significantly reduced PT activity, prolonged aPTT, and reduced fibrinogen concentration. The observed changes were more pronounced when incubations were performed with the highest concentration of KOCN. Under this condition, all results obtained on the automated analyzer were $< 15\%$ for PT, > 180 s for aTTP, and < 30 mg/dL for fibrinogen. The changes observed in plasma pools were less pronounced. PT activity was reduced after incubation with KOCN 150 μ M, while the highest concentration of KOCN produced in the human plasma pool showed the same changes observed for the commercial control. Additionally, commercial control and pooled human plasma samples were incubated with different concentrations of urea to investigate their potential influence on coagulation assays, as shown in Table 2. Interestingly, incubation with urea reduced PT activity and prolonged aPTT at all concentrations tested in the commercial control. For the plasma pool, these changes were observed only in incubations with the highest concentration of urea. Fibrinogen was not influenced by variations in urea concentration under the conditions tested.

4. Discussion

The induced carbamylation, especially with KOCN, promoted significant changes in the laboratory tests, that allowed us to infer that structural and functional changes may have occurred in the proteins involved in hemostasis. Carbamylation affects proteins, amino acids, and peptides through the irreversible non-enzymatic interaction of cyanate with protein terminal

amino groups or lysine residues in polypeptide chains, generating α -carbamyl amino acids and ϵ -carbamyl-lysine (homocitrulline) [1,3,4,7,9]. As a result, carbamylated proteins undergo destabilization in their secondary and tertiary structures, that affects protein intramolecular interactions. It has been shown that this post-translational modification may promote changes in conformation, stability, enzymatic and hormonal functions [6], and dysfunction in cellular responses [1,3,6,7,9]. Additionally, functional changes due to carbamylation in insulin, erythropoietin, enzyme activities, low-density lipoprotein (LDL)[10], and fibrinogen [7], among others, have been described [1,3]. For these reasons, we speculate that carbamylation may promote destabilization of the structure of proteins involved in hemostasis, including clotting factors, in order to promote significant changes in PT, aPTT, and fibrinogen.

This study indicated that high concentrations of cyanate, that can be found in patients with CKD, can affect the results of coagulation tests, such as PT, aPTT, and fibrinogen. The increase in urea also promoted alterations in coagulation tests, but these alterations were more discrete and occurred mainly when the urea concentration was very high, with values not observed in clinical practice. The observed changes may have occurred because of carbamylation in the coagulation proteins, which affects the function of these proteins and the interpretation of laboratory results. Thus, patients with CKD and other conditions associated with increased endogenous KOCN may show alterations in hemostasis as they are exposed to the carbamylation reaction. The results found in this in vitro study can be complemented by studies comparing healthy patients and patients with chronic kidney disease to evaluate possible differences in coagulation parameters between the groups. Analysis of carbamylated proteins or homocitrulline would aid in the detection of carbamylation involving coagulation proteins in those subjects.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

Rafael Noal Moresco is a recipient of research productivity scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, number 313379/2021-1).

References

- [1] S. Delanghe, J. R. Delanghe, R. Speeckaert, W. van Biesen, M. M. Speeckaert. Mechanisms and consequences of Carbamoylation, *Nat Rev Nephrol.* 9 (2017) 580-593. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.103>
- [2] L. Gorisse, S. Jaisson, C. Pietrement, P. Gillery. Carbamylated Proteins in Renal Disease: Aggravating Factors or Just Biomarkers? *Int J Mol Sci.* 574 (2022) 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms23010574>.
- [3] Z. Wang, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis, *Nat Med.* 2007 (10) 1176-1184. <https://doi.org/10.1038/nm1637>.
- [4] S. Jaisson, C. Pietrement, P. Gillery. Carbamylation-Derived Products: Bioactive Compounds and Potential Biomarkers in Chronic Renal Failure and Atherosclerosis. *Clin Chem.* 11 (2011) 1499–1505. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.163188>.
- [5] J.S. Claxton, P.C. Sandoval, G. Liu, C.L. Chou, J.D. Hoffert, M.A. Knepper, Endogenous carbamylation of renal medullary proteins, *PLoS One.* 8 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082655>.
- [6] J. Long, X. V. Parada, S. Kalim. Protein Carbamylation in Chronic Kidney Disease. *Adv Clin Chem.* 87(2018) 37-67, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.002>.
- [7] V. Binder, B. Bergum, S. Jaisson, P. Gillery, C. Scavenius, E. Spriet, A.K. Nyhaug, H. M. Roberts, I. L. C. Chapple, A. Hellvard, N. Delaleu, P. Mydel. Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. *Thromb Haemost.* 117 (2017) 899-910. <https://doi.org/10.1160/TH16-09-0704>.
- [8] M. B. Kok, F. P. W. Tegelaers, B. van Dam, J. L. M. L. van Rijn JLML. Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. *Clin Chim Acta* 434 (2014) 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.03.035>.
- [9] W. Jelkmann. 'O', erythropoietin carbamoylation versus *carbamylation*. *Nephrol Dial Transplant.* 9 (2008) 3033–3038. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn342>.
- [10] M. A. Ghaffari, M. Shanaki. In vitro inhibition of low density lipoprotein carbamylation by vitamins, as an ameliorationg atherosclerotic risk in uremic patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 70 (2010) 122-127. <https://doi.org/10.3109/00365511003624137>.

Table 1. PT, aPTT, and fibrinogen values after the carbamylation induced with potassium cyanate.

	PBS	KOCN 150 nM	KOCN 150 μM	KOCN 150 mM
STA Coag Control N				
PT (%)	68.7 \pm 0.6	67.3 \pm 0.6*	67.3 \pm 0.6*	< 15***
aPTT (sec)	39.7 \pm 0.2	40.3 \pm 0.3*	40.5 \pm 0.2**	> 180***
Fibrinogen (mg/dL)	222 \pm 7	215 \pm 12	221 \pm 11	< 30***
Plasma Pool				
PT (%)	93.3 \pm 1.2	92.7 \pm 3.8	87.7 \pm 0.6*	< 15***
aPTT (sec)	38.8 \pm 0.1	38.8 \pm 0.3	38.3 \pm 0.5	> 180***
Fibrinogen (mg/dL)	406 \pm 17	397 \pm 6	406 \pm 21	< 30***

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). PBS, Phosphate-buffered saline; PT, Prothrombin time; aPPT, activated partial thromboplastin time. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 compared to PBS group.

Table 2. PT, aPTT, and fibrinogen values after the carbamylation induced with urea.

	PBS	Urea 20 mg/dL	Urea 100 mg/dL	Urea 500 mg/dL
STA Coag Control P				
PT (%)	32.7 \pm 0.6	32.3 \pm 0.6*	32.0 \pm 0.0*	30.3 \pm 0.6**
aPTT (sec)	74.9 \pm 1.3	75.8 \pm 2.0*	78.2 \pm 2.7**	81.7 \pm 1.0**
Fibrinogen (mg/dL)	110 \pm 1	108 \pm 2	110 \pm 2	103 \pm 5
Plasma Pool				
PT (%)	93.3 \pm 1.1	92.3 \pm 2.1	94.0 \pm 1.0	88.7 \pm 0.6*
aPTT (sec)	38.8 \pm 0.1	38.8 \pm 0.4	38.5 \pm 0.3	40.4 \pm 0.5**
Fibrinogen (mg/dL)	406 \pm 17	410 \pm 11	390 \pm 16	377 \pm 10

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). PBS, Phosphate-buffered saline; PT, Prothrombin time; aPPT, activated partial thromboplastin time. *P < 0.05, and **P < 0.01 compared to PBS group.

4.3 PARTE III – RESULTADOS ADICIONAIS: CARBAMILAÇÃO DE D-DÍMERO

4.3.1 Metodologia

4.3.1.1 Modelo Experimental da Carbamilação *in Vitro*

Os ensaios *in vitro* de carbamilação foram baseados no modelo proposto por Binder et al (2017) e utilizaram controle comercial STA-Coag Control (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, França) e controle comercial de D-dímero (Liatest, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, França) que foram expostos à solução de cianato de potássio (KOCN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino PBS 0,1 M pH 7,4 em diferentes concentrações: 0 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM. As amostras foram incubadas a 37°C por 6 horas e os parâmetros da coagulação foram imediatamente analisados.

4.3.1.2 Efeitos da Carbamilação Sobre D-Dímero

Para avaliar o efeito da carbamilação sobre a análise de D-dímero, foi utilizado controle comercial de D-dímero (Liatest, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, França). Após a reconstituição do controle conforme indicação do fabricante, foi feita a incubação com solução de KOCN em tampão fosfato salino (PBS) (0,1M, pH 7,4) em diferentes concentrações com o objetivo de atingir concentrações finais de 0 mM, 25mM, 50 mM e 100 mM, sendo cada concentração preparada em triplicata. As amostras foram incubadas em estufa a 37° por 6 horas e as análises foram realizadas em equipamento STA-Compact (Diagnostica Stago, Asnière sur Seine, França) utilizando o kit STA- Liatest D-Di Plus (Diagnostica Stago, Asnière sur Seine, França) pelo método imunoturbidimétrico. Todas as análises laboratoriais foram conduzidas de acordo com as especificações do fabricante e seguindo métodos padrões. Os resultados das amostras expostas ao cianato de potássio foram comparadas com amostras não expostas.

4.3.1.3 Análise Estatística

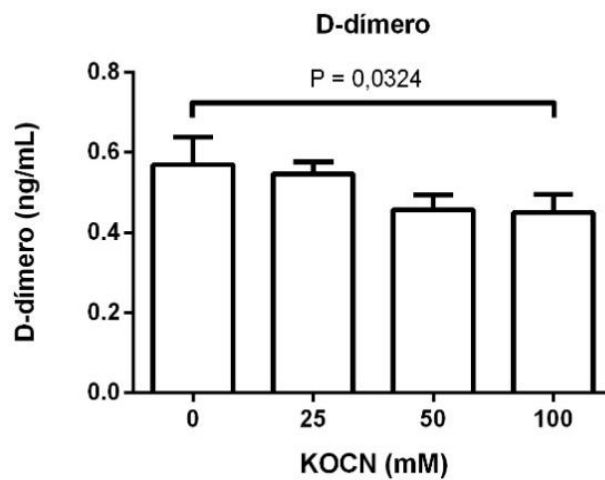
Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou porcentagens. A influência da exposição ao cianato *in vitro* nos testes de coagulação foram analisados por ANOVA de uma via, seguido por teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente

significativos. Os dados foram analisados usando GraphPadPrism[®] versão 6.00 para Windows (Software GraphPad, San Diego, CA).

4.3.2 Resultados

Na análise de D-dímero os resultados encontrados após incubação com KOCN nas concentrações de 25, 50 e 100 mM foram 96%, 81% e 79% do valor encontrado na amostra não exposta ao KOCN (Figura 4). Os valores médios (desvio-padrão) foram, respectivamente, 0,57 ng/mL (0,07), 0,55 ng/mL (0,03), 0,46 ng/mL (0,04) e 0,45 ng/mL (0,05) e sendo o valor de $P < 0,05$ ($P = 0,0324$) na análise estatística, os resultados são considerados significativamente diferentes entre si, mostrando uma tendência de queda na quantificação do analito conforme a concentração de KOCN aumenta.

Figura 4 - Resultados obtidos na avaliação de D-dímero após incubação com KOCN nas concentrações de 0, 25, 50 e 100 mM.



Fonte: autoria própria

5 DISCUSSÃO

Dada a importância da avaliação de parâmetros da coagulação para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes, a segurança e confiabilidade de resultados fornecidos por laboratórios clínicos é imprescindível. Para tanto, a investigação de fatores interferentes em tais exames é essencial (CAKIRCA, 2018; LIPPI, 2019).

O presente trabalho avaliou a interferência de concentrações elevadas de bilirrubina indireta na dosagem de D-dímero, verificando que concentrações de bilirrubina indireta até 30 mg/dL não afetariam a dosagem do analito, sendo confiável sua análise em pacientes com alteração hepática com icterícia ou outras condições que levem à icterícia pela elevação da bilirrubina indireta.

Outra característica possível de causar alteração em exames que avaliam a hemostasia é a reação da carbamilação. A modificação ocorre pela presença do cianato, proveniente do metabolismo da ureia e de processos inflamatórios, afetando biomoléculas como proteínas, que alteram sua estrutura e sua função, levando a processos patológicos (BINDER, 2017; DELANGHE *et al*, 2017).

Os controles da coagulação expostos ao cianato de potássio e à ureia causaram diminuição da atividade do TP e prolongamento do TTPa conforme a concentração do cianato aumentou. A determinação de fibrinogênio foi diminuída de forma significativa apenas na concentração de 150 mM de KOCN. Ao utilizar *pool* de plasma como amostra, a atividade do TP foi diminuída nas duas concentrações mais elevadas de cianato, enquanto TTPa e fibrinogênio sofreram alteração apenas na concentração mais elevada do agente carbamilante.

A incubação dos controles da coagulação com ureia não afetou a avaliação do fibrinogênio, mas promoveu alteração das análises de TP e TTPa de forma significativa. As amostras de plasma mostraram alteração apenas na concentração mais elevada de ureia, pouco compatível com o encontrado nos pacientes.

As alterações observadas no estudo são compatíveis com a alteração das proteínas envolvidas na coagulação promovidas pela carbamilação, pois a desestabilização das estruturas secundárias e terciárias proteicas afeta sua função biológica (LONG *et al*, 2018).

A exposição de controles de coagulação ao cianato de potássio em quatro concentrações (0, 25, 50 e 100 mM) foi realizada a fim de avaliar as consequências na avaliação do D-dímero. A análise da exposição do D-dímero às crescentes concentrações de cianato mostrou valores de concentração pouco, mas significativamente, decrescentes.

O D-dímero, um produto de degradação da fibrina, foi avaliado por método imunoturbidimétrico, utilizando anticorpos contra D-dímero. Os resultados que mostraram uma diminuição na quantificação de D-dímero conforme a concentração de KOCN aumentou podem evidenciar que os D-dímero formados sofreram alterações moleculares de tal forma que a ligação com os anticorpos reagentes não tenha ocorrido na mesma extensão. A possibilidade da carbamilação do D-dímero *in vivo* pode fornecer resultados falsamente diminuídos naqueles pacientes em que se deseja avaliar a fibrinólise (FAVRESSE et al, 2018; LINKINS, 2017; STANG, 2013).

Os resultados demonstram que a exposição de proteínas envolvidas na coagulação ao cianato prejudicam a formação da fibrina, com maior tempo para a formação do coágulo. Além disso, a análise de D-dímero pode falsamente informar um valor menor pelo método imunoturbidimétrico, gerando interpretação incorreta sobre a situação clínica do paciente.

O conhecimento das alterações que são possíveis de serem observadas nos parâmetros da coagulação devido à reação de carbamilação é importante para a avaliação de pacientes com doença renal crônica ou condições inflamatórias que os predispõem à maior chance de exposição ao cianato proveniente do metabolismo de ureia ou tiocianato, uma vez que suas proteínas, incluindo as da coagulação, tem maior chance de serem afetadas. Essas alterações podem interferir no processo hemostático natural e/ou na interpretação dos resultados laboratoriais, levando a consequências clínicas e relacionadas ao tratamento.

Uma vez que os parâmetros laboratoriais da hemostasia são utilizados para avaliação de coagulopatias e trombozes e as proteínas da coagulação pode sofrer alterações pela presença de cianato, é possível sugerir que pacientes com maior probabilidade de sofrerem reações de carbamilação, como aqueles com doença renal crônica ou processos inflamatórios crônicos possam apresentar alterações nos resultados laboratoriais de parâmetros da coagulação, seja por diminuição da função de proteínas envolvidas na coagulação ou alterações moleculares que impedem a determinação correta, como no caso do D-dímero. Assim, seus resultados de TP, TTPa, fibrinogênio e D-dímero devem ser avaliados com mais cautela, pois podem vir a desenvolver consequências clínicas ou ter interpretações incorretas que levam a tratamentos inadequados devido às alterações observadas no presente estudo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a determinação de D-dímero não é afetada pela hiperbilirrubinemia quando concentrações de bilirrubina estão até 30 mg/dL. Desta forma, pacientes com doença hepática podem ter sua fibrinólise monitorada através do D-dímero.

O cianato de potássio, um agente carbamilante, ao ser incubado com plasma controle diminuiu a determinação de fibrinogênio na concentração de 150 mM e diminuiu a atividade do TP e prolongou o TTPa em todas as concentrações testadas. A incubação de KOCN com *pool* de plasma mostrou as mesmas alterações na concentração mais elevada do agente carbamilante para PT, TTPa e fibrinogênio. Além disso, a atividade do TP também diminuiu a concentração de 150 μ M.

A incubação do controle da coagulação com ureia em concentrações crescentes (20, 100 e 500 mg/dL) diminuiu a atividade do TP e prolongou o TTPa, enquanto a análise de fibrinogênio não foi afetada. A incubação da ureia com o *pool* de plasma afetou apenas o TP e TTPa na concentração mais elevada de ureia, sem ter afetado a determinação de fibrinogênio.

O controle comercial de D-dímero, após incubação com KOCN em concentrações de KOCN até 100 mM, apresentou alteração significativa ao ser comparado com amostra não exposta ao cianato.

Assim, pacientes com possibilidade de sofrerem carbamilação de proteínas da coagulação por DRC ou doenças inflamatórias devem ser avaliados quanto à possibilidade de sofrerem eventos hemostáticos e ter uma correta interpretação do TP, TTPa e fibrinogênio. Já a avaliação da fibrinólise através do D-dímero é confiável em casos de hiperbilirrubinemia; porém, apresenta potencial de ser influenciada em situações onde a carbamilação possa estar presente.

REFERÊNCIAS

- ARIËNS, R. A. S. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, s. 1, pp. 294-305, 2013.
- BADAR, A.; ARIF, Z.; ALAM, K. Role of Carbamylated Biomolecules in Human Diseases. **IUBM Life**, v. 70, n. 4. Pp. 267-275, 2018.
- BINDER, V. et al. Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, pp. 899-910, 2017.
- CAKIRCA, G. The Evaluation of Error Types and Turnaround Time of Preanalytical Phase in Biochemistry and Hematology Laboratories. **Iranian Journal of Pathology**, v. 13, n. 2, pp. 173-178, 2018.
- CARRARO P, PLEBANI M. Errors in a stat laboratory: Types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, n. 53, pp. 1338-1342, 2007.
- CHIASAKUL, T. et al. Inherited Thrombophilia and the Risk of Arterial Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, pp. 1-12, 2019.
- CLAXTON, J. S.; SANDOVAL, P. C.; LIU, G. et al. Endogenous carbamylation of renal medullary proteins. **PLoS One**, v. 8, pp. 1-9, 2013.
- CROLES, F. N. et al. Risk of Venous Thrombosis in Antithrombin Deficiency: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 44, n. 04, pp. 315–326, 2018.
- D'ANGELO, G. et al. Evaluation of the main tests in the presence os hemolysis in healthy subjects and patients on oral anticoagulante therapy. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, pp. 819-833, 2015.
- DELANGHE, S. et al. Mechanisms and consequences of Carbamoylation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 9, pp. 580-593, 2017.
- DENG, H-Y. et al. High pretreatment D-dimer level is an independent unfavorable prognostic fator of small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 100, n. 15, pp. 1-7, 2021.
- DIMESKI, G. Inteference Testing. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 29, sup. I, 2008.
- DOLSCHEID-POMMERICH, R. C. et al. Impact of carbamylation on three different methods, HPLC, capillary electrophoresis and TINIA of measuring HbA1c levels in patients with kidney disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 108, n. 1, pp. 15-22, 2015.
- DRECHSLER, C. et al. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end stage renal disease. **Kidney International**, v. 87, n. 6, pp. 1201-1208, 2015.

FAVALORO, E. J. et al. Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. **Labmedicine**, v. 43, n. 2, pp 1-10, 2012.

FAVRESSE, J.; LIPPI, G.; ROY, P-M. et al. D-dimer: Preanalytical, postanalytical variables, and clinical applications. **Clinical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, n. 8, pp. 548-577, 2018.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata da coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, pp. 416-421, 2010.

FRANCHINI, M. et al. Acquired FXIII inhibitors: a systematic review. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 36, pp. 109- 114, 2013.

GHAFFARI, M. A.; SHANAKI, M. In vitro inhibition of low density lipoprotein carbamylation by vitamins, as na ameliorating atherosclerotic risk in uremic patients. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 70, pp. 122-127, 2010.

GLICK, M. R.; RYDER, K. W.; JACKSON, S. A. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 3, pp. 470-475, 1986.

GORISSE, I. et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 5, pp. 1191-1196, 2016.

GUDER, W. G. History of the preanalytical phase: a personal review. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, pp. 25-30, 2013.

HAYWARD, C. P. M. et al. Laboratory Investigations for Bleeding Disorders. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 38, n.7, pp 742-752, 2012.

HERNANINGSIH, Y.; AKUALING, J. S. The effects of hemolysis on plasma prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests using photo-optical method. **Medicine**, v. 96, n. 38, pp. e7976-e7980, 2017.

HILGARTNER, M. W.; MILLER, D. R. The Effect of Cyanate on the Clotting Proteins and Platelet Function. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 149, n. 1, pp 5-9, 1975.

HISADA, Y.; MACKMAN, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. **Blood**, v. 130, n. 13, pp. 1499-1506, 2017.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em Hematologia**. 5ed, Porto Alegre:Artmed, 2008.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavires in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, pp. 497-506, 2020.

JAISSON, S.; PIETREMENT, C.; GILLERY, P. Carbamylation-Derived Products: Bioactive Compounds and Potential Biomarkers in Chronic Renal Failure and Atherosclerosis. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 11, pp. 1499–1505, 2011.

- JELKMANN, W. 'O', erythropoietin carbamoylation versus carbamylation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 9, pp. 3033–3038, 2008.
- KAFEZA, M. et al. A systematic review of clinical prediction scores for deep vein thrombosis. **Phlebology: The Journal of Venous Disease**, v. 32, n. 8, pp. 516–531, 2016.
- KALOT, M. A. Von Willebrand factor levels in the diagnosis of von Willebrand disease: a systematic review and meta-analysis. **Blood Advances**, v. 6, n. 1, pp. 62–71, 2022.
- KOK, M. B. et al. Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. **Clinica Chimica Acta**, v. 434, pp. 6-10, 2016.
- KONKLE, B. A. Defining von Willebrand disease. **Blood**, v. 127, n. 20, pp. 2373-2374, 2016.
- LAU, W. L.; VAZIRI, D. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. **Clinical Science**, v. 131, pp. 3-12, 2016.
- LI, W. et al. Prognostic Role of Pretreatment Plasma D-Dimer in Patients with Solid Tumors: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, pp. 1663-1676, 2018.
- LIN, Y. et al. Clinical significance of plasma D-dimer and fibrinogen in digestive cancer: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 44, pp. 1494-1503, 2018.
- LINKINS, L. –A.; LAPNER, S. T. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 39, s.1, pp. 98–103, 2017.
- LINSKENS, E. A.; DEVREESE, K. M. J. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. **International Journal of Laboratory Hematology** v. 40, n. 3, pp. 292-303, 2018.
- LIPPI, G. et al. Interference of Blood Cell Lysis on Routine Coagulation Testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 130, pp. 181-184, 2006.
- LIPPI, G.; PLEBANI, M.; FAVALORO, E. J. Interference in Coagulation Testing: Focus on Spurious Hemolysis, Icterus, and Lipemia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 39, n.3, pp. 258-266, 2013.
- LIPPI, G. et al. Preanalytical challenges. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 57, n. 7, pp. 974-981, 2019.
- LIPPI, G.; PLEBANI, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 7, pp. 1131–1134, 2020.
- LONG, J.; PARADA, X. V.; KALIM, S. Protein Carbamylation in Chronic Kidney Disease. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 87, pp. 37-67, 2018.

- MA. M. et al. The D-dimer level predicts the prognosis in patients with lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 16, n. 243, pp. 1-11, 2021.
- MACKIE, I. M. et al. Guidelines on fibrinogen assays. **British Journal of Haematology**, v. 121, n. 3, pp. 396-404, 2003.
- MIOVSKI, M. B. Advances in monitoring anticoagulant therapy. In: Makowski, G. S (Editor). **Advances in Clinical Chemistry**, v. 90, Elsevier, 2019, cap 5, pp. 197-213.
- MONTARULI, B.; GUITTO, C; COSSEDDU, D. Influence of Hemolysis, icterus and lipemia on coagulation testes as performed in Cobas t511 new analuzer. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 31, pp. 48-54, 2020.
- NAIR, A. B.; PARKER, R. I. Hemostatic Testing in Critically Ill Infants and Children. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, pp. 921-938, 2021
- NOVELLI, C. et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation testes by evaluation os 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples, **Biochemia Medica**, v. 28, n.3, pp. 1-10, 2018.
- PALUMBO, J. S. et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. **Blood**, v. 96, n.10. pp. 3302-3309, 2000.
- RAO, L. V. et al. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under diferente storage conditions. **Clinica Chimica Acta**, v. 300, pp. 13-21, 2000.
- RATTO, N. et al. Patient Modelling of Blood Coagulation. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 83, n. 50, 2021.
- REZENDE, S. M. Distúrbios da Hemostasia: doenças hemorrágicas. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 20, n. 4, pp.534-553, 2010.
- SAGAN, C. **O Mundo Assombrado pelos Demônios**. São Paulo: Schwarcz, 1996.
- SAHLI, S. D. et al. Point-of-Care Diagnostics in Coagulation Management. **Sensors**, v. 20, n. 15, pp 4254-4275, 2021.
- SAIBABA K. S. S. et al. Interferences in clinical chemistry analysis, **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.13, n. 2, pp. 55-62, 1998.
- SILVA, A. S.; BRAZÃO, M. L.; GRANITO, S. et al. Distúrbios pró-trombóticos/Trombofilias. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, v. 17, n. 1, pp. 49-64, 2010.
- SILVA, P. H. et al. **Hematologia Laboratorial: teoria e procedimentos**. Porto Alegre:Artmed, 2016.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 12, n. 1, pp. 3-10, 2009.

STANG, L. J. D-Dimer and Fibrinogen/Fibrin Degradation Products. **Methods in Molecular Biology**, v. 992, pp. 414-427. Totowa:Humana Press, 2013.

TANG, N.; LI, D.; WANG, X.; SUN, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.18, pp. 844-847, 2020.

TERPOS, E. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 7, pp. 834-847, 2020.

WEITZ, J. I.; FREDENBURGH, J. C.; EIKELBOOM, J. W. A Test in Contest: D-Dimer. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, pp. 2411-2420, 2017.

WENDELBOE, A. M.; RASKOB, G. E. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. **Circulation research**, v. 118, n. 9, pp. 1340–1347, 2016.

WANG, Z. et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, pp. 1176-1184, 2007.

WOOLLEY A, GOLMARD JL, KITCHEN S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 4, pp. 375-88, 2016

ZHANG, L. et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, pp.1324-1329, 2020

ZHAO, Y. et al. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and XI activity. **Scientific Reports**, v.7, n. 1, pp. 12179-12187, 2017

ZHAO, Y.; FENG, G.; FENG, L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 23, pp 456-464, 2018.