

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA  
CNPq/INSTITUTO BUTANTAN – PIBIC**

**Nome da Instituição:** INSTITUTO BUTANTAN

**Título do Trabalho:** “Pesquisa sobre o gene, mRNA e proteína correspondentes ao fator XII no organismo de aves”

**Nome do Bolsista:** Flávia Garcia Borges

**Data de ingresso como bolsista do CNPq:** Julho de 2010

**Nome do orientador:** Dr. Benedito Carlos Prezoto

**Título do projeto de pesquisa do orientador ao qual está vinculado:** “Comparação do efeito procoagulante do ácido ribo-nucleico (RNA) extra-celular sobre os fatores de contato da coagulação sanguínea em mamíferos e aves” *Processo FAPESP n<sup>o</sup> 2009/54620-4*

**Nome do curso:** Ciências Biológicas

**Período que está cursando:** 8<sup>o</sup> semestre noturno

**É bolsista de renovação:** Sim

## 1. Introdução

Descoberto na década de 50, (Ratnoff and Colopy, 1955), o fator XII (FXII, ou fator de Hageman) experimentou um relativo esquecimento por pelo menos 40 anos. Pacientes (ou algumas espécies animais) com deficiência genética neste fator, apesar de apresentarem valores de alguns ensaios clássicos de coagulação anormalmente prolongados, não apresentam sintomas hemorrágicos significativos. Assim sendo, o FXII tem sido considerado dispensável à hemostasia (Kitchens, 2002). Um novo modelo para a explicação do mecanismo fisiológico de formação da fibrina *in vivo* foi então apresentado a partir dos anos 90, propondo como essencial apenas a via extrínseca (Davie *et al*, 1991; Nemerson, 1992; Gailani, 2000; Dahlback, 2000), restando à via intrínseca o papel de amplificação (ou propagação do processo de formação do coágulo) (Gailani and Broze Jr, 1991). Uma das justificativas para a aceitação deste modelo é que seus princípios se aplicam a todas as classes de vertebrados. O FXII, porém, voltou recentemente a ser objeto de amplo interesse e está no centro de importante polêmica, pois está envolvido na patogenia de trombos patológicos experimentais (Gailani and Renné, 2007; Stavrou and Schmaier, 2010). Parece ser um paradoxo que esta substância, peça central na ativação de vários sistemas enzimáticos importantes tais como os da coagulação sanguínea, da fibrinólise, caliceína-cininas e de complemento (Bhoola *et al*, 1992) possa ser dispensável à hemostasia. Neste sentido, muito esforço tem sido direcionado para o esclarecimento das seguintes questões: [1] qual é (ou quais são) o(s) ativador(es) fisiológico(s) (e qual o mecanismo de sua ativação *in vivo*)? (Colman, 2006; Colman and Schmaier, 1997). e [2] qual é a real participação do FXII na ativação da PCP e do FXI (segundo a teoria da cascata da coagulação, seus mais óbvios substratos), uma vez que existem estudos confirmando a ativação dos mesmos por mecanismos independentes? (Gailani and Broze Jr, 1991; Oliver *et al*, 1999; Baird and Walsh, 2002; Schmaier and McCrae, 2007; Schmaier, 2008). Inúmeros candidatos a ativadores endógenos do FXII têm sido propostos nos últimos anos, tais como as células epiteliais (Schmaier and McCrae, 2007), o colágeno (Gailani and Renné, 2007), o ácido ribonucléico (RNA) (Kannemeier *et al*, 2007) e endotoxinas bacterianas (Preissner, 2007), mas a real participação de cada um deles na ativação da via intrínseca da coagulação sanguínea ainda não está comprovada.

Há aproximadamente cinco décadas, estudos propondo uma conexão entre a superfície plaquetária de mamíferos e a ativação do FXII foi proposta por Caen and Haas (1960) e posteriormente por Walsh e cols. Este último detectou o aparecimento de uma atividade denominada “atividade formadora de produto de contato”, na qual a formação de FXII ativado ocorria sobre a superfície plaquetária na ausência de cálcio e estimulada por “concentrações fisiológicas” da substância pró-agregante adenosina difosfato (Walsh, 1972; Walsh and Griffin, 1981; Walsh, 2006). Só recentemente, porém, surgiram estudos que podem ajudar no esclarecimento do mecanismo desta ativação.

Estudos recentes apontam o polifosfato (poliF) plaquetário como o candidato mais provável ao papel de ativador fisiológico do FXII em mamíferos. Os poliF têm sido considerados um componente estrutural em procariotos e pequenos eucariotos, onde desempenham papel fisiológico em reações metabólicas e em algumas respostas ao stress (Ruiz *et al*, 2004). Moléculas de poliF estão também armazenadas dentro dos grânulos densos de plaquetas que, uma vez ativadas, as liberam no plasma circunjacente, ativando em consequência a via intrínseca da coagulação e influenciando positivamente a estabilidade da rede de fibrina (Smith *et al*, 2006; Muller *et al*, 2009; van der Meijden and Heemskerk, 2010; Müller and Renné, 2011). Os poliF seriam a conexão entre as hemostasias primária (plug plaquetário) e secundária (tampão hemostático), sendo capazes de desencadear tanto a formação de fibrina quanto a liberação do mediador inflamatório bradicinina (via caliceína plasmática), ambos através de um processo FXII-dependente (Smith *et al*, 2006; Muller *et al*, 2009; Müller and Renné, 2011). Os processos trombóticos representam a causa subjacente presente em variadas patologias potencialmente fatais que acometem vasos arteriais, tais como o infarto do miocárdio, obstrução de artérias dos membros inferiores ou acidentes vasculares cerebrais isquêmicos. As plaquetas e o FXII desempenham um papel crucial na patogenia de trombos intravasculares. Achados recentes indicam que camundongos geneticamente deficientes em FXII estão protegidos contra a formação de trombos ricos em plaquetas em vários modelos de trombose arterial experimental (Kerbiriou-Nabias, 2010). A patogenia deste processo não foi ainda precisamente compreendida, mas muitas evidências sugerem que alguns processos trombóticos sejam mediados tanto por poliF liberados por plaquetas ativadas quanto pelo FXII, uma vez que a eliminação destas duas variáveis protegeu camundongos de embolia pulmonar letal poliF-dependente (Muller *et al*, 2009). Uma vez que pode ser responsável pela patogenia de

processos trombóticos e que parece ser dispensável para a “hemostasia normal”, a inibição farmacológica do FXII e dos poliF tem sido sugerida por renomados grupos de pesquisadores como uma estratégia terapêutica promissora na abordagem dos processos trombóticos (Gailani and Renné, 2007; Schousboe, 2008; Muller *et al*, 2009; Vine, 2009, Müller *et al*, 2011). Neste contexto, esclarecer se o FXII desempenha papel fisiológico torna-se uma necessidade crucial, pois se este fator for importante para a hemostasia em seres humanos, certamente esta estratégia terapêutica levará a efeitos colaterais nocivos. Inúmeros trabalhos têm mostrado que o plasma das mais diversas espécies de aves, ao contrário do de mamíferos, coagula muito vagarosamente quando exposto a substâncias negativamente carregadas tais como o kaolin, e este comportamento tem sido atribuído à ausência do FXII (Seki *et al*, 1973; Spurling, 1981; Didisheim *et al*, 1959; Stopforth, 1970; Doerr and Hamilton, 1981; Frost *et al*, 1999; Thomson *et al*, 2002; Weir-M *et al*, 2004). Um estudo recente mostrou que o gene evolucionariamente correspondente ao FXII está completamente ausente no genoma de aves (Ponczek *et al*, 2008). Por outro lado, já foi detectada, no plasma desta espécie animal, a presença do CAPM (Kimura, 1987) e da PCP (Schleuning, 1983). O tempo de coagulação de amostras de sangue total (ST) (mas não do plasma) em galinhas foi significativamente encurtado após contato com ativadores de superfície negativamente carregados, tais como kaolin ou vidro (Doerr and Hamilton, 1981), ou após adição de trombócitos “lavados” (Venkatayan and Nambiar, 1968). Estes achados sugerem a existência de “resquícios” de uma via intrínseca, mas o mecanismo de ativação envolvido permanece desconhecido. A aposta, portanto, em uma completa independência da via intrínseca da coagulação de aves do FXII seria, no momento, precipitada. Recentemente, nosso grupo demonstrou que, a despeito das ausências de dois componentes-chave (o FXII e o CAPM), uma das atividades primordiais desempenhadas pelo sistema calicreína-cininas em mamíferos (cardio- proteção) está preservada no organismo da galinha doméstica *White leghorn* (Prezoto *et al*, 2009). Portanto, temos em mãos uma espécie animal que apresenta uma hemostasia normal e que pode ser considerado um modelo natural da doença denominada “deficiência de Hageman”.

## 2. Objetivos

A utilização deste modelo animal poderá nos ajudar a avaliar um sistema

eficiente na produção de fibrina, na ausência do FXII plasmático. Seria possível, portanto, nesta abordagem, a detecção (se existente) de mecanismos fisiológicos alternativos de ativação da via intrínseca da coagulação em vertebrados. Para esta tarefa, propomos então duas estratégias para confirmação de uma total independência da via intrínseca da coagulação em relação ao FXII, no organismo da galinha *White leghorn*: suas possíveis detecções: (a) funcional e (b) estrutural. A detecção funcional deste fator pode ser tentada através de ensaios de tromboelastometria em amostras citratadas de sangue total (ST) ou de plasma rico em trombócitos (PRT) e a estrutural, através de técnicas de biologia molecular, tais como a extração do ácido desoxiribonucléico (DNA) e análise em gel de agarose, seguido por amplificação das sequências de pares de base de interesse por polimerase chain reaction (PCR) e seqüenciamento.

*Observação: Os ensaios em Biologia Molecular para detecção estrutural do FXII em tecidos da galinha White leghorn estão detalhados no relatório 1 (Período: Agosto de 2010 a Janeiro de 2011, PIBIC, Anexo).*

No presente trabalho, os ensaios foram realizados através da tromboelastometria (TEM) rotacional (ROTEM®) (Zuckerman *et al*, 1981). Do perfil proporcionado pela TEM, analisamos o parâmetro Tempo de Coagulação (TC, em segundos), que determina a velocidade da formação da fibrina, que monitora a iniciação do processo da coagulação sanguínea, refletindo por consequência as atividades relativas aos fatores de contato.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **Animais**

Galinhas adultas *White leghorn* pesando entre 1 e 2 kg foram adquiridas de fonte comercial. Todas as aves (com idades entre 15 e 20 semanas) foram acomodadas em salas apropriadas a 22°C. Ratos machos *Wistar*, pesando entre 280 e 320 g, foram obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Eram submetidos a ciclo claro/escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração comercial. Todos os procedimentos envolvendo animais experimentais foram aprovados por um Comitê Institucional de Ética para o uso de animais.

#### **Métodos**

##### **Processamento das amostras**

**Obtenção de amostras de sangue total (ST), plasma rico (PRP) e pobre em plaquetas de ratos.** Ratos foram anestesiados com Urethane (1.300 mg/kg; ip). Amostras de sangue (3,6 mL) foram coletadas das artérias carótidas esquerda e direita em seringas contendo citrato de sódio (3.2%, w/v; 0,4 mL). Plasma rico (PRP) e pobre em plaquetas foram obtidos após centrifugação a 200 g (1000 rpm) por 10 min e 800g (4000 rpm) respectivamente, por 15 min à temperatura ambiente. A contagem plaquetária foi realizada manualmente em uma câmara de Neubauer e a concentração plaquetária ajustada para 250.000/mL. O PRP era então utilizado nos ensaios de coagulação e agregação em no máximo duas horas.

**Obtenção de amostras de sangue total (ST), plasma rico (PRT) e pobre em trombócitos de galinhas.** As aves foram contidas mecanicamente e a face interna de suas asas exposta. Após remoção das penas e uso de xylocaine spray como agente anestésico local, amostras de sangue total (8,1 mL) foram coletadas de cada asa em seringas contendo solução de citrato de sódio (3.2%, w/v; 0,9 mL). Plasma foi obtido após centrifugação de amostras de sangue total (800g por 20 min à temperatura ambiente). PRT foi obtido através de centrifugação por densidade sobre o Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany, densidade 1.077 g/mL), de acordo com o seguinte procedimento: 5 mL de sangue total eram diluídos com igual parte de solução salina tamponada (Phosphate buffered saline – PBS) e cuidadosamente colocados sobre 10 mL de Ficoll-Paque. Após 12 min de centrifugação à temperatura ambiente por 600g, a interface era coletada, contada manualmente e ajustada com a adição de plasma, para uma concentração de 100.000 células/mL.

### **Ensaio de coagulação**

**Avaliação do efeito do corn trypsin inhibitor (CTI) sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).** Inicialmente, amostras de plasma de rato ou galinha (100 µL) foram ativadas (5 min a 37°C) com HemosiL (100 µL) na presença ou ausência de CTI, para o ensaio de TTPA. Finalmente, 100 µL de CaCl<sub>2</sub> (25 mM) foram adicionados e o experimento conduzido em um sistema computadorizado para medição de ensaios de coagulação. Os valores foram expressos em segundos (média ± desvio padrão, n=6).

**Avaliação do efeito de alguns ativadores do fator XII sobre o tempo de recalcificação (TR) do plasma.** Para avaliação de possível ativação do FXII (nos plasmas de rato e galinha) o TR foi avaliado em uma segunda série de experimentos

(n=6, para cada grupo experimental), pela adição a 200  $\mu$ L de plasma (por 10 min a 37°C), de 50  $\mu$ L das seguintes substâncias detentoras de cargas negativas: (tRNA, concentrações finais crescentes de  $1^1$ ;  $1^{10}$ ;  $1^{100}$   $\mu$ g/mL) (grupo um); ou poliF45 (concentrações finais crescentes de  $1^1$ ;  $1^{10}$ ;  $1^{100}$   $\mu$ g/mL) (grupo dois); ou de uma solução de kaolin (concentrações finais crescentes de  $1^1$ ;  $1^{10}$ ;  $1^{100}$   $\mu$ g/mL) (grupo 3) ou de solução salina a 0,9% (grupo 4, controle) para posterior recalcificação com 100  $\mu$ L de uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 25mM. O tempo de coagulação foi determinado através de observação visual e cronometrado. Em caso de diminuição de tempo de coagulação do plasma por estas substâncias, o ensaio era então realizado na presença ou ausência de corn trypsin inhibitor (CTI, um inibidor específico do FXII), a uma concentração final de 100  $\mu$ g/mL) (Hojima *et al*, 1980). Finalmente, foram avaliadas as atividades enzimáticas da RNase e da fosfatase sobre o tRNA e poliF45, respectivamente. Estes ensaios obedeceram ao seguinte protocolo:

**Obtenção de RNA hidrolizado.** tRNA (dose efetiva) foi incubado com RNase A (3 doses:  $1^1$ ;  $1^{10}$ ;  $1^{100}$ ) (1/1) em tampão imidazol 0.1 M, pH 7.4, por 30 min a 37°C (Kannemeier C *et al*, 2007).

**Obtenção de polifoF hidrolizado.** PoliF<sub>45</sub> (dose efetiva) foi incubado com Fosfatase alcalina (3 doses:  $1^1$ ;  $1^{10}$ ;  $1^{100}$ ) (1/1) por 0; 30 ou 60 minutos para verificação do tempo necessário à degradação enzimática do Poly<sub>125</sub> (Müller *et al.*, 2009).

### **Ensaio de agregação**

Os ensaios de agregação plaquetária (ratos) ou trombocitária (galinhas) foram realizados através de metodologia padrão, com o uso de um agregômetro óptico (Born, 1962). As plaquetas (no PRP) e os trombócitos (no PRT), em alíquotas de 0,35 mL, foram estimulados com o agonista ionóforo de cálcio A23187, em variadas concentrações, em um agregômetro de dois canais Chrono-Log (Havertown, Pa) a 37°C e sob constante agitação. A calibração e a porcentagem de agregação foram monitoradas com a ajuda de software, de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade da agregação foi expressa como a porcentagem máxima da alteração na transmissão da luz, utilizando-se o plasma pobre em plaquetas (ou trombócitos) como referência.

### **Ensaio de tromboelastometria**

## **I Ensaio de tromboelastometria (TEM) em amostras de sangue total (ST) ou de plasmas ricos (PRP) ou pobres em plaquetas ou trombócitos (PRT) de ratos e de galinhas**

Ensaio de TEM foram realizados no aparelho ROTEM<sup>®</sup> de quatro canais (Pentapharm, Germany) com seu respectivo software (www.sunmedcare.com.br). Antes da recalcificação com 20 µL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 200mM, amostras de ST ou de PRP (ratos) ou PRT (galinhas) (300 µL cada) eram incubadas (em eppendorf em banho a 37<sup>o</sup>C por 10 min) com (a) 20 µL de TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) (amostras controle) e comparadas com (b) 20 µL de diversos ativadores ou inibidores diluídos em PBS (ver detalhes em Resultados). As amostras eram então colocadas em “cups” plásticos do aparelho e os parâmetros TC, TFC, Ângulo  $\alpha$  e FMC do perfil TEM avaliados por no mínimo 1 hora.

### **Cálculos estatísticos**

Variáveis foram expressas como média  $\pm$  DP. Os dados obtidos dos ensaios de coagulação (TTPA e TP) foram submetidos a análise de variância. Comparações entre os parâmetros do perfil TEM para avaliar os efeitos dos vários tratamentos em comparação com o controle foram feitas através do teste *t* pareado. Finalmente, os efeitos das diferentes doses de corn trypsin inhibitor, poly<sub>45</sub>, fosfatase, tRNA e RNase nos parâmetros TEM foram analisados por meio de análise de variância de uma via após repetidas medições com teste Holm-Sidak *post-hoc* para múltiplas comparações. Um valor de  $P < 0.05$  foi considerado como significativo.

## **4. Resultados**

### **Ensaio de coagulação**

**Avaliação do efeito do corn trypsin inhibitor (CTI) sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).** O CTI inibiu a atividade do Hemosil sobre o plasma de rato, mas não sobre o de galinhas (tabela 1).

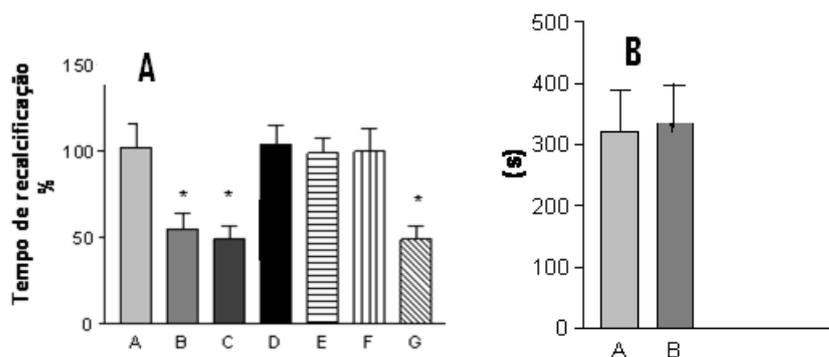
**Tabela 1 - Efeito da adição de corn trypsin inhibitor (CTI) sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) dos plasmas de rato e galinha.**

<u>Plasma</u>	<u>Salina a 0,9%</u>	<u>Corn trypsin inhibitor</u>
	TTPA (s)	TTPA (s)

Rato	29 ± 5	86 ± 14*
Galinha	108 ± 32	106 ± 24

Plasma (100µL) foi incubado com 100µL de HemosiL por 5min a 37°C, na presença ou ausência de CTI (concentração final de 100µg mL<sup>-1</sup>) antes da adição de 100µL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (25mM) e o TTPA (s, segundos) era então avaliado. Dados representados como média ± desvio padrão, n = 5. \* P< 0.05 (ANOVA).

**Avaliação do efeito de alguns ativadores do fator XII sobre o tempo de recalcificação (TR) do plasma de ratos e galinhas.** A figura 1 mostra os efeitos da incubação de alguns ativadores do FXII sobre o TR de plasma de ratos e galinhas. O TR não foi alterado quando o plasma de ratos ou galinhas foi tratado com variadas doses de poliF45 (concentrações finais crescentes de 1<sup>1</sup>; 1<sup>10</sup>; 1<sup>100</sup> µg/mL).



**Fig 1**

**Figura 1- A** 200 µL de plasma foram incubados com 50 µL de (A) solução salina a 0,9%; (B) kaolin e (C) tRNA, ambos a 10 µg/mL; (D) pré-incubação do plasma com CTI a 100 µg/mL para posterior ativação com kaolin ou com (E) tRNA; (F) tRNA pré-tratado com RNase A e (G) DNase I. O TR (segundos) do plasma de ratos sem a adição de ativadores (A, amostras-controle) foi de 102±14 segundos (m±dp, n=8), apresentando-se sempre dentro dos parâmetros de variabilidade normal (de 88 a 125 s) e este valor foi considerado como sendo 100±13%.

**B** O TR (segundos) do plasma de galinhas sem a adição de ativadores (A, amostras-controle) mostrou-se significativamente maior que aquele apresentado pelo plasma de mamíferos (321±68). A adição de kaolin (B) e tRNA, nas doses efetivas para plasma de rato (uma unidade kaolin) não alterou significativamente o TR do plasma de galinhas (342±63). média ± desvio padrão, n= 6 \* p<0,001 (ANOVA).

*Abreviações:* CTI, corn trypsin inhibitor; TR, tempo de recalcificação; s, segundos.

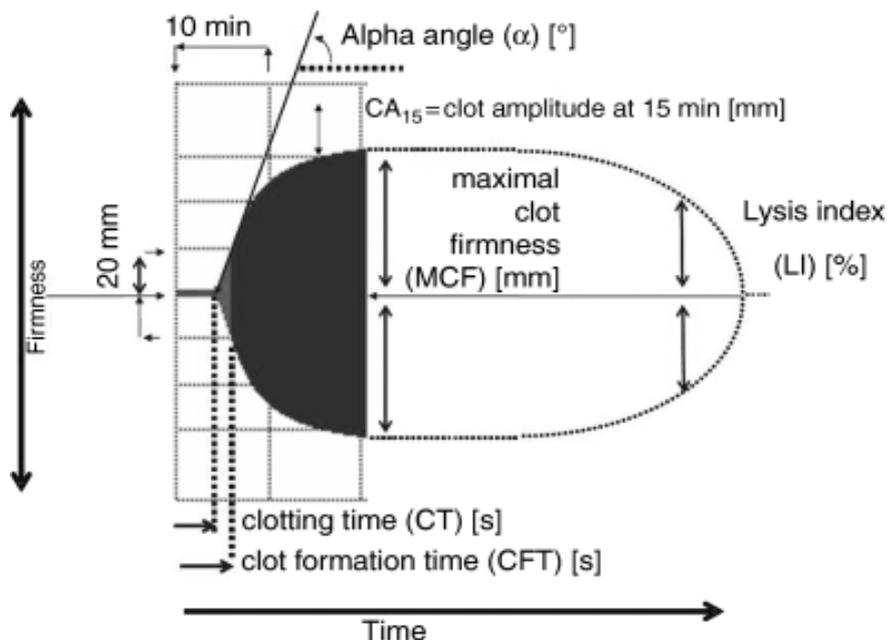
### Ensaio de agregação plaquetária

O ionóforo de cálcio A23187 (concentrações finais de 5 e 10 µM) promoveu respectivamente 48±5% e 99±8% de agregação em PRP de ratos (n=7). Para o TRP de

galinhas, a porcentagem de  $50\pm 4$  e  $100\pm 9\%$  de agregação foi conseguida com 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$ , respectivamente ( $n=8$ ).

### Ensaio de tromboelastometria

Abaixo, estão representados alguns dos parâmetros avaliados em um perfil típico de TEM:

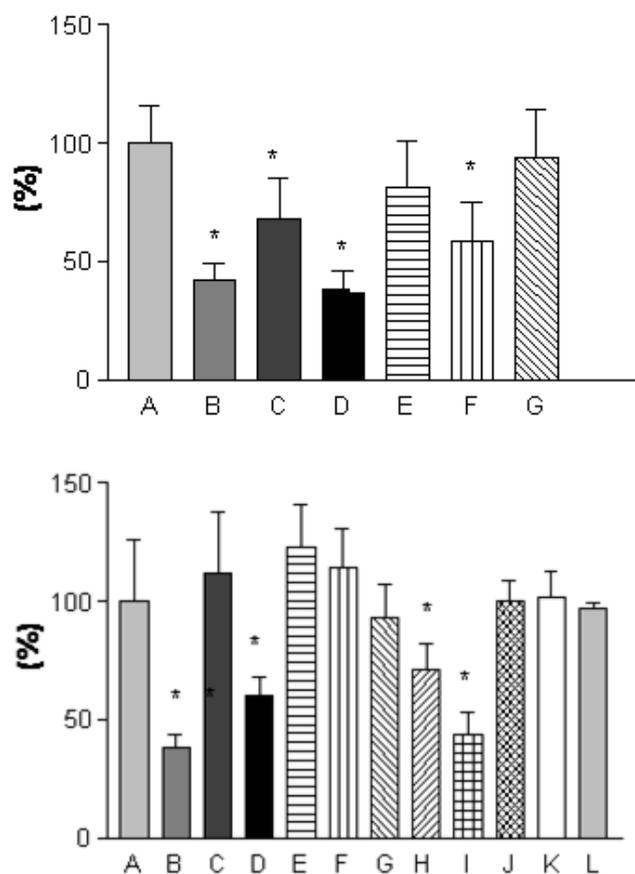


**Figura 2 – Principais parâmetros da tromboelastometria ROTEM®.**

*Abreviações:* CT, clotting time, tempo de coagulação; CFT, clot formation time, tempo de formação do coágulo; ALP, alpha angle, ângulo alfa; MCF, maximum clot firmness, firmeza máxima do coágulo; CA15, clot amplitude at 15 min, amplitude do coágulo a 15 min; CLI60, clot lysis index at 60 min after CT, índice de lise do coágulo 60 min após CT.

### Ensaio de tromboelastometria

**I Efeito de ativadores (INTEM, kaolin e agente agregante ionóforo A23187) ou dos inibidores corn trypsin inhibitor e aprotinin sobre o parâmetro TC do perfil TEM em amostras de sangue total (*em cima*) e de plasma rico em plaquetas (*em baixo*) de ratos**



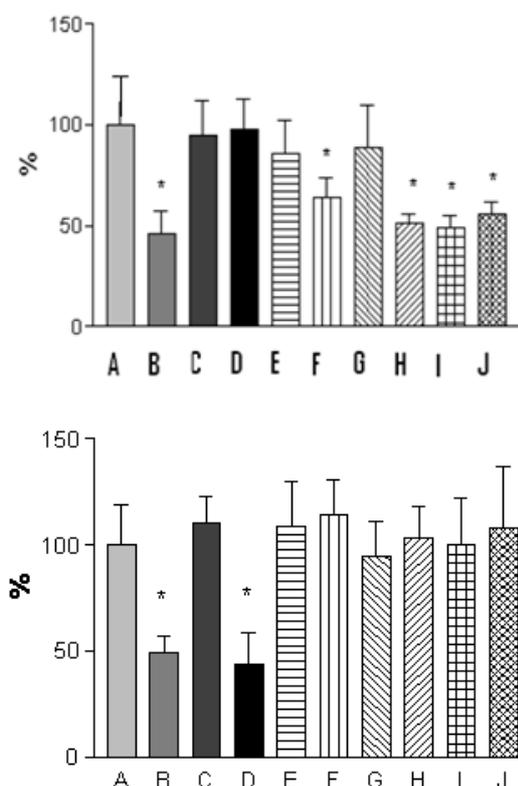
**Figura 3-Em cima:** Antes da recalcificação com 20 µL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> (200mM), amostras ST (300 µL) foram incubadas com 20 µL de: (A) tampão PBS (amostra controle ); (B) INTEM; kaolin a (C, 3 µg) ou (D, 30 µg); o agente agregante ionóforo de cálcio A23187 a (E, 2 µM) ou (F, 20 µM) e (G) ionóforo de cálcio A23187 a 20 µM em amostras pré-tratadas com CTI.

**Em baixo:** Antes da recalcificação, amostras de PRP (300 µL) foram incubadas com 20 µL de: (A) tampão PBS (amostra controle ); (B) INTEM; (C) INTEM sobre PRP pré-tratado com aprotinin; (D) ionóforo de cálcio A23187 a 20 µM; (E) ionóforo de cálcio A23187 a 20 µM em PRP pré-tratado com CTI; (F) ionóforo de cálcio A23187 a 20 µM em PRP pré-tratado com PSP; kaolin 0,3 µg (G) ou 3 µg (H) ou 30 µg (I); (J) RVV ; RVV em PRP pré-tratado com aprotinin (K) ou CTI (L).

**Abreviações:** TBS, tampão salina tamponada (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4); TEM, tromboelastométrico; PBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4); INTEM (reagente com ácido elálgico e fosfolípídeos sintéticos); ST, sangue total; PRP, plasma rico em plaquetas (250.000/mL); CTI, corn trypsin inhibitor a 100 µg por mL; TC, tempo de coagulação; Apro, aprotinin a 400 UI/mL; RVV, Russell's viper venom (10 ng/mL); m, média; DP, desvio padrão. Valores são expressos em porcentagem em relação às amostras-controle, como média ± desvio padrão, n = 6 para todos os grupos experimentais. Foram considerados como 100% os seguintes valores de referência do TC para amostras tratadas com solução salina a 0,9%: (1) ST ~TC de 168 ± 28 s ~ como 100 ± 16,6%; (2) PRP ~ TC de 313 ± 51 s ~ 100 ± 16,3% e (3) PRP + RVV ~ TC de 143 ± 13 s ~ 100 ± 9,1%.

\*P < 0.05 comparados com amostras controle (ANOVA).

**II Efeito dos inibidores aprotinin e corn trypsin (CTI) inhibitor sobre a ativação proporcionada pelos ativadores (INTEM, kaolin, ionóforo A23187) em amostras de sangue total (ST) (em cima) e plasma rico em trombócitos (em baixo) de galinhas. Análise do parâmetro tempo de coagulação (TC) do perfil TEM**



**Figura 4-***Em cima:* Antes da recalcificação com 20  $\mu$ L de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (200mM), amostras de ST (300  $\mu$ L) foram incubadas com 20  $\mu$ L de: (A) tampão PBS (amostra controle ); (B) INTEM; (C) INTEM sobre ST pré-tratado com aprotinin a 400 UI/mL; kaolin a (D, 0,3  $\mu$ g) ou (E, 3  $\mu$ g) ou (F, 30  $\mu$ g); o agente agregante ionóforo de cálcio A23187 a (G, 0,2  $\mu$ M) ou (H, 2  $\mu$ M) e ionóforo de cálcio A23187 a 2  $\mu$ M em ST pré-tratado com PBS (I) ou CTI (J).

*Em baixo:* Antes da recalcificação com 20  $\mu$ L de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (200mM), amostras de PRT (300  $\mu$ L) foram incubadas com 20  $\mu$ L de: (A) tampão PBS (amostra controle ); (B) ionóforo de cálcio A23187 a 2  $\mu$ M; (C) ionóforo de cálcio A23187 a 2  $\mu$ M sobre PRT pré-tratado com aprotinin; (D) ionóforo de cálcio A23187 a 2  $\mu$ M em PRT pré-tratado com CTI; (E) ionóforo de cálcio A23187 a 2  $\mu$ M em PRT pré-tratado com PSP; (F) amostras não-estimuladas pré-tratadas com PSP; (G) RVV; RVV em PRP pré-tratado com (H) aprotinin; (I) PSP e (J) CTI. *Abreviações:* PBS, tampão salina tamponada (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4); ST, sangue total; PRT, plasma rico em trombócitos (100.000 células/mL); CTI, corn trypsin inhibitor a 100  $\mu$ g por mL; TC, tempo de coagulação; PSP, fosfatase alcalina a 4 U/mL; RVV, Russell's viper venom (10 ng/mL); m, média; DP, desvio padrão. Valores são expressos como  $m \pm DP$ ,  $n = 6$  para todos os grupos experimentais. \* $P < 0.05$  comparados com amostras controle (ANOVA). Foram considerados como 100% os seguintes valores de referência do TC para amostras tratadas com solução salina a 0,9%: (1) ST ~TC de  $1147 \pm 278$  segundos~ como  $100 \pm 24\%$ ; (2) PRT ~ TC de  $398 \pm 71$  segundos ~ $100 \pm 18\%$  e (3) PRP + RVV~ TC de  $48 \pm 11 \sim 100 \pm 22\%$ .

## 5. Discussão

Foram inicialmente padronizadas as doses efetivas dos diversos ativadores do FXII plasmático, para posteriores ensaios com amostras de ST de ratos e galinhas. Como previsto, a diminuição significativa do TTPA proporcionada pelo reagente Hemosil APTT-ST foi revertida pela adição prévia de CTI ao plasma de ratos, mas não ao de galinhas. Este achado pode ser consequência da alta performance exibida pelo sistema hemostático de roedores, que apresenta níveis quantitativos dos vários fatores da cascata da coagulação significativamente maiores, quando comparados àqueles apresentados pelo plasma humano (Hawkey, 1975). O raciocínio inverso pode ser aplicado para explicar os resultados com plasma de galinhas, uma vez que atividade semelhante ao FXII nunca foi detectada em plasma de aves. A ativação da via extrínseca da coagulação de ratos proporcionada pelo reagente PT-fibrinogen, não é afetada pela adição do CTI, o que está de acordo com estudos anteriores (Hojima *et al.*, 1980) (Tabela 1). Assim sendo, dispomos de dois sistemas hemostáticos: com e sem atividade específica de FXII (plasmas de ratos e de galinhas, respectivamente).

Em uma segunda série de experimentos, a atividade de doses eficazes dos prováveis candidatos a ativadores endógenos do FXII em plasma de ratos foram comparadas quantitativamente àquela apresentada pelo ativador inorgânico clássico kaolin. Para efeito de comparação, “uma unidade de kaolin” equivale à dose de um ativador específico que encurtou o TR de 200  $\mu$ L de plasma em aproximadamente 50%. Neste sentido, tanto o kaolin quanto o tRNA apresentam, na dose de 10  $\mu$ g/mL, a eficácia de “uma unidade de kaolin”. Semelhantemente ao que acontece com plasma humano (Kannemeier *et al.* 2009), o encurtamento do TR proporcionado pelo tRNA é antagonizado pelo tratamento prévio do plasma com CTI e RNaseA mas não DNase I, envolvendo assim a intermediação específica do FXII (Figura 1). O TR do plasma de galinhas sem a adição de ativadores (amostras-controle) mostrou-se significativamente maior que aquele apresentado pelo plasma de mamíferos, e mesmo a adição de kaolin e de tRNA nas doses efetivas para plasma de ratos não o influenciou, uma vez que este plasma é deficiente em FXII. O TR não foi alterado quando amostras de plasma de ratos foram incubadas com variadas doses de poliF<sub>45</sub> sintético. A explicação provável pode estar relacionada ao tamanho da molécula. Um estudo recente demonstrou que a ativação do FXII plasmático desencadeada pelo poliF sintético acontece quando a molécula apresenta um número mínimo de 65 unidades de fosfato (Smith *et al.* 2010) e

o poliF utilizado no presente estudo, apesar de ser uma superfície negativamente carregada, apresenta apenas 45 unidades. Polif sintéticos com mais de 45 unidades não estão disponíveis para aquisição comercial. Trabalhos recentes têm considerado os poliF secretados por plaquetas ativadas como o mais forte candidato a ativador endógeno do FXII (Smith *et al.* 2006; Muller *et al.* 2009; Caen and Wu, 2010; Kerbiriou-Nabias, 2010; Mackman and Gruber, 2010; Smith *et al.* 2010; van der Meijden *et al.*, 2010; Muller and Renné, 2011), enquanto que o RNA extracelular tem perdido terreno neste quesito (Kannemeier *et al.* 2007; Preissner, 2007). Assim sendo, a possível atividade procoagulante dos poliF sobre os sistemas hemostáticos de ratos e galinhas foi reconsiderada, e uma outra estratégia foi adotada. Sabe-se que a estimulação de plaquetas humanas com doses adequadas de alguns agentes agregantes, entre eles o ionóforo de cálcio A23187 promove a expulsão de substâncias semelhantes a poliF dos grânulos densos após a reação de liberação, desencadeando o processo de formação de fibrina em um processo dependente tanto de poliF quanto de FXII (Mueller *et al.*, 2009). Assim sendo, a dose agregante efetiva do ionóforo de cálcio A23187 foi testado em PRP de ratos e PRT de galinhas. O ionóforo de cálcio A23187, nas concentrações finais de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , promoveu respectivamente  $48\pm 5\%$  e  $99\pm 8\%$  de agregação em PRP de ratos, o que está de acordo com estudos anteriores (Da Yardumian *et al.*, 1986). Similarmente, a concentração final de 0,3 e 0,6  $\mu\text{M}$  foi eficaz no efeito agregante sobre trombócitos em amostras de PRT de galinhas em  $50\pm 4$  e  $100\pm 9\%$ , respectivamente, também de acordo com estudos anteriores (Cox, 1985). A partir de então, foram tentadas a estimulação de amostras ricas em plaquetas (ratos) e trombócitos (galinhas) com variadas doses do agente agregante ionóforo de cálcio A23187, para avaliação de seu possível efeito procoagulante. O “teste de recalcificação modificado” (TRM) é considerado um teste de coagulação global de “screening” capaz de detectar alterações através de todo o espectro da coagulação sanguínea, se estendendo desde o estado de hiper-coagulação (trombofilia) até o de hipo-coagulação (hemofilia) (Spillert and Lazaro, 1993). Para avaliação de possível atividade procoagulante de doses do ionóforo de cálcio A23187 sobre amostras de ST ou PRP e PRT das duas espécies animais estudadas, foi então adaptada a junção do TRM com o ensaio TEM (, para avaliação principalmente do parâmetro CT, que reflete a iniciação do processo de coagulação sanguínea, ligado diretamente às atividades dos fatores de contato. A recalcificação de amostras de ST ou de plaquetas e trombócitos de ambas as espécies animais dá origem a perfis TEM similares, apesar de qualitativamente diferentes, uma vez que o CT de

amostras provenientes de ratos apresenta valores aproximadamente 8 vezes menores que o de amostras provenientes de galinhas (ambos com variação biológica de aproximadamente 20%). De acordo com as instruções do fabricante, a adição do reagente INTEM (ativador da via intrínseca da coagulação, composto de ácido elágico e fosfolipídeos sintéticos) diminui o CT de amostras de ST humano em aproximadamente 50%. Esta diminuição proporcionada pelo INTEM em ambos os sistemas avaliados foi considerada “uma unidade INTEM”. Como pode ser visto na figura 3, a adição de 20 µL contendo doses apropriadas dos diversos ativadores INTEM, kaolin e ionóforo de cálcio A23187 diminuíram significativamente o CT de amostras de ST e PRP de ratos, quando comparados a amostras-controle tratadas com solução salina a 0,9%. Pela análise dos resultados, pode-se chegar às seguintes conclusões: (1) Os fatores XII e XI e os poliF estão envolvidos na diminuição do CT das amostras de ST e PRP de ratos tratadas com ionóforo de cálcio A23187, uma vez que esta diminuição é inibida pela adição prévia às amostras de CTI, aprotinin e PSP, respectivamente. Estudos similares com amostras de ST ou plasma humanas com estes inibidores apresentaram resultados semelhantes (Dargaud *et al*, 2006; Nielsen V G, 2006; Muller *et al*. 2009) e (2) Estes achados sugerem que os reagentes PSP, aprotinin e CTI estão inibindo substâncias semelhantes a poliF, FXI e FXII respectivamente, uma vez que, nas doses aqui utilizadas, não afetam o efeito procoagulante do veneno da *Vipera Russellii* (*Russell's viper venom*) sobre a via comum da coagulação (Johnson *et al*, 1985). Igualmente, doses similares de PSP não afetam o TC de amostras-controle e nem daquelas tratadas com doses eficazes de kaolin. Estes achados são facilmente explicáveis, uma vez que a ativação do FXII pelo kaolin não depende de substâncias semelhantes a poliF.

Finalmente, pela análise dos resultados expostos na figura 4, podemos sugerir as seguintes conclusões: (1) Diferentemente do que acontece quando utilizamos os ensaios clássicos de coagulação com plasma de aves, a recalcificação de amostras de ST ou PRT desta espécie animal dá origem a um perfil TEM similar àqueles proporcionados por amostras correlatas de mamíferos. Este achado está de acordo com estudos anteriores, que sugerem significativa atividade procoagulante de trombócitos de galinhas (Venkatayan and Nambiar, 1968); (2) A adição de diversos ativadores (INTEM, kaolin e ionóforo de cálcio A23187) diminuíram significativamente o CT de amostras de ST e PRT de galinhas, quando comparados a amostras-controle tratadas com solução salina a 0,9%; (3) O FXI e os poliF estão envolvidos na diminuição do CT das amostras destas amostras tratadas com ionóforo de cálcio A23187, uma vez que esta

diminuição é inibida pela adição prévia às amostras de aprotinin e PSP, respectivamente; (4) O FXII não está envolvido na diminuição do CT destas amostras tratadas com ionóforo de cálcio A23187 e INTEM, uma vez que esta diminuição não é inibida pela adição prévia às amostras de CTI; (5) A incubação prévia das amostras com PSP anula o encurtamento proporcionado pelo ionóforo, mas não pelo kaolin; (6) Nas doses aqui utilizadas, os reagentes PSP e aprotinin não afetam o efeito procoagulante do veneno da *Vipera Russelli* (Russell's viper venom) sobre a via comum da coagulação e (7) As diminuições do CT proporcionada pelas adições de INTEM (fosfolipídeos sintéticos e ácido elágico) e kaolin às amostras de ST ou PRT de galinhas provavelmente não estão relacionadas à ativação de substância semelhante a FXII, uma vez que não são afetadas pela incubação prévia das amostras com CTI. Estudos clássicos indicam que os fosfolipídeos aceleram inespecificamente as reações enzimáticas da coagulação sanguínea nesta espécie animal (Johnson et al, 1985) e que os mesmos são também liberados após incubação de plaquetas com kaolin (Pérez-Requejo, 1976).

Os ensaios para a detecção estrutural do FXII se mostram imprescindíveis, pois este ensaio controle é necessário quando se trabalha com animais geneticamente deficientes (Pauer *et al*, 2004). Através da utilização de um programa de busca para identificação de sequências de proteínas e de DNA (BLAST programs), Ponczek *et al* (2010) não conseguiram detectar o gene correspondente ao FXII no genoma de galinhas. Assim sendo, foram realizados ensaios em biologia molecular para detecção parcial de algumas sequências do sítio ativo do FXII em alguns tecidos da galinha *White leghorn*, através da extração do ácido desoxirribonuclêico (DNA), seguido por amplificação das sequências de interesse por polimerase chain reaction (PCR) e sequenciamento (relatório anexo). Foram testados os primers PB1d e PB1r, desenhados de acordo com sequências comuns encontradas nos alinhamentos do exon 10 do gene correspondentes ao FXII do camundongo *Mus musculus* e do *Homo sapiens*. Os resultados de PCR mostraram uma banda de 160 bp nos DNAs da galinha *White leghorn* e da serpente *Bothrops jararaca*, que após o sequenciamento e análise pelo programa *Clustal W* revelou identidade de sequência de pelo menos parte da região codificadora do sítio ativo do FXII no DNA destes dois animais (Relatório em anexo).

**Avaliação crítica do método:** A interpretação dos resultados parciais dos ensaios em biologia molecular deve ser conduzida com muito cuidado. O FXII é produzido e secretado pelo fígado. Este fator é um produto de um único gene pertencente ao cromossomo 5, composto de 13 introns e 14 exons (12kb). O zimogênio do FXII é composto por duas cadeias (353 e 243 resíduos, respectivamente), unidas por ponte dissulfeto) (Stavrou and Schmaier, 2010). Nesta molécula estão compreendidos os seguintes domínios estruturais semelhantes a: (1) fibronectina (tipos I e II); (2) fator de crescimento da epiderme (EGF-like); (3) “kringle”; (4) região rica em prolina e (5) domínio catalítico. Estes domínios possuem homologia aos presentes em outras serino-proteases. Quando analisamos as sequências de bases correspondentes ao gene do FXII, podemos observar que nenhuma sequência específica é 100% conservada nas diferentes espécies animais na escala zoológica. Em outras palavras, não existe neste gene uma região com sequência de pares de bases que caracterizaria a detecção precisa deste fator. Os primers utilizados no presente trabalho amplificam algumas sequências presentes em seu domínio catalítico, mas que, por outro lado, podem estar também presentes em outras serino-proteases. Portanto, reações cruzadas com outras serino-proteases tais como o Ativador do Fator de Crescimento Hepático (HGFA) e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) não podem ser descartadas, quando analisamos os resultados por nós obtidos com que o fragmento obtido no PCR. Portanto, qualquer estratégia que utilize a técnica de PCR para amplificação de algumas sequências de pares de bases correspondentes ao FXII pode esbarrar neste inconveniente: a amplificação inespecífica de outros produtos que apresentem homologia com o FXII. Outra alternativa para a detecção estrutural poderia ser aquela obtida através de ensaios imunológicos, através de anticorpos contra este fator. **Avaliação crítica:** Esta estratégia não foi considerada, uma vez que existem relatos afirmando que anticorpos que reconhecem componentes do sistema de contato em mamíferos podem não reconhecer estes mesmos fatores em aves (Cheng et al, 2010).

**Em resumo,** nossos resultados sugerem que: (1) à semelhança do fator tecidual que representa o ativador universal da via extrínseca da coagulação dos vertebrados em geral, os poliF parecem ser também os ativadores da via intrínseca da coagulação em vertebrados mamíferos e não mamíferos. E assim sendo, esquemas terapêuticos que apregoem sua supressão poderão desencadear episódios hemorrágicos como efeito colateral. Entre os exemplos de diáteses hemorrágicas por deficiência de poliF podem

ser citadas a Síndrome de Hermansky-Pudlak (SHP), que é uma rara e complexa doença hereditária, na qual os sintomas hemorrágicos acontecem como consequência de deficiência nos mecanismos de estocagem dos constituintes dos grânulos plaquetários (Gahl *et al*, 1998). Pacientes que apresentam esta síndrome possuem plaquetas com reduzida ou nula concentração de grânulos densos, o local de estocagem dos poliF. A capacidade de ativação do processo da coagulação sanguínea está significativamente diminuída em plaquetas provenientes de pacientes com SHP (Muller *et al*, 2009), indicando que a redução na concentração normal de poliF prejudica o potencial procoagulante de plaquetas ativadas. Outro exemplo pode ser constatado na Síndrome de trombastenia, em que as plaquetas apresentam deficiência no mecanismo de secreção do conteúdo granular após agregação (Castaldi *et al*, 1965, Caen and Wu, 2010). A importância fisiológica do FXII para o sistema hemostático de aves não está descartada até o momento, uma vez que detecção parcial de sequências de bases do sítio ativo desta enzima foi constatada. Estudos mais aprofundados serão conduzidos para esclarecimento desta questão.

## 6. Referências

Baird T R, Walsh P N. Activated platelets but not endothelial cells participate in the initiation of the consolidation phase of blood coagulation. *J Biol Chem*. 2002; 277: 28498-28503

Bhoola K D, Figueroa C D, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 1-80

Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962, 194: 927-929

Caen J, Haas F. Interaction des plaquettes et du plasma dans la phase initiale de la coagulation. Technique d'étude chez le sujet normal du rôle des plaquettes. Effet du contact. *Rev Fr Et Clin Biol*. 1960;5:146-152

Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1670-1674

Castaldi P A, Larrieu M J, Caen J. Availability of platelet Factor 3 and activation of factor XII in thrombasthenia. *Nature*. 1965; 207: 422-424

Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, Sisler I, Matafonov A, Sun MF, White-Adams TC, Smith SA, Hanson SR, McCarty OJ, Renné T, Gruber A, Gailani D. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010;116: 3981-3989

Colman R W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med*. 2006; 203: 493-495

Cox C P. Activation of washed chicken thrombocytes by 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1985; 82: 145-151

Da Yardumian, I J Mackie, S J Machin. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol* 1986; 39: 701-712

Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet* 2000; 355: 1627-1632

Dargaud Y, Luddington R, Baglin TP. Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated thrombography at low-concentration tissue factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1160-1161

Davie E W, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-10370

Didisheim P, Hattori K, Lewis J H. Hematologic and coagulation studies in various animal species. *J Lab Clin Med.* 1959; 53: 866-875

Doerr J A, Hamilton P B. New evidence for intrinsic blood coagulation in chickens. *Poult Sci.* 1981; 60: 237-242

Frost C L, Naudé R J, Oelofsen W, Jacobson B. Comparative blood coagulation studies in the ostrich. *Immunopharmacology* 1999; 45: 75-81

Gailani D. Activation of Factor IX by Factor XIa. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10: 198-204

Gailani D, Broze G J Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science.* 1991; 253: 909-912

Gailani D, Renné T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 1106-1112

Gailani D and Renné T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27: 2507-2513

Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, Iwata F, Hazelwood S, Shotelersuk V, Duffy LF, Kuehl EM, Troendle J, Bernardini I. Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med.* 1998; 338: 1258-1264

Gomez-Garcia M R and Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival, *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 605-647

Hawkey C M. 1975. *Comparative Mammalian Haematology, Cellular Components and Blood Coagulation of Captive Wild Animals.* Heinemann, London

Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ. Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thromb Res* 1980; 20: 149-162

Johnson G S, Turrentine M A, Swayne D E. Coagulation of plasma from the chicken (*Gallus domesticus*). Phospholipids influence clotting rates induced by components from Russell's viper venom. *Comp Biochem Physiol B* 1985; 82: 647-653

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl M L, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner K T. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 6388-6393

Kerbiriou-Nabias D. Platelet polyphosphates: new mediators linking thrombosis with inflammation. *Med Sci*. 2010; 26(4): 343-346

Kimura M, Sueyoshi T, Takada K, Tanaka K, Morita T, Iwanaga S. Isolation and characterization of ornitho-kininogen. *Eur J Biochem*. 1987; 168: 493-501

Kitchens C S. The contact system. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1382–1386

Mackman N, Gruber A. Platelet polyphosphate: an endogenous activator of coagulation factor XII. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(5): 865-867

Muller F, Mutch N J, Schenk W A, Smith S A, Esterl L, Spronk H M, Schmidbauer S, Gahl W A, Morrissey J H, Renne T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009;139: 1143–1156

Müller F and Renné T. Platelet polyphosphates: the nexus of primary and secondary hemostasis. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71(2): 82-86

Müller F, Gailani D, Renné T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr Opin Hematol*. 2011 Jul 1. [Epub ahead of print]

Nemerson Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol* 1992; 29: 170–176

Nielsen VG, Cohen BM, Cohen E. Effects of coagulation factor deficiency on Plasma coagulation kinetics determined via thrombelastography: critical roles of Fibrinogen and factors II, VII, X and XII. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005; 49: 222-231

Nielsen V G. Effects of aprotinin on plasma coagulation kinetics determined by thrombelastography: role of Factor XI. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:168-172

Oliver J A, Monroe D M, Roberts H R, Hoffman M. Thrombin activates Factor XI on activated platelets in the absence of Factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 170–177

Pérez-Requejo JL. A standardized bioassay for platelet factor 3 released by kaolin. *Br J Haematol* 1976;33:39-51

Ponczek M B, Gailani D, Doolittle R F. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 1876-1883

Preissner K T. Extracellular RNA. A new player in blood coagulation and vascular permeability. *Hamostaseologie*. 2007; 27: 373-377

Prezoto B C, Couto G K, Rossoni L V, Schoorlemmer GH, Carillo BA, Campos RR. Cardioprotective effect of ornitho-kinin in an anesthetized, open-chest chicken model of acute coronary occlusion. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42: 824-830

Ratnoff O D, Colopy J E. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest*. 1955; 34: 602-613

Ruiz, C.R. Lea, E. Oldfield and R. Docampo, Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes, *J. Biol. Chem*. 279 (2004), pp. 44250–4425

Schleuning W D, Sudol M, Reich E. A proenzyme from chicken plasma similar to Human plasma prekallikrein. *J Biol Chem*. 1983; 258: 14106-14115

Schmaier A H. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest*. 2008; 118: 3006-3009.

Schmaier A H, McCrae K R. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 2323-2329

Schousboe I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 1007-1013

Seki T, Miwa I, Nakajima T, Erdös E G. Plasma kallikrein-kinin system in non-mammalian blood: evolutionary aspects. *Am J Physiol*. 1973; 224: 1425-1430

Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 903–908

Smith S A, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, Morrissey JH. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood* 2010; 116(20):4353-4359

Spillert C R, Lazaro E J. Modified recalcification time: a global coagulation screening test. *J Natl Med Assoc* 1993; 85(8): 611-616

Spurling NW. Comparative physiology of blood clotting. *Comp Biochem Physiol A*. 1981; 68: 541-548

Stavrou E, Schmaier A H Factor XII: What does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res* 2010; 125: 210-215

Stopforth A. A study of coagulation mechanisms in domestic chickens. *J Comp Pathol*. 1970; 80: 525-533

Thomson A E, Squires E J, Gentry P A. Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. *Br Poult Sci*. 2002; 43: 313-321

van der Meijden P E, Heemskerk J W. Polyphosphates: a link between platelet activation, intrinsic coagulation and inflammation? *Expert Rev Hematol*. 2010; 3: 269-272

Venkatayan S, Nambiar K T. The role of thrombocytes on coagulation of blood in the domestic fowl. *Indian Vet J*. 1968; 45: 499-504

Vine A K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina*. 2009; 29: 17

Walsh P N. The role of platelets in the contact phase of blood coagulation. *Br J Haematol*. 1972; 22: 237-254

Walsh P N, Griffin JH. Contributions of human platelets to the proteolytic activation of blood coagulation factors XII and XI. *Blood* 1981; 57: 106-118

Walsh P N. *Role of platelets and blood coagulation*. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 605-616.

Weir-M J, Acurero Z, Salas-A R, Arteaga-Vizcaino M. Blood coagulation factors in the black headed vulture (*Coragyps atratus*), a potential animal model for the study of haemostasis. *Thromb Res*. 2004; 113: 269-273

Zuckerman L, Cohen E, Vagher J P, Woodward E, Caprini J A. Comparison of thrombelastography with common coagulation tests. *Thromb Haemost* 1981; 46: 752-756.