

TAYANA BEZERRA TEIXEIRA MELLO

**FIBRINOGENO, FVII, FVIII, FIX, FX E FXI COMO
FATORES DE RISCO PARA TROMBOEMBOLISMO
VENOSO EM PACIENTES DE UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

CAMPINAS

2006

TAYANA BEZERRA TEIXEIRA MELLO

**FIBRINOGENO, FVII, FVIII, FIX, FX E FXI COMO
FATORES DE RISCO PARA TROMBOEMBOLISMO
VENOSO EM PACIENTES DE UMA POPULAÇÃO
BRASILEIRA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia
estrutural, celular e molecular.*

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Joyce Maria Annichinno Bizzacchi

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M489f Mello, Tayana Bezerra Teixeira
Fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI como fatores de risco para tromboembolismo venoso em pacientes de uma população brasileira / Tayana Bezerra Teixeira Mello. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Joyce Maria Annichinno-Bizzacchi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sangue- Fatores de coagulação. 2. Trombose Venosas. 3. Sistema do grupo sanguíneo ABO. 4. Proteínas Relacionadas a Receptor de LDL. I. Annichinno-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Fibrinogen, FVII, FVIII, FIX, FX and FXI as risk factors for venous thrombosis among patients of a Brazilian population

Keywords: • Blood – coagulation factors
• Venous thromboembolism
• ABO blood group system
• LDL – receptor related protein

Área de concentração : Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora: Profa Dra Joyce Maria Annichinno-Bizzacchi
Prof Dr Rendrik França Franco
Profa. Dra. Margareth Castro Ozello
Profa. Dra. Vânia Maris Morelli
Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati**

Data da defesa: 05-07-2006

Banca examinadora da tese de doutorado

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joyce Maria Annichinno Bizzacchi

Membros:

1. Prof. Dr. Rendrik França Franco
2. Prof^ª. Dr^ª. Margareth Castro Ozello
3. Prof^ª. Dr^ª. Vânia Maris Morelli
4. Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima Sonati

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/07/2006

Dedicatória

Ao meu querido marido Guilherme, porto seguro, que estimula o meu crescimento em todos os âmbitos da minha vida.

Ao meu filho Luís Otávio, anjinho sapeca, que fez do seu nascimento o acontecimento mais importante da minha vida.

Ao meu filho Davi, que em breve nascerá, trazendo consigo uma nova esperança.

Aos meus pais, Raimundo e Terezinha, alicerces da minha existência.

Aos meus irmãos, Taty, Ramon e Rodrigo, por saberem, mesmo distantes, se fazerem tão presentes.

A Deus por ter iluminado minha mente para que eu pudesse concretizar este sonho.

Este trabalho só foi possível ser realizado pelo empenho de um grupo de pessoas com o qual tive o privilégio de trabalhar.

Á Prof. Dra. Joyce Maria Annichinno Bizzacchi, idealizadora do projeto, pelos ensinamentos científicos e confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

Aos Drs. Rendrik França Franco, Margareth Castro Ozello, Vânia Maris Morelli e Maria de Fátima Sonati pelas valiosas sugestões emitidas durante a defesa desta tese.

As biólogas Tânia, Silmara e Ucha, pessoas de alto nível profissional, pelo valioso auxílio técnico e paciência com que me introduziram nas técnicas laboratoriais de hemostasia e biologia molecular.

As colegas do Laboratório de Hemostasia: Margareth, Erik, Mariane, Michele, Aline, Ana Cláudia, Deva, Cristina, Beka, Rafael, Ricardo, pelos momentos alegres de convívio.

A todos os funcionários do Ambulatório de Hematologia e Serviço de Coleta do Banco de Sangue do Hemocentro da UNICAMP, pela paciência e bom humor com o qual mobilizaram 350 pessoas para coleta de espécimes biológicas.

Ao serviço de estatística da UNICAMP, em especial Roberto e Helymar, pelo empenho na realização das análises estatísticas.

A todos os pacientes e doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, que contribuíram com parte de si para concretização deste estudo.

À Secretaria de Saúde Municipal de Campinas, que me concedeu horas semanais da minha jornada de trabalho, para que eu pudesse me dedicar à confecção desta tese.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, através do processo:
03/01779-0.

Responsável: Prof. Dra. Joyce Maria Annichinno Bizzacchi

*Se não houver frutos,
valeu a beleza das flores
Se não houver flores,
valeu a sombra das folhas
E, se não houver folhas,
valeu a intenção da semente.*

Henfil

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO	45
1.1- A cascata da coagulação: um modelo revisado	47
1.2- Mecanismos inibitórios da coagulação	50
1.3- Tromboembolismo venoso: aspectos gerais	51
1.4- Trombofilia hereditária	53
1.5- Fatores da coagulação e tromboembolismo venoso	55
1.6- Classificação dos estados protrombóticos hereditários	60
1.7- LRP e o catabolismo do FVIII	61
2- JUSTIFICATIVA	65
3- OBJETIVOS	69
4- MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1- Cálculo do tamanho amostral	75
4.2- Pacientes e controles	76
4.3- Coleta de sangue	77

4.4- Protocolo de trombofilia.....	78
4.5- Determinação dos fatores da coagulação.....	79
4.6- Determinação dos polimorfismos no gene da LRP.....	81
4.7- Análise Estatística.....	85
5- RESULTADOS.....	89
6- DISCUSSÃO.....	133
7- CONCLUSÕES.....	167
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
9- APÊNDICE.....	193
9.1- APÊNDICE I: Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa em humanos.....	195
9.2- APÊNDICE II: Publicações.....	197

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	Anticoncepcional hormonal
AT	Antitrombina
AUREC	The Austrian Study on Recurrent Venous Thrombosis
DDAVP	Desmopressina
DNA	Acido. Dexoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
dRVV	Dilute Russel viper venom time
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzime linked immunoasorbent assay
FT	Fator tecidual
FII	Fator II da coagulação ou Protrombina
FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII da coagulação
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII ativado

FIX	Fator IX da coagulação
FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI da coagulação
FXIa	Fator XI ativado
FvW	Fator de von Willebrand
GS ABO	Grupo sanguíneo ABO
HCL	Ácido clorídrico
IC	Intervalo de confiança
KCL	Cloreto de potássio
LDL	Low density lipoprotein
LETS	The Leiden Thrombophilia Study
LITE	The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology
LRP	LDL receptor related protein
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Mg/dl	Miligrama por decilitro
mM	Milimolar
OR	Odds Ratio-

pb	Pares de bases
pmol	picomol
P75	Percentil 75
P90	Percentil 90
PC	Proteína C
PCA	Proteína C ativada
PCR	Proteína C reativa
PS	Proteína S
RAP	Risco atribuído populacional
RCP	Reação de cadeia de polimerase
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolipídio
SAS	System for Windows
TAFI	Thrombin activable fibrinolysis inhibitor
TCK	Tempo de coagulação com caulim
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TM	Trombomodulina
TP	Tempo de protrombina
TRH	Terapia de reposição hormonal

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
UI/dl	Unidade internacional por decilitro
VLDL	Very low density lipoprotein
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Classificação dos estados protrombóticos hereditários	61
Tabela 2- Tamanhos amostrais para estudo caso-controle, por fator da coagulação.....	75
Tabela 3- Distribuição dos pacientes por idade no 1º episódio de TEV.....	92
Tabela 4- Distribuição dos pacientes por tempo decorrido entre o episódio de TEV e coleta de exames.....	93
Tabela 5- Episódio de TEV de acordo com o sítio acometido.....	94
Tabela 6- Episódios de TEV de acordo com fator de risco adquirido.....	95
Tabela 7- Características clínicas do 1 episódio de TEV.....	96
Tabela 8- Características dos pacientes e controles quanto a presença e tipo de trombofilia.....	97
Tabela 9- FV de Leiden e mutação G20210A no gene FII e risco de TEV.....	98
Tabela 10- Presença e tipo de trombofilia hereditária. em pacientes. com TEV em sítio não usual e controles.....	98
Tabela 11- Trombofilia hereditária de acordo com o grupo étnico.....	99
Tabela 12- FV de Leiden e mutação G20210A no gene FII de acordo com o grupo étnico.....	100
Tabela 13- Medianas (min-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação ao sexo.....	105

Tabela 14- Medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes. e controles em relação à idade.....	106
Tabela 15- Medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes. e controles em relação à etnia.....	107
Tabela 16- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação ao GS ABO.....	108
Tabela 17- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles com relação à trombofilia	109
Tabela 18- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes, com relação a número de episódios trombóticos	109
Tabela 19- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes com relação ao sítio da trombose	110
Tabela 20- Média (DP) e mediana (mín - máx) da PCR em pacientes e controles	110
Tabela 21- Risco de TEV de acordo com fatores da coagulação e GS ABO.....	113
Tabela 22- FVIII e risco trombótico ajustado para variáveis propostas	114
Tabela 23- FvW e risco trombótico ajustado para variáveis propostas.....	114
Tabela 24- GS ABO e risco trombótico ajustado para variáveis propostas.....	115
Tabela 25- GS ABO, FVIII, FvW e risco trombótico: ajuste simultâneo para as três variáveis.....	115
Tabela 26- FIX e risco trombótico ajustado para variáveis propostas	118
Tabela 27- FXI e risco trombótico ajustado para variáveis propostas	120
Tabela 28- Risco de TEV de acordo com os fatores da coagulação e GS ABO.....	122

Tabela 29-	Interação entre FVIII com FIX e FXI no risco de TEV	122
Tabela 30-	Interação entre GS ABO com FIX, FXI no risco de TEV.....	123
Tabela 31-	Interação entre FvW com FIX, FXI no risco de TEV	123
Tabela 32-	Risco de TEV de acordo com o sexo	124
Tabela 33-	Risco de TEV de acordo com a idade	125
Tabela 34-	Risco de TEV de acordo com a etnia	125
Tabela 35-	Risco de TVE de acordo com o sítio acometido	126
Tabela 36-	Risco de TEV recorrente de acordo com a trombofilia	127
Tabela 37-	Risco de TEV recorrente de acordo com GS ABO e fatores da coagulação...	128
Tabela 38-	Participantes do estudo molecular.....	129
Tabela 39-	Prevalência dos polimorfismos no gene da LRP em pacientes com TEV e controles	130
Tabela 40-	Prevalência dos polimorfismos no gene da LRP em pacientes com TEV (FVIII>150UI/dl) e controles	131
Tabela 41-	Mediana (mín-máx) do FVIII de acordo com os polimorfismos no gene da LRP	132
Tabela 42-	Mediana (mín-máx) do FvW de acordo com polimorfismos no gene da LRP.....	132

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Modelo revisado da coagulação.....	49
Figura 2- Digestão do polimorfismo D2080N, no gene da LRP.....	83
Figura 3- Digestão do polimorfismo C200T, no gene da LRP.....	84
Figura 4- Digestão do polimorfismo A775P, no gene da LRP.....	85
Figura 5a- Classificação do grupo de estudo quanto à etnia.....	91
Figura 5b- Classificação do grupo não caucasóide.....	92
Figura 6- Mediana das concentrações do FVIII, FIX, FXI e FvW em pacientes e controles.....	100
Figura 7- Mediana das concentrações do fibrinogênio em pacientes e controles.....	101
Figura 8- Mediana das concentrações do FVII e FX em pacientes e controles	101
Figura 9- FVIII x FIX em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	102
Figura 10- FVIII x FIX em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	102
Figura 11- FVIII x FXI em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	103
Figura 12- FVIII x FXI em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	103
Figura 13- FVIII x FvW em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	103
Figura 14- FVIII x FvW em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	103
Figura 15- FIX x FXI em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	104

Figura 16- FIX x FXI em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	104
Figura 17- FIX x FvW em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	104
Figura 18- FIX x FvW em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	104
Figura 19- PCR x Fibrinogênio em pacientes (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	111
Figura 20- PCR x Fibrinogênio em controles (Coeficiente de Correlação de Pearson).....	111
Figura 21- OR para TEV referente ao nível de FVIII estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o 1º quartil.....	116
Figura 22- OR para TEV referente ao nível de FvW estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o 1º quartil.....	117
Figura 23- OR para TEV referente ao nível de FIX estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o 1º quartil.....	119
Figura 24- OR para TEV referente ao nível de FXI estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o 1º quartil.....	121



RESUMO

Nos últimos anos tem sido demonstrada uma associação entre níveis elevados de certos fatores da coagulação e risco de tromboembolismo venoso (TEV). Entretanto, o número de estudos é pequeno e a maioria estão restritos a populações caucasóides. Neste estudo caso-controle emparelhado por idade, sexo e etnia investigamos os níveis plasmáticos do fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FvW e grupo sanguíneo (GS) ABO no risco trombótico. Foram analisados 175 pacientes com TEV (122 mulheres e 53 homens), com idade mediana de 36 anos (13-63), acompanhados no Ambulatório de Hemostasia da Unicamp no período de julho de 2002 a julho de 2005. Na análise univariada, níveis elevados de FVIII (OR: 5,3 IC95% 2,9-9,6), FvW (OR: 4,9 IC95% 2,7-8,9), FIX (OR: 2,4 IC95% 1,3-4,4), FXI (OR: 2,1 IC95% 1,1-4,0) e GS não O (OR: 3,0 IC95% 1,9-4,6) foram fatores de risco para TEV. O FVIII, FvW e GS não O foram associados ao risco tanto em membro inferior como em sítio incomum da doença. A análise de todas estas variáveis, segundo critério de seleção “stepwise”, mostrou o FVIII (OR: 3,1 IC95% 1,6-6,0), FvW (OR:2,8 IC95% 1,4-5,4) e o GS não-O (OR:2,2 IC95% 1,3-3,5) como fatores de risco independentes para TEV e que o FIX e FXI agiram sinergicamente a estas variáveis no acréscimo do risco trombótico. Risco de recorrência foi conferido por elevações do FIX (OR: 4,7 IC95% 1,8-11,9) e FXI (OR: 3,4 IC95% 1,8-8,7). Os determinantes dos níveis plasmáticos do FVIII não estão totalmente esclarecidos. Como a LRP (Low density lipoprotein receptor related protein) tem um papel no catabolismo do FVIII, foram pesquisados os polimorfismos C200T, o A775P e o D2080N no gene codificador dessa proteína, como fator de risco para TEV e a influência dos mesmos sobre os níveis do FVIII e FvW. Não houve diferença nas prevalências destes polimorfismos entre pacientes e controles. No entanto, no grupo-controle, o genótipo DN, do polimorfismo D2080N, foi associado a menores concentrações do FVIII (77,4 UI/dl) e FvW (70,2 UI/dl), quando comparado ao genótipo DD (127 UI/dl e 108,4 UI/dl, respectivamente $p < 0,05$). Em conclusão, nesta população brasileira miscigenada, o FVIII, FvW, FIX, FXI e GS não O foram associados ao risco de TEV e o polimorfismo D2080N, no gene da LRP, interferiu com os níveis plasmáticos de FVIII e FvW.



ABSTRACT

During the last years an association between high levels of certain coagulation factors and the risk for venous thromboembolism (VTE) has been demonstrated. The number of studies, however, is small, and most of them are restricted to Caucasian populations. In this case control study, matched for age, sex and ethnicity, we investigated the plasma levels of fibrinogen, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, vWF and the ABO blood group (BG) in the thrombotic risk. It was analyzed 175 patients with VTE (122 women and 53 men), median age 36 years (13-63), followed at the hemostasis outpatient clinic at the State University of Campinas – UNICAMP, between July 2002 and July 2005. In univariate analysis, elevated levels of FVIII (OR: 5.3 95%CI 2.9-9.6), FvW (OR: 4.9 95%CI 2.7-8.9), FIX (OR: 2.4 95%CI 1.3-4.4), FXI (OR: 2.1 95%CI 1.1-4.0) and non O BG (OR: 3.0 95%CI 1.9-4.6) were risk factors for VTE. FVIII, FvW and non O BG were associated with the risk both in lower limbs and unusual sites of disease. Analysis of all these variables by stepwise selection criteria showed FVIII (OR:3.1 95%CI 1.6-6.0), FvW (OR:2.8 95%CI 1.4-5.4) and non O BG (OR:2.2 95%CI 1.3-3.5) as independent risk factors for VTE, and FIX and FXI increased synergistically the risk of thrombosis of these variables. Risk of recurrence was conferred by FIX (OR:4.7 IC95% 1.8-11.9) and FXI (OR:3.4 IC95% 1.8-8.7). The FVIII plasma levels determinants are not well established. Since LRP (Low density lipoprotein receptor related protein) has a role in the catabolism of FVIII, we evaluated the C200T, A775P and, D2080N polymorphisms in the gene coding of this protein, as risk factor for VTE and their influence upon the levels of FVIII and vWF. There was no difference regarding the prevalence of these polymorphisms between patients and controls. However, in the control group, the DN genotype, of the D2080N polymorphism, was associated with lower concentrations of FVIII (77.4 UI/dl) and vWF (70.2 UI/dl), when compared to DD genotype (127 UI/dl e 108.4 UI/dl, respectively $p < 0.05$). In conclusion, in these Brazilian miscigenous population, increased levels of FVIII, FvW, FIX, FXI and non O BG were associated with VTE risk and the D2080N polymorphism, in the LRP gene, influenced plasma levels of FVIII and vWF.



1- INTRODUÇÃO

1.1- A cascata da coagulação: um modelo revisado

O sistema hemostático tem por função fornecer uma potente, porém localizada resposta à injúria vascular e, conseqüente bloqueio do sangramento. Este sistema deve estar em perfeito equilíbrio para evitar dois extremos patológicos, que são a hemorragia e a hipercoagulabilidade.

O ponto central do sistema hemostático está na cascata da coagulação que consiste em uma série de reações enzimáticas, onde zimogênios (fatores da coagulação) são seqüencialmente ativados em uma superfície fosfolipídica, culminando na formação do coágulo de fibrina.

No modelo clássico da coagulação, a ativação da cascata da coagulação é feita através de duas vias: via extrínseca e via intrínseca. Na primeira a ativação é desencadeada pela formação do complexo fator tecidual (FT) e fator VII (FVII), que se torna ativado (FVIIa). Na via intrínseca a exposição dos fatores de contato (calicreína, cininogênio de alto peso molecular e fator XII) a uma superfície de contato negativa deflagra o processo. As duas vias convergem na ativação do fator X (FX), que converte a protrombina (FII) em trombina. (Macfarlane, 1964)¹

O modelo clássico considerava as duas vias da coagulação como mecanismos isolados e independentes. Sob esta ótica algumas dúvidas emergiam, como a ausência de sangramento em indivíduos com deficiência dos fatores da via de contato, em contrapartida à presença de doença hemorrágica grave naqueles com deficiências nos fatores VIII (FVIII) e IX (FIX), uma vez que o modelo clássico afirmava que os fatores de contato eram essenciais para ativação da via intrínseca. Do mesmo modo, a ativação da coagulação pelo complexo FVIIa-FT seria suficiente para formação do coágulo de fibrina, na deficiência da via intrínseca.

¹ Macfarlane RG. *apud* Bouma BN, Von dem Borne PAK, Meijers JCM. Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis - a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:24-5.

Através de estudos de Gailane e Brozer (1991), simultâneos aos estudos de Naito e Fujikawa (1991), foi demonstrado que a ativação fisiológica do fator XI (FXI) é mediada pela trombina por um processo de “feedback” positivo. Estes achados levaram a formulação de um novo modelo de coagulação (figura 1).

O processo de coagulação fisiológica é iniciado pelo complexo FT-FVIIa, que ativa o F IX e FX. Após a geração das primeiras moléculas de FX ativado (FXA), a mesma sofre ação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI-tissue factor pathway inhibitor), que inibe a via extrínseca pela formação de complexos com o FXa, FVIIa e FT (Broze, 1992).

Apesar da inibição precoce da via extrínseca, a formação de pequenas concentrações de trombina pela ação do FVIIa-FT, denominada geração primária de trombina, é insuficiente para manutenção de uma hemostasia adequada. No entanto, é capaz de ativar o FXI, na membrana plaquetária, através da ligação deste fator ao receptor de glicoproteína plaquetária Ib-IX-V (Baglia et al., 2002).

A partir daí reinicia-se a cascata da coagulação, ativada pela via intrínseca: o FXI ativado (FXIA) ativa o FIX que, por sua vez forma um complexo com o FVIII ativado (FVIIIa), para em seguida ativar o FX. O FXa, tendo o fator V ativado (FVa) como cofator, converte o FII em trombina. A trombina por sua vez atua sobre o fibrinogênio, gerando os monômeros de fibrina, que serão polimerizados para formar o coágulo de fibrina.

A formação da trombina decorrente da ativação através do FXI, é denominada de geração secundária de trombina. As altas concentrações de trombina ativam o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI-thrombin activable fibrinolysis inhibitor). Este inibe a ativação do plasminogênio pela remoção de resíduos carboxi-terminais de lisina da molécula de fibrina, local de ligação e ativação do plasminogênio (Von dem Borne et al., 1997).

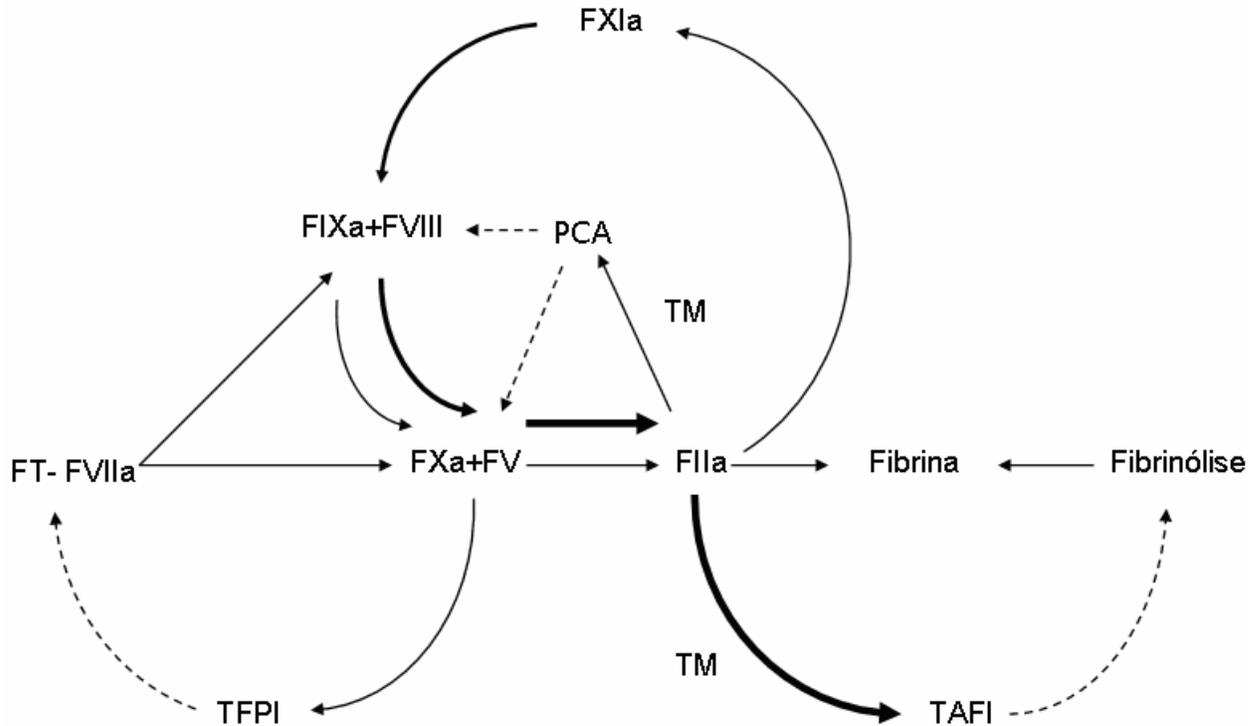


Figura 1- Modelo revisado da coagulação.

Linhas contínuas representam ativação. Linhas tracejadas indicam inibição. Detalhes descritos no texto. (adaptado de Bolman et al., 1998)

Nos últimos anos houve um aumento no conhecimento sobre os mecanismos de ação dos fatores da coagulação. Em um modelo de coagulação *in vitro* foi demonstrado que o FIX e FX, ativados pelo complexo FVII-FT, desempenham papéis distintos, porém complementares na coagulação. O FX teria pouco efeito na formação da trombina, porém uma extrema importância para a ativação plaquetária. Por outro lado, o FIX ativado (FIXa) promove a formação de fibrina de uma forma rápida e efetiva, na superfície plaquetária ativada pelo FX (Hoffman et al., 1995).

Dentro do que foi descrito, pode-se concluir que o modelo revisado da coagulação difere do clássico nos seguintes aspectos:

- Os fatores da coagulação são integrados em uma via única, iniciada pelo FT-FVIIa e os fatores de contato não são necessários em momento algum.
- A geração primária de trombina não é capaz de efetivar a coagulação e, para isso, é necessário a geração adicional de trombina, que é feita com a participação do FXI, FIX e FVIII.
- Fica evidenciada a importância do FXI na coagulação, tanto para geração secundária de trombina, como também na supressão da fibrinólise, mediada pelo TAFI.

1.2- Mecanismos inibitórios da coagulação

A coagulação sanguínea é cuidadosamente controlada por mecanismos inibitórios, que tem por objetivo manter o sangue fluído no interior do vaso. Há dois tipos de mecanismos inibitórios na regulação da hemostasia: o sistema de anticoagulantes naturais e o inibidor da via do fator tecidual. Os anticoagulantes naturais são representados pela antitrombina (AT), pela proteína C (PC) e pela proteína S (PS).

A AT faz parte da família dos inibidores serino-proteases, também chamadas de serpinas. A mesma inibe a formação da fibrina, através da ligação e inativação da trombina, assim como do FIXa, FXa, FXIa e FXIIa. Esta reação é potencializada pela ligação da AT com a heparina (Blajchman et al.,1992).

A PC e PS são glicoproteínas plasmáticas, vitamina K dependentes, produzidas no fígado. O complexo trombomodulina-trombina ativa a PC na superfície das células endoteliais, que por sua vez limita a geração de trombina ao inativar os co-fatores FVa e FVIIIa (Dahlbäck, 1995).

A PS atua como co-fator não enzimático da PC ativada (PCA), na inibição dos fatores VIIIa e Va (Dahlbäck, 1995). Além disso, a PS inativa o FVa e FXa, por ação independente da PCA (Hackeng et al., 1994).

O inibidor do fator tecidual exerce sua ação através da formação de um complexo quartenário, resultante da ligação FXa-TFPI ao FVIIa-FT (Broze, 1992).

1.3- Tromboembolismo venoso: aspectos gerais

A trombose é definida como um processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada da resposta hemostática normal do organismo, podendo envolver tanto o território venoso quanto o arterial (Loscalzo, 1995). O tromboembolismo venoso (TEV) é considerado uma doença comum, com incidência anual de um a três casos por 1000 indivíduos (Silverstein et al., 1998; Hanson et al., 1997). Na população brasileira se estima uma prevalência de 0,6 casos por 1000 habitantes (Maffei, 1995).

A incidência do TEV aumenta com a idade, com taxas que variam de um para 100.000 durante a infância a um para 100, em idosos (Rosendaal, 1997). Quanto ao sexo, a incidência da doença é aproximadamente igual em homens e mulheres (Fowkes et al., 2003; Nordström et al., 1992).

Um estudo que incluiu diferentes grupos étnicos demonstrou uma maior incidência anual de TEV entre norte-americanos de origem africana (29/100.000) e caucasóide (23/100.000), quando comparados aos hispânicos (14/100.000) e asiáticos (6/100.000) (White et al., 1998).

Virchow (1856)², ainda no século XIX, descreveu os três mecanismos envolvidos na patogênese da trombose: lesão do endotélio vascular, alteração do fluxo sanguíneo e/ou, anormalidades dos componentes do sangue. Na trombose venosa predominam a alteração do fluxo sanguíneo, lento e sujeito a estase, além de alterações dos constituintes do sangue.

² Virchow R. *apud* Crowther, MA, Kelton, JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003; 128(2):134-8.

O TEV manifesta-se através de duas formas clínicas: trombose venosa profunda e embolia pulmonar (Hampton, 2001). A primeira afeta com maior frequência as veias profundas do membro inferior, porém pode acometer outros sítios como: membro superior, vasos cerebrais, sistema portal hepático, renal e retiniano (Carter JC, 1994).

Os achados clínicos da doença são: edema, eritema e aumento da temperatura do membro afetado (Growther e McCourt, 2004). A trombose que afeta as veias distais do membro inferior raramente causam sintomas; por outro lado, 80% dos episódios sintomáticos envolvem as veias proximais (Kearon, 2003).

A embolia pulmonar geralmente é originada pelo desprendimento do trombo da parede do vaso do membro inferior para a vasculatura pulmonar. Pode ser uma complicação fatal da trombose venosa profunda, ocorrendo em 12% destes pacientes (Anderson et al., 1991).

A síndrome pós-flebítica é a complicação mais frequente do TEV, ocorrendo em 20 a 50% dos casos nos primeiros dois anos da doença. Está relacionada a uma alta morbidade, sendo caracterizada por dor crônica, edema e nos casos mais graves, ulceração no membro afetado (Kahn e Ginsberg, 2004).

A incidência cumulativa de recorrência do TEV é da ordem de 12% a 25% após 5 anos (Christiansen et al., 2005; Prandoni et al., 1996; Hanson et al., 2000). O risco desta complicação é maior imediatamente após o episódio agudo, assim como nos pacientes sem fatores de risco precipitantes (Baglin et al., 2003) e naqueles nos quais há um fator de risco permanente, como no caso de neoplasia (Cushman et al., 2001), ou presença do anticorpo antifosfolípido (Levine et al., 2002).

O tratamento do TEV baseia-se em terapia anticoagulante, com duração de 12 semanas a seis meses (British Committee for Standards in Haematology, 1998). O anticoagulante permite a estabilização e/ou lise endógena do trombo, assim como previne a formação de novos trombos, de embolia pulmonar, e de recorrência da trombose (Kearon, 2003).

1.4- Trombofilia hereditária

A trombofilia é caracterizada como uma tendência à formação de trombos, e pode decorrer de fatores de risco genéticos ou adquiridos. Os fatores de risco adquiridos são representados por certas condições tais quais: imobilização, gravidez, câncer, uso de hormônio sexual feminino, trauma, cirurgia, síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAAF), dentre outros (Rosendaal, 1999a; Robertorye e Rodgers, 2001).

A trombofilia hereditária decorre de defeitos genéticos em um ou mais mecanismos de anticoagulação, sendo classificados em deficiência de PC, PS, AT, mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden), mutação G20210A no gene do FII e disfibrinogenemia (Rosendaal, 1999a ; Robertorye e Rodgers, 2001).

A trombofilia hereditária deve ser suspeitada nas seguintes situações: indivíduos jovens (abaixo de 45 anos) que apresentaram um episódio tromboembólico venoso único ou recorrente, ou naqueles não expostos a um fator de risco adquirido, ou ainda em mulheres com história de abortos de repetição (Seligsohn e Lubetsky, 2001).

O TEV é uma doença multifatorial onde é necessário a interação dinâmica entre fatores de risco genéticos e adquiridos. Uma vez que várias mutações em genes distintos interagem, amplificando o risco trombótico, o TEV é também uma patologia multigênica (Rosendaal, 1999b; Franco e Reitsma, 2001).

Da mesma forma há aumento do potencial de trombose quando portadores de trombofilias hereditária são expostos a fatores de risco adquiridos; é o caso da associação Fator V de Leiden e uso de anticoncepcional hormonal (Vandenbroucke et al., 1994) ou das deficiências dos inibidores da coagulação e gestação (Friederich et al., 1996), dentre outras.

A instalação da trombose venosa na vigência de fatores de risco hereditários deve-se a um desarranjo na geração ou neutralização da trombina. Enquanto a deficiência de AT acarreta uma redução da neutralização da trombina, as deficiências de PC e PS levam a uma maior geração deste fator da coagulação (Seligsohn e Lubetsky, 2001).

A mutação G20210A no gene do FII, caracterizada pela substituição da guanina pela adenina na posição 20210 do gene deste fator, resulta em elevações plasmáticas do FII (Poort et al., 1996). Foi demonstrado em estudos *in vitro*, que concentrações elevadas deste fator contribuem para o aumento nos níveis de trombina (Butenas et al., 1999). Por outro lado, a elevação do FII interfere com o efeito inibitório da PCA sobre o FVa, outro fato que corrobora para a instalação da trombose (Sminov et al., 1999).

O fator V de Leiden (FV de Leiden) resulta da substituição da guanina pela adenina na posição 1691 no gene do FV (Bertina et al., 1994). Conseqüentemente, há perda de um dos sítios de clivagem deste fator, o que resulta em taxa reduzida de inativação do FVa pela PCA e maior geração de trombina (Heeb et al., 1995).

A prevalência das anormalidades trombofílicas entre indivíduos saudáveis, depende em grande parte da população analisada. O FV de Leiden e a mutação G20210A no gene do FII ocorrem em aproximadamente 5% daqueles com ascendência caucasóide; já, entre asiáticos e africanos a taxa de ocorrência é praticamente nula (De Stefano et al., 1998; Rees et al., 1995, Rosendal et al., 1998). Quanto aos inibidores da coagulação, não há dados sobre a prevalência da deficiência de PS. Entretanto, a prevalência das deficiências de AT e PC é de 0,2% (Wells et al., 1994; Tait et al., 1994).

Nos pacientes com TEV a prevalência total das trombofilias hereditárias varia de acordo com os critérios de seleção, tais como: história familiar positiva para a doença, episódios espontâneos ou recorrentes. Em indivíduos não selecionados, a prevalência é de 30%, enquanto nos casos enquadrados nestes critérios as taxas chegam a 70%. (Seligsohn e Lubetsky, 2001).

A etnia também parece ser um interferente para prevalência da trombofilia hereditária. Estudo de Patel et al. (2003) demonstrou que enquanto em negros a positividade para alguma destas anormalidades é de 9%, esta taxa chega a 30% em caucasóides.

As deficiências de AT, PS e PC são encontradas em 1,9; 2,3 e 3,7% dos pacientes não selecionados com TEV, respectivamente (Seligsohn e Lubetsky, 2001). O FV de Leiden é a forma mais comum de trombofilia hereditária, ocorrendo em 20-50% dos pacientes com TEV (Koster et al., 1993; Griffin et al., 1993). Entretanto, esta mutação tem menor potencial trombogênico do que os defeitos dos anticoagulantes naturais. Enquanto o risco trombótico é de dois para o FV de Leiden, nas deficiências dos inibidores naturais o mesmo é de cerca de oito (Martinelli et al., 1998a). No entanto, estudos que avaliaram o risco de TEV em homocigotos para o FV de Leiden mostraram um acréscimo no risco trombótico que varia de 10 (Svensson et al., 1997) a 80 vezes (Rosendaal et al., 1995). A mutação G20210A no gene do FII é encontrada em 6% dos pacientes não selecionados e, em 18% nos selecionados. O risco relativo de TEV associado a esta mutação é de cerca de três (Poort et al., 1996).

A manifestação clínica mais frequente na trombofilia hereditária é a trombose venosa, envolvendo em 90% dos casos as veias profundas dos membros inferiores, associada ou não a embolia pulmonar. O acometimento das veias intra-abdominais e cerebrais, enquanto raro, é característico destes defeitos genéticos. O primeiro episódio da doença ocorre antes dos 45 anos de idade, sendo que em 30 a 60% dos casos há coexistência com fatores de risco adquiridos. Pacientes homocigotos para deficiências de PC e PS apresentam formas clínicas graves em idade mais precoce, como a púrpura neonatal fulminante (Lane et al., 1996; De Stefano et al., 1996).

1.5- Fatores da coagulação e tromboembolismo venoso

Nos últimos anos outras anormalidades da coagulação tem sido descritas como potencialmente trombogênicas. Estas condições são representadas por níveis elevados de certos fatores da coagulação: fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX e FXI.

O aumento do fibrinogênio é um fator de risco bem estabelecido para trombose arterial (Kannel et al., 1987). Recentemente, Doutremepuich et al. (1998) demonstraram aumento do risco de complicações tromboembólicas, arteriais e venosas, em cobaias, após infusão de fibrinogênio. Entretanto, há escassez de dados relacionando este fator a trombose venosa em humanos.

Koster et al. (1994), assim como Kamphuisen et al. (1999) analisaram, respectivamente, 199 e 474 pacientes caucasóides após o primeiro evento de trombose venosa profunda e demonstraram que a elevação do fibrinogênio acima de 5 g/l acarretou acréscimo de quatro vezes no risco trombótico. Por outro lado, em um estudo prospectivo, com uma ampla casuística, não foi mostrado associação entre altos níveis de fibrinogênio e risco de TEV (Tsai et al., 2002).

O aumento do FVII já foi demonstrado, através de estudo prospectivo, ser um fator de risco para doença arterial isquêmica (Meade et al., 1993). Boyer et al., (1986) demonstraram aumento deste fator em pacientes com trombose venosa profunda, quando comparados a indivíduos normais. No entanto, um estudo caso-controle envolvendo 199 indivíduos com trombose venosa, não demonstrou relação entre este fator e risco trombótico (Koster et al., 1994).

O maior número de relatos na literatura sobre a relação entre aumento dos fatores de coagulação e trombose venosa refere-se ao FVIII. Em um estudo caso-controle envolvendo 301 pacientes após o primeiro episódio de TEV, verificou-se que aqueles com níveis deste fator acima de 150 UI/dl apresentavam um risco cinco vezes maior de desenvolver a doença (Koster et al., 1995a).

Níveis elevados do FVIII em pacientes após episódio único ou múltiplo de trombose conferiram um risco de TEV de 5,4 e 22%, respectivamente. Observou-se que, para cada elevação de 10 UI/dl na dosagem do FVIII no plasma, o risco para um primeiro episódio de trombose ou episódios recorrentes aumenta para 10% e 24%, respectivamente (Kraaijenhagen et al., 2000).

Kyrle et al. (2000) analisaram 360 pacientes após o primeiro episódio de TEV, por um período de 30 meses. A probabilidade de recorrência em dois anos entre indivíduos com FVIII acima do percentil 90 (P90) foi de 37%, comparada a 5% dentre aqueles com níveis abaixo desse percentil, correspondendo a um risco relativo de recorrência de 5,5. Após ajuste de variáveis confundidoras (idade, sexo, trombofilia hereditária), este risco permaneceu significativo.

É importante frisar que apesar do FVIII comportar-se como uma proteína de fase aguda, o risco trombótico a ele relacionado permaneceu inalterado após correção pelos níveis de proteína C reativa (PCR), um marcador sensível de processo inflamatório agudo (Kamphuisen et al., 1999).

Da mesma forma foram realizadas medições seriadas do FVIII em indivíduos com TEV na ocasião do evento e nos meses subsequentes, não sendo observada diferenças significativas nos níveis deste (O' Donnell et al., 2000), o que corrobora a hipótese de que a elevação do FVIII não é apenas decorrente de um processo inflamatório agudo.

O fator de von Willebrand (FvW) e o grupo sanguíneo ABO (GS ABO) são os principais determinantes das concentrações séricas do FVIII. O FVIII circula no plasma ligado ao FvW, através de ligações não covalentes, inibindo sua remoção precoce da circulação (Wise et al., 1991).

Estruturas oligossacarídeas ABO (H) já foram identificadas na molécula do FvW, podendo assim não só influenciar a variabilidade do FvW, mas também do complexo FVIII-FvW (Matsui et al., 1992). Indivíduos do GS não-O apresentam níveis, cerca de 25% mais elevados do FvW e FVIII, quando comparados àqueles do GS O (Souto et al., 2000).

Estudo com gêmeos demonstrou que 66% da variação das concentrações plasmáticas do FvW e 57% do FVIII são determinadas geneticamente. As variações genéticas do FVIII e FvW devido ao efeito do GS ABO são 30% e 12%, respectivamente (Orstavik et al., 1985).

Foi demonstrado um efeito direto do locus ABO sobre os níveis do FvW e FVIII (Souto et al., 2000). Entretanto, os mecanismos pelos quais o GS ABO influenciam a variabilidade plasmática destes fatores da coagulação ainda não estão totalmente claros. A atuação dos antígenos ABO sobre o FvW poderia ocorrer na síntese, secreção ou clearance desta molécula.

Infusão de desmopressina (DDAVP), em sujeitos com diferentes GS ABO, não mostrou diferenças na secreção do FvW entre sujeitos do GS O e não-O, sugerindo que o GS ABO não afeta a secreção desta proteína (Scott et al., 1993).

Estudo em portadores de doença de von Willebrand mostrou que a razão FVIII/FvW permite discriminar o mecanismo que leva à deficiência do FvW. Quando a razão está acima de um, a síntese deste fator é reduzida, e quando a razão é um, o clearance está aumentado (Eikenboom et al., 2002).

A razão FVIII:FvW, cerca de um, foi a mesma nos diversos genótipos ABO, sugerindo que o efeito do locus ABO nos níveis plasmáticos destes fatores seja mediado pelo clearance (O'Donnell et al., 2002).

Foi comprovado que os níveis plasmáticos do FvW variam conforme a expressão dos antígenos H na molécula deste fator. Enquanto indivíduos do GS O e A2, onde é maior a expressão do antígeno H, apresentam níveis inferiores deste fator; naqueles com genótipo não O, onde a expressão deste antígeno é menor, os níveis do FvW estão aumentados (O'Donnell et al., 2002).

Estudos atuais sugerem que a enzima metaloprotease ADAMTS 13, responsável pelo catabolismo do FvW, possa explicar os mecanismos que regem a associação GS ABO e FvW. Bowen, (2003) mostrou que a proteólise exercida por esta enzima sobre o FvW difere entre os grupos sanguíneos, sendo maior para o FvW do GS O, comparado ao GS não O, na seguinte seqüência: O>B>A>AB.

Outros determinantes em menor grau que influenciam positivamente as dosagens plasmáticas do FVIII são: idade avançada, sexo feminino, etnia negra, índice de massa corporal, diabetes *mellitus*, fibrinogênio e triglicérides (Conlan et al., 1993). Algumas situações podem causar o aumento transitório do FVIII, como é o caso da estimulação adrenérgica secundária ao exercício físico. A elevação sustentada deste fator é observada na gravidez, cirurgia, inflamação crônica, câncer, doença renal, hepática e hipertiroidismo. Na maioria destas condições, o aumento do FvW ocorre simultaneamente ao FVIII (Kamphuisen et al., 2001a).

Apesar de estar bem descrita a associação entre FVIII, FvW e GS ABO, não é sabido ao certo o papel real de cada uma destas variáveis na ocorrência de TEV. Apenas um estudo caso-controle investigou as três variáveis e demonstrou o FVIII, FvW e GS

ABO (não O) como fatores de risco para trombose. Após análise multivariada, onde as três variáveis foram corrigidas entre si, o efeito do FvW desapareceu completamente. No entanto, não foi possível excluir definitivamente o GS ABO como fator de risco independente para trombose venosa (Koster et al., 1995a).

Estudos recentes mostraram agregação familiar de níveis elevados de FVIII, independente do GS ABO ou FvW, em famílias nas quais alguns integrantes haviam apresentado episódio de trombose venosa (Kamphuisen et al., 2000; Schambeck et al., 2001). Este fato permitiu inferir que o aumento do FVIII possa ter outra influência genética que não apenas do GS ABO. Por outro lado, não se detectou qualquer polimorfismo ou mutação nos genes do FVIII ou do FvW associados a atividade ou níveis antigênicos do FVIII (Kamphuisen et al., 2001b; Mansvalt et al., 1998; Bowen et al., 2001).

Trabalhos experimentais sugerem que o FIXa tem um papel crítico na instalação da trombose. Um estudo demonstrou a ocorrência de trombose disseminada em coelhos após a infusão de FIXa purificado (Gurewich et al., 1979)³. A utilização de anticorpo anti-FIXa, em modelo animal de trombose venosa, reduziu em quatro vezes o volume do trombo (Feuerstein et al., 1999). Philippou et al. (1996) ressaltaram o papel do FIX no desencadeamento da trombose, uma vez que a presença deste fator ativado foi responsável pelo desencadeamento da trombose após utilização do complexo protrombínico.

Van Hylckama Vlieg et al. (2000) relataram risco duas a três vezes maior de trombose em pacientes com FIX acima de 120 U/dl, quando comparados àqueles com níveis abaixo deste valor. Esta predisposição permaneceu constante após ajuste de demais fatores de risco como idade, uso de anticoncepcional hormonal e exclusão de anormalidades genéticas reconhecidamente protrombóticas.

É descrito na literatura associação entre elevações do FIX e risco de recorrência de TEV. Após seguimento prospectivo de pacientes com a doença, a taxa de recorrência em três anos foi de 23% entre aqueles com FIX acima de 138UI/dl e 11% naqueles com níveis inferiores a esse valor (Weltterman et al., 2003).

³ Gurewich V., et al. *apud* Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. Br J Haematol 2001; 115(3):507-513.

de Visser et al. (2001) analisaram pacientes após o primeiro episódio de trombose venosa e detectaram um risco de cerca de duas vezes maior desta patologia entre indivíduos com dosagem de FX maior que 126 U/dl. Entretanto, após análise multivariada com demais fatores dependentes de vitamina K (FII, FVII e FIX), o risco desapareceu.

Neste estudo foi também avaliada a influência de variações genéticas sobre os níveis de FX. No entanto não se encontrou qualquer correlação entre níveis plasmáticos e polimorfismos na região promotora do gene deste fator (de Visser et al., 2001).

As evidências iniciais que mostraram associação entre elevação do FXI e trombose venosa advém de estudos que relataram ativação da cascata da coagulação *in vivo* induzida pela infusão de FXIa (Cate et al., 1996).

Um estudo caso-controle, com pacientes após primeiro episódio de TEV, mostrou maior risco da doença em pacientes com níveis de FXI acima do P90 (121%) quando comparados àqueles com níveis inferiores. Após ajuste de variáveis confundidoras o risco permaneceu inalterado (Meijers et al., 2000).

Um fato interessante é que o TAFI foi considerado um fator de risco independente para TEV, após estudo nesta mesma população (Van Tilburg et al., 2000).

1.6- Classificação dos estados protrombóticos hereditários

Recentemente foi proposto um sistema de classificação simples para as trombofilias hereditárias. Esta classificação divide as trombofilias em dois grupos: aquelas associadas a níveis reduzidos de inibidores da coagulação e as relacionadas ao aumento das concentrações ou função dos fatores da coagulação (tabela 1). A grande vantagem desta classificação é agrupar patologias protrombóticas com o mesmo comportamento clínico.

Apesar das trombofilias do segundo grupo serem mais prevalentes nos pacientes com TEV, o risco trombótico exercido pelas mesmas é menor, quando comparado às anomalias do primeiro grupo. Além do que, diferente do primeiro grupo, patologias do segundo grupo, assumem pouca importância clínica na recorrência da doença (Crowther e Kelton, 2003).

Tabela 1- Classificação dos estados protrombóticos hereditários

Grupo I	Trombofilias com deficiência dos inibidores da coagulação
	- Deficiência de proteína C
	- Deficiência de proteína S
	- Deficiência de antitrombina
Grupo II	Trombofilias com aumento dos níveis ou função dos fatores da coagulação
	- Mutação G20210A no gene do FII
	- Fator V de Leiden
	- Níveis elevados de Fibrinogênio, FVIII, FIX e FXI
	- Disfibrinogenemias

1.7- LRP e o catabolismo do FVIII

A LRP (LDL-“receptor related protein”) é um dos membros da família dos receptores LDL (“low density lipoprotein”). Estão também inclusos nesta classificação os receptores VLDL (“very low density lipoprotein”), e a glicoproteína 330 (Strickland et al., 1995).

A LRP é uma proteína de superfície celular com 4.544 aminoácidos e peso molecular de 503Kda, o que a caracteriza como uma das maiores estruturas protéicas entre os receptores de superfície celular já reconhecidos. A designação LRP deve-se à homologia estrutural, da seqüência de domínios rico em cisteína, com a molécula do receptor de LDL (Herz et al., 1988).

Este receptor é expresso principalmente no fígado, mas também foi detectado em outros tecidos humanos: células musculares lisas, fibroblastos, neurônios e astrócitos, epitélio do trato gastrointestinal, células gonadais , placentárias e até mesmo na medula óssea (Moestrup et al., 1992).

A LRP é um receptor endocítico do mais amplo espectro conhecido, uma vez que media o catabolismo de múltiplos ligantes, como lipoproteínas, proteinases, além de toxinas bacterianas e, alguns tipos de vírus (Strickland et al., 1995).

Este receptor assume funções importantes na biologia vascular. Remove da circulação os ativadores do plasminogênio e, deste modo regula a atividade fibrinolítica do organismo (Strickland et al., 1995). Associado a isso, a LRP cataboliza a trombospondina, molécula envolvida na agregação plaquetária, crescimento de tecido muscular liso e angiogênese (Mikhailenko et al., 1995).

O estudo de Saenko et al. (1999) acrescentou uma nova função a este receptor ao demonstrar, *in vitro*, que o mesmo é responsável pela internalização e degradação do FVIII. Um trabalho em modelo animal corroborou este achado, por detectar maiores concentrações do FVIII entre camundongos deficientes no receptor LRP, em relação aos controles (Bovenchen et al., 2003a).

A região do gene do FVIII envolvida com a ligação com o receptor LRP compreende os domínios A2 resíduo 484-509; A3 resíduo 1804-1834 e C2 resíduo 2303-2332 (Saenko et al., 1999; Lenting et al., 1999; Bovenchen et al., 2003b).

O gene codificador do receptor localiza-se no cromossomo 12q13-q14, compreende aproximadamente 92Kb de DNA genômico e é formado por 89 éxons (Van Leuven et al., 1994) com tamanho variando entre 65 a 925 pb. Os íntrons apresentam entre 82 pb a 8Kb (Van Leuven et al., 1994).

Inúmeros polimorfismos foram descritos neste gene (Van Leuven et al., 1998; Van Leuven et al., 2001). Alguns destes mostraram relação com certas doenças. É o caso do polimorfismo C766T, no éxon 3, associado ao câncer de mama entre mulheres caucasóides (Benes et al., 2003), e também com a doença de Alzheimer (Hollenbach et al., 1998).

Em estudo realizado com pacientes jovens portadores de doença arterial coronariana demonstrou-se a relação entre a doença e o polimorfismo C200T, no éxon 22 do gene LRP. Indivíduos coronariopatas apresentaram maior frequência do genótipo CC, quando comparados aos controles, o que conferiu a este genótipo um risco 1,5 vez maior da doença (Pocathikorn et al., 2003).

Morange et al. (2004) analisaram a associação entre o polimorfismo D2080N, no éxon 39, e as concentrações plasmáticas de FVIII e FvW entre familiares saudáveis. Os indivíduos com o alelo N apresentaram níveis inferiores destes fatores da coagulação. Neste mesmo trabalho, não foi demonstrado qualquer polimorfismo na região de ligação do gene do FVIII com o receptor LRP.

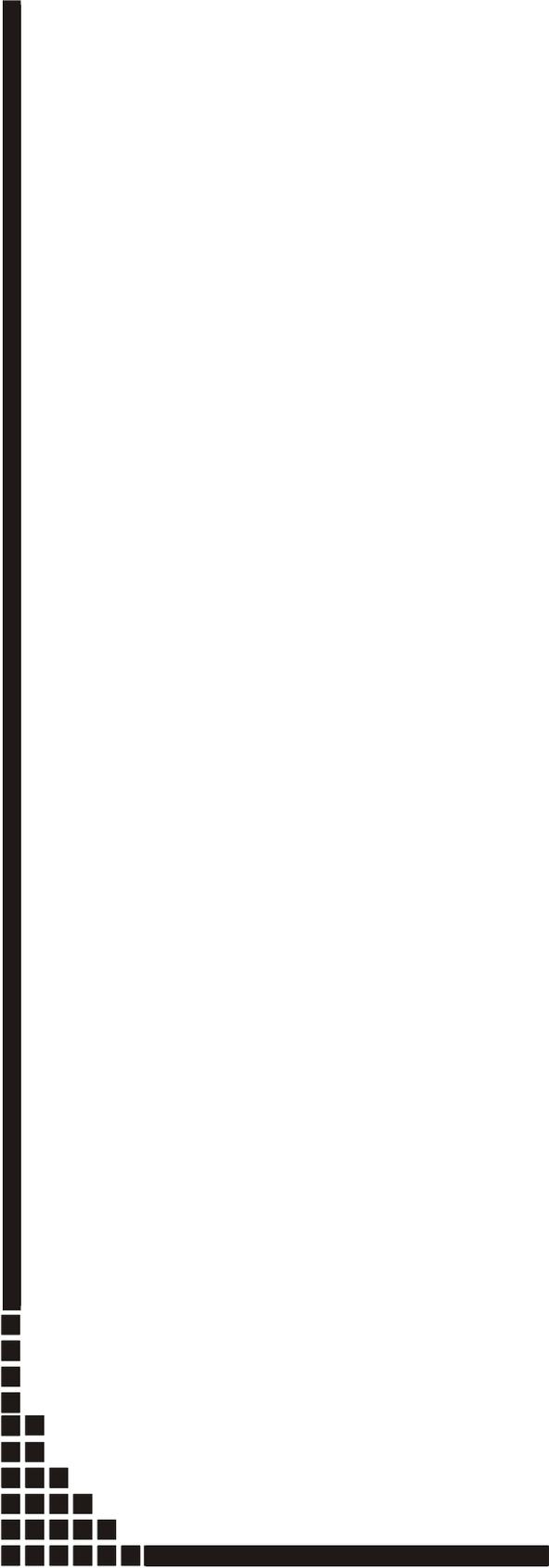
Foi descrito previamente que a maioria dos sujeitos com TEV e FVIII elevado apresentam a razão FVIII/FvW de um (Kamphuisen et al., 2001b). Assim, sugere-se que a origem de aumento nas concentrações do FVIII no TEV decorra de um prejuízo no clearance plasmático deste fator.

Apesar de teoricamente o FvW ser capaz de ligar-se a todo FVIII plasmático, uma porção deste fator permanece livre. Um estudo que avaliou pacientes trombóticos com aumento de FVIII mostrou uma redução da fração livre deste fator (Schambeck et al., 2004). É sabido que a catabolização desta fração livre pelo receptor LRP é mais eficiente (Saenko et al., 1999).

Isto se deve ao fato de que todos os sítios de ligação desta fração do FVIII com a LRP são aproveitáveis, enquanto que no FVIII ligado, apenas o sítio A2 é disponível para a ligação com este receptor (Saenko et al., 1999; Lenting et al., 1999; Bovenschen et al., 2003b). Estas evidências reforçam um papel do clearance ineficiente associado a elevações do FVIII no curso do TEV.

O FvW e GS ABO influenciam as concentrações plasmáticas do FVIII. No entanto, estudos com famílias trombofílicas demonstraram agregação familiar de níveis elevados de FVIII que persistem após ajuste por estas variáveis. Este fato permite inferir a existência de outros fatores regulatórios sobre as concentrações do FVIII.

O conhecimento sobre a LRP demonstra que a mesma assume papel na formação da lesão vascular, manutenção da hemostasia, além do clearance do FVIII. Frente a isto parece interessante a inclusão deste gene nos estudos envolvendo estados protrombóticos e concentrações plasmáticas do FVIII.



2- JUSTIFICATIVA

O TEV é considerado um importante problema de saúde pública, fato que se deve à expressiva incidência e morbi-mortalidade desta patologia. Apesar da trombofilia hereditária ser mais prevalente em caucasóides, os estudos em afro-descendentes relatam uma freqüência semelhante da doença em ambas as etnias.

Os mecanismos etiológicos envolvidos no TEV ainda não estão totalmente elucidados, e os fatores pró-trombóticos, adquiridos ou hereditários, não são identificados em uma parcela dos pacientes com a doença. A presença de fatores predisponentes hereditários é ainda menor em pacientes afro-descendentes.

Nos últimos anos houve acréscimo de informações sobre a gênese da trombose venosa através de estudos que demonstraram associação entre esta doença e níveis plasmáticos de alguns fatores da coagulação. No entanto, o número de estudos é pequeno, sendo a maioria deles realizado em populações de ascendência caucasóide, particularmente a população holandesa (Leiden), o que não permite afirmar relação causal definitiva.

Apesar da identificação de alguns fatores envolvidos na gênese do aumento do FVIII, incluindo a influência genética, ainda não se elucidaram todos os mecanismos que podem contribuir para a variação deste fator no plasma.

Frente a essas prerrogativas, seria relevante a investigação de pacientes de outras etnias, para avaliar a associação entre o aumento de fatores da coagulação e trombose venosa, além dos mecanismos envolvidos nestas alterações. Os resultados provenientes deste estudo elucidarão novos fatores de risco para trombose em uma população miscigenada, o que corrobora para o avanço no conhecimento epidemiológico da doença.



3- OBJETIVOS

3.1- Gerais

Determinar se os níveis plasmáticos dos fatores da coagulação: fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX e FXI estão associados a um risco aumentado de TEV em pacientes de uma população brasileira miscigenada

3.2- Específicos

3.2.1- Analisar a relação entre os fatores da coagulação e o risco de TEV em diferentes subgrupos de uma população brasileira, classificada quanto ao sexo, idade (acima e abaixo de 35 anos), etnia (caucasóides e não caucasóides) e localização da trombose (membro inferior e outros sítios)

3.2.2- Avaliar o papel do FVIII, FvW e GS ABO no risco trombótico

3.2.3- Avaliar se há relação entre os fatores da coagulação, GS ABO e o risco de recorrência da trombose

3.2.4- Avaliar os polimorfismos C200T no éxon 22, A775P no éxon 14 e D2080N no éxon 39 do gene da LRP, como fator de risco para TEV nesta população

3.2.5- Analisar a influência destes polimorfismos sobre as concentrações do FVIII e FvW



4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Cálculo do tamanho amostral

Para obtenção de uma amostra final representativa da população a ser estudada, realizou-se o cálculo amostral, baseado em estudo caso-controle emparelhado (Hulley e Cummings, 1988). O mesmo foi realizado a partir de um estudo-piloto, com 50 pacientes e 50 controles, fixando o erro tipo I alfa de 0,05 e o erro tipo II beta de 0,20 (poder do teste de 80%). Os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Tamanhos amostrais para estudo caso-controle, por fator da coagulação

Fator da coagulação	Odds Ratio estimado	Tamanho amostral em cada grupo	Tamanho total (casos + controles)
FvW	3,9	60	120
Fibrinogênio	1,7	504	1008
Fator VII	1,0	indeterminado	-
Fator VIII	6,8	26	52
Fator IX	2,4	169	338
Fator X*	0.8	>1000	>1000
Fator XI	2,8	109	218

Considerando $p=10\%$, $\alpha=0,005$ e $\beta=0,20$. Referência: Hulley e Cummings (1998). * Fator X resultou em fator de proteção ($OR<1$)

Como seriam incluídos no estudo apenas pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o tamanho amostral requerido de mais de 500 pacientes, para avaliação do fibrinogênio como fator de risco para TEV, no tempo disponível para a realização da pesquisa seria inexecutável. Sendo assim, optou-se pela inclusão de um número menor de indivíduos, avaliando-se apenas os outros fatores da coagulação como fatores de risco para o TEV.

4.2- Pacientes e controles

Este é um estudo caso-controle, onde foram analisados pacientes em consulta de rotina no período de julho de 2002 a julho de 2005. Estes pacientes haviam sido admitidos previamente no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP com diagnóstico de trombose venosa, para tratamento anticoagulante ou diagnóstico de trombofilia, no período de janeiro de 1990 a outubro de 2004. Os pacientes foram reavaliados três meses após o término do tratamento anticoagulante e então, anualmente até julho de 2005.

Após o término da anticoagulação os pacientes foram submetidos a uma investigação de trombofilia hereditária (PC, PS, AT, FV de Leiden e mutação G20210A no gene do FII), e de SAAF. Aqueles com idade superior a 45 anos realizaram ainda exames de triagem para descartar neoplasia (ultra-som abdominal, radiografia de tórax, marcadores tumorais ou exames mais específicos como endoscopia digestiva e colonoscopia, de acordo com a história clínica).

Todos os pacientes tinham diagnóstico confirmado de trombose venosa, por método que variou de acordo com o sítio acometido. Para trombose de extremidades e de região cervical foi usada a flebografia ou ultra-som com doppler, enquanto na trombose do sistema portal ou cerebral utilizou-se tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear ou angiografia. O diagnóstico de embolia pulmonar foi baseado em achados de cintilografia pulmonar por ventilação e perfusão. A trombose de veias da retina foi estabelecida através de fundoscopia realizada por um oftalmologista.

Os episódios trombóticos que ocorreram em demais sítios venosos, que não os membros inferiores, foram denominados de trombose em sítio incomum ou não usual. Os casos de embolia pulmonar só foram considerados como sítio incomum, após exclusão de trombose em membro inferior.

Trombose recorrente foi considerada, quando um novo evento trombótico ocorria após o término do tratamento anticoagulante, ou a qualquer momento, em outro local que não o do evento primário.

Os critérios de elegibilidade foram a idade inferior a 70 anos e o tempo mínimo de três meses após a suspensão do anticoagulante. Os critérios de exclusão foram indivíduos na infância, presença de gravidez, câncer, doença renal, hepática, reumatológica, hipertireoidismo, SAAF e uso de drogas como corticóide, anticoncepcional hormonal (ACH) e terapia de reposição hormonal (TRH) no momento da coleta. Foi seguido o critério da Organização Mundial de Saúde, que classifica como infância o período da vida que vai do nascimento aos 10 anos de idade.

Todos os pacientes responderam a um questionário para se verificar a presença ou não de fatores de risco adquirido como fator desencadeante do evento trombótico. Foram registrados como fatores de risco adquiridos: cirurgia até três meses antes do episódio de TEV, hospitalização ou imobilização prolongada de mais de cinco dias, todas estas precedentes ao evento trombótico, puerpério, gravidez, uso de ACH ou TRH pós-menopausa na data da trombose.

A trombose espontânea foi definida, quando o paciente não apresentava nenhum destes fatores de risco como desencadeante. Os antecedentes familiares não foram considerados nesta classificação.

Os indivíduos-controle foram doadores de sangue matriculados no Hemocentro, emparelhados pelo sexo, grupo étnico e idade aproximada (diferença de até cinco anos) dos pacientes, e provenientes da mesma área geográfica dos pacientes. Foram excluídos doadores com história familiar ou pessoal de trombose venosa além de gravidez, câncer, doença renal, hepática, reumatológica, hipertireoidismo e uso de drogas como corticóide, ACH e TRH. Para classificação de etnia foi considerada a ascendência até a terceira geração e aspectos físicos (cor da pele, textura dos cabelos, formato nasal).

4.3- Coleta de sangue

O sangue para os exames de coagulação foi colhido de veia periférica em tubo Vacutainer, contendo citrato de sódio 3,8%, na proporção de 9:1. Após a coleta, o sangue foi centrifugado no máximo em 30 minutos, separado em alíquotas e congelado a -80°C até sua utilização.

O sangue para determinação do GS ABO e PCR foi colhido em tubos Vacutainer, contendo EDTA ou sem anticoagulante, respectivamente. A tipagem sanguínea ABO foi realizada por método “standard”, pelo sistema automático de microplaca PK-7200, da marca OLYMPUS. Os resultados foram expressos em tipo A, B, AB ou O. Para extração do DNA foi colhido sangue periférico, em tubo com EDTA

A determinação da PCR foi feita através de método imunológico nefelométrico (Dade Behring). Os pacientes e controles que apresentassem concentrações deste marcador acima de 1 mg/dl e níveis elevados de FVIII, FvW eram submetidos a uma nova coleta e somente inclusos no estudo, após normalização da PCR.

4.4- Protocolo de trombofilia

Para os estudos moleculares foi empregada a técnica de amplificação das regiões de cada gene pela reação em cadeia de polimerase (RCP) (Saiki et al., 1988), utilizando-se “primers” específicos. Após a extração do DNA, a RCP foi realizada em um ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer-Cetus Corp, Boston, MA, USA).

Para determinação da mutação G1691A no gene do FV, após amplificação do exon 10 realizou-se a digestão com a enzima de restrição *MnII* (Seixas et al, 1998). Os resultados foram descritos como normal, mutante heterozigoto ou mutante homozigoto.

Para detecção da mutação G20210A, no gene do FII, o fragmento amplificado da região 3’ foi digerido com a enzima *HindIII* (Arruda et al., 1997). Os resultados foram descritos como normal, mutante heterozigoto ou mutante homozigoto.

As atividades da PS e PC foram determinadas por método coagulométrico utilizando-se o Kit Stago®Protein S e Protein C (Stago, Asnière, France), respectivamente. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em porcentagem. A atividade da AT foi determinada por método amidolítico, utilizando-se o substrato cromogênico S-2338 (Kabivictum, Stockholm, Sweden). Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em porcentagem. Os valores de normalidade do

laboratório, estabelecidos em plasma de 50 indivíduos normais, foi de 70-140% para PC, 50-150% para PS e 75-105% para AT. A deficiência destas proteínas somente foi considerada mediante duas dosagens, em amostras coletadas em momentos diferentes, com valores diminuídos. Para confirmação de deficiência de PC ou PS administrou-se 10mg de vitamina K via oral, antes da nova coleta para repetição da dosagem.

A pesquisa de anticoagulante lúpico foi realizada por dois métodos de triagem, o tempo de coagulação com caulim (TCK) e, o “dilute Russel viper venom time” (dRVV-Viperquik LA-test, Organon Teknika), tendo-se o cuidado de proceder uma mistura a 50% com um plasma normal, para demonstrar a presença de um inibidor. No caso de um teste dRVV alterado, utilizou-se um teste confirmatório, o “dilute Russel viper venom” (Viperquik La Check, Organom Teknika). Todos os testes foram realizados em duplicata e o resultado considerado como positivo, apenas quando confirmado em duas amostras coletadas com um intervalo de seis semanas.

Os anticorpos anticardiolipina foram determinados no soro por método ELISA (enzyme linked immunoasorbent assay) sendo considerados negativos resultados com níveis inferiores a 5 U/ml tanto para IgG, IgM como anti- β_2 GP1 (Triplett et al., 1993). Foram utilizados controles positivos com concentrações conhecidas dos anticorpos. As amostras dos pacientes foram testadas em duplicata e a média considerada como resultado final, podendo ser positivo ou negativo. O resultado somente foi considerado positivo quando confirmado em duas amostras coletadas com um intervalo de seis semanas.

A determinação de PC, PS, AT e pesquisa de SAAF não foi realizada no grupo controle, pelo alto custo e a baixa prevalência na população normal.

4.5- Determinação dos fatores da coagulação

4.5.1- Fatores VIII, IX, XI

Para a determinação da atividade dos fatores de coagulação foi empregado o método coagulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente no fator a ser pesquisado (DiaMed, Cressier, Suíça) e reagentes para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), em coagulômetro de leitura foto-óptica Koagulab

32-S, do fabricante Ortho Diagnóatic Systems. Inicialmente foi executada uma curva-padrão (tempo de coagulação em segundos versus diluição), obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (DiaMed, Cressier, Suíça) em tampão veronal, com concentrações previamente determinadas pelo fabricante. Após a diluição das amostras em tampão veronal, as mesmas foram quantificadas, e os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão dos tempos em segundos. A curva foi previamente testada com controle normal e patológico. Os resultados foram expressos em UI/dl. Os valores de normalidade do laboratório, estabelecidos em plasma de 50 indivíduos normais, foi de 60-150 para FVIII, 50-150 para FIX e 60-140 para FXI.

4.5.2- Fatores VII e X

Para a determinação da atividade dos fatores VII e X foi empregado o método coagulométrico de um estágio, utilizando-se plasma deficiente no fator a ser pesquisado (Diagnostica Stago, Asnières-Sur-Seine, France), reagentes para determinação do tempo de protrombina (TP), em coagulômetro de leitura foto-óptica Koagulab 32-S, do fabricante Ortho Diagnóatic Systems. Inicialmente foi executada uma curva-padrão (tempo de coagulação em segundos versus diluição) obtida por diluições seriadas de um controle comercial normal (Diagnostica Stago, Asnières-Sur-Seine, France) em tampão veronal, com concentrações previamente determinadas pelo fabricante. Após a diluição das amostras em tampão veronal, as mesmas foram quantificadas e os resultados foram obtidos por interpolação na curva-padrão dos tempos em segundos. A curva foi previamente testada com controle normal e patológico. Os resultados foram expressos em UI/dl. Os resultados foram expressos em UI/dl. Os valores de normalidade do laboratório, estabelecidos em plasma de 50 indivíduos normais, foi de 70-130 para FVII e 70-120 para FX.

4.5.3- Fibrinogênio

A determinação deste fator foi realizada baseada no método descrito por Clauss, em que a concentração do fibrinogênio é proporcional ao tempo de coagulação obtido após a adição de trombina concentrada ao plasma. O “Kit” comercial utilizado foi o Fibriquik (Organon Teknika, Durham, North Carolina, USA). A curva de calibração foi construída através de diluições seriadas do controle comercial em tampão veronal, com concentrações previamente determinadas pelo fabricante. As amostras foram diluídas em tampão veronal na concentração de 1:10 e o tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição de trombina foi interpolado na curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg/dl. Os valores normais do laboratório foi de 150 a 400 mg/dl.

4.6- Determinação dos polimorfismos no gene da LRP

Após a extração do DNA, os polimorfismos no gene do LRP foram determinados pela RCP, utilizando-se “primers” específicos para as regiões a serem amplificadas, conforme descrito (Van Leuven et al., 1998; Van Leuven et al., 2001). Para realização das reações foi utilizado um termociclador automático (PTC 100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc MA, E.U.A).

4.6.1- Polimorfismo D2080N

Para a identificação do polimorfismo D2080N, localizado no éxon 39, foi realizada uma reação para um volume final de 30µl contendo 0,5µg de DNA, 2mM de MgCl₂, 20mM Tris-HCL, 50mM de KCL, 0,33mM de dNTP e 0,1pmol de cada “primer” (sense 5'-aagctgtactggtgcgatg-3' e anti-sense 5'-tcacctgtcactccagtagat-3'), e duas unidades da enzima taq DNA polimerase (Invitrogen).

A reação foi incubada por cinco minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 40 segundos de desnaturação a 94°C, 40 segundos para anelamento dos “primers” a 56°C e um minuto para extensão do DNA complementar a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento foi digerido utilizando-se três unidades da enzima de restrição *TaqI* (Pharmacia, MA, EUA). As amostras foram deixadas em banho maria a 65°C durante 12h e após procedeu-se a eletroforese em gel de agarose a 3%.

Na presença do alelo normal (D) houve clivagem do sítio de restrição pela enzima, formando dois fragmentos, com 106 e 44pb. Na presença do alelo mutante (N) não houve clivagem do sítio pela enzima, sendo visualizado apenas um fragmento de 150pb. Nos indivíduos heterozigotos (DN) verificou-se a presença de três fragmentos com 150,106 e 44pb (figura 2).

4.6.2- Polimorfismo C200T

Para a identificação do polimorfismo C200T, localizado no éxon 22, foi realizada uma reação para um volume final de 30µl contendo 0,5µg de DNA, 2mM de MgCl₂, 20mM Tris-HCL, 50mM de KCL, 0,33mM de dNTP e 0,1pmol de cada “primer” (sense 5’- gctcagatgagggcgagct-3’ e anti-sense 5’-tgggccaaggac-3’), e duas unidades da enzima taq DNA polimerase (Invitrogen).

A reação foi incubada por cinco minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 40 segundos de desnaturação a 94°C, 40 segundos para anelamento dos “primers” a 61°C e, um minuto para extensão do DNA complementar a 72°C.

Após a amplificação, o produto do RCP foi digerido, utilizando-se 3 unidades da enzima de restrição *MwoI* (Uniscience, MA, E.U.A). As amostras foram deixadas em banho maria a 60°C durante 12h e, após, separadas por eletroforese em gel de agarose a 3%.

Na presença do alelo normal (C) houve clivagem do sítio pela enzima, sendo observado um fragmento com 67 e 19pb. Na presença do alelo mutante (T) não houve clivagem do sítio, sendo observado apenas um fragmento de 86pb. Nos indivíduos heterozigotos (CT), observou-se a presença dos fragmentos de 86, 67 e 19pb (figura 3).

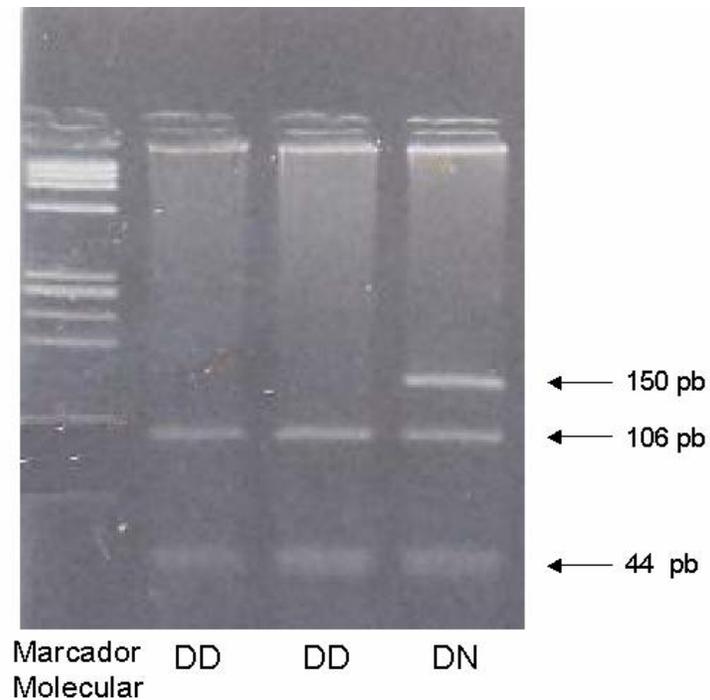


Figura 2- Digestão do polimorfismo D2080N, no gene da LRP.

DD = Homozigoto normal

DN = Heterozigoto

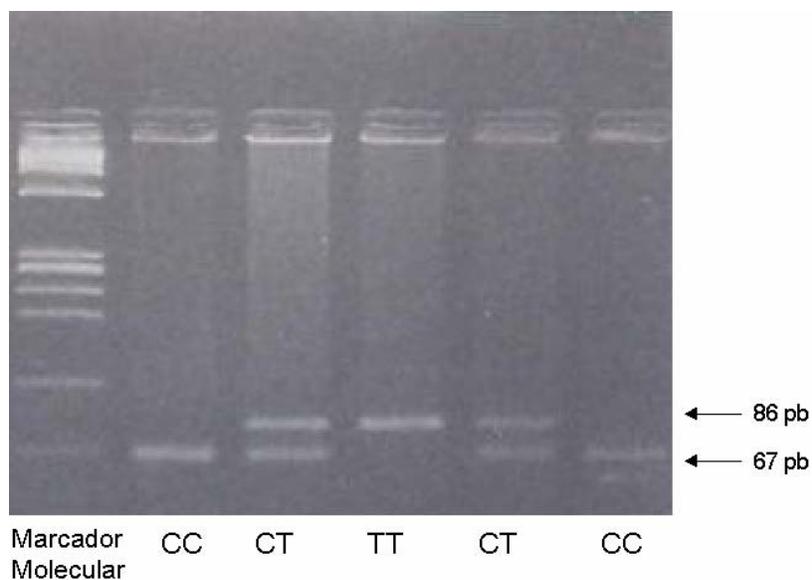


Figura 3- Digestão do polimorfismo C200T, no gene da LRP.

CC = Homozigoto normal

CT = Heterozigoto

TT = Homozigoto mutante

4.6.3- Polimorfismo A775P

Para a identificação do polimorfismo A775P, localizado no éxon 14, foi realizada uma reação para um volume final de 30µl contendo 0,5µg de DNA, 2mM de MgCl₂, 20mM Tris-HCL, 50mM de KCL, 0,33mM de dNTP e 0,1pmol de cada “primer” (sense 5'- gcaactacctcttctggactg-3' e anti-sense 5'-aatgccgggtgaacaatg-3'), e duas unidades da enzima taq DNA polimerase (Invitrogen).

A reação foi incubada por cinco minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 40 segundos de desnaturação a 94°C, 40 segundos para anelamento dos “primers” a 55°C e um minuto para extensão do DNA complementar a 72°C.

Após a amplificação o produto do RCP foi digerido, utilizando-se 3 unidades da enzima de restrição *Hae*III (Gibco BRL, Califórnia, EUA). As amostras foram deixadas em banho maria a 37°C durante 12h, em seguida separadas por eletroforese em gel de agarose a 3%.

Na presença do alelo normal (A) não houve clivagem do sítio de restrição pela enzima, sendo observados três fragmentos de 372, 104 e 43pb. No caso da presença do alelo mutante (P) haveria clivagem do sítio resultando quatro fragmentos: 372, 67, 43 e 37pb. Nos indivíduos heterozigotos (AP) seriam visualizados cinco fragmentos: 372, 104, 67, 43 e 37pb (figura 4).

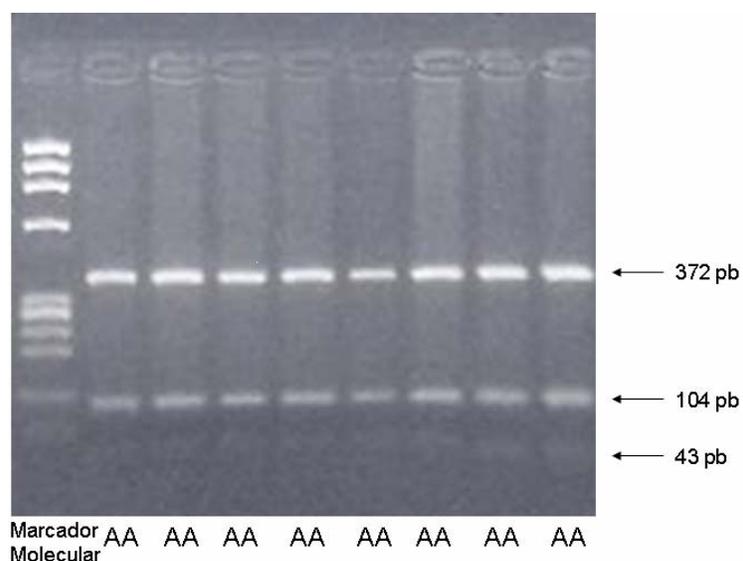


Figura 4- Digestão do polimorfismo A775P, no gene da LRP.

AA = Homocigoto normal

4.7- Análise Estatística

Para descrever o perfil da amostra foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram descritas como média, desvio-padrão e mediana, valores mínimos e máximos.

Para comparar as variáveis categóricas foi usado o teste Qui-Quadrado ou, quando necessário (valores esperados menores que cinco), o teste exato de Fisher. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as variáveis contínuas entre o grupo de casos e controles.

A análise da relação dos fatores da coagulação entre si e da PCR com os fatores da coagulação foi feita através do coeficiente de correlação de Pearson. A análise de regressão linear foi usada para avaliar o efeito da idade sobre os fatores da coagulação. Devido à ausência de distribuição normal das variáveis do estudo, as mesmas foram transformadas previamente em logaritmo (log10).

Foi realizado uma análise de covariância (Ancova) para estudar a relação do GS ABO, com níveis do FIX e FXI, em cada grupo (controle e pacientes), ajustando para níveis de FVIII (covariável).

As variáveis de interesse para cálculo de risco foram os fatores da coagulação e GS ABO. Para demonstrar a associação entre as mesmas e o risco de TEV foi utilizado o cálculo da estimativa do risco relativo ou razão dos produtos cruzados (“odds ratio”-OR). O intervalo de confiança (IC) considerado foi de 95%.

Os fatores da coagulação foram avaliados como variáveis contínuas e categóricas. Para os fatores da coagulação e PCR o ponto de corte utilizado foi o P90, medido nos controles. GS ABO (O e não-O) entrou como variável dicotomizada.

O OR foi determinada de três maneiras: primeiro foi utilizado um modelo de regressão logístico univariado. Posteriormente, as variáveis demonstradas como fatores de risco na análise univariada foram ajustadas separadamente, para cada um das variáveis confundidoras: PCR, trombofilia (presença de FV de Leiden e mutação G20210A no gene do FII), níveis elevados de fatores da coagulação e GS ABO (não O). Em uma terceira etapa, as variáveis foram analisadas em um modelo multivariado, usando-se o critério de seleção “Stepwise”.

Para pesquisar uma relação dose-dependente entre o nível do fator e o risco trombótico, os fatores da coagulação foram subdivididos aproximadamente em quartis, tendo como referência o primeiro quartil. O OR para trombose também foi avaliado nos diferentes subgrupos de pacientes, utilizando-se o teste de homogeneidade para comparar as ORs

Para avaliar o impacto das elevações das concentrações dos fatores da coagulação no risco trombótico foi calculado o risco atribuído populacional (RAP). O seu cálculo é derivado do OR e da prevalência (P) do fator de risco na população, sendo utilizado a fórmula de Levin (Almeida Filho e Rouquayrol, 2003):

$$\text{RAP: } P (\text{OR}-1) : P (\text{OR}-1) +1 \times 100.$$

No estudo dos polimorfismos foi usado o teste Qui-Quadrado, com o objetivo de avaliar as frequências dos genótipos, entre casos e controles. A comparação entre as concentrações do FVIII e FvW, nos diversos genótipos, foi realizada através dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. Para estudo da distribuição genotípica dos polimorfismos foi utilizado o equilíbrio de Hardy-Weinberg

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional: SAS System for Windows, versão 8.02.



5- RESULTADOS

5.1- Dados clínicos dos pacientes e controles

Foram analisados 175 pares de pacientes e controles pareados por sexo, idade aproximada e etnia. Destes pacientes, 122 (69,7%) eram do sexo feminino e 53 (30,3%) do sexo masculino. Nos pacientes, a idade média (\pm DP) dos pacientes, no momento da coleta, foi de 36,6 (\pm 11) anos e mediana de 36 anos, variando de 13 a 63 anos e nos controles a idade média foi de 36,1 (\pm 11) anos, com mediana de 35 anos com variação de 16 a 63 anos.

A idade média e mediana na época do último evento trombótico foi 34 anos (\pm 11,6), idade mínima de 13 e máxima de 63 anos. O tempo decorrido entre o último episódio de TEV e coleta dos exames variou de seis a 110 meses, com média de 35,7 meses (\pm 43,7) e mediana de 21,5 meses.

Do total da amostra 100 (57,1%) pacientes eram caucasóides e 75 (42,9%) não caucasóides (Figuras 5a e 5b).

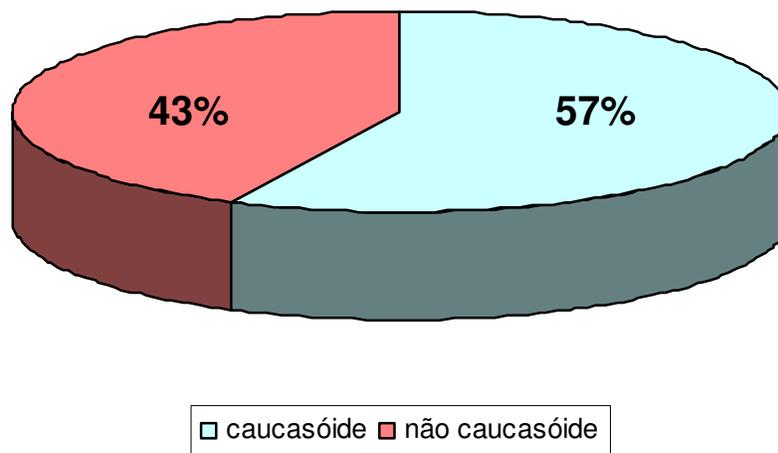


Figura 5a- Classificação do grupo de estudo quanto à etnia

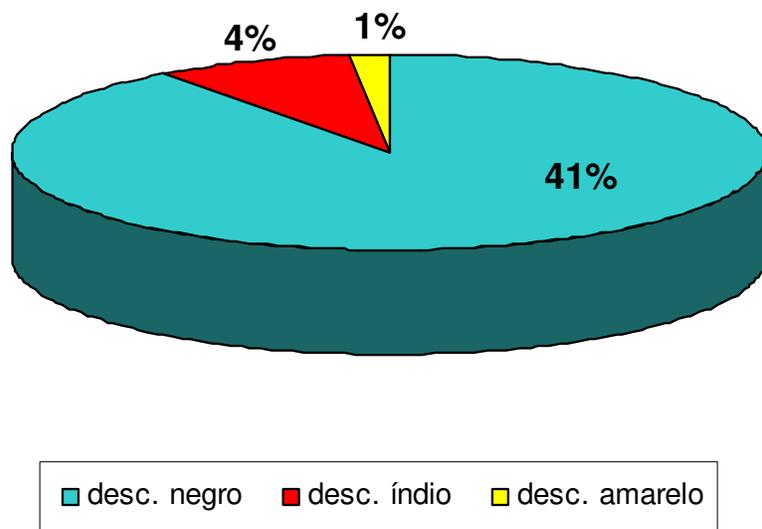


Figura 5b- Classificação do grupo não caucasóide

Dos 175 pacientes, 123 (70%) apresentaram a primeira trombose antes dos 40 anos e 19 pacientes (11%) acima dos 50 anos. A maioria dos pacientes 130 (74%) submeteu-se à coleta de exame para o estudo após um ano da ocorrência da doença. A distribuição dos pacientes por idade, assim como o tempo entre a trombose e o exame (período pós trombótico), estão nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3- Distribuição dos pacientes por idade no 1º episódio de TEV

Idade (anos)	Pacientes (%)
< 30	68 (38,8)
30 - 39	55 (31,5)
40 - 49	33 (18,8)
≥ 50	19 (10,9)

Tabela 4- Distribuição dos pacientes por tempo decorrido entre o episódio de TEV e coleta de exames

Tempo (meses)	Pacientes (%)
< 12	45 (25,7)
13 - 24	55 (31,4)
25 - 36	26 (14,9)
≥ 37	49 (28)

5.2- Características clínicas dos episódios trombóticos

Dos pacientes envolvidos no estudo 153 (87,4%) apresentaram episódio de TEV único, enquanto em 22 (12,6%) houve recorrência. Foram totalizados 200 eventos trombóticos, sendo que 25 (12,5%) eram eventos recorrentes. Em 153 (76,5%) episódios o sítio trombótico foi o membro inferior apenas, associado ou não à embolia pulmonar e em 47 (23,5%), o local acometido foi não usual, representado por trombose em membro superior, retina, cérebro, porto-esplênico, pulmão ou veia jugular. Dos episódios de trombose de membro inferior houve associação com embolia pulmonar em oito pacientes (tabela 5).

Tabela 5- Episódio de TEV de acordo com o sítio acometido

Sítio do TEV	N (%)
Membro Inferior	153 (76,5)
Direito	45 (22,5)
Esquerdo	97(48,5)
Bilateral	03 (1,5)
Associado a Embolia Pulmonar	08 (4,0)
Não usual	47 (23,5)
Pulmão	12 (6,0)
Retina	10 (5,0)
Cerebral	09 (4,5)
Membro Superior	08 (4,0)
Porto-esplênico	07 (3,5)
Jugular	01 (0,5)
Total	200(100)

Houve 75 (37,5%) eventos trombóticos espontâneos e 125 (62,5%) secundários a algum fator de risco adquirido. Os fatores predisponentes mais frequentes foram o uso de hormônio sexual feminino em 41 (20,5%) e puerpério/gestação em 42 (21%) dos episódios. Outros fatores de risco presentes foram cirurgia, hospitalização, compressão local, além de associação entre estes fatores. As informações sobre as características dos episódios de trombose podem ser vistas na tabela 6.

Tabela 6- Episódios de TEV de acordo com fator de risco adquirido.

Fator de risco	TEV (%)
Ausente	75 (37,5)
Presente	125 (62,5)
Hormônio sexual feminino	41 (20,5)
ACH	37
TRH	04
Puerpério	23 (11,5)
Gestação	19 (9,5)
Cirurgia	14 (7,0)
Hospitalização	19 (9,5)
Compressão local	01 (0,5)
Múltiplas	08 (4,0)

A tabela 7 mostra o sítio de trombose e a frequência dos fatores de risco adquiridos por sexo, considerando apenas o primeiro episódio trombótico por paciente. Notar que diferente das mulheres, a maioria dos eventos trombóticos no sexo masculino foi espontâneo.

Tabela 7- Características clínicas do 1º episódio de TEV.

Sexo		N (%)
Feminino		122 (69,7)
Masculino		53 (30,3)
Fator de risco adquirido quanto ao sexo		N (%)
Feminino	Presente	96 (78,7)
	Ausente	26 (21,3)
Masculino	Presente	17 (32,1)
	Ausente	36 (67,9)
Tipo de fator de risco adquirido*		N (%)
Hormônio sexual feminino		41 (33,6)
	ACH	37 (30,3)
	TRH	04 (3,3)
Puerpério		21 (17,2)
Gestação		16 (13,1)
Cirurgia		13 (7,4)
Hospitalização		19 (10,9)
Compressão local		01 (0,6)
Múltiplos		06 (3,4)
Sítio da trombose		N (%)
Membro inferior		120 (68,6)
Membro Inferior e embolia pulmonar		08 (4,6)
Sítio não usual		47 (26,8)
	Membro superior	08 (4,6)
	Porto-esplênico	07 (04)
	Cerebral	09 (5,1)
	Retina	10 (5,7)
	Jugular	01 (0,6)
Pulmão		12 (6,8)

* No cálculo para TRH, ACH, gestação e puerpério foi considerada apenas a população feminina.

5.3- Prevalência das trombofilias hereditárias e cálculo de “odds ratio” para trombose

Conforme mostrado na tabela 8, 140 (80%) pacientes não apresentaram qualquer trombofilia hereditária. Nos pacientes portadores de trombofilia o FV de Leiden e a deficiência de PC foram as mais freqüentes, ocorrendo em 22 casos. Entre os indivíduos-controle, em 12 (6,9%) diagnosticou-se o FV de Leiden ou a mutação G20210A no gene do FII.

Tabela 8- Características dos pacientes e controles quanto à presença e tipo de trombofilia

Trombofilia hereditária	Pacientes (%)	Controles (%)
Ausente	140 (80)	163 (93,1)
Presente	35 (20)	12 (6,9)
FV de Leiden	11 (6,3)	06 (3,4)
Mutação G20210A no gene do FII	08 (4,6)	06 (3,4)
Deficiência PC	11 (6,3)	
Deficiência PS	02 (1,1)	
Deficiência AT	01 (0,6)	
FV Leiden + deficiência PC	02 (1,1)	

Para a análise sobre presença de fator de risco adquirido e trombofilia hereditária, foi considerado apenas o primeiro episódio trombótico para cada paciente. A trombose foi precipitada por fator de risco adquirido em 23 (65,7%) portadores de trombofilia hereditária e 95 (67,8%) dos pacientes sem esta anormalidade.

Das trombofilias hereditárias propostas para cálculo do OR, nenhuma foi associada ao risco de TEV. Apesar de portadores do FV de Leiden apresentaram o dobro do risco para a doença, não houve significância estatística (tabela 9).

Tabela 9- FV de Leiden e mutação G20210A no gene FII e risco de TEV

Fator de risco	Pacientes(%)	Controles(%)	OR	p
FV de Leiden	13 (7,4)	06 (3,4)	2,3 (0,8 - 6,8)	0,15
Mutação G20210A no gene FII	08 (4,6)	06 (3,4)	1,3 (0,4 - 4,5)	0,78

5.4- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com TEV em sítio não-usual

A idade média e mediana dos 47 pacientes com trombose em sítio não usual foi de 36 anos ($\pm 11,3$), idade mínima 13 anos e máxima 63 anos.

A trombofilia hereditária esteve presente em 10 (21,3%) casos, sendo as mais freqüentes o FV de Leiden, a mutação G20210A no gene do FII e a deficiência de PC, com uma prevalência aproximada de 6%, cada uma (tabela 10).

Tabela 10- Presença e tipo de trombofilia hereditária em paciente com TEV em sítio não usual e controles

Trombofilia hereditária	Pacientes (%)	Controles (%)
Ausente	37 (78,7)	44 (93,6)
Presente	10 (21,3)	03 (6,4)
FV de Leiden	03 (6,4)	02 (4,3)
Mutação G20210A Gene FII	03 (6,4)	01 (2,1)
Deficiência de PC	03 (6,4)	
Deficiência de PS	0	
Deficiência de AT	01 (2,1)	

5.5- Trombofilia hereditária e etnia

A tabela 11, mostra a análise da prevalência de trombofilias hereditárias, entre pacientes, em dois diferentes grupos étnicos: caucasóide e não-caucasóide.

Tabela 11- Trombofilia hereditária de acordo com o grupo étnico

Trombofilia hereditária	caucasóide	Não- caucasóide	
	n:100 (%)	N:75 (%)	
Ausente	76 (76)	64 (85,3)	p= 0,11
Presente	24 (24)	11 (14,7)	
FV Leiden	07	04	
mutação G20210A Gene FII	05	03	
deficiência de PC	09	02	
deficiência de PS	01	01	
deficiência de AT	01	0	
deficiência de PC + FV Leiden	01	01	

A análise da frequência do FV de Leiden e da mutação G20210A no gene do FII nos pacientes e controles de acordo com o grupo étnico, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 12).

Tabela 12- FV de Leiden e mutação G20210A no gene FII de acordo com o grupo étnico

Trombofilia Hereditária	Nã- caucasóide		P= 0,75
	caucasóide n:200 (%)	N:150 (%)	
FV de Leiden	11	06	
mutação G20210A no Gene FII	08	06	
Total	19 (9,5)	12 (8,0)	

5.6- Concentração plasmática dos fatores da coagulação

As medianas das concentrações do FVIII (184,3 UI/dL), FIX (127,7 UI/dL), FXI (123,4 UI/dL) e FvW (157,4 UI/dl) e fibrinogênio (302 mg/dL) foram estatisticamente superiores no grupo de pacientes, quando comparadas aos controles (127 UI/dl, 110 UI/dl, 104,2 UI/dl, 108,1 UI/dl e 282 mg/dl respectivamente, $p < 0,05$) (figuras 6 e 7).

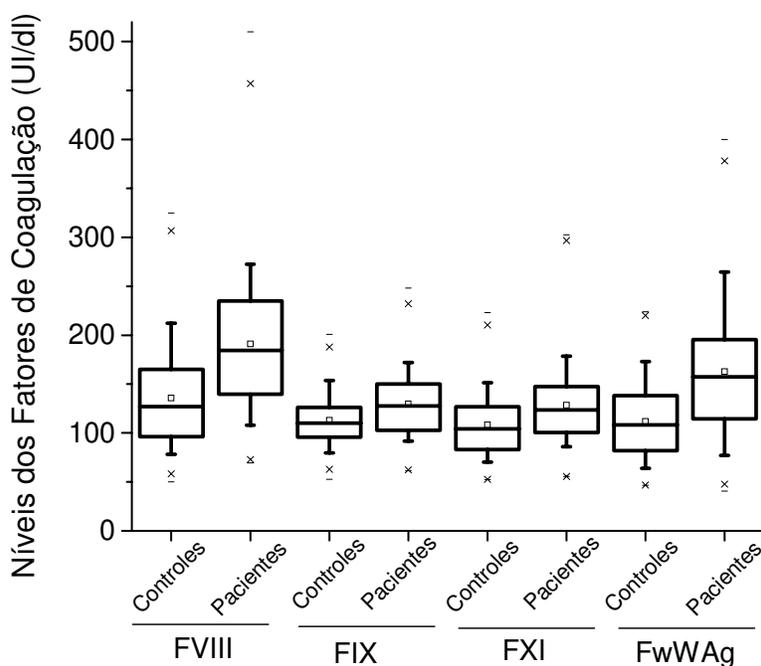


Figura 6- A mediana das concentrações do FVIII, FIX, FXI e FvW em pacientes e controles

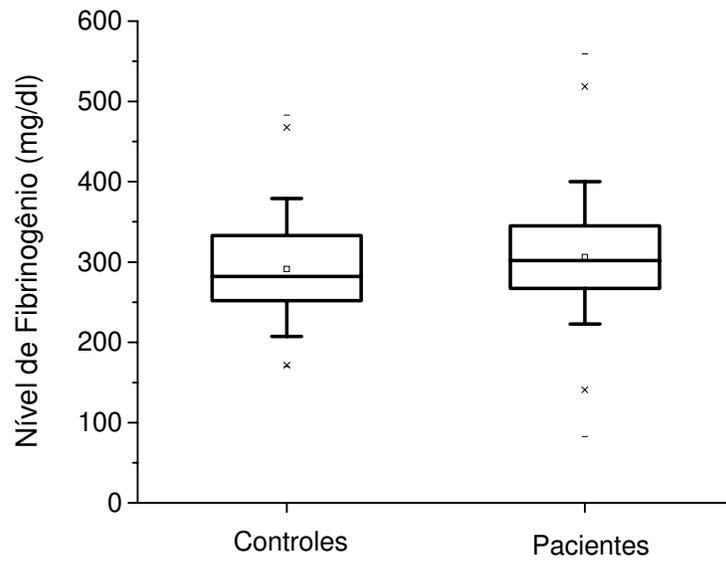


Figura 7- Mediana das concentrações do fibrinogênio em pacientes e controles

As medianas do FVII e FX não se mostraram significativamente diferentes nos pacientes (105,3 UI/dl e 108,9 UI/dl, respectivamente) e controles (104,7 UI/dl e 112,8 UI/dl, respectivamente) (figura 8).

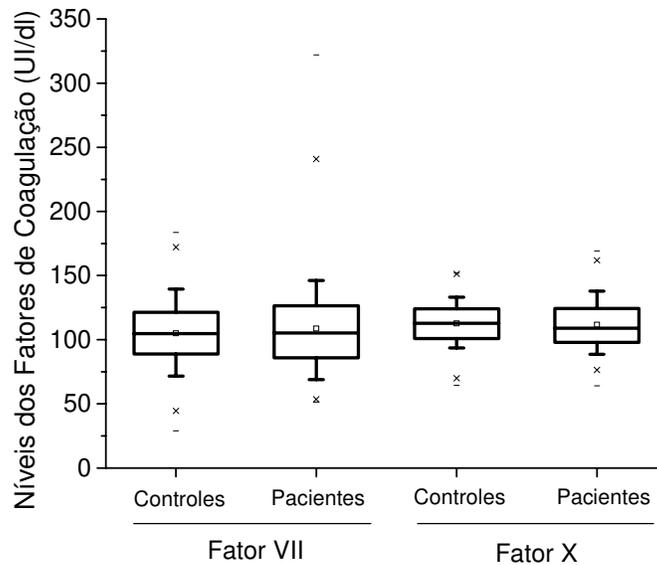


Figura 8- A mediana das concentrações do FVII e FX em pacientes e controles

O P90 das concentrações do fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI e FvW, no grupo controle foi: 379 mg/dl, 139 UI/dl, 212 UI/dl, 153,7 UI/dl, 133,1 UI/dl, 150,5 UI/dl e 172,8 UI/dl, respectivamente. No grupo de pacientes o P90 das concentrações destes fatores foi: 400mg/dl, 145,9 UI/dl, 272,3 UI/dl, 171,6 UI/dl, 137,5 UI/dl, 178,2 UI/dl e 263 UI/dl, respectivamente. O P90 das concentrações do fibrinogênio, FVIII, FIX, FXI e FvW foi estatisticamente superior no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle.

Os fatores da coagulação foram analisados com relação a associação entre os níveis dos mesmos. Conforme visto nas figuras abaixo, o FVIII, FIX, FvW e FXI apresentaram uma correlação estatisticamente significativa em ambos os grupos, pacientes e controles.(figuras 9 a 18).

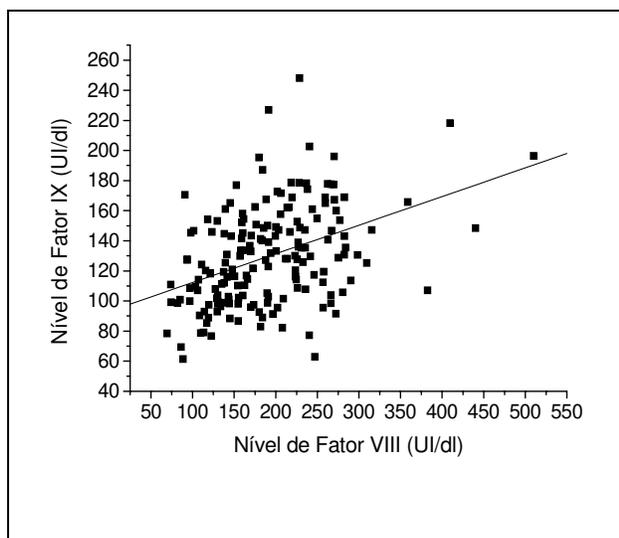


Figura 9- FVIII x FIX em pacientes

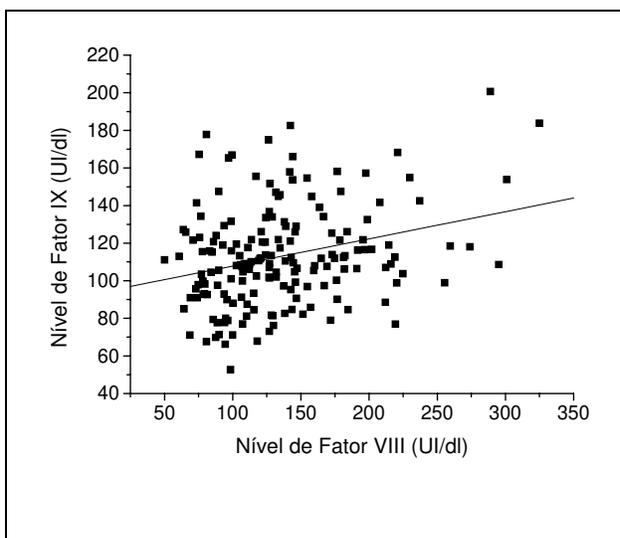


Figura 10- FVIII x FIX em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,42 (Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,25
p: 0,0001) p: 0,0005)

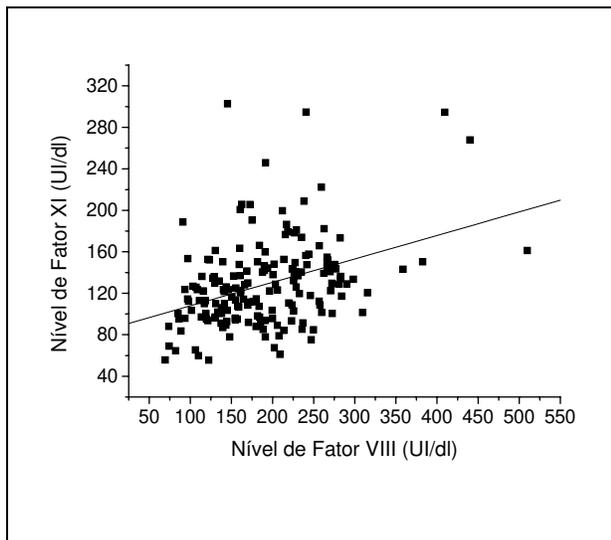


Figura 11- FVIII x FXI em pacientes

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,39
p: 0,0001)

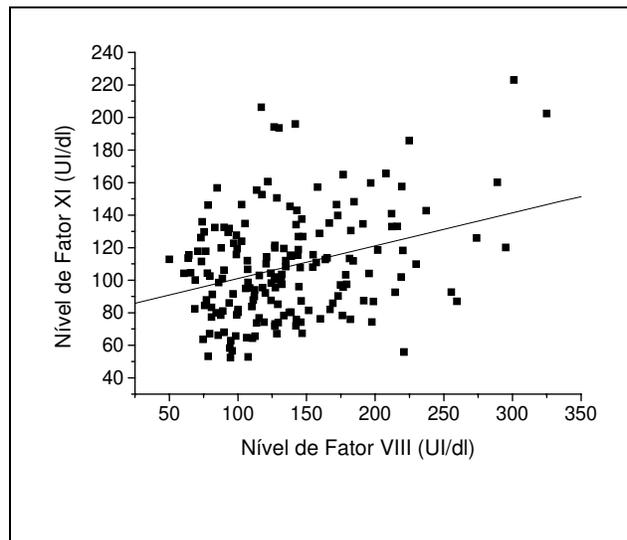


Figura 12- FVIII x FXI em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,27
p: 0,0004)

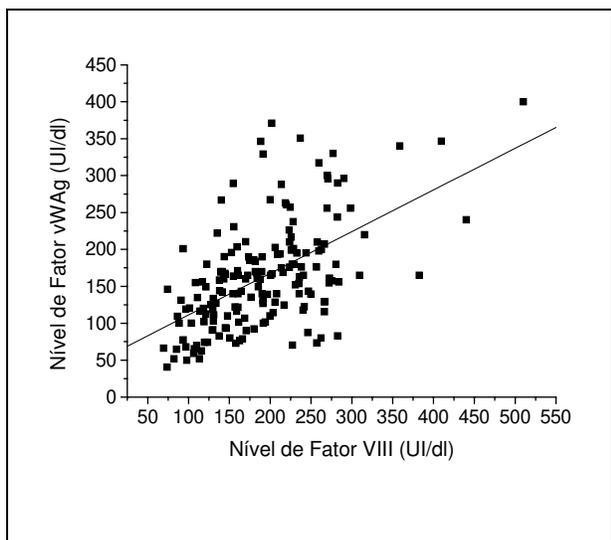


Figura 13- FVIII x FvW em pacientes

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,58
p: 0,0001)

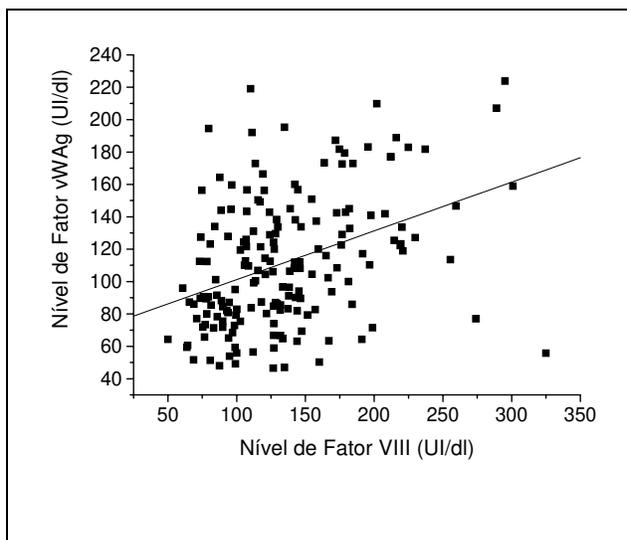


Figura 14- FVIII x FvW em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,42
p: 0,0001)

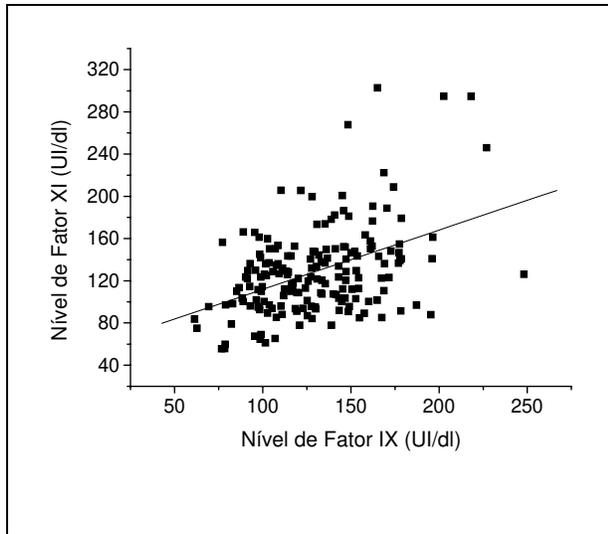


Figura 15- FIX x FXI em pacientes

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,44
p: 0,0001)

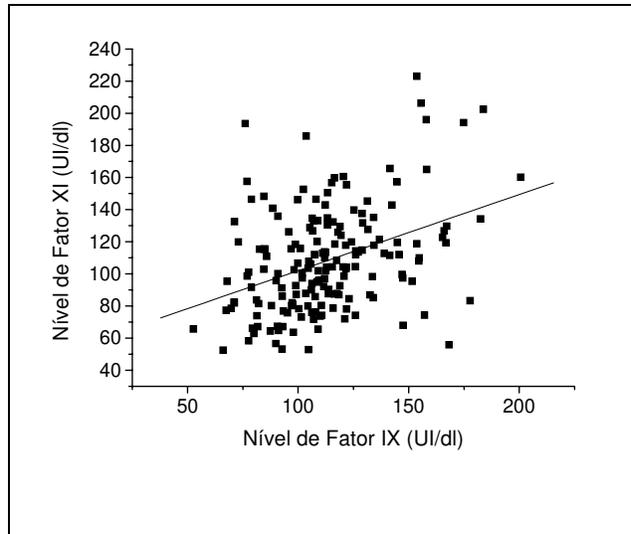


Figura 16- FIX x FXI em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,38
p: 0,0001)

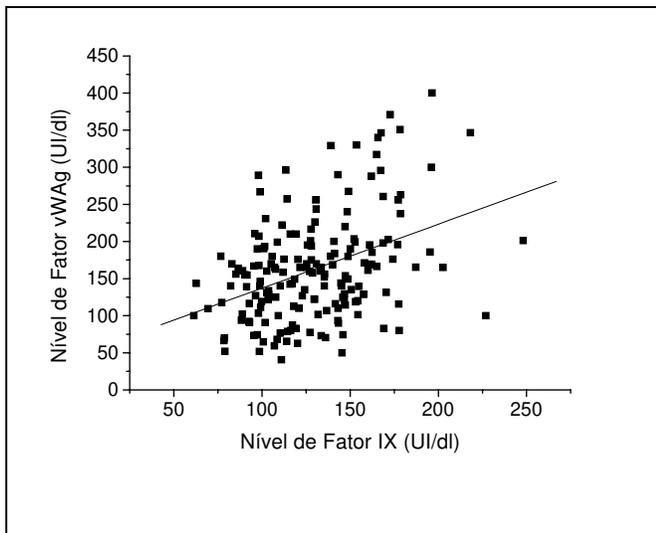


Figura 17- FIX x FvW em pacientes

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,36
p: 0,0001)

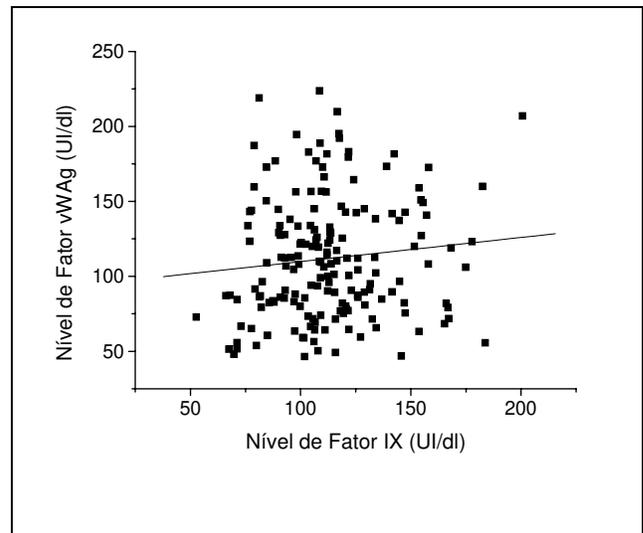


Figura 18- FIX x FvW em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,25
p: 0,04)

5.7- Determinantes dos fatores da coagulação

Com a finalidade de se identificar os determinantes da variabilidade plasmática dos fatores da coagulação, em pacientes e controles, analisou-se as medianas dos mesmos em subgrupos, levando-se em consideração o sexo, idade, etnia e GS ABO.

No grupo dos controles, as medianas do FVII e fibrinogênio apresentaram maiores níveis plasmáticos nas mulheres (106UI/dL e 294,5UI/dL, respectivamente), quando comparados aos homens. A análise nos pacientes não mostrou qualquer diferença das medianas entre os homens e mulheres (tabela 13).

Tabela 13- Medianas (min-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação ao sexo.

Fator da coagulação	Pacientes			Controles		
	feminino	Masculino	p-valor	feminino	masculino	p-valor
Fibrinogênio	310,2 (159 -506)	285 (150 - 559)	0,08	294,5 (172-463)	266 (170-483)	0,03
FVII	106,1 (71,5-322)	101,7 (70-199,8)	0,6	106,2 (75,5-183,6)	97,7 (70-162,9)	0,04
FVIII	190,6 (69,5-440,2)	161,1 (73,9-510,1)	0,09	127 (60-301)	127 (71-324,9)	0,4
FIX	127,9 (61,4-248,1)	125,2 (62,8-196,4)	0,6	110,8 (52,7-182,6)	109,1 (66,1-200,7)	0,5
FX	107,9 (64,1-169,2)	111,9 (83,4-159,5)	0,4	112,8 (64,4-151)	113,3 (74-151,9)	0,5
FXI	125,9 (65,7-294,7)	114,4 (65,5-302,7)	0,4	108,1 (62,8-223)	97,4 (62,4-202,4)	0,1
FvW	160,2 (59,3-371)	143,3 (40,7-400)	0,2	105,3 (46,5-223,8)	114,4 (49,2-207)	0,2

O efeito da idade sobre os níveis dos fatores da coagulação foi realizado de dois modos, através da separação em duas faixas etárias e pela utilização da análise de regressão linear. Quanto à análise por faixas etárias, as medianas do FVII, FIX e FvW foram estatisticamente mais elevadas nos pacientes acima de 35 anos. Entre os controles não se observou qualquer diferença estatística nas medianas dos fatores, de acordo com a idade (tabela 14). A análise de regressão mostrou que entre os controles, houve aumento de 10U nas concentrações de FVII e FIX para cada 10 anos adicionais de idade. No grupo dos pacientes, o mesmo ocorreu para o FVII e FvW.

Tabela 14- Medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação a idade.

Fator da coagulação	Pacientes			Controles		
	Abaixo de 35 anos	Acima de 35 anos	p-valor	Abaixo de 35 anos	Acima de 35 anos	p-valor
Fibrinogênio	306 (150 -464)	301 (159 - 559)	0,6	287,5 (172-483)	279,5 (170-463)	0,5
FVII	97,9 (70-322)	113,9 (71,5-215,3)	0,004	102,7 (70-168,5)	108,6 (70,5-183,6)	0,1
FVIII	176,4 (69,5-382,6)	194 (73,9-510,1)	0,1	126,9 (64,4-295,1)	127,1 (60-324,9)	0,9
FIX	124,2 (61,4-227)	135,7 (69,4-248,1)	0,04	108,5 (52,7-182,6)	111,5 (66,1-200,7)	0,3
FX	104,4 (80,4-169,2)	112,4 (64,1-159,5)	0,06	113,3 (74-151,9)	112,5 (64,4-144,3)	0,3
FXI	122,2 (65,7-246)	123,5 (65,3-302,7)	0,3	104,5 (62,8-193,6)	102,7 (62,4-223)	0,7
FvW	143,9 (50-346,3)	165 (40,7-400)	0,02	102,3 (46,9-223,8)	108,7 (46,5-219)	0,9

Tanto no grupo dos controles como no dos pacientes não houve influência do grupo étnico nas concentrações dos fatores da coagulação (tabela 15).

Tabela 15- Medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação a etnia.

Fator da coagulação	Pacientes			Controles		
	caucasóide	Não caucasóide	p-valor	caucasóide	Não caucasóide	p-valor
Fibrinogênio	294,3 (159 -506)	313 (150 - 559)	0,2	277,9 (181-483)	296 (170-463)	0,09
FVII	105,7 (70-322)	104,6 (74,3-199,8)	0,6	103,2 (74,3-162,9)	108,4 (70-183,6)	0,2
FVIII	186,4 (82,1-440,2)	183,7 (69,5-510,1)	0,6	125,8 (60-301)	127 (60,8-324,9)	0,3
FIX	130 (77,2-248,1)	127,2 (61,4-202,6)	0,6	112,4 (66,1-200,7)	108,1 (52,7-183,8)	0,7
FX	108,9 (82-169,2)	108,7 (64,1-154,2)	0,5	111,1 (64,4-151,9)	119 (71,6-151,1)	0,06
FXI	122,9 (69,8-302,7)	123,4 (65,3-294,7)	0,9	106,4 (62,4-223)	101,9 (64,2-206,3)	0,7
FvW	163,9 (51,6-371)	149,5 (40,7-400)	0,2	104,4 (46,9-219)	112,3 (46,5-223,8)	0,5

O GS ABO foi um fator determinante das concentrações do FVIII, FIX, FXI e FvW, tanto no grupo de pacientes como nos controles. Os indivíduos do GS não-O apresentaram medianas superiores deste fatores comparados aos do GS O (tabela 16). Após feita análise de covariância, ajustada para FVIII, não foi mais observado diferenças nas concentrações do FIX (pacientes e controles) e FXI (pacientes) entre os GS ABO. Entretanto, no grupo controle, as concentrações do FXI persistiram superiores no GS não-O (p:0,02).

Tabela 16- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles em relação ao GS ABO.

fator da coagulação	Pacientes			Controles		
	GS O	GS não-O	p-valor	GS O	GS não-O	p-valor
Fibrinogênio	298 (168,1-464)	306 (150-559)	0,2	282 (170-433)	280 (172-483)	0,7
FVII	103,1 (70-322)	108,9 (71,5-215,3)	0,5	105,3 (70,5-168,5)	104,2 (70-183,6)	0,8
FVIII	144,3 (69,5-277)	200 (74,22-510,1)	<0,001	114,6 (60-259,5)	142,4 (74-324,9)	<0,001
FIX	116,6 (61,4-195,4)	133,6 (62,8-248,1)	0,007	107,2 (66,1-168,3)	113,3 (52,7-200,7)	0,01
FX	103,9 (82-151,1)	110,7 (64,1-169,2)	0,09	112,4 (74-151,9)	115,6 (64,4-150,3)	0,6
FXI	112,5 (65,7-165,8)	129,9 (65,3 302,7)	0,003	99,1 (62,4-196)	110,9 (64,7-223)	0,003
FvW	119,5 (40,7-330)	165 (64,7-400)	<0,001	88,7 (46,5-219)	123,1 (55,7-223,8)	<0,001

As medianas dos fatores da coagulação também foram avaliadas nos pacientes e controles de acordo com a presença ou ausência de trombofilia, mas não se observou diferença estatisticamente significativa (tabela 17).

Tabela 17- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes e controles com relação a trombofilia

fator da coagulação	Pacientes			Controles		
	Presença	Ausência	pvalor	Presença	Ausência	pvalor
Fibrinogênio	272 (167-559)	303,6 (150-506)	0,055	284,5 (193-369)	282 (170-483)	0,8
FVII	115,5 (70-215,3)	104,4 (74,3 322)	0,4	110,6 (74,3-152,9)	104,7 (70-183,6)	0,2
FVIII	181,8 (97,9-510,1)	190,1 (69,5-440,2)	0,9	132,1 (64,4-229,9)	127 (60-324,9)	0,8
FIX	111,4 (62,8-248,1)	129,6 (61,4-218,2)	0,09	112,8 (71,2-165,3)	110 (52,7-200,7)-	0,8
FX	108,9 (80,4-156,6)	108,8 (64,1-169,2)	0,8	111,2 (87,2-142,2)	112,9 (64,4-151,9)	0,7
FXI	125,8 (65,3-246)	123 (65,5-302,7)	0,8	112,3 (73,9-157,6)	103,2 (62,4-223)	0,5
FvW	162,7 (50-400)	156 (40,7-371)	0,9	99,8 (55,8-195,2)	108,1 (46,5-223,8)	0,7

A análise das medianas dos fatores de coagulação de acordo com o número de eventos trombóticos mostrou que os pacientes com recorrências apresentavam concentrações mais elevadas do FVIII, FIX e FXI (tabela 18).

Tabela 18- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes, com relação a número de episódios trombóticos

Fator da coagulação	Episódio único	Episódio recorrente	p-valor
Fibrinogênio	300 (150-506)	315,1 (167-559)	0,7
FVII	104,4 (70-322)	111 (78-157,2)	0,3
FVIII	180 (69,5-440,2)	205,5 (96,9-510,1)	0,04
FIX	127,1 (61,4-248,1)	152,7 (77,2-227)	0,03
FX	108,8 (64,1-169,2)	110,9 (83-152,9)	0,8
FXI	122,7 (65,5-294,7)	145 (65,3-302,7)	0,05
FvW	154,6 (40,7-350,8)	168,7 (68-400)	0,08

A análise das medianas dos fatores de coagulação de acordo com o sítio de acometimento da trombose não mostrou diferença estatisticamente significativa quanto a essa variável (tabela 19).

Tabela 19- Comparação entre as medianas (mín-máx) dos fatores da coagulação em pacientes com relação ao sítio da trombose

Fator da coagulação	Membro Inferior	Sítio não-usual	p-valor
Fibrinogênio	300,5 (150-559)	302 (199-464)	0,6
FVII	104,5 (71,5-322)	111,5 (70-175,9)	0,09
FVIII	187 (69,5-510,1)	183,7 (74,2-409,6)	0,6
FIX	129,8 (61,4-248,1)	116,9 (69,4-227)	0,06
FX	108,9 (80,4-169,2)	106,5 (64,1-158,4)	0,6
FXI	126 (65,3-302,7)	114,3 (65,5-294,6)	0,3
FvW	160,2 (40,7-400)	145,9 (52-346,5)	0,4

5.8- PCR e fatores da coagulação

Os valores médios e medianos da PCR não foram significativamente diferentes entre pacientes e controles (tabela 20).

Tabela 20- Média (DP) e mediana (mín - máx) da PCR em pacientes e controles

	PCR (mg/dL)		p-valor
	média	mediana	
Pacientes	0,31 (\pm 0,39)	0,18 (0,01 - 3,7)	0,22
Controles	0,27 (\pm 0,44)	0,16 (0,01 - 4,7)	

O P90 das concentrações da PCR, dosado em controles, foi de 0,66mg/ml. A concentração deste marcador esteve acima deste valor em 23 (14%) pacientes e em 17 (10%) controles (p=0,22).

A influência da PCR sobre os níveis dos fatores da coagulação com resposta de fase aguda (fibrinogênio, FVIII e FvW), não mostrou nenhuma associação estatisticamente significativa em relação ao FVIII e FvW. O coeficiente de correlação de Pearson para o FVIII nos controles e pacientes foi de r: 0,10, p: 0,18 e r: 0,13, p: 0,09, respectivamente. Para o FvW, o coeficiente de correlação de Pearson nos controles foi de r: 0,06, p: 0,44 e nos pacientes de r: 0,15, p: 0,06. Entretanto, observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de fibrinogênio e a PCR (figuras 19 e 20)

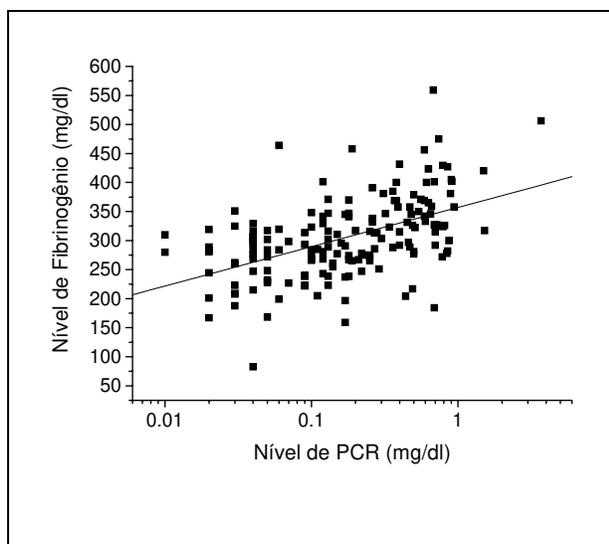


Figura 19- PCR x Fibrinogênio em pacientes

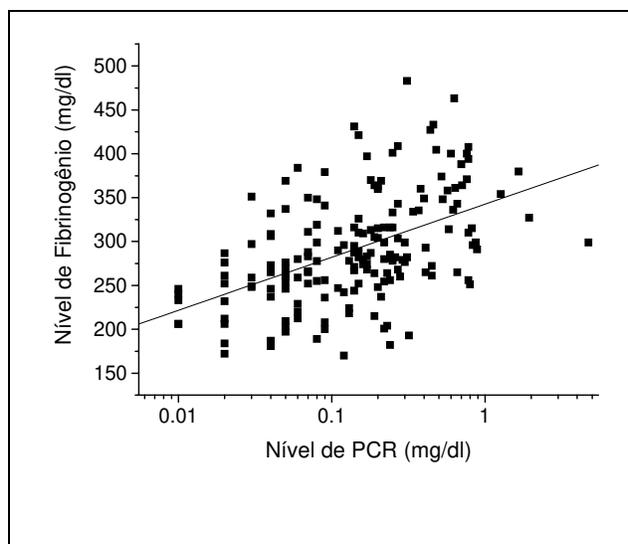


Figura 20- PCR x Fibrinogênio em controles

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,48
p: 0,0001)

(Coeficiente de Correlação de Pearson r: 0,49
p: 0,0001)

A dosagem da PCR, nos pacientes, em diferentes intervalos pós-trombóticos não mostrou nenhuma variação e a mediana manteve-se ao redor de 0,2 mg/dl. Da mesma forma, não houve variação importante na dosagem dos fatores da coagulação nos diversos períodos pós- trombóticos.

5.9- Fatores da coagulação e risco de TEV

Conforme descrito na análise estatística, o cálculo do risco de TEV, associado aos fatores da coagulação, foi realizado em três etapas.

5.9.1- Primeira etapa

Pela análise univariada, o FVIII, FIX, FXI e FvW acima do P90 e o GS não-O foram considerados fatores de risco para doença (tabela 21).

Tabela 21- Risco de TEV de acordo com fatores da coagulação e GS ABO

	Fator de Risco	Pacientes	Controles	OR (IC95%)	p-valor
GS ABO	O	52	98	3,0 (1,9-4,6)	<0,001
	não O	123	77		
Fibrinogênio	< 379 mg/dl	153	158	1,3 (0,6-2,6)	0,39
	> 379 mg/dl	22	17		
FVII	< 139 UI/dl	149	158	1,6 (0,8-3,1)	0,14
	> 139 UI/dl	26	17		
FVIII	< 212 UI/dl	111	158	5,3 (2,9-9,6)	<0,001
	> 212 UI/dl	64	17		
FIX	< 153,7 UI/dl	137	157	2,4 (1,3-4,4)	0,004
	> 153,7 UI/dl	38	18		
FX	< 133,1 UI/dl	153	157	1,2 (0,6-2,4)	0,5
	> 133,1 UI/dl	22	18		
FXI	< 150,5 UI/dl	140	157	2,1 (1,1-4,0)	0,01
	> 150,5 UI/dl	35	18		
FvW	< 172,8 UI/dl	114	158	4,9 (2,7-8,9)	<0,001
	> 172,8 UI/dl	61	17		

5.9.2- Segunda etapa

Nesta fase foram incluídas apenas as variáveis consideradas fatores de risco para TEV pela análise univariada

5.9.2.a- FVIII, FvW, GS ABO e risco trombótico

Como demonstrado nas tabelas 22, 23 e 24, o risco conferido pelo FVIII, FvW e GS ABO persistiu após ajuste para as variáveis confundidoras.

Tabela 22- FVIII e risco trombótico ajustado para variáveis propostas

Fator de risco	Variáveis	OR ajustado (IC 95%)	p-valor
FVIII	PCR	5,5 (3,0 – 10,0)	< 0,001
	Trombofilia	5,6 (3,1 - 10,2)	< 0,001
	FvW	3,6 (1,9 - 6,7)	< 0,001
	GS ABO	4,3 (2,4-7,9)	<0,001
	FIX	4,8 (2,7 - 8,8)	< 0,001
	FXI	5,0 (2,7 - 9,0)	< 0,001

Tabela 23- FvW e risco trombótico ajustado para variáveis propostas

Fator de risco	Variáveis	OR ajustado (IC 95%)	p-valor
FvW	PCR	4,9 (2,7-9,0)	<0,001
	Trombofilia	5,1 (2,8-9,2)	<0,001
	FVIII	3,2 (1,7-5,9)	<0,001
	GS ABO	4,2 (2,3-7,7)	<0,001
	FIX	4,6 (2,5-8,3)	<0,001
	FXI	4,9 (2,7-8,8)	<0,001

Tabela 24- GS ABO e risco trombótico ajustado para variáveis propostas

Fator de risco	Variáveis	OR ajustado (IC 95%)	p-valor
GS ABO	PCR	3,3 (2,1-5,1)	<0,001
	Trombofilia	2,9 (1,9-4,6)	<0,001
	FvW	2,6 (1,6-4,0)	<0,001
	FVIII	2,4 (1,5-3,8)	<0,001
	FIX	2,8 (1,8-4,3)	<0,001
	FXI	2,8 (1,8-4,4)	<0,001

Devido à relação estreita entre o FVIII, FvW e, GS ABO, essas variáveis foram submetidas a uma análise conjunta. Na tabela 25 estão os dados referente ao risco trombótico exercido pelo FVIII, FvW e GS ABO, após ajuste simultâneo entre os mesmos.

Tabela 25- GS ABO, FVIII, FvW e risco trombótico: ajuste simultâneo para as três variáveis.

Fator de risco	OR (IC 95%)*	p-valor	
GS ABO	O	2,2 (1,4-3,6)	<0,001
	Não O		
FVIII	< 212 UI/dl	3,0 (1,6-5,7)	<0,001
	> 212UI/dl		
FvW	< 172,8 UI/dl	2,9 (1,5-5,5)	0,001
	> 172,8 UI/dl		

Quando o FVIII foi analisado como variável contínua, o risco trombótico duplicou (OR: 2,2; IC95%: 1,7-2,7) a cada acréscimo de 50UI/dl nas concentrações deste fator. O mesmo ocorreu com o FvW, onde o risco para doença aumenta em duas vezes (OR: 2,4 IC95%:1,8-3,0) a cada acréscimo de 50 UI/dl deste fator.

A análise destes fatores estratificados, em quartis aproximados, mostrou uma relação dose- dependente entre o nível do FVIII (figura 21) e FvW (figura 22) e o risco de TEV.

FVIII	OR (IC 95%)
P25-P50	2,1 (0,9-5,0)
P50-P75	4,1 (1,8-9,2)
P75-P90	6,6 (2,8-15,4)
>P90	16,6 (6,9-39,5)

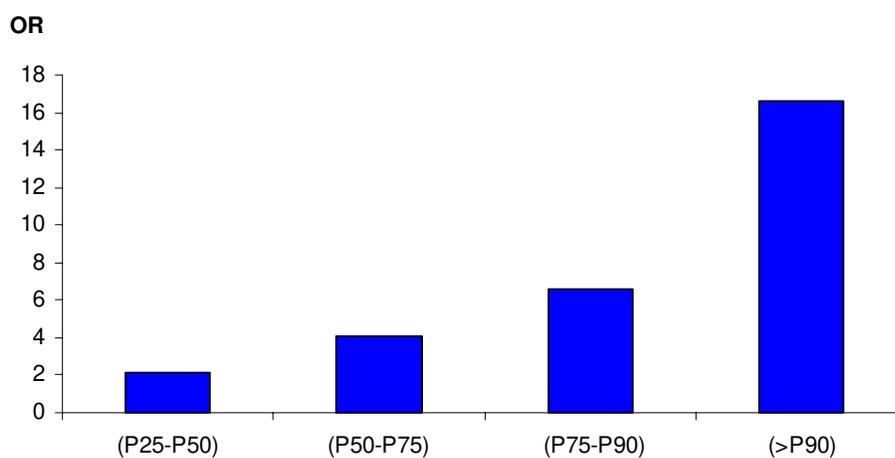


Figura 21- OR para TEV referente ao nível de FVIII estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o primeiroº quartil.

FvW	OR (IC 95%)
P25-P50	0,83 (0,4-1,8)
P50-P75	1,35 (0,7-2,7)
P75-P90	3,8 (1,9-7,7)
>P90	7,5 (3,6-15,8)

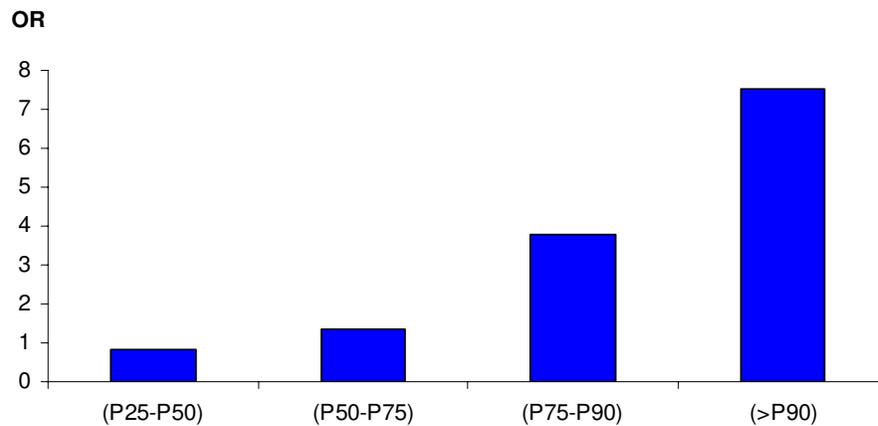


Figura 22- OR para TEV referente ao nível de FvW estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o primeiroº quartil.

5.9.2.b- FIX e risco trombótico

As concentrações elevadas do FIX foram consideradas como fator de risco para TEV, mesmo após correção para PCR, trombofilia, GS ABO e FXI. Entretanto, ao introduzir o FVIII e FvW no modelo de regressão logística, o risco conferido pelo FIX desapareceu (tabela 26).

Tabela 26- FIX e risco trombótico ajustado para variáveis propostas

Fator de risco	Variáveis	OR ajustado (IC 95%)	p-valor
FIX	PCR	2,4 (1,3-4,5)	0,005
	Trombofilia	2,4 (1,3-4,5)	0,005
	FvW	1,9 (0,9-3,6)	0,05
	GS ABO	1,9 (1,0-3,5)	0,047
	FVIII	1,6 (0,8-3,1)	0,15
	FXI	2,1 (1,1-3,9)	0,02
	Todas as variáveis	1,3 (0,6-2,7)	0,45

Quando o FIX foi analisado como variável contínua, o risco trombótico foi de 2,6 (IC95%: 1,8-3,8) para acréscimo de 50UI/dl das concentrações do fator.

A figura 23 mostra que o efeito do FIX no risco trombótico somente é observado a partir do P75 e permanece constante com o aumento das concentrações deste fator.

FIX	OR (IC 95%)
P25-P50	1,4 (0,7-2,8)
P50-P75	1,2 (0,6-2,4)
P75-P90	4,1 (2,0-8,1)
>P90	4,0 (1,9-8,6)

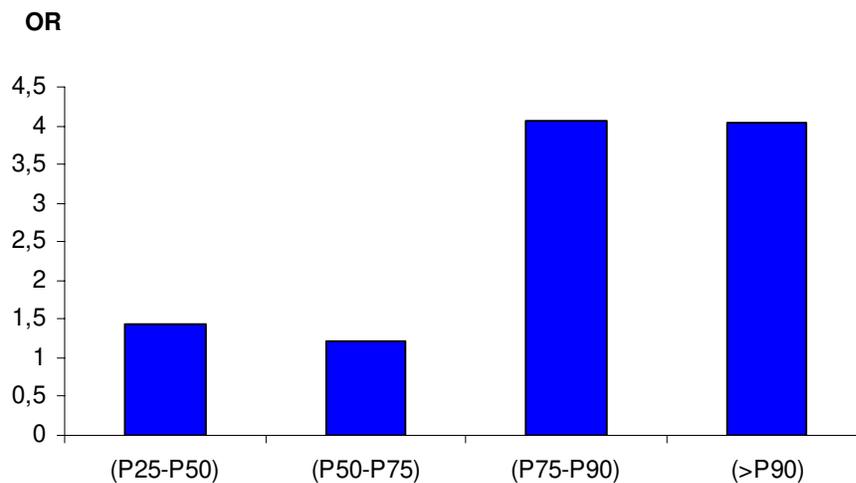


Figura 23- OR para TEV referente ao nível de FIX estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o primeiroº quartil.

5.9.2.c- FXI e risco trombótico

O risco trombótico relacionado aos níveis elevados do FXI foi mantido após ajuste para PCR, trombofilia e FvW. No entanto, não houve associação entre FXI e risco de TEV após correção pelo FVIII, FIX e GS ABO (tabela 27).

Tabela 27- FXI e risco trombótico ajustado para variáveis propostas

Fator de risco	Variáveis	OR ajustado (IC 95%)	p-valor
FXI	PCR	2,1 (1,1-3,9)	0,02
	Trombofilia	2,0 (1,0-3,7)	0,03
	FvW	2,0 (1,1-3,9)	0,03
	GS ABO	1,6 (0,9-3,1)	0,13
	FVIII	1,5 (0,8-2,9)	0,21
	FIX	1,8 (0,9-3,4)	0,07
	Todas as variáveis	1,4 (0,7-2,9)	0,33

A análise do FXI, como variável contínua, mostrou que o risco trombótico foi de 2,2 (IC95%:1,6-3,0) a cada aumento de 50UI/dl nas concentrações do FXI.

Assim como o FVIII e FvW, a figura 24 mostra uma relação dose-dependente entre concentrações do FXI e risco trombótico.

FXI	OR (IC 95%)
P25-P50	3,6 (1,7-7,7)
P50-P75	3,5 (1,6-7,6)
P75-P90	6,2 (2,8-13,8)
>P90	7,1 (3,0-16,8)

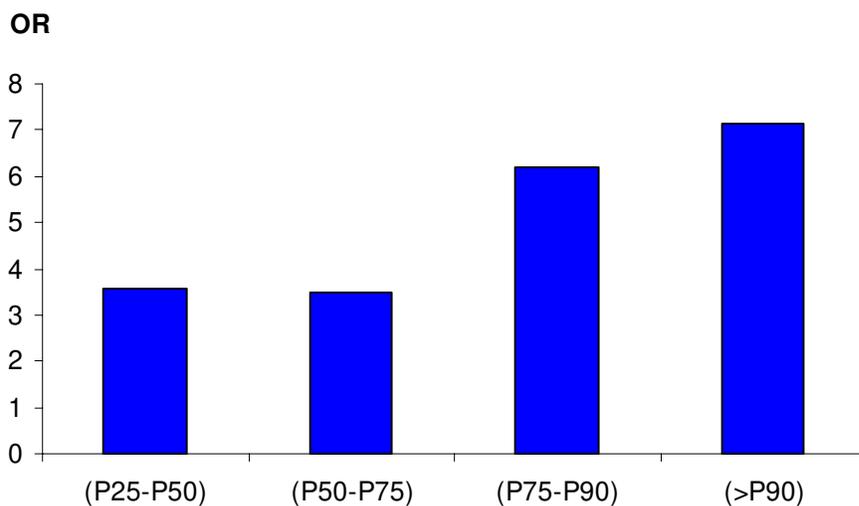


Figura 24- OR para TEV referente ao nível de FXI estratificado, em quartis aproximados, tendo como nível de referência o primeiroº quartil.

5.9.3- Terceira etapa

A análise de todas as variáveis, dentro do modelo “Stepwise”, mostrou elevações do FVIII, FvW e GS não O, como fatores de risco independentes para trombose venosa (tabela 28).

Tabela 28- Risco de TEV de acordo com os fatores da coagulação e GS ABO

	OR ajustado (IC 95%)*	p-valor
GS nãoO	2,2 (1,3-3,5)	0,002
FVIII	3,1 (1,6-6,0)	<0,001
FvW	2,8 (1,4-5,4)	0,002

* OR ajustado de acordo com critério de seleção “stepwise”

5.10- Interação entre fatores da coagulação e GS ABO no risco trombótico

Os fatores IX e XI aumentados não foram fatores de risco independentes para TEV. Entretanto a análise combinada destes fatores sugeriu que os mesmos contribuíram para um maior potencial trombótico, quando associado ao FVIII, FvW e GS ABO (tabelas 29, 30, 31).

Tabela 29- Interação entre FVIII com FIX e FXI no risco de TEV

		Pacientes	Controles	OR (IC 95%)
FVIII ↓	FIX ↓	95	144	1*
FVIII ↑	FIX ↓	39	13	4,6 (2,2-9,6)
FVIII ↓	FIX ↑	15	13	1,8 (0,7-4,1)
FVIII ↑	FIX ↑	26	5	7,9 (2,8-24,5)
FVIII ↓	FXI ↓	96	144	1*
FVIII ↑	FXI ↓	44	13	5,1 (2,5-10,5)
FVIII ↓	FXI ↑	14	13	1,6 (0,7-3,8)
FVIII ↑	FXI ↑	21	5	6,3 (2,1-19,8)

Ponto de corte: P90, medido em controles

* Grupo de referência

Tabela 30- Interação entre GS ABO com FIX, FXI no risco de TEV

		Pacientes	Controles	OR (IC 95%)
GS O	FIX ↓	47	88	1*
GS não O	FIX ↓	87	62	2,6 (1,6-4,4)
GS O	FIX ↑	5	10	0,9 (0,3-3,2)
GS não O	FIX ↑	36	15	4,5 (2,1-9,6)
GS O	FXI ↓	49	92	1*
GS não O	FXI ↓	91	65	2,6 (1,6-4,3)
GS O	FXI ↑	3	6	0,9 (0,2-4,5)
GS não O	FXI ↑	32	12	5,0 (2,2-11,4)

Ponto de corte: P90, medido em controles.

* Grupo de referência

Tabela 31- Interação entre FvW com FIX, FXI no risco de TEV

		Pacientes	Controles	OR (IC 95%)
FvW ↓	FIX □	97	141	1*
FvW ↑	FIX □	37	18	3,0 (1,5-5,8)
FvW ↓	FIX ↑	17	14	1,8 (0,8-4,0)
FvW ↑	FIX ↑	24	2	17,4 (3,9-109,4)
FvW ↓	FXI □	92	140	1*
FvW ↑	FXI □	47	17	4,2 (2,2-8,1)
FvW ↓	FXI ↑	22	16	2,1 (0,9-4,4)
FvW ↑	FXI ↑	14	2	10,5 (2,2-68,8)

Ponto de corte: P90 medido em controles

* Grupo de referência

5.11- Fatores da coagulação e risco de TEV nos subgrupos

5.11.1- Sexo feminino versus sexo masculino

Como visto na tabela 32, em ambos os sexos. o GS não-O e o FVIII, FIX e FvW foram demonstrados como fatores de risco para TEV. Por outro lado, o FXI não foi relacionado ao risco trombótico entre homens.

Tabela 32- Risco de TEV de acordo com o sexo

Fator de risco	OR (IC 95%)			
	Masculino	pvalor	Feminino	pvalor
GS ABO	2,3 (1,1-5,1)	<0,001	3,4 (1,9-5,7)	<0,001
FVIII	3,4 (1,2-9,5)	0,02	6,5 (3,2-13,4)	<0,001
FIX	3,9 (1,0-15,0)	0,049	2,1 (1,1-4,2)	0,03
FXI	2,3 (0,8-6,7)	0,13	2,1 (1,0-4,5)	0,048
FvW	5,3 (1,6-17,2)	0,006	4,9 (2,5-9,7)	<0,001

5.11.2- Idade abaixo e acima de 35 anos

Quando o cálculo do risco para trombose levou em consideração a idade, viu-se que nos pacientes mais jovens o FIX deixou de conferir risco para a doença. O mesmo ocorreu com o FXI, quando analisado apenas os indivíduos acima de 35 anos. O risco trombótico conferido pelo FvW foi maior nos pacientes mais velhos (OR: 8,7; IC95%: 3,6-20,8), comparado aos mais jovens (OR: 2,5; IC95%: 1,1-5,9), com diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$). Estes resultados estão descritos na tabela 33.

Tabela 33- Risco de TEV de acordo com a idade

Fator de risco	OR (IC 95%)			
	< 35 anos	pvalor	> 35 anos	pvalor
GS ABO	2,9 (1,5-5,7)	0,002	3,2 (1,8-5,8)	<0,001
FVIII	4,3 (1,7-10,9)	0,002	6,1 (2,8-13,3)	<0,001
FIX	1,6 (0,6-4,5)	0,35	2,9 (1,4-6,3)	0,006
FXI	2,8 (1,0-7,8)	0,04	1,8 (0,8-3,9)	0,13
FvW	2,6 (1,1-5,9)	0,03	8,7 (3,7-20,8)	<0,001

5.11.3- Caucasoíde vesus não-caucasoíde:

A análise do FVIII, FvW e GS ABO de acordo com o grupo étnico mostrou que todos são fatores de risco para TEV em ambas as etnias. No entanto, os fatores IX e XI somente foram relacionados ao risco trombótico entre caucasoídes (tabela 34).

Tabela 34- Risco de TEV de acordo com a etnia

Fator de risco	OR (IC 95%)			
	Caucasoíde	pvalor	Não-caucasoíde	pvalor
GS ABO	3,6 (1,9-6,5)	<0,001	2,4 (1,2-4,7)	0,009
FVIII	7,5 (3,1-17,8)	<0,001	3,8 (1,7-8,7)	0,001
FIX	3,8 (1,6-8,9)	0,002	1,3 (0,6-3,3)	0,5
FXI	2,4 (1,4-5,4)	0,03	1,9 (0,7-4,9)	0,2
FvW	5,5 (2,6-11,9)	<0,001	4,3 (1,7-10,7)	0,002

5.11.4- Trombose em membro inferior versus trombose em sítio não-usual

A análise dos pacientes por localização da trombose mostrou GS não-O, o FVIII e o FvW como fatores de risco para TEV em ambos os grupos. O FIX foi relacionado ao risco da doença apenas nos pacientes com trombose em membro inferior e o FXI apenas nos pacientes com trombose em sítio não-usual (tabela 35).

Tabela 35- Risco de TVE de acordo com o sítio acometido

		Membro inferior			Não-usual				
		Pacientes	controles	OR (IC95%)	pvalor	Pacientes	controles	OR (IC95%)	pvalor
FVIII	<212 IU/dl	79	115	5,5 (2,8-10,8)	<0,001	32	43	5,0 (1,5-16,6)	0,008
	>212 IU/dl	49	13			15	04		
FvW	<172,8 IU/dl	80	116	5,8 (2,9-11,6)	<0,001	34	42	3,2 (1,0-9,9)	0,04
	>172,8 IU/dl	48	12			13	05		
FIX	<153,8 IU/dl	99	114	2,4 (1,2-4,8)	0,01	38	43	2,5 (0,7-8,9)	0,1
	>153,8 IU/dl	29	14			09	04		
FXI	<150,5 IU/dl	102	112	1,8 (0,9-3,5)	0,09	38	45	5,3 (1,0-26,2)	0,04
	>150,5 IU/dl	26	16			09	02		
GS	O	35	68	3,0 (1,8-5,1)	<0,001	17	30	3,1 (1,3-7,2)	0,008
ABO	non O	93	60			30	17		

5.12- Trombose recorrente

Em 22 (12,6%) pacientes houve TEV recorrente, sendo que 20 destes já haviam apresentado esta complicação antes da inclusão no estudo. A recorrência cumulativa em cinco anos foi de 9%, segundo análise de Kaplan-Meyer.

A maioria do grupo (19 pacientes – 86%) apresentou apenas um episódio de recorrência, enquanto três pacientes tiveram dois episódios cada um. A mediana do tempo decorrido entre o primeiro e o segundo episódio foi de 43,7 meses (dois a 105 meses) e entre o segundo e terceiro evento foi de 31,5 meses (21,7 a 98,6 meses).

A idade mediana destes pacientes foi de 38 anos (Min:18, Max:63 anos), sendo que 15 (68,2%) eram do sexo feminino. Não houve diferença estatística com relação a estas variáveis, entre sujeitos com ou sem recorrência. O primeiro episódio da doença foi espontâneo em 36,4% (8/22) e 31,4% (48/153) dos pacientes com ou sem recorrência, respectivamente (p=0,6).

Conforme observado nas tabelas 36 e 37, a mutação G20210A no gene do FII assim como níveis acima do P90 do FIX e FXI foram associados ao risco de recorrência. O risco conferido pelo FXI (OR:3,2 IC95%: 1,2-8,5) e FIX (OR: 5,5 IC95%: 1,9-13,2) persistiu após correção para trombofilia.

Tabela 36- Risco de TEV recorrente de acordo com a trombofilia

Fator de risco	Episódio único (n=153)	Recorrência (n=22)	OR (IC 95%)	p-valor
FV Leiden	08 (5,3)	03 (13,6)	2,8 (0,7-11,6)	0,15
Mutação G20210A Gene FII	04 (2,6)	04 (18,2)	8,2 (1,9-35,6)	0,01
Deficiência dos inibidores naturais (PC, PS, AT)	13 (8,5)	01 (4,5)	0,5 (0,06-4,1)	1,0

Tabela 37- Risco de TEV recorrente de acordo com GS ABO e fatores da coagulação

Fator de risco	Episódio único (n=153)	Recorrência (n=22)	OR (IC 95%)	p-valor	
GS ABO	O	48	04	2,0 (0,7-6,4)	0,2
	Não-O	105	18		
FVIII	< 212 UI/dl	99	12	0,9 (0,2-4,3)	0,3
	> 212 UI/dl	54	10		
FIX	< 153,7 UI/dl	126	11	4,7 (1,8-11,9)	<0,001
	> 153,7 UI/dl	27	11		
FXI	< 150,5 UI/dl	127	13	3,4 (1,3-8,7)	0,02
	> 150,5 UI/dl	26	09		
FvW	< 172,8 UI/dl	102	12	2,4 (0,7-8,1)	0,3
	> 172,8 UI/dl	51	10		

5.13- Determinação dos polimorfismos no gene da LRP

Para a determinação da prevalência dos polimorfismos foi utilizada a mesma casuística do estudo caso-controle. Entretanto com algumas diferenças, pois foram excluídos três pacientes devido a quantidade de material insuficiente para genotipagem e inclusos três novos controles.

Em uma etapa posterior, para o estudo do polimorfismo D2080N, foram incluídas mais 188 amostras de DNA de controles normais. A tabela 38 mostra o número de participantes para os diferentes polimorfismos.

Tabela 38- Participantes do estudo molecular

Polimorfismo	Pacientes	Controles
éxon 14 G121C (A775P)	172	178
éxon 22 C200T	172	178
éxon 39 G52A (D2080N)	172	366

Nos indivíduos analisados para o polimorfismo A775P do éxon 14 e C200T do éxon 22, a idade mediana foi de 36 anos (13 - 63 anos) para os pacientes e de 35 anos (16 - 63 anos) para os controles. A maioria da casuística era formada por mulheres, tanto no grupo dos pacientes 122 (70,9%) quanto no dos controles 124 (69,7%).

A idade mediana dos pacientes e controles analisados para o polimorfismo de éxon 39 foi de 36 anos (13 - 63 anos) e 32 anos (16 - 63 anos), respectivamente. A maioria dos pacientes 122 (70,9%) e controles 294 (80,3%) eram do sexo feminino.

A prevalência dos polimorfismos, tanto nos pacientes como nos controles, estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença na prevalência dos genótipos entre eles (tabela 39), assim como na análise realizada de acordo com o sexo.

Tabela 39- Prevalência dos polimorfismos no gene da LRP em pacientes com TEV e controles

Polimorfismo	genótipo	Pacientes (%)	Controles (%)	p-valor
Éxon 14 G121C (A775P)	AA	172 (100)	178 (100)	
	AP	0	0	
	PP	0	0	
Éxon 22 (C200T)	CC	70 (40,7)	71 (39,9)	
	CT	74 (43)	83 (46,6)	0,8
	TT	26 (15,1)	24 (13,5)	
	Não analisado	02 (1,2)		
Éxon 39 G52A (D2080N)	DD	167 (97,1)	356 (97,3)	
	DN	05 (2,9)	09 (2,5)	0,9
	NN	0	0	
	não analisado		1 (0,2)	

Do mesmo modo, a prevalência dos genótipos não foi diferente quando a análise dos polimorfismos foi restrita a pacientes com concentrações elevadas de FVIII, considerados aqueles nos quais a dosagem deste fator estava acima do limite superior de normalidade de 150UI/dL (tabela 40).

Tabela 40- Prevalência dos polimorfismos no gene da LRP em pacientes com TEV (FVIII>150UI/dl) e controles

Polimorfismo	genótipo	Pacientes (%)	Controles (%)	p-valor
Éxon 14 G121C (A775P)	AA	117 (100)	178 (100)	
	AP	0	0	
	PP	0	0	
Éxon 22 (C200T)	CC	44 (37,6)	71 (39,9)	
	CT	52 (44,4)	83 (46,6)	0,8
	TT	19 (16,2)	24 (13,5)	
	não analisado	02 (1,8)		
Éxon 39 G52A (D2080N)	DD	113 (96,6)	356 (97,3)	
	DN	04 (3,4)	09 (2,5)	0,9
	NN	0	0	
	não analisado		1 (0,2)	

Não houve influência do polimorfismo C200T, no éxon 22, sobre os níveis plasmáticos de FVIII e FvW. A análise do polimorfismo no éxon 39 mostrou menores concentrações destes fatores em controles com o genótipo DN (tabelas 41 e 42).

Tabela 41- Mediana (mín-máx) do FVIII de acordo com os polimorfismos no gene da LRP

FVIII					
	Genótipo	Pacientes		Controles	
Éxon 22 (C200T)	CC	181,8 (82,1-440,2)		127 (63,8-324,9)	
	CT	189,1 (69,5-510,1)	p = 0,5	126,3 (65,6-289)	p = 0,8
	TT	195,8 (86,4-309)		126,9 (60–212,3)	
Éxon 39 G52A (D2080N)	DD	185,6 (69,5-510,1)	p = 0,7	127 (60-324,9)	p = 0,004
	DN	160,5 (129,7-240)		77,4 (66,3-191,6)	

Tabela 42- Mediana (mín-máx) do FvW de acordo com polimorfismos no gene da LRP

FvW					
	Genótipo	Pacientes		Controles	
Éxon 22(C200T)	CC	153 (50-346,5)		112,7 (46,9 - 280)	
	CT	167,3 (40,7 – 400)	p=0,2	108,1 (48 – 207)	p = 0,7
	TT	146,2 (73,3 – 350,8)		99,4 (46,5-194,6)	
Éxon 39 G52A (D2080N)	DD	158,5 (40,7-400)	p = 0,5	108,4 (46,5-280)	p = 0,01
	DN	121,6 (90,9-193,3)		70,2 (48-127,4)	



6- DISCUSSÃO

Este estudo envolveu 175 pacientes com TEV emparelhados a controles por sexo, idade e etnia. Algumas características deste grupo, mesmo não sendo alvo dos objetivos deste trabalho, merecem ser discutidos, a fim de se conhecer o comportamento do TEV nos indivíduos brasileiros.

6.1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes e episódios trombóticos

A trombofilia hereditária foi encontrada em 20% dos pacientes e 7% dos controles. As diferentes regiões geográficas e os critérios de seleção usados são fatores importantes para justificar a diferença na prevalência das trombofilias hereditárias, em diversos estudos.

Quando as trombofilias são analisadas separadamente, nota-se que a deficiência dos anticogulantes naturais (PS, PC e AT), neste estudo foi de 9%, e é similar às encontradas por outros estudos internacionais, realizados em populações caucasóides (Mateo et al., 1997; Koster et al., 1995b; Heijboer et al., 1990) e também em estudos nacionais (Annichino-Bizzacchi, 2003). Entretanto prevalências superiores, acima de 45%, já foram relatadas (Shen et al., 1997; Salomon et al., 1999).

O FV de Leiden foi detectado em 13 (7,4%) pacientes desta pesquisa. É uma das menores prevalências já descritas em indivíduos com TEV. Entre pacientes caucasóides, a ocorrência desta mutação é, em média, de 20% (De Stefano et al., 1998). Os resultados, aqui obtidos, estão próximos aos 4% relatados no México (Ruiz-Arguelles et al., 1999) e superiores aos achados na Ásia, onde a prevalência é nula (Ho et al., 2000; Shen et al., 1997).

Outros estudos nacionais, mostram que a ocorrência do FV de Leiden varia de 6 à 13% (Morelli, 2000; Franco et al., 1999; Annichino-Bizzacchi, 2003). Entretanto, estudo de Arruda et al. (1995) surpreende pela alta prevalência de 20%, semelhante a países europeus. Isto se deve provavelmente, a critérios de seleção utilizados e padrão étnico dos sujeitos analisados, uma vez que no último estudo os pacientes eram caucasóides não miscigenados.

A mutação G20210A no gene do FII foi encontrada em oito (4,6%) dos pacientes deste estudo. Esta mutação é considerada a segunda trombofilia mais comum e, da mesma forma que o FV de Leiden, é mais prevalente entre caucasóides. Estudos internacionais mostram prevalências de 6 a 18,5%, entre indivíduos com TEV (Poort et al.,1996; Emmerich et al.,2001; Saloman et al.,1999). Os resultados deste estudo estão dentro da faixa de ocorrência mostrada por outros grupos brasileiros, de 4 a 8% (Arruda et al.,1997; Franco et al.,1999; Morelli, 2000).

Nesta casuística o FV de Leiden conferiu o dobro do risco de trombose, porém sem significância estatística. A literatura relata risco que varia de três a oito, (Ridker et al.,1999; Emmerich et al.,2001; Rosendaal et al.,1995) No Brasil, os dados são conflitantes quanto à importância desta mutação na instalação da doença. Enquanto o estudo de Franco et al, (1999) mostrou um risco de três, em outro estudo esta mutação não foi associada ao risco trombótico (Morelli, 2000) .

A mutação G20210A no gene do FII não foi associada ao risco trombótico neste estudo. Estes dados confrontam com relatos nacionais (Arruda et al., 1997; Franco et al., 1999 e Morelli, 2000) e internacionais (Poort et al., 1996; Emmerich et al., 2001 e Salomon et al., 1999) sobre a questão. No entanto, esta mutação não foi demonstrada como fator de risco para TEV em um estudo caso-controle prospectivo com um amplo “cohort” de indivíduos (Ridker et al., 1999).

Nos controles deste estudo, a prevalência do FV de Leiden e da mutação G20210A no gene do FII foi de 3,5%, cada uma, sendo próxima daquela descrita em caucasóides (De Stefano et al., 1998; Rosendaal et al., 1998). Entretanto, a prevalência destas mutações foi superior a relatos prévios na população brasileira, e talvez este fato motivou a ausência de risco exercido por estas trombofilias (Arruda et al., 1995, 1997; Franco et al., 1999)..

Deve-se considerar também que os vários critérios de exclusão adotados neste estudo, possa ter influenciado a baixa prevalência destas mutações nos pacientes trombóticos. Por outro lado, apesar do grupo total de estudo ter sido emparelhado por etnia, não se pode excluir, definitivamente, por razões socio econômicas, um maior número de caucasóides entre os controles.

Quando o total da casuística (pacientes e controles) foram analisados por etnia não houve diferença estatística na prevalência dessas mutações entre caucasóides e não-caucasóides. Neste estudo a classificação de etnia foi baseada nos caracteres físicos e ascendência até terceira geração. Esta análise apresenta dois fatores limitantes: o da memória, referente a não recordação sobre miscigenação nos ascendentes mais distantes, e o viés do preconceito em assumir uma ascendência não-caucasóide. Estes resultados expressam o alto grau de miscigenação da população brasileira, onde a tentativa de classificação fenotípica é frustrada após averiguação genética.

A trombofilia hereditária também esteve presente entre pacientes com trombose em sítio não usual. A prevalência do total de trombofilias foi de 21%, sendo as mais prevalentes o FV de Leiden, a mutação G20210A no gene do FII e a deficiência de PC, cada uma contribuindo com 6%.

Há na literatura escassez de dados relacionando trombofilia hereditária e trombose em sítio não usual. O estudo controlado de Bombeli et al., (2002), que analisou a maior casuística de pacientes com trombose em sítio incomum (260 pacientes), mostrou uma prevalência de alterações protrombóticas em 24,5%, sendo o FV de Leiden e a mutação no gene do FII as mais comuns, com ocorrência de 15% e 3%, respectivamente.

O acometimento pulmonar é na maioria das vezes uma complicação da trombose de membro inferior. No entanto, em até 20% dos casos a origem da embolia pode não ser identificada, mesmo após investigação minuciosa (Martinelli et al., 2002). Neste estudo 12 pacientes (6,8%) apresentaram embolia pulmonar sem confirmação de trombose venosa em membro inferior.

A trombose de veia porta está muitas vezes associada a doença mieloproliferativa ou hepática. Nos pacientes aqui analisados, a trombose neste sítio, devido às características do desenho do estudo, não foi secundária a qualquer doença de base.

Nesta casuística, cerca de 60% dos episódios de TEV foram precipitados por fatores de risco adquiridos, sendo a terapia hormonal, principalmente o ACH, a mais comum. Estudo de Mateo et al., (1997), com pacientes consecutivos com TEV, relata taxas de 70% de trombose secundária a fator de risco adquirido. No grupo de estudo de Leiden o uso do ACH foi responsável por 70% de eventos trombóticos entre mulheres em idade reprodutiva (Rosendaal., 1999a).

A cirurgia, a imobilização e a hospitalização também são citadas como fatores importantes para instalação da trombose, com uma prevalência de 34% no total de indivíduos (Rosendaal, 1999a). No presente estudo, pela maioria da amostra ser composta de mulheres, e em idade reprodutiva, a gravidez e puerpério (30%) e o ACH (30%) superaram a cirurgia e a imobilização (16%), como fatores precipitantes para o TEV.

Como observado, houve uma diferença nítida nos fatores de risco adquiridos para TEV entre os sexos, sendo mais freqüente no feminino. Estes achados são importantes para explicar a maior ocorrência de trombose entre mulheres em idade reprodutível, uma vez que as mesmas são mais expostas a fatores trombogênicos (ACH, TRH, gravidez e puerpério), que os homens.

O primeiro episódio de TEV, também entre pacientes com trombofilia, foi na maioria das vezes, associado a um fator precipitante adquirido. Este achado concorda com a literatura, que relata a presença de um fator de risco adquirido em mais da metade dos pacientes com trombofilia hereditária (Martineli et al., 1998a; Mateo et al., 1998).

6.2- Fatores da coagulação e risco de TEV: características dos estudos progressos

6.2.1- Método científico e características da casuística

Os estudos progressos sobre este assunto caracterizam-se por serem na maioria retrospectivos, casos-controle e envolverem pacientes caucásios inseridos no grupo de trombofilia de Leiden - LETS.

Fora do continente europeu ou quando analisados indivíduos não-caucasóides, os fatores da coagulação foram estudados em alguns grupos isolados de pesquisa. É o caso do Canadá, onde o FVIII foi analisado em um “cohort” de pacientes com TEV, que apesar de ser descrito como miscigenado era composto em 98% por caucasóides (Wells et al., 2005).

Entre pacientes afro-descendentes, há relato dos estudos sobre o fibrinogênio nos Estados Unidos (Austin et al., 2000) e do FVIII no Reino Unido (Patel et al., 2003).

Os trabalhos sobre fatores da coagulação e risco de recorrência de trombose foram analisados no estudo austríaco AUREC (The Austrian Study on Recurrent Venous Thrombosis), tendo como foco o FVIII (Kyrle et al., 2000) e FIX (Weltermann et al., 2003).

O estudo que se diferencia dos demais, por utilizar metodologia prospectiva, foi o LITE (The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology). Este estudo foi composto por quase 20.000 pessoas, acompanhadas por um longo período de tempo, para análise de ocorrência de TEV e sua relação com o fibrinogênio, FVII, FVIII e FvW (Tsai et al., 2002).

Assim, os fatores IX, X e XI e sua relação com o primeiro episódio trombótico foram analisados apenas em um estudo, em Leiden - Holanda. Além disso, excetuando-se o FVIII e o fibrinogênio, todos os demais fatores foram pesquisados exclusivamente em caucasóides.

6.2.2- Método estatístico para avaliação do risco de TEV

O grupo de estudo que avaliou o maior número de fatores da coagulação, em uma mesma população foi o LETS. Os trabalhos publicados por este grupo avaliaram os fatores individualmente ou em modelo de regressão condicionado apenas para algumas variáveis. Através dessa análise, é difícil estabelecer se um fator de coagulação é realmente um fator de risco para trombose ou meramente um reflexo de outras variáveis, também envolvidas na fisiopatologia multifatorial do TEV.

O modelo de seleção “stepwise” parece ser mais apropriado para anular o efeito de variáveis confundidoras. Neste método, dentre as variáveis consideradas importantes para instalação da trombose, o programa computacional seleciona aquelas que exercem papel independente no risco trombótico. Sendo assim o “odds ratio” encontrado para um dado fator não advém da correção para variáveis isoladas.

Um exemplo esclarecedor de tal problema pode ser dado através do estudo do fibrinogênio. A primeira publicação sobre este fator como risco trombótico mostrou que níveis elevados do mesmo aumentavam o risco de TEV (Kamphuisen et al., 1999). Van Hylckama Vlieg e Rosendaal (2003a) após uma nova análise destes resultados, concluíram que o risco inferido ao fibrinogênio era na verdade reflexo de demais variáveis protrombóticas, só evidenciado após análise simultânea das mesmas.

Vale ressaltar que a presença do SAAF não foi contemplada nos estudos sobre fatores da coagulação e TEV. São duas as implicações desta anormalidade nestes estudos. Por ser uma doença auto-imune, a mesma pode ser a causa do aumento de fatores susceptíveis ao processo inflamatório, como o FVIII, FvW e fibrinogênio. Por outro lado, sendo uma trombofilia adquirida prevalente, de ocorrência em até 15% dos pacientes com TEV (Ginsberg et al.,1995; Simioni et al.,1996), deveria fazer parte das variáveis protrombóticas consideradas no cálculo de risco.

6.2.3- Métodos laboratoriais para determinação dos fatores da coagulação

A metodologia utilizada para a dosagem dos fatores da coagulação nos diversos estudos publicados anteriormente variou conforme o fator analisado. O método coagulométrico de um estágio foi escolhido nos trabalhos sobre FVII, fibrinogênio (método de Clauss) e na maioria das vezes sobre o FVIII. Por outro lado, a dosagem antigênica foi a única forma de avaliação do FIX, FX, FXI e FvW.

Dentre os fatores avaliados como risco de TEV, o FVIII foi o único a ser dosado através de três diferentes técnicas. Como a dosagem do FVIII é a mais empregada na área de hemostasia, é a que apresenta maior número de estudos a respeito das técnicas disponíveis para sua mensuração. Talvez por esta razão, também, seja o fator analisado com a maior diversidade de métodos, nos estudos de TEV.

O método coagulométrico e cromogênico são dois métodos de aferição funcional do FVIII. Enquanto o primeiro baseia-se no TTPA e utiliza como substrato um plasma deficiente no fator, no método cromogênico, a atividade funcional do FVIII é medida por um método colorimétrico. Por sua vez, o método imunológico quantifica a proteína circulante, através de anticorpos dirigidos contra epítopos do FVIII.

Trabalhos que confrontaram os dois métodos, mostraram alta correlação entre os mesmos (Tripodi e Mannucci, 1986; Chandler et al., 2003). Entretanto, o método coagulométrico é mais susceptível a interferências que podem gerar falsos resultados de diminuição do FVIII, como é o caso da presença de um inibidor (Rosén et al., 1985), do anticoagulante lúpico ou da terapia anticoagulante (Chandler et al., 2003). Por outro lado, não se pode descartar que elevações deste fator sejam decorrentes de uma pré-ativação (Rosén et al., 1985), que pode ocorrer durante a coleta ou estocagem das amostras de plasma (Kamphuisen et al., 2001b; Legnani et al., 2004).

As técnicas também apresentam variações de reprodutibilidade conforme a amostra analisada. Para níveis elevados deste fator a reprodutibilidade é maior quando utilizado o método cromogênico (Chandler et al., 2003) e para níveis diminuídos, o melhor método é o coagulométrico (Chandler et al., 2003; Tripodi e Mannucci, 1986).

Todas estas possíveis limitações do método coagulométrico foram consideradas nas pesquisas sobre fatores da coagulação e risco trombótico. Isto porque, pela primeira vez, o estudo do FVIII focou-se na elevação e não mais nos tradicionais estados de deficiência, representados pela hemofilia A e doença de von Willebrand.

De qualquer modo, o risco trombótico associado a níveis aumentados de FVIII está bem estabelecido, independente do método empregado, coagulométrico (Koster et al., 1995a), imunológico (Kamphuisen et al., 2001b) ou cromogênico (Legnani et al., 2004).

O'Donnel et al. (1997) confrontaram os métodos coagulométrico e imunológico, para dosagem do FVIII, em indivíduos com TEV e elevadas concentrações deste fator. Os resultados mostraram uma correlação significativa entre os dois métodos. Deste modo concluiu-se que o aumento do FVIII nestes pacientes é um reflexo do aumento da proteína circulante.

6.3- Determinantes das concentrações dos fatores da coagulação

Levando-se em consideração apenas o grupo-controle, representante da população normal, observou-se que as concentrações plasmáticas da maioria dos fatores da coagulação não mudou de acordo com as variáveis pesquisadas.

Os níveis plasmáticos do FIX e FVII variaram positivamente com a idade. Dados prévios mostraram um efeito idade-dependente não apenas sobre estes fatores (Van Hylckama Vlieg et al., 2000; Balleisen et al., 1985), mas também sobre o fibrinogênio, FVIII, FvW e FXI (Balleinsen et al., 1985; Conlan et al., 1993, Austin et al., 2000, Meijers et al., 2000).

Como a casuística deste estudo foi constituída principalmente por indivíduos jovens, onde 70% apresentavam menos de 40 anos, isto talvez possa explicar a ausência de interferência da idade sobre os níveis da maior parte dos fatores de coagulação aqui pesquisados.

Nesta população, o fibrinogênio e o FVII foram influenciados pelo sexo. Níveis superiores de fibrinogênio, FVIII e FvW já foram observados entre mulheres, quando comparadas aos homens (Balleisen et al., 1985; Conlan et al., 1993). Talvez o predomínio de mulheres (70%), com pequena representatividade do sexo masculino neste estudo, explique em parte esses resultados.

Nenhum dos fatores pesquisados teve variações relacionadas ao grupo étnico. Apenas o FVIII e FvW foram analisados em outros estudos em que se considerou diferentes etnias, observando-se concentrações mais elevadas em negros, quando comparados a caucasóides (Conlan et al., 1993).

O perfil predominantemente miscigenado da população brasileira talvez possa explicar a inexistência de diferenças nas dosagens do FVIII, FvW, assim como dos demais fatores de coagulação nos diferentes grupos étnicos. Apesar de metade desta amostra ter sido classificada como caucasóide, isto pode não corresponder à verdade absoluta. Um estudo genético com brasileiros demonstrou que mesmo naqueles considerados como caucasóides, pela cor da pele, observou até 30% de contribuição africana no total de DNA mitocondrial (Alves et al., 2000).

O GS ABO mostrou-se, neste estudo, um importante determinante das concentrações séricas do FVIII, FvW, FIX e FXI. No entanto, para estes dois últimos fatores esta relação é na verdade uma influência do FVIII. A estreita relação entre o FVIII, o FvW e o GS ABO já é bem estabelecida, onde indivíduos do GS não-O apresentam níveis mais elevados destes fatores, em comparação àqueles pertencentes ao GS O (Souto et al., 2000). No entanto, a influência do GS ABO sobre os níveis de FXI, detectada neste estudo nos indivíduos controles, ainda não havia sido descrito.

Outras variáveis, não consideradas na presente análise, já se mostraram importantes como determinantes do aumento plasmático de alguns fatores da coagulação. O diabetes e hipetrigliceridemia para o FVIII e o FvW; o índice de massa corpórea para estes fatores e também o FVII e o fibrinogênio; o tabagismo para o FVIII e o fibrinogênio; além do hormônio sexual feminino para o FVIII, FvW, o FVII e o fibrinogênio (Balleisen et al., 1985; Conlan et al., 1993).

6.4- Fatores da coagulação e TEV: avaliação do risco

Este estudo investigou os níveis de fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FvW e GS ABO como fatores de risco para TEV em uma população brasileira. Esta é a primeira pesquisa que avaliou simultaneamente estas variáveis em uma única população miscigenada.

6.4.1- FVIII, FvW e GSABO

O FVIII foi o fator da coagulação avaliado, em maior número de estudos, para risco de TEV (Koster et al., 1995a; Kraaijenhagen et al., 2000; Kyrle e cols, 2000). No entanto, em apenas um deles participaram indivíduos não-caucasóides, representado por afro-descendentes sem qualquer miscigenação (Patel et al., 2003).

Como a prevalência das trombofilias hereditárias pode variar conforme o grupo étnico (De Stefano et al., 1998; Rosendaal et al., 1998), o mesmo poderia ocorrer com os fatores da coagulação. Principalmente, porque como já discutido anteriormente, alguns estudos demonstraram variação na concentração dos fatores de coagulação de acordo com a etnia.

Os pacientes deste estudo mostraram uma prevalência de elevações do FVIII e FvW, cada um, de quase 35%. Este valor é superior aos relatados nas populações européias, onde o aumento deste fator foi encontrado em até 25% dos pacientes (Koster et al., 1995a; Kraaijenhagen et al., 2000).

Estes resultados demonstram a importância de elevações destes fatores na etiopatogenia do TEV, nestes pacientes brasileiros. A soma do total de trombofilias clássicas foi de 20%, neste grupo. O aumento do FVIII e FvW também sobressai-se, dentre as trombofilias, mesmo quando comparado a estudos nacionais que surpreendem pelo encontro de altas taxas destas anormalidades, como é o caso do FV de Leiden que ocorreu em 20% dos pacientes com TEV (Arruda et al., 1995).

Quando estes dados são comparados ao cenário internacional do estudo da trombofilia hereditária, vê-se que, na população brasileira, a importância epidemiológica destes fatores é similar ao FV de Leiden no norte europeu e à mutação do FII na região mediterrânea.

Os poucos estudos sobre trombose venosa em grupos étnicos não-caucasóides mostram que a prevalência da doença é similar entre caucasóides e afro-descendentes (Patel et al., 2003). Apesar do antecedente familiar de trombose ser comum entre os pacientes de origem afro-descendente com TEV (Dowling et al., 2002), a presença de trombofilia hereditária é bem menor que nos caucasóides.

O presente estudo, neste ponto de vista, contribuiu para o conhecimento da etiopatogenia da doença trombótica venosa em afro-descendentes. Os resultados encontrados permitem adicionar fatores de risco protrombóticos a um grupo étnico, onde a aplicação de testes clássicos de trombofilia é pouco relevante.

Os dados quantitativos (média, P90) do FVIII foram superiores aos encontrado entre os europeus. Este fato pode ser explicado pelo perfil étnico da população analisada. Já foi demonstrado que um dos fatores que influenciam os níveis deste fator é a etnia, pois os afro-descendentes apresentam níveis maiores quando comparados a caucasóides (Conlan et al., 1993). Realmente, os valores numéricos do FVIII foram similares aos descritos em afro-descendente (Patel et al., 2003).

O valor de corte considerado neste estudo, 212 UI/dL foi o P90 determinado nos controles. Este valor é superior ao considerado pelo grupo de Leiden, que foi de 150UI/dL. Caso este valor tivesse sido aplicado aos indivíduos brasileiro, 30% do grupo-controle e 70% do grupo de pacientes seriam considerados portadores de elevações deste fator.

A determinação de um ponto de corte têm importantes repercussões na prática clínica. Para definir o FVIII como fator de risco para TEV, é necessário estabelecer um valor de referência, com um acurado limite superior de normalidade. Como previamente ressaltado por Wells et al. (2005), o melhor ponto de corte para o FVIII deve ser

padronizado para cada população, levando-se em consideração variáveis que influenciam os níveis deste fator como idade, sexo e etnia. Estes cuidados evitam o erro de classificar falsamente um indivíduo carreador de uma trombofilia.

Neste trabalho tomou-se o cuidado na definição de um limite superior de normalidade, calculado pela dosagem do fator na população saudável da mesma área geográfica dos pacientes pesquisados. Como o presente estudo tem um perfil epidemiológico, objetivando determinar variáveis de risco trombótico, a utilização do P90 parece representar um bom ponto de corte.

Entretanto, para fins clínicos, com o objetivo de determinar decisões terapêuticas, talvez o uso do P90, por incluir 10% dos sujeitos saudáveis como portadores de uma anomalia, não seja o mais adequado, pois inclui mais que o valor padronizado de 2,5% da população normal. Nesta situação, valores de corte com mais alta especificidade são requeridos. Um estudo que objetivou traçar um valor de corte para uso clínico encontrou um valor elevado (270 UI/dL), com especificidade de 95% (Wells et al., 2005). Para os autores esta seria a melhor forma de identificar pacientes com o fator de risco, com baixo índice de falso positivo.

Na análise univariada, o risco de TEV associado a elevações do FVIII e FvW ocorreu independente do sexo, idade e etnia. Um aumento proporcional do risco foi observado para acréscimos nas concentrações destes fatores, o que configurou um efeito dose-dependente.

O risco de TEV para cada um dos fatores acima do P90 foi cinco vezes maior, quando comparado a níveis abaixo desse valor. O fato dos vários estudos utilizarem pontos de cortes diferentes para cálculo de risco, torna difícil a comparação dos resultados. No estudo LETS foram considerados dois pontos de cortes para cálculo de risco. O risco associado ao FVIII e FvW excedendo 150 UI/dl foi cinco e seis vezes maior que os níveis abaixo de 100 UI/dl, respectivamente (Koster et al., 1995a).

Na análise de pacientes afro-descendentes, que usou critério de corte semelhante ao presente estudo, o risco trombótico conferido pelo FVIII foi de quatro (Patel et al., 2003). No único trabalho prospectivo, o risco conferido foi de cinco para o FVIII e de 10 para o FvW. Os níveis de comparação superior e inferior foram, respectivamente, P95 e P25 (Tsai et al., 2002).

Conforme descrito por outros autores, o aumento das concentrações de FVIII não foi secundário a uma reação de fase aguda. Indivíduos com elevações da PCR e FVIII foram submetidos a uma nova coleta e somente inclusos no estudo após normalização deste marcador. Os níveis de PCR foram similares em pacientes e controles e não foi observada correlação entre os níveis dos fatores com este marcador inflamatório.

Da mesma forma, o aumento do FVIII e FvW não parece ser decorrente do processo pós-trombótico. Respeitou-se um tempo mínimo de seis meses após a trombose para a coleta do sangue, além de não ter havido diferença estatística nas concentrações destes fatores em diferentes períodos pós-trombóticos.

É importante mencionar que pacientes e controles com doenças, estados fisiológicos e uso de drogas relacionadas a um aumento desses fatores no plasma foram excluídos deste estudo.

Não é possível afirmar, com certeza, que a alta prevalência de níveis elevados do FVIII não possa ser decorrente do método escolhido para dosagem dos fatores. Como já descrito, o método coagulométrico é susceptível a inúmeros interferentes que levariam a falsos aumentos na dosagem. Para atenuar a possibilidade de tais erros foram excluídos pacientes em uso de terapia anticoagulante ou com SAAF, assim como foram empregadas técnicas adequadas de coleta e armazenamento.

Na análise individual das variáveis, o GS não-O em relação ao O conferiu o triplo do risco de trombose. O risco permaneceu, independente do sexo, idade ou etnia. A associação entre risco trombótico e GS ABO já havia sido aventado há décadas (Talbot et al., 1970). Entretanto, eram desconhecidos os mecanismos envolvidos nessa associação.

Nesta análise, após ajuste simultâneo das três variáveis, apesar de diminuído, o risco persistiu para o FVIII (OR: 3,0 IC95%: 1,6-5,7), o FvW (OR: 2,9 IC95%: 1,5-5,5) e o GS não-O (OR:2,2 IC95%: 1,4-3,6). Uma interpretação para tal fato é que estes fatores da coagulação e o GS ABO agem em sinergismo na instalação do TEV. No entanto, a ação individual dos mesmos é suficiente para caracterizar cada uma destas como variáveis independentes no risco trombótico.

A literatura é controversa sobre o papel do GS ABO e FvW no risco trombótico. No estudo LETS o risco conferido por estes, na análise univariada, desapareceu após correção simultânea dos três elementos. Os autores sugeriram que apesar da participação do FvW e GS ABO, a via final que efetua a trombogênese é o FVIII (Koster et al., 1995a).

Por outro lado, durante o seguimento prospectivo de um amplo “cohort” de sujeitos saudáveis o FVIII e o FvW emergiram como fatores de risco independentes para o TEV (Tsai et al., 2002).

Os resultados encontrados, no presente estudo, levantam uma questão de quais seriam os mecanismos pelos quais o FVIII, o FvW e o GS ABO agiriam no maior risco de trombose venosa.

O FVIII é uma proteína primordial no processo da coagulação por atuar como co-fator do FIX para ativação do FX e subsequente formação de trombina e fibrina. Sob esta ótica o FVIII levaria um estado protrombótico através da ativação da cascata da coagulação.

O estudo de O'Donnell et al. (2001) confirmou esta hipótese ao encontrar níveis elevados de fragmento₁₊₂ da protrombina e complexo trombina-AT, que são marcadores de geração de trombina, em mais de 75% de pacientes trombóticos com elevações do FVIII.

Uma outra explicação seria que níveis elevados do FVIII induziriam menor resposta à PCA. Esta especulação provém de um estudo, que mostrou uma redução de 50% do risco trombótico após ajuste para a presença de resistência à PCA na ausência do FV de Leiden (Kamphuisen et al., 2001a). Além disso, a análise de mulheres menopausadas mostrou alta prevalência de resistência à PCA atribuída ao aumento do FVIII (Marcucci et al., 1999).

O FvW é uma glicoproteína plasmática sintetizada e armazenada principalmente no endotélio vascular, mas também nos megacariócitos. Ele media a adesão plaquetária ao endotélio vascular, além de agir na agregação plaquetária (Vlot et al., 1998).

Na literatura, o FvW está associado principalmente com a gênese da trombose arterial (Martinelli et al., 2005). É sabido que ocorre aumento dos níveis deste fator nas grandes artérias com estenose devido a presença de placa de ateroma. Neste contexto, a inclusão do FvW na fisiopatologia da trombose arterial é assertiva, uma vez que o mesmo assume papel importante na hemostasia primária e as plaquetas têm uma papel relevante na formação do trombo arterial.

Considerando que os mecanismos hemostáticos são inter-relacionados, estas afirmações podem ser extrapoladas para a trombose venosa. A hipótese seria que o hiperfuncionamento do sistema hemostático primário, representado por elevações deste fator, repercutiria na hemostasia secundária, através de uma ativação mais potente da cascata da coagulação pelas plaquetas e formação do coágulo de fibrina.

Esta suposição é corroborada por um estudo que demonstrou maior deposição de FvW subendotelial como um dos responsáveis pelo potencial trombogênico aumentado das veias em relação as artérias (Cho e Ouriel, 1995).

Aliado a isso, o complexo FVIII-FvW é importante para estabilização plasmática dos níveis de FVIII. Na ausência do FvW a meia vida do FVIII diminui e a ação exercida pelo mesmo é comprometida. É o caso da ineficiência terapêutica do concentrado de FVIII sem FvW, na doença de von Willebrand (Vlot et al., 1998). Sob este prisma pode-se imaginar que níveis elevados do FVIII teriam um efeito maior na trombogênese com aumento também dos níveis do FvW.

Os mecanismo pelos quais o GS ABO atua no risco trombótico, parece envolver os antígenos ABO (H), onde o alelo H é protetor e o alelo A1 é predisponente para a doença.

A análise molecular de um estudo caso-controle com pacientes com TEV demonstrou a existência de dois grupos, um com baixo risco (OO, A2O1) caracterizado por excesso de antígeno H e outro, com alto risco (A1A1, A1B, A1O1, BO1) onde este antígeno é escasso (Scleef et al., 2004).

De fato, quando analisados os fenótipos não-O, observa-se que a atividade plasmática da enzima glicosil-transferase A, responsável em converter o antígeno H em A, é menor em sujeitos com o genótipo A2O1 (O'Donnel et al., 2002).

Posteriormente, Morelli et al. (2005) reforçaram esta hipótese ao descrever que os genótipos não-OO conferiram o dobro do risco trombótico quando comparados aos genótipos OO. As exceções foram os genótipos homozigoto A2 e combinações A2O, que não mostraram relação com a doença. Por outro lado, foi demonstrado que o responsável pelo maior risco de TEV associado ao GS não-O era o alelo A1 (Tirado et al., 2005).

Também deve ser enfatizado que os antígenos ABO além de expressos no FvW, também são expressos nas hemácias, plaquetas e endotélio vascular. A ação do GS ABO na agregação plaquetária, hemossedimentação talvez possa influenciar no processo de trombogênese.

Frente a estes resultados, que mostram uma forte associação do FVIII com risco trombótico, aliado a outros estudos que relataram dados semelhantes, inclusive prospectivamente, além do efeito dose dependente, pode-se inferir uma relação causal do FVIII no risco de TEV.

Se realmente a associação entre FVIII e TEV é causal, estima-se que 30% dos episódios trombóticos na população analisada podem ser atribuídos a elevações deste fator. Este valor é superior ao encontrado em pacientes caucásicos, onde o FVIII contribuiu em cerca de 16% do total de eventos da doença (Rosendaal, 2000).

6.4.2- Fibrinogênio

No presente estudo o fibrinogênio não foi relacionado ao risco de TEV (OR: 1,3 IC95%: 0,6-2,6). Há relato de quatro estudos casos-controle sobre a associação entre fibrinogênio e risco de TEV, com resultados discrepantes.

No LETS, com um “cohort” formado por 474 indivíduos com TEV, pacientes com concentrações de fibrinogênio acima de 5g/L apresentaram um risco quatro vezes maior de trombose, quando comparados àqueles com níveis abaixo de 3g/L (Kamphúisen et al., 1999).

A análise subsequente desta casuística por Van Hylckama Vlieg e Rosendaal (2003a), tendo como ponto de corte o P95 (4,5g/L), mostrou um risco de TEV de aproximadamente três. O ajuste para a mutação G20210A no gene do FII, FV de Leiden, PCR e elevações de FVIII, FIX e FXI, levou ao desaparecimento desse risco (OR: 1,5 ; IC95%: 0,8-3,0).

Os resultados encontrados neste estudo são similares aos de Austin et al. (2000), único dentre os estudos progressos a avaliar um pequeno grupo de pacientes não caucasóides (negros). Este fator também não predispôs a TEV em uma análise prospectiva (Tsai et al., 2002).

É importante que os resultados advindos deste estudo com pacientes brasileiros, sejam analisados com ressalva. O tamanho amostral requerido de 500 doentes não foi alcançado, não sendo possível excluir definitivamente o papel do fibrinogênio sobre o risco trombótico.

O fator que pode explicar as diferenças entre o presente estudo e o de Leiden talvez seja a idade. A idade média no grupo brasileiro foi de 35 anos, comparado a 45 anos no grupo holandês. É reconhecido que as concentrações deste fator aumentam com a idade (Austin et al., 2000), sendo maior naqueles acima de 45 anos (Van Hylckama Vlieg e Rosendaal, 2003a).

De fato, quando os pacientes de Leiden foram estratificados por faixas etárias, o risco desapareceu entre os jovens, ficando restrito a pacientes acima de 45 anos (Van Hylckama Vlieg e Rosendaal, 2003a). Da mesma forma não foi demonstrado risco trombótico associado a elevações deste fator entre mulheres abaixo de 49 anos (Van Hylckama Vlieg e Rosendaal, 2003b).

Estes achados levaram estes autores à hipótese de que o risco trombótico conferido pelo fibrinogênio seria reflexo de outros fatores de riscos incorporados ao longo dos anos.

Como descrito na maioria dos trabalhos sobre a questão, o fibrinogênio não foi fator de risco importante para TEV. Dentre os estudos que demonstraram esta associação a análise simultânea de variáveis protrombóticas tornou o risco irrelevante.

6.4.3- FVII e FX

Neste trabalho o FVII (OR: 1,6; IC95%: 0,8-3,1) e o FX (OR: 1,2; IC95%: 0,6-2,4) não foram relacionados ao risco de TEV.

O FVII foi investigado em relação ao risco de TEV em dois trabalhos. Koster et al., (1994) analisaram os primeiros 199 pacientes da casuística de Leiden e, semelhante aos resultados do presente estudo, níveis elevados deste fator não foram relacionados ao risco de trombose.

Por outro lado, o FVII foi referido como fator de risco trombótico entre indivíduos com níveis acima do P95 (OR: 3,5; IC95%: 1,8-6,7), quando comparados àqueles abaixo do P25. Após análise multivariada, o risco apesar de reduzido (OR: 2,4; IC95%: 1,2-4,8), persistiu (Tsai et al., 2002).

O fato da única variável considerada no ajuste do risco conferido pelo FVII ter sido o FVIII, pode ter contribuído para obtenção destes resultados. Fatores de risco bem estabelecidos para a trombose, como a mutação G20210A no gene do FII e o FV de Leiden, não foram mencionados (Tsai et al., 2000).

Evidências prévias da relação entre o FX e TEV provêm de um único estudo com 474 pacientes do LETS. O FX acima do P90 (126 U/dl) conferiu um pequeno risco, que desapareceu após ajuste para os demais fatores dependentes da vitamina K (de Visser et al., 2001).

6.4.4- FIX e FXI

Entre os pacientes brasileiros deste estudo, os níveis plasmáticos de FIX e FXI acima de 150 UI/dl foram relacionados ao dobro do risco trombótico, quando comparados a valores inferiores. Contudo, houve desaparecimento do risco na análise multivariada.

Estes fatores apresentaram comportamentos distintos quando analisados em subgrupos da população. O FXI e FIX só foram relacionados ao risco trombótico entre indivíduos abaixo e acima de 35 anos, respectivamente. Da mesma forma, o FXI somente conferiu risco no sexo feminino. Estes resultados foram interpretados como acaso, já que a separação da casuística em dois grupos reduziu o poder da amostra.

A análise onde cada uma das variáveis foram ajustadas para estes fatores individualmente, mostrou que o risco desapareceu com a inclusão do FVIII no modelo de regressão. Isto sugere que o efeito do FIX e FXI no risco trombótico é na verdade um reflexo do aumento do FVIII.

O resultado acima descrito pode ser justificado pela correlação positiva encontrada entre os níveis do FVIII, FIX e FXI. A ligação entre eles seria o GS ABO que, neste estudo, também foi determinante das concentrações destes fatores. Indivíduos do GS não-O apresentaram maiores concentrações destes fatores, comparados aos do GS O. Contudo, esta influencia, foi secundário ao FVIII.

Como visto, nos indivíduos controles deste estudo, este é o primeiro relato do GS ABO como determinante das concentrações do FXI. Por outro lado não é sabido os mecanismos pelos quais o FXI teria influência do GS ABO, o que não afasta a hipótese de um achado ao acaso.

Apesar do FIX e FXI não serem fatores de risco independentes para TEV, os achados da análise combinada destes fatores com o FVIII, GS não-O e FvW sugeriram que os mesmos potencializaram a ação das variáveis independentes. No entanto, esta conclusão não é definitiva, pois apesar de um risco superior ter sido visto com a associação destas variáveis, quando comparado à ação individual das mesmas, o IC (95%) foi amplo, com superposição numérica entre os mesmos.

A avaliação do risco de trombose representado por estes fatores, de acordo com diferentes quartis demonstrou que apenas o FXI exerceu um efeito dose-dependente. Portanto, mesmo que na análise multivariada o FXI não seja um fator de risco independente, talvez contribua para o risco trombótico, principalmente quando em níveis mais elevados.

Estudos prévios, envolvendo o FIX, FXI e o risco de primeiro evento trombótico, foram realizados exclusivamente pelo grupo de Leiden. O ponto de corte foi o P90, dosado em controles e o método usado para a dosagem dos fatores foi o imunológico.

No estudo sobre o FIX, os níveis acima de 129 U/dl foram considerados fatores de risco para TEV tanto na análise univariada (OR:2,8; IC95%: 1,9-4,3) como após ajuste para outras variáveis, incluindo o FVIII (Van Hylckama Vlieg et al., 2000). É importante mencionar algumas características deste estudo que podem justificar achados diferentes do presente estudo.

Em primeiro lugar, a análise multivariada foi realizada por um modelo de regressão condicionado para determinadas variáveis, individualmente. Outras variáveis como GS ABO e FvW, que como já demonstrado, podem assumir papéis relevantes no risco de TEV, não foram incluídas no modelo.

O método funcional, utilizado neste trabalho, pode suscitar dúvidas sobre o resultado, já que como descrito anteriormente ele pode não ser a representação fiel da proteína do fator. Para tal, a técnica imunológica é mais fidedigna. Esta dúvida só poderia ser solucionada com estudo no qual os dois métodos fossem confrontados, da mesma forma que foi feito com o FVIII.

Outro aspecto a ser comentado refere-se ao ponto de corte do estudo holandês, de 129 U/dL, que corresponderia ao P75 na nossa população saudável. Caso este percentil tivesse sido considerado neste estudo, o FIX seria considerado um fator de risco para TEV, tanto na análise univariada (OR: 3,3; IC95%: 2,0-5,4) como na multivariada (OR: 2,1; IC95%: 1,3-3,6). Isto mostra a importância de se determinar os valores de normalidade em cada população para a análise de risco.

Meijers et al. (2000) descreveram o FXI, acima de 120,8%, como fator de risco para TEV (OR: 2,2; IC95%: 1,5-3,2). Foi realizado ajuste simultâneo com outras variáveis protrombóticas, tendo o risco permanecido (OR: 1,9; IC95%: 1,3-2,9). No entanto o FIX, FvW e GS ABO não foram considerados na análise.

Uma justificativa para o presente estudo, diferente do Lets, falir em mostrar o FIX e FXI como fator de risco independente para TEV pode estar na população analisada. As características da casuística de ambos os estudos são similares com relação ao sexo, frequência de fatores de risco adquiridos ou trombofilia. Sendo assim a idade mais jovem e a etnia miscigenada dos pacientes desta pesquisa pode ter influenciado os resultados

O modelo que rege o risco trombótico é idade dependente onde o potencial de se ter doença aumenta com a incorporação de fatores de risco no decorrer da vida.(Rosendaal, 1999b). Além do que, como mostrado neste estudo, a separação em etnias anulou o risco exercido por estes fatores, entre pacientes não-caucasóides.

É importante ressaltar que o tamanho desta casuística, apesar de ter seguido o cálculo amostral, foi bem inferior aos mais de 400 pacientes inclusos no estudo de Leiden. Como visto neste e outros trabalhos, as concentrações séricas do FVIII, FIX e FXI são interrelacionadas, podendo assim ser difícil separar o efeito isolado de cada uma das variáveis no processo de trombogênese. Sob este prisma talvez um maior número de sujeitos seja capaz de revelar o efeito independente do FIX e FXI no risco trombótico.

Desconsiderando alguns interferentes que possam colocar em dúvida os achados deste estudo, pode-se concluir que o FIX e FXI não assumiram papel importante no risco trombótico nos pacientes brasileiros. Uma vez que o risco não se manteve após confronto com outras variáveis protrombóticas, especialmente o FVIII.

Entretanto, como explicar que apenas o FVIII esteja associado ao risco trombótico, já que a formação do coágulo de fibrina é consequência da interação dinâmica entre todos os fatores da coagulação?

A trombina desempenha papel central na cascata da coagulação, pois além de participar da fase final da formação do coágulo, também atua na via intrínseca pela ativação do FXI e subsequentemente FIX e FVIII. Por estas razões, a geração de trombina é um bom reflexo do potencial da coagulação, sendo por esta razão utilizada para estudo da cinética dos fatores da coagulação e, também, para demonstrar a hipercoagulabilidade gerada por uma determinada trombofilia (Spronk et al., 2003).

Ainda que não seja o único mecanismo, talvez o efeito exercido pelo aumento dos fatores da coagulação no risco trombótico ocorra pela maior geração de trombina.

O estudo de Butenas et al. (1999) ajuda a responder a questão acima. Estes autores mostraram, em modelo artificial de coagulação, os efeitos de concentrações elevadas dos fatores da coagulação sobre a geração de trombina. Apenas o aumento do fator II, em maior grau e, do FVIII, em menor grau, promoveram maior formação de trombina.

É provável que, se extrapolar o resultado desse estudo experimental, com todas as restrições implícitas, para os pacientes com TEV, poder-se-á compreender as diferenças encontradas no risco trombótico relacionado ao aumento dos fatores de coagulação analisados no presente estudo.

6.5- Fatores da coagulação e trombose em sítio não usual

O GS ABO, FvW, FVIII e o FXI foram associados a um aumento do risco trombótico em pacientes com doença em sítio não-usual. Antes de discutir estes achados é importante realçar que a trombose em sítio incomum foi representada por várias patologias. Sendo assim, a conclusão desta análise pode ser simplista e não espelhar o real comportamento da oclusão venosa extra membro inferior.

O aumento do FXI apenas foi considerado fator de risco para TEV nos pacientes com trombose em sítio não-usual, enquanto o FIX apenas esteve associado a doença em membro inferior. Contudo, estes resultados devem ser analisados com cuidado, já que a separação da casuística em dois grupos, gerou redução no poder estatístico pela diminuição do tamanho amostral.

Pelo que se conhece até o momento, este é o primeiro estudo controlado que estudou a relação entre fatores da coagulação e risco trombótico através de análise isolada de um grupo de pacientes com trombose em sítio incomum.

Elevações das concentrações de FVIII foi a única trombofilia encontrada em dois relatos de casos de trombose de veia porta (Brandenburg et al., 2001; Julapalli et al., 2003). Em uma série de casos de trombose cerebral o FVIII foi a desordem da coagulação mais freqüente, ocorrendo em metade dos pacientes analisados (Cakmak et al., 2003).

O FVIII e FvW foram testados para o risco da doença em pacientes com trombose de veia de retina, não sendo detectado diferenças estatísticas nas concentrações dos mesmos entre pacientes e controles (Boyd et al., 2001).

A prevalência de fatores de risco hereditários e adquiridos na trombose em sítio não usual diverge da trombose em membro inferior (Martinelli, 2002). Talvez isto também possa ser aplicado ao aumento dos fatores de coagulação e justificar os resultados aqui encontrados.

6.6- Trombose recorrente

A taxa cumulativa de recorrência foi de 9% em cinco anos, segundo curva de Kaplan-Meyer. Esse resultado foi inferior quando comparado a dados de outros estudos, nos quais as taxas foram de 12% a 25% em cinco anos (Christiansen et al., 2005; Prandoni et al., 1996).

O fato de terem sido excluídos os pacientes com situações clínicas associadas a um alto risco de recorrência, como SAAF e câncer, poderia explicar em parte a menor taxa de recorrência observada neste estudo. Além disso, a maioria dos participantes do estudo (70%) tiveram seu primeiro episódio trombótico desencadeado por um fator de risco adquirido e isto está associado a um decréscimo na recorrência.

Neste trabalho, não houve qualquer fator clínico que possa ter predisposto ao risco de recorrência. A literatura relata entre os fatores de risco para um segundo evento trombótico o sexo masculino, o uso de pílula contraceptiva (Christiansen et al., 2005) e evento prévio espontâneo (Baglin et al., 2003).

A presença da mutação G20210A no gene do FII foi a única trombofilia demonstrada como fator de risco para recorrência. São controversos os trabalhos da literatura sobre trombofilia e risco de recorrência. Apesar desta mutação já ter sido associada ao risco de recorrência (Simioni et al., 2000), a deficiência dos inibidores da coagulação (Prandoni et al., 1996), a homozigose para FV de Leiden (Emmerick et al., 1997), e a associação de trombofilias (De Stefano et al., 1999; Meinardi et al., 2002) parecem ser as situações que mais estão relacionadas a episódios recorrentes de trombose.

Na população analisada, o FVIII não conferiu maior risco de recorrência. Estes resultados divergem de dois estudos prospectivos (Kyrle et al., 2000; Legnani et al., 2004) e um retrospectivo (Kraaijenhagen et al., 2000) que mostraram níveis elevados deste fator relacionados ao risco desta complicação.

Os pacientes brasileiros deste estudo com FIX e FXI, acima do P90, apresentaram um risco quatro e três vezes maior de recorrência, respectivamente. Após ajuste para trombofilia o risco persistiu, indicando que o risco de recorrência não é decorrente da coexistência de outros fatores genéticos.

Achados semelhantes aos deste trabalho, foram descritos pelo grupo austríaco AUREC. Em uma análise prospectiva, os pacientes com FIX acima do P90 após o primeiro episódio trombótico, apresentaram três vezes mais risco de recorrência (Weltermann et al., 2003).

Como descrito anteriormente, a reformulação do modelo de coagulação na década de 90, veio realçar o papel do FXI na coagulação sanguínea, por sua importância tanto na geração secundária de trombina e estabilização do coágulo, assim como na ativação do TAFI e inibição da fibrinólise.

Recentemente foi descrito uma interação entre o sistema fibrinolítico e a cascata da coagulação, com repercussão na recorrência da trombose venosa. O aumento das concentrações de TAFI entre pacientes após o primeiro evento trombótico, associado a elevações dos fatores IX e XI conferiram risco de um segundo episódio de trombose. É interessante frisar que o risco só foi visto com o aumento concomitante do TAFI e tais fatores (Eichinger et al., 2004).

Desta maneira, a ativação continuada e exacerbada do FIX e FXI talvez possa favorecer uma maior geração de TAFI e conseqüente instalação de uma nova trombose. Esta seria uma explicação para justificar o papel destes fatores na recorrência.

A presença de doença trombótica residual, após o tratamento para trombose, é reconhecidamente um importante fator de risco para TEV recorrente (Prandoni, 2003/2004). Além disso, o estudo de Bank et al. (2003/04) mostrou alguns estados protrombóticos, incluindo a mutação G20210A no gene do FII, associados a um maior risco de trombo residual. A partir destes achados poder-se-ia fazer uma hipótese de que o aumento das concentrações dos fatores da coagulação, culminaria em um estado de hipercoagulabilidade mantido, que impediria a recanalização do trombo.

Os resultados desta pesquisa divergem do LETS, no qual não houve relação entre variáveis protrombóticas, inclusive fatores da coagulação (FVIII, FIX, FXI), e o risco de recorrência. Fatores clínicos como sexo masculino, ausência de fatores precipitantes adquiridos no primeiro episódio foram mais importantes como preditivos de um segundo evento trombótico (Christiansen et al., 2005).

Os estudos sobre fatores da coagulação e risco de retrombose apresentam resultados conflitantes, que podem advir do desenho do estudo e critérios de seleção dos pacientes. O estudo AUREC, diferente do LETS, excluiu indivíduos com algumas trombofilias e a presença de eventos precipitantes adquiridos, além de um menor tempo de acompanhamento dos pacientes.

O TEV por ter etiologia multifatorial necessita de uma combinação de fatores de risco que, ao se somarem, devem desencadear o episódio trombótico individual. Sendo assim, é provável que discrepâncias no papel dos fatores da coagulação em predispor recorrência seja devido à complexa interação de fatores de risco genéticos e adquiridos, que apresenta um certo grau de variação em cada indivíduo.

6.7- Avaliação dos polimorfismos no gene da LRP

O presente estudo analisou três polimorfismos no gene LRP, C200T, A775P e, D2080N. Este é o primeiro estudo que avaliou estes polimorfismos em pacientes com TEV.

O estudo de Schambeck et al. (2004) ajudou a esclarecer os mecanismos envolvidos no aumento do FVIII na trombose venosa. Os pacientes com trombose apresentavam diminuição da fração livre do FVIII, sugerindo que a alteração no clearance deste fator poderia estar envolvida na fisiopatologia do aumento de FVIII e TEV.

A LRP, até o momento, é considerado a única molécula associada ao catabolismo do FVIII. Sendo assim, optou-se por investigar polimorfismos no gene codificador deste receptor e sua relação com os níveis de FVIII e risco de TEV.

Nesta população, o polimorfismo A775P não foi detectado em nenhum dos pacientes ou controles, e o polimorfismo D2080N foi detectado em heterozigose apenas em 3% em cada um dos grupos.

Estes achados são concordantes com a literatura que, desde a primeira descrição destes polimorfismos, mostrou que os mesmos são pouco prevalentes, ao redor de 2% para ambos (Van Leuven et al., 1998). Em análise posterior, a prevalência de heterozigotos para os polimorfismos A775P e D2080N foi 0,7% e 4%, respectivamente (Pocaticorn et al., 2003).

Pelo fato da LRP estar relacionada ao metabolismo lipídico, a grande maioria dos estudos que avaliou este gene teve como alvo portadores de doenças desta natureza. Sendo assim torna-se difícil comparar os resultados dos estudos pregressos com este, que não envolve sujeitos com este tipo de patologia.

Um estudo caso-controle de Pocathikorn et al. (2003), restrito a caucasóides, mostrou prevalências destes polimorfismos, entre pessoas saudáveis, similares aos desta pesquisa (nula para o genótipo AP e de 3% para o DN). Estes achados sugerem que estes polimorfismos são raros independente da etnia, uma vez que a população aqui analisada foi miscigenada.

O polimorfismo C200T foi comum, com uma ocorrência de cerca de 45% para o estado heterozigoto e 15% para o homozigoto T. Este polimorfismo, assim como os demais estudados, não mostrou diferença na frequência alélica ou genotípica entre pacientes e controles. Deste modo, não pôde ser demonstrado qualquer associação dos três polimorfismos com o TEV.

Dois dos polimorfismos aqui analisados, já foram estudados por outros autores na doença coronariana arterial: o C200T (éxon 22) e o A775P (éxon14). Em um destes trabalhos houve uma maior frequência do genótipo AP nos pacientes em comparação aos controles normais ($p=0,03$). Entretanto, devido à baixa frequência deste genótipo não foi possível atribuir a ele um papel na doença. Com relação ao outro polimorfismo, o alelo C foi significativamente mais freqüente nos doentes, sendo o genótipo CC associado positivamente ao risco de coronariopatia (OR:1,5; IC95%: 1,2-1,8; $p=0,001$) (Pocathikorn et al., 2003).

É importante ressaltar que apesar do papel do receptor LRP, com o metabolismo lipídico, não foi encontrado qualquer associação consistente de polimorfismos neste gene com o perfil lipídico sérico (Harris et al., 1998; Benes et al., 2001). Uma vez que níveis elevados de FVIII também foram descritos como fatores de risco para coronariopatia (Meade et al., 1993), poderia haver alguma relação entre esses polimorfismos e a ligação do receptor com o FVIII. Entretanto, os resultados aqui descritos não favorecem essa hipótese, uma vez que não houve diferença na prevalência dos genótipos entre os pacientes com TEV e os controles. Talvez o tamanho da amostra tenha influenciado, uma vez que o estudo prévio analisou cerca 600 casos e 700 controles.

A investigação da relação dos polimorfismos no gene da LRP com a concentração plasmática do FVIII e FvW não mostrou nenhuma associação com o polimorfismo C200T. A análise do polimorfismo A775P não pôde ser realizada devido a sua ausência tanto nos pacientes como nos controles.

Em contrapartida o polimorfismo D2080N mostrou uma certa influência sobre o FVIII e o FvW. O genótipo DN foi associado a menores concentrações destes fatores, nos controles. Estudo prévio de Morange et al. (2004), que avaliou 400 indivíduos saudáveis, mostrou menores concentrações plasmáticas destes fatores, entre sujeitos com o mesmo genótipo.

É importante ressaltar que, entre os pacientes com TEV, não foi demonstrado associação do alelo N com estes fenótipos. Talvez, uma possível explicação para tal fato seja o tamanho amostral. Como este polimorfismo é de ocorrência rara na população geral, haveria necessidade de um número maior de pacientes para que esta associação pudesse ser detectada. Isto ficou evidente, uma vez que somente nos controles, que compreendem uma maior casuística, é que essa relação pôde ser demonstrada.

Outro ponto a ser considerado é que a população de pacientes não parece ser o grupo mais indicado para demonstrar determinantes da variabilidade plasmáticas do FVIII e FvW. Uma grande parte destes indivíduos apresentavam elevações do FVIII e FvW que podem ser decorrentes de múltiplos fatores, o que pode ter interferido nos resultados encontrados no grupo de pacientes.

Os relatos de elevações do FVIII como fator de risco para TEV, a partir do trabalho de Koster et al. (1995a), confirmado posteriormente por outros autores, gerou a questão de quais seriam os mecanismos envolvidos no aumento do FVIII. Os estudos com este objetivo sugeriam um fator genético, já que foram excluídos através da correção por marcadores inflamatórios e dosagens sucessivas do fator um fenômeno reacional transitório pós-trombótico. Devido às evidências da literatura, grupos de estudo realizaram investigações genéticas sobre a questão, onde os genes do FVIII e FvW foram os alvo iniciais.

Os estudos também não conseguiram demonstrar nenhuma relação entre esses fatores e polimorfismos na região promotora e região 3' do gene do FVIII (Mansvelt et al., 1998), assim como na região promotora do FvW (Kamphuisen et al., 2001b, Bowen et al. 2001). Até mesmo variações gênicas no sítio de clivagem do FVIII para a PCA foram estudadas, sem sucesso (Roelse et al., 1996).

Estudos mais recentes, pela primeira vez, obtiveram sucesso em demonstrar determinante genético, extra GS ABO, nas concentrações do FVIII. Através de “screen” genético, foram relatados lócus nos cromossomos 8, 5, 11 e 18 associados à variabilidade plasmática deste fator (Soria et al., 2003; Berger et al., 2005).

Não se pode deixar de mencionar também o papel do gene da LRP, através do polimorfismo D2080N, genótipo DN, sobre as níveis de FVIII. Estes achados corroboram a teoria de que elevações do FVIII em pacientes com TEV provém de uma interação complexa de múltiplos fatores genéticos.

Um estudo em modelo animal deficiente de LRP demonstrou elevação do FVIII após infusão de RAP, molécula bloqueadora de ligação do LRP e vários outros receptores de superfície da família LDL (Bovenschen et al., 2003a). Este achado sugere que outros receptores desta família possam estar envolvidos no catabolismo deste fator. Posteriormente, esta hipótese foi comprovada através da verificação de um efeito cooperativo entre os receptores LDL e LRP na regulação dos níveis do FVIII (Bovenschen et al., 2005).

A falência do presente estudo em correlacionar o risco trombótico a alguns polimorfismos no gene LRP, não exclui um papel deste gene na patofisiologia do TEV secundário a elevações destes fatores. Não se pode deixar de frisar, que o gene é amplo e polimórfico com quase 50 polimorfismos já descritos e a presente análise foi restrita a três destes.

A atual tendência de uma origem poligênica interferindo nas níveis plasmáticos do FVIII reforça a necessidade de estudos adicionais envolvendo este ou outros genes, a fim de elucidar definitivamente a origem do acréscimo deste fator na trombose venosa.

6.8- Fatores da coagulação devem ser incluídos na avaliação de pacientes com TEV?

Atualmente um assunto em debate é a necessidade de se investigar laboratorialmente a trombofilia em pacientes com TEV (Martinelli, 2003; Machin, 2003). Em termos práticos, a aplicação destes testes só deveria ser justificada se os mesmos fossem capazes de influenciar decisões terapêuticas.

Os argumentos a favor referem que os testes seriam úteis para determinar a duração da anticoagulação em pacientes carreadores de trombofilias com alto risco de recorrência, como é o caso da homozigose para o FV de Leiden ou mutação no gene do FII, ou da deficiência grave dos anticoagulantes naturais. Além disso, a aplicação dos testes seria benéfica para indicar profilaxia primária em situações de risco a familiares de pacientes trombofílicos (Martinelli, 2003).

Em contrapartida, não há recomendações baseadas em evidências para estratificar o risco ou prolongar a terapia anticoagulante, em pacientes com algum teste positivo para trombofilia. Pelo contrário, alguns autores relatam baixo risco de recorrência entre carreadores de trombofilia hereditária, que nem mesmo excede o risco de sangramento associado à terapia anticoagulante prolongada (Sarasin et al., 1998).

Também deve ser considerado o alto custo financeiro destes testes, que poderiam ser aplicado em situações de maior custo-benefício para o paciente (Machin, 2003). Esta consideração é ainda mais importante em países em desenvolvimento, onde os recursos são restritos e devem ser maximizados para ações com reconhecido impacto na saúde da população.

Os fatores da coagulação e o risco de TEV representam um achado recente na trombofilia. A prevalência, assim como o risco relativo destes fenótipos no cenário da doença vascular venosa é ainda desconhecida para maior parte das populações do mundo. Deste modo há possibilidade de achados totalmente diversos aos descritos na literatura. O presente estudo ilustra este problema, ao mostrar um comportamento próprio destas variáveis em um grupo de pacientes miscigenados, nem sempre correspondente aos relatados em outros países.

Da mesma forma que outras trombofilias, os critérios que guiam a inclusão da dosagem destes fatores na avaliação de pacientes trombóticos seria a habilidade destes testes em orientar terapêutica ou aconselhamento, aos pacientes e familiares. Com relação aos pacientes, os critérios para a inclusão da dosagem destes fatores nos protocolos de trombofilia seria o valor preditivo para recorrência da trombose.

Como já descrito, há quatro estudos sobre o FVIII e um sobre o FIX que relaciona níveis altos deste fatores ao risco de trombose recorrente. Por outro lado, a maior casuística a realizar esta análise, a de Leiden, não encontrou um aumento significativo no risco de trombose recorrente para qualquer trombofilia, inclusive para o FVIII, FIX e FXI.

Uma vez que o número de estudos sobre fatores da coagulação e TEV recorrente é pequeno, além de apresentarem resultados conflitantes são necessárias novas investigações em outras populações antes de uma conclusão definitiva.

Em relação aos familiares, deve ser considerado a indicação de anticoagulante profilático em situações de risco e aconselhamento na escolha de método contraceptivo ou terapia de reposição hormonal. Apesar de já ter sido mostrado agregação familiar de níveis elevados de FVIII, não há estudos controlados e prospectivos com estes indivíduos que comprovem um maior risco de doença nestas situações.

Uma outra questão que merece destaque, diz respeito aos cuidados técnicos para realização deste exames. Deve ser lembrado a necessidade de um ponto de corte que deve ser padronizado para cada população. Aliado a isso, é necessária atenção para o período da coleta a fim de evitar reação de fase aguda causada pelo evento trombótico ou outros processos inflamatórios menores.

Por todas estas razões, níveis elevados dos fatores da coagulação (especialmente FVIII, FvW) devem ser incluídos no espectro multifatorial de risco para TEV. Entretanto não se tem indícios suficientes, baseados em evidências, para impor estes fatores na avaliação de pacientes com trombose venosa.



7- CONCLUSÕES

- 7.1-** O GS não-O e níveis plasmáticos elevados de FvW, FVIII, FIX e FXI foram considerados fatores de risco para TEV nesta população brasileira miscigenada, mas apenas os três primeiros foram fatores de risco independentes.
- 7.2-** O risco de TEV relacionado ao GS não-O, FVIII e FvW foi semelhante em ambos os sexos, em diferentes faixas etárias, etnias e sítios de trombose.
- 7.3-** O FIX e o FXI, em níveis elevados, foram relacionados ao risco trombótico apenas em pacientes com trombose em membro inferior ou sítio não usual, respectivamente.
- 7.4-** A recorrência dos episódios de trombose teve relação apenas com o aumento do FIX e do FXI.
- 7.5-** A análise de três polimorfismos no gene da LRP (C200T, A775P e D2080N) nos pacientes com trombose desta população brasileira não revelou associação com o risco de TEV ou com os níveis de FVIII e FvW.
- 7.6-** O polimorfismo D2080N foi determinante dos níveis plasmáticos de FVIII e de FvW nos indivíduos saudáveis deste estudo. Menores concentrações destes fatores foram encontrados em portadores do genótipo DN.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. Análise de dados epidemiológicos. In: Rouquayrol MZ. Epidemiologia e Saúde. 6ª Ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2003. p.179-92.

Alves SJ, da Silva SMS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet 2000; 67(3):775.

Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Worcester DVT study. Arch Intern Med 1991; 151:933-8.

Annichino-Bizzacchi JM.. Avaliação clínica, laboratorial e molecular de paciente brasileiros portadores de trombose venosa. Tese (Livre Docência) - Universidade Estadual de Campinas-Faculdade de Ciências Médicas. Campinas-SP, 2003.

Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. Am J Hematol 1995; 49:242-3.

Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Gonçalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. Thromb Haemost 1997; 78:1430-33.

Austin H, Hooper WC, Lally C, Dilley A, Ellingsen D, Wideman C, Wenger NK, Rawlins P, Silva V, Evatt B. Venous thrombosis in relation to fibrinogen and factor VII genes among African-Americans. J Clin Epidemiol 2000; 53:997-1001.

Baglia FA, Badelino KO, Li CQ, Lopez JA, Walsh PN. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. J Biol Chem 2002; 277:1662-68.

Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. Lancet 2003; 362:523-6.

Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost* 1985; 54(2):475-9.

Bank I, Tick LW, Hutten BA, Kramer MHH, Middeldorp S, Büller HR. Acquired and Inherited Thrombophilic Factors and the Risk for Residual venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/04; 33:192-6.

Benes P, Muzik J, Benedík J, Elbl L, Vašků A, Šišková L et al. The C766T low-density lipoprotein receptor related protein polymorphism and coronary artery disease, plasma lipoproteins, and longevity in the Czech population. *J Mol Med* 2001; 79(2-3):116-20.

Benes P, Jurajda M, Zaloudik J, Izakovicova-Holla L, Vacha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5(3):R77-81.

Berger M, Mattheisen M, Kulle B, Schmidt H, Oldenburg J, Bickeboller H, et al. High factor VIII levels in venous thromboembolism show linkage to imprinted loci on chromosomes 5 and 11. *Blood* 2005; 105(2):638-44.

Bertina RM, Koeleman RPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronda H et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.

Blajchman MA, Austin RC, Fernandez-Rachubinski F, Sheffield WP. Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency. *Blood* 1992; 80(9):2159-71.

Bombeli T, Basic A, Fehr J. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. *Am J Hematol* 2002; 70(2):126-32.

Bouma BN, Von dem Borne PAK, Meijers JCM. Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis - a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:24-5.

Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, van Vlijmen BJM. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* 2003a; 101: 3933-39.

Bovenschen N, Boertjes RC, van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB et al. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein and Factor Ix share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 2003b; 278(11):9370-7.

Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LH, van Vlijmen BJ. Blood LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* 2005; 106(3): 906-12.

Bowen DJ, Maclean RM, Pellard S, Collins PW. High concentrations of coagulation factor VIII and thrombosis: is the factor VIII - binding domain of von Willebrand factor implicated? *Br J Haematol* 2001; 113:655-7.

Bowen DJ. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS 13. *J Thromb Haemost* 2003; 1:33-40.

Boyd S, Owens D, Gin T, Bunce K, Sherafat H, Perry D et al. Plasma homocysteine, methylene tetrahydrofolate reductase C677T and factor II G20210A polymorphisms, factor VIII, and VWF in central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1313-5.

Boyer C, Wolf M, Rothschild C, Migaud M, Amiral J, Mannucci PM, Meyer D, Larrieu MJ. An enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitation of human factor VII. *Thromb Haemost* 1986; 56:250-5.

Brandenburg VM, Frank RD, Wasmuth HE, Gartung C. Elevated levels of factor VIII:C as a possible risk factor for portal, splenic, and mesenteric vein thrombosis. *Gastroenterology* 2001; 120(6):1563-4.

British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on oral anticoagulation: 3rd ed. *Br J Haematol* 1998; 101:374-87.

Broze GJ. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol* 1992; 29:159-69.

Butenas S, van't Veer C, Mann KG. Normal thrombin generation. *Blood* 1999; 94:2169-78.

Cakmak S, Derex L, Berruyer M, Nighoghossian N, Philippeau F, Adeleine P, et al. Cerebral venous thrombosis: Clinical outcome and systematic screening of prothrombotic factors. *Neurology* 2003; 60(7):1175-8.

Carter JC. The natural history and epidemiology of venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1994; XXXVI(6):423-38.

Cate HT; Biemond BJ; Levi M; Wuillemin WA; Bauer KA; Barzegar S; et al. Factor XIa induced activation of the intrinsic cascade in vivo. *Thromb Haemost* 1996; 75(3):445-9.

Chandler WL, Ferrell C, Lee J, Tun T, Kha H. Comparison of three methods for measuring factor VIII levels in plasma. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(1):34-9.

Cho J, Ouriel K. Differential thrombogenicity of artery and vein: The role of von Willebrand factor. *Ann Vasc Surg* 1995; 9(1):60-70.

Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *The JAMA* 2005; 293(19):2352-61.

Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis, CE, Sorlie, P, Marucci G, Wu KK. Associations of factor VIII and von Willebrand Factor with race, age, sex, and risk factors for atherosclerosis. The ARIC Study. *Thromb Haemost*. 1993; 70(3):380-5.

Crowther, MA, Kelton, JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003; 128(2):134-8.

Cushman M, Tsai A, Heckbert SR. Incidence rates, case fatality, and recurrence rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Thromb Haemost* 2001;86(suppl 1):OC2349. Abstract.

Dahlbäck B. The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77(1):43.

De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood* 1996; 87(9):3531-44.

De Stefano U, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: Clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24:367-79.

De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al. The Risk of Recurrent Deep Venous Thrombosis among Heterozygous Carriers of Both Factor V Leiden and the G20210A Prothrombin Mutation. *N Engl J Med* 1999; 341:801-6.

de Visser MCH, Poort SR, Vos LH, Rosendaal FR, Bertina RM. Factor X levels, polymorphisms in the promoter region of factor X and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 85:1011-17.

Doutremepuich F, Aguejou O, Belougne-Malfatti E, Doutrmepiich C. Fibrinogen as a factor of thrombosis: Experimental Study. *Thrombs Res* 1998; 90:57-64.

Dowling NF, Austin H, Dilley A, et al. The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study. *J Thromb Haemost* 2002; 1: 80-7.

Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Schneider B, Quehenberger P, Kyrle PA. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004; 103:3773-6.

Eikenboom JCJ, Castaman G, Kamphuisen PW, Rosendaal FR, Bertina RM. The Factor VIII/Von Willebrand Factor Ratio Discriminates between Reduced Synthesis and Increased Clearance of Von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 2002, 87(2):252-7.

Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Juhan-Vague I, Jude B, Garcin JM, et al. Clinical features in 36 patients homozygous for the ARG 506 → GLN factor V mutation. *Thromb Haemost* 1997; 77(4):620-3.

Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo m, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86:809-16

Feuerstein GZ, Toomey JR, Valocik R, Koster P, Patel A, Blackburn MN. An inhibitory anti-factor IX antibody effectively reduces thrombus formation in a rat model of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82:1443-45.

Fowkes FJI, Price JF, Fowkes FGR. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: Systematic review. *Eur J Endovasc Surg* 2003; 25:1-5.

Franco RF, Reitsma PH, Lorenço D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araújo AG, Piccinato CE, Zago MA. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81:676-79.

Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001; 109:369-84.

Friederich PW, Sanson BJ, Simiono P et al. Frequency of pregnancy related venous thromboembolism in anticoagulant factor deficient women: implications for prophylaxis. *Ann Intern Med* 1996; 125:955-60.

Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253:909-12.

Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; 86(10):3685-91.

Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82:1989-93.

Growther M, McCourt K. Review practical DVT screening considerations to enhance assesment skills. *Nurs Managment* 2004; 35(1):21-30.

Gurewich V, Nunn T, Lipinski, B. Activation of intrinsic or extrinsic blood coagulation in experimental venous thrombosis and disseminated intravascular coagulation: pathogenic differences. *Thromb Res* 1979; 14:931-40.

Hackeng TM, Van't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994; 269(33) 21051-8.

Hampton KK. Pathophysiology of venous thromboembolism. *Hosp Med* 2001; 62(12):765-72.

Hanson PO, Werlin L, Tibblin G, Eriksson H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. *Arch Intern Med* 1997; 157:1665-70.

Hansson PO, Sorbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2000; 160:769-774.

Harris MR, Bunker CH, Hamman RF, Sanghera DK, Aston CE, Kamboh MI. Racial differences in the distribution of a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) polymorphism and its association with serum lipoprotein, lipid and apolipoprotein levels. *Atherosclerosis* 1998; 137(1):187-95.

Heeb MJ, Kojima Y, Greengard JS, Griffin JH, . Activated protein C resistance: molecular mechanisms based on studies using purified GLN506 factor V . *Blood* 1995; 85:3405-11.

Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990; 323:1512-1516.

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-Kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 1988; 7(13):4119-27.

Ho CH, Chau WK, Hsu HC, Gau JP, Yu TJ. Causes of venous thrombosis in fifty chinese patients. *American Journal of Hematology* 2000; 63(2):74-8.

Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995; 86(5):1794-801.

Hollenbach E, Ackermann S, Hyman BT, Rebeck GW. Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer disease. *Neurology* 1998; 50:1905-07.

Hulley SB, Cummings SR. *Designing Clinical Research*. Baltimore: Williams and Wikins; 1988.

Julapalli V, Bray P, Duchini A. Elevated Factor VIII and Portal Vein Thrombosis. *Dig Dis Sci*. 2003; 48(12):2369-71.

Kahn S, Ginsberg JS. Relationship between deep venous thrombosis and the postthrombotic syndrome. *Arch Intern Med* 2004; 64:17-26.

Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM, Rosendaal FR . Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost* 1999; 81(5):680-83.

Kamphuisen PW, Lensen R, Howing-Duistermaat JJ, Eikenboom JCJ, Harvey M. Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with trombophilia. *Br J Haematol* 2000; 109:519-22.

Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Bertina RM. Elevated Factor VIII Levels and the Risk of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001a; 21(5):731-8.

Kamphuisen PW, Jeroen CJ, Eikenboom JCJ, Rosendaal FR, Koster T, Blann AD, Vos HL, Bertina RM. High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. *British Journal of Haematology* 2001b; 115:156-58.

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. *JAMA* 1987, 258:1183-86.

Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107:122-130.

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response activated protein C : Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342:1503-6.

Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briet E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis: a case control study of plasma levels and DNA polymorphisms - The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1994, 71:719-22.

Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995a; 345(8943):152-5.

Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but a clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study) *Blood* 1995b; 85:2756-61.

Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MMW, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, Büller HR. High concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000, 83: 5-9.

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, Weltermann A, Speiser W, Leckner K, Eichinger S. High plasma level of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343(7):457-62.

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited Thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76(6):824-34.

Legnani C, Cosmi B, Cini M, Frascaro M, Guazzaloca G, Palareti G. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2004; 124:504-10.

Lenting PJ, Neels JG, Van den Berg BMM, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; 274 (34):23734-9.

Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346:752-63.

Loscalzo J. Pathogenesis of thrombosis. In: Williams WJ. *Hematology*. 5th Edition. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1525-31.

Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. *Br J Haematol* 2001; 115(3):507-13.

Machin SJ. Pros and cons of thrombophilia testing:cons. *J Thromb Haemost* 2003; 1:412-3.

Maffei FHA. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: incidência, patologia, fisiopatologia e diagnóstico. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshioda WB, Rollo HA ed. *Doenças Vasculares Periféricas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1995.pp. 841-62.

Mansvelt EP, Laffan M, McVey JH, TuMenham EG. Analysis of the F8 gene in individuals with high plasma factor VIII: C levels and associated venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80(4):561-565.

Marcucci R, Abbate R, Fedi S, Gori AM, Brunelli T, Bruni V, Bucciantini S, et al. Acquired activated protein C resistance in postmenopausal women is dependent on factor VIII:c levels. *Am J Clin Pathol*. 1999; 111(6):769-72.

Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F et. al. Different risks on thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998; 92:2353-8.

Martinelli I. Unusual forms of venous thrombosis and thrombophilia. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:343-5.

Martinelli I. Pros and cons of thrombophilia testing: pros. *J. Thromb Haemost* 2003; 1(3):410-1.

Martinelli I. von Willebrand factor and factor VIII as risk factors for arterial and venous thrombosis. *Semin Hematol* 2005; 42(1):49-55.

Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J and the EMET Group. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism- Results of the spanish multicentric study on thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997; 77:444-451.

Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Increased risk of venous thrombosis in carriers of natural anticoagulant deficiencies. Results of the family studies of the Spanish Multicenter Study on Thrombophilia (EMET study). *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9(1):71-8.

Matsui T, Titani K, Mizuochi T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992; 267:8723-31.

Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwich Park Heart Study. *Lancet* 1993; 342:1076-9.

Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*, 2000; 342(10):696-701.

Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MMW, van Pampus ECM, Hamulyák K, et al. The incidence of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden is related to concomitant thrombophilic disorders. *Br J Haematol* 2002; 116(3):625-31.

Mikhailenko I, Kounnas MZ, Argraves WS, Strickland DK. Low density lipoprotein receptor-related protein/alfa2- macroglobulin receptor mediates the celular internalization and degradation of thrombospondin. *J Biol Chem* 1995; 270:9543-49.

Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alfa2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor- related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* 1992; 269:375-82.

Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Saut N, Pellegrina L, Alessi MC, Visvikis S, Tired L, Juhan-Vague I. Biological and genetic factors inflencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. *Br J Haematol* 2004; 128:91-9.

Morelli, VM. Avaliação da prevalência de algumas causas de trombofilia hereditária e de hiperhomocisteinemia em pacientes com trombose venosa. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2000.

Morelli VM, De Visser MCH, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost* 2005; 3(1)183-5.

Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266(12)7353-8.

Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Internal Med* 1992; 232:155-60.

O'Donnell J, Tuddenham EG, Manning R, Kemball-Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost* 1997; 77(5):825-8.

O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of VIII:C in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost* 2000, 83:10-13.

O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan MA. Marked elevation of thrombin generation in patients with elevated FVIII:C and venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2001; 115(3): 687-91.

O'Donnell J, Boulton FE, Manning RA, Laffan MA. Amount of H Antigen expressed on circulating von Willebrand Factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand Factor antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(2):335-41.

Orstavik KH, Magnus P, Reisner H, Berg K, Graham JB, Nance W. Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. *Am J Hum Genet.* 1985; 37(1):89-101.

Patel RK, Ford E, Thumpston J, Arya R. Risk factors for venous thrombosis in the black population. *Thromb Haemost* 2003, 90:835-8.

Phillippou H, Adami A, Lane D, McGregor I, Tuddenham E, Lowe GDO, Rumley A, Ludlam C. High purity factor IX and prothrombin complex concentrate (PCC): pharmacokinetics and evidence that factor IXa is the thrombogenic trigger in PCC. *Thromb Haemost* 1996; 76:23-8.

Pocathikorn A, Granath B, Thiry E, Van Leuven F, Taylor R, Mamotte C. Influence of exonic polymorphism in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003; 168:115-21.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-703.

Prandoni P, Lensing AWA, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, Cattelan AM, Polistena P, Bernardi E, Prins MH. The long term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996; 125:1-7.

Prandoni P. Risk Factors of Recurrent Venous Thromboembolism: The Role of Residual Vein Thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; 33:351-353.

Rees DC, Cox M, Clejgg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133-4.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, Stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99:999-1004.

Robertorye RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol* 2001; 68:256-68.

Roelse JC, Koopman MMW, Buller HR, ten Cate JW, Montaruli B, van Mourik JA, et al. Absence of mutations at the activated protein C cleavage sites of factor VIII in 125 patients with venous thrombosis. *Br J Haematol* 1996; 92(3):740-3.

Rosén S, Andersson M, Blomback M, Hagglund U, Larrieu MJ, Wolf M, et al. Clinical application of a chromogenic substrate method for determination of factor VIII activity. *Thromb Haemost* 1985; 54(4):818-23.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85(6):1504-8.

Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors, a focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78:1-6.

Rosendaal FR, Dagen CJM, Zivelin A, Arruda VR, Alach M, Siscovick Ds, et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79:706-8.

Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999a; 82:610-9

Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999b; 353:1167-73.

Rosendaal FR. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83:1-2.

Ruiz-Arguelles GJ, González-Estrada S, Garcés Eisele J, Ruiz-Arguelles A. Primary thrombophilia in Mexico: A prospective study. *Am J Hematol*. 1999; 60:1-5.

Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; 274:37685-92.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-91.

Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubtsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism. Prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:511-8.

Sarasin Fp, Bounameaux H. Decision analysis model of prolonged oral anticoagulant treatment in factor V Leiden carriers with first episode of deep vein thrombosis. *BMJ* 1998; 316:95-9.

Schambeck CM, Hinney K, Haubitz I, Mansouri Talenghani B, Wahler D., Keller F. Familial Clustering of high factor VIII levels in patients with venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:289-92.

Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, Berger M, Teuchert K, Spahn A, Walter U. High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. *Thromb Haemost* 2004; 92:42-6.

Scleef M, Strobel E, Dick A, Frank J, W Schramm, Spannagl M. Relationship between ABO and Secretor genotype with plasma levels of factor VIII and von Willebrand factor in thrombosis patients and controls individuals. *Br J Haematol* 2004; 128:100-7.

Scott JP, Gill JC, Rock A, Levine S, Vokac EA, Montgomery RR. The effect of ABO type on synthesis, release and platelet binding of von Willebrand factor (vWF) *Thromb Haemost* 1993; 69:946.

Seixas CA, Hessel G, Siqueira LH, Machado TF, Gallizone AM, Annichino-Bizzacchi JM. Study of hemoastasis in pediatric patients with portal vein thrombosis. *Haematologica* 1998; 83:955-6.

Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis. *The N Engl J Med* 2001; 344(16):1222-31.

Shen MC, Lin JS, Tsay W. High prevalence of antithrombin III, protein C and S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic chinese patients in Taiwan. *Thrombs Res* 1997; 87:377-85.

Silverstein MD, Heit John A, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Arch Intern Med* 1998; 158:585-93.

Simioni P, Prandoni P, Zanon E, Saracino MA, Scudeller A, Villalta S et al. Deep venous thrombosis and lupus anticoagulant. A case-control study. *Thromb Haemost* 1996; 76(2):187-9.

Simioni P, Prandoni P, Lensing AWA, Manfrin D, Tormene D, Gavasso S et al. Risk for subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis. *Blood* 2000; 96(10):3329-33.

Smirnov Md, Safa O, Esmon NL, Esmon CT. Inhibiion of activated protein C anticoagulant activety by prothrombin. *Blood* 1999; 94:3839-46.

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Martinez-Sanchez E, Mateo J, et al. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood* 2003; 101(1):163-7.

Souto JC; Almasy L; Muniz-Diaz E; Soria JM; Borrell M; Bayen L et al. Functional Effects of the ABO Locus Polymorphism on Plasma Levels of von Willebrand Factor, Factor VIII, and Activated Partial Thromboplastin Time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(8):2024-8.

Spronk HMH, Govers-Riemslog JWP, Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *BioEssays* 2003; 25:1220-8.

Strickland DK, Kounas MZ, Argraves WS. LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J* 1995; 9:890-8.

Svensson PJ, Zoller B, Mattiasson J, Dalback B. The factor V R506Q mutation causing APC resistance is highly prevalent amongst unselected outpatients with clinically suspected deep venous thrombosis. *J Intern Med* 1997; 241:379-85.

Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam SI, Daly ME, McCall F, Conkie JA, Carrell RW. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994; 87(1):106-12.

Talbot S, Wakley EJ, Rylie D, Langman MJ. ABO blood-groups and venous thromboembolic disease. *Lancet* 1970; 1(7659):1257-9.

Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martinez-Sanches E, Vallvé C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2005; 93:468-74.

Triplett DA, Barna LK, Unger GA. A hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification. *Thromb Haemost* 1993; 70(5):787-93.

Tripodi A, Mannucci PM. Factor VIII activity as measured by an amidolytic assay compared with a one-stage clotting assay. *Am J Clin Pathol* 1986; 86(3):341-4.

Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, Folsom AR. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Am J Med.* 2002; 113:636-42.

Van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95(12):3678-82.

Van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J Thromb Haemost* 2003a; 1:2677-8.

Van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. Interaction between oral contraceptive use and coagulation factor levels in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003b; 1:2186-90.

Van Leuven F, Stas L, Hilliker C, Lorent K, Umans L, Serneels L, Overbergh L, Torrekens S, Moechars D, De Strooper B, Van den Berghe H. Structure of the gene(LRP1) coding for the human alpha2-macroglobulin receptor-related protein. *Genomics* 1994; 24:78-89.

Van Leuven F, Stas L, Thiry E, Nelissen B, Miyake Y. Strategy to sequence the 89 exons of the human LRP1 gene coding for the lipoprotein receptor related protein: identification of one expressed mutation among 48 polymorphisms. *Genomics* 1998; 52:138-44.

Van Leuven F, Thiry E, Lambrechts M, Stas L, Boon T, Bruynseells K, Muls E, Descamps O. Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes. *Atherosclerosis* 2001; 154:567-77.

Van Tilburg, Nico H, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95:2855-59.

Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344:1453-7.

Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1998; 79:456-5.

Von dem Borne PAK, Bajzar L, Meijers JCM, Nesheim NE, Bouma BN. Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* 1997; 99:2323-27.

Wells PS, Blajchman MA, Henderson P, Wells MJ, Demers C, Bourque R, McAvoy A. Prevalence of antithrombin deficiency in healthy blood donors: a cross-sectional study. *Am J Hematol* 1994; 45(4):321-4.

Wells PS, Langlois NJ, Webster MA, Jaffey J, Anderson JA. Elevated factor VIII is a risk factor for idiopathic venous thromboembolism in Canada-is it necessary to define a new upper reference range for factor VIII? *Thromb Haemost* 2005; 93:842-46

Weltermann A, Eichinger S, Bialonczyk C, Minar E, Hirschl M, Quehenberger P, Schonauer V, Kyrle PA. The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. *J Thromb Haemost* 2003; 1:28-32.

White RH, Zhou H, Romanos PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. *Ann Intern Med* 1998; 128:737-40.

Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimerization and propeptide cleavage in the binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266:21948-55.



9- APÊNDICES

Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa em seres humanos

Projeto de doutorado: Fibrinogênio, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI como Fatores de Risco para Tromboembolismo Venoso em Pacientes de uma População Brasileira.

Pesquisadora: Tayana Bezerra Teixeira Mello.

Paciente voluntário da pesquisa _____

RG _____ Registro hospitalar _____

End _____

Prezado paciente:

A trombose venosa é uma doença com elevada frequência na população e também responsável por grande mortalidade. Infelizmente muitas dúvidas existem sobre as causas desta doença, o que dificulta seu tratamento e prevenção.

Trabalhos realizados em outros países mostraram que determinadas substâncias importantes na coagulação (fatores da coagulação), quando aumentadas no organismo levam a um maior risco de trombose. Este fato nos motivou a realizar esta pesquisa, onde serão dosadas tais substâncias no sangue de indivíduos com esta doença.

Os pacientes participantes do estudo, terão pequenas amostras do seu sangue colhidas de maneira habitual às demais coletas já realizadas por eles neste hospital. Caso seja necessário, mais de uma coleta será realizada.

Os participantes serão informados sobre quaisquer dúvidas que venham a ter sobre a pesquisa. Estes podem se recusar a participarem do estudo em qualquer momento, sem que isso cause prejuízo ao seu atendimento neste hospital. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, porém a identidade será mantida em sigilo.

Os participantes terão acesso aos resultados obtidos durante ou após o término do estudo. Caso haja qualquer dúvida durante a pesquisa, os participantes poderão entrar em contato com a pesquisadora. Em caso de denúncia deverá dirigir-se ao comitê de ética em pesquisa.

Tayana Mello: 3788-8740

Comitê de ética da Unicamp: 3788-8963

Assinatura do pesquisador:

Assinatura do paciente:

Trabalhos apresentados em Congresso

1. Mello T, Machado T, Ozello M, Annichino-Bizzacchi JM. Factors I, VII, VIII, IX, X and XI levels and the risk of deep venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(suppl 2):62. OC151.
2. Mello T, Machado T, Lima S, Siqueira L, Annichino-Bizzacchi JM. Avaliação de polimorfismos no gene LRP (low density lipoprotein – related protein receptor), níveis de fator VIII e fator de Von Willebrand no risco de tromboembolismo venoso em uma população brasileira. Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. Rio de Janeiro 09 de Novembro de 2005.

Trabalhos para publicação

1. Mello TBT, Machado TFG, Lima S, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Assessing the interaction of coagulation factor levels, inherited thrombophilia and ABO blood group on the risk for venous thrombosis among Brazilians (submetido - Thrombosis and Haemostasis).
2. Mello TBT, Siqueira L, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Evaluation of polymorphisms in the gene of LRP (low density lipoprotein receptor related protein), levels of factor VIII and von Willebrand factor among patients with deep venous thrombosis (aguarda submissão).

