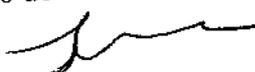


C2

GRAZIELA SILVEIRA ARAÚJO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento do(a) aluno(a) **GRAZIELA SILVEIRA ARAÚJO**.
Campinas, 13 de março de 2008.

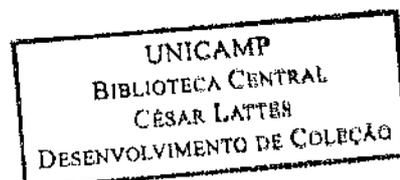

Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Orientador(a)

**“AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DA
FIBRINÓLISE E DO FATOR XIII EM PACIENTES COM
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA ESPONTÂNEA
E DOENÇA HEMORRÁGICA”**

CAMPINAS

Unicamp

2008



GRAZIELA SILVEIRA ARAÚJO

**“AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DA
FIBRINÓLISE E DO FATOR XIII EM PACIENTES COM
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA ESPONTÂNEA
E DOENÇA HEMORRÁGICA”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADORA: PROFa. DRA. JOYCE ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

Ar15a Araújo, Graziela Silveira
“Avaliação de alguns parâmetros da fibrinólise e do fator XIII em
pacientes com trombose venosa profunda espontânea e doença
hemorrágica” / Graziela Silveira Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrinólise. 2. Transtornos Hemostáticos. 3. Trombose
Venosa. 4. Deficiência do fator XIII. I. Annichino-Bizzacchi,
Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Evaluation of fibrinolysis and factor XIII some parameters
in patients with spontaneous deep venous thrombosis and hemorrhagic
disease**

Keywords: • Fibrinolysis
• Hemostatic disorders
• Venous thrombosis
• Factor XIII Deficiency

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
**Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento**

Banca examinadora:

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Prof Dr Erich Vinícius de Paula
Profa. Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi

Data da defesa:13 - 03 - 2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

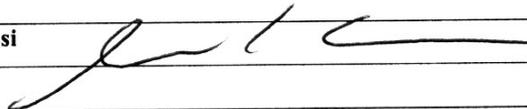
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Erich Vinicius de Paula



Professor (a) Doutor (a) Ana Marisa Chudzinski Tavassi



Curso de pós-graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/03/2008

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP e CNPq, através dos processos 05/56403-0 e 477583/04-0.

Responsável: Profa. Dra. Joyce Annichino-Bizzacchi

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, Ângela Maria, que me deu asas para aprender a voar, mas também me deu raízes para saber que sempre tenho para onde voltar.

Ao meu saudoso pai, Francisco Araújo, que se ausentou no físico, mas permanece vivo em meu coração.

Às minhas amadas irmãs, Idelma e Stela, verdadeiros exemplos de perseverança e conquista.

Aos meus pequenos amores, Lipe, Lyssa e Clara, fontes de constante alegria ao meu coração.

Ao meu grande amoreco, Júnior Alves, ajuda constante, apoio incessante, companheiro fiel e inspiração para tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu o dom da vida e me concedeu esta grande oportunidade, satisfazendo os sonhos do meu coração e me fortalecendo nos momentos que mais precisei.

À Dra. Joyce, que desde o primeiro momento, depositou em mim confiança, investiu em meu potencial, sempre me orientando e ensinando de forma atenciosa, carinhosa, encorajadora e exemplar.

Ao supervisor do laboratório Érich Vinícius de Paulla pelos constantes ensinamentos, pelas motivações ao longo desta caminhada e por todo apoio.

Às funcionárias e amigas Ucha e Silmara, que com dedicação e paciência participaram de forma ativa durante toda a execução deste projeto, buscando alternativas enriquecedoras e sábias soluções para cada intercorrência vivenciada durante este percurso.

Aos funcionários e verdadeiros apoios para várias etapas deste projeto Devanira, Cristina, Ricardo, Rafael, Susan, Tânia e Mayara, por todo auxílio, ensinamento e dedicação.

Ao amigo Luís Fernando (Barba) pelas inúmeras ajudas, tanto na prática quanto na parte burocrática de documentos e afins.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia: Aline, Ana, Mariane, Michelle, Eloá, Natália, Andrey, Fernanda Basso, Carolina, Carla, Aranha, Karina, Guilherme e Vagner pela amizade e companhia durante este projeto.

Aos médicos do Ambulatório de Hemostasia: Margareth Ozello, Daniela Fabri, Fernanda Orsi, Tayana de Mello, pela atenção e auxílio a cada inclusão de paciente para este estudo.

Aos funcionários do serviço de coleta do Ambulatório de Hemostasia e Hematologia do Hemocentro da Unicamp: Marlene, Cássia, Valdirene, Nelly, Isabel, Suely, Silvia, Marcos, pela ajuda e apoio na aquisição de amostras.

À funcionária do setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, Maria Aparecida Satiko, pelos ensinamentos e auxílio técnico.

À enfermeira Andréa Luisa de Almeida Sambo por todo auxílio e ensino em relação ao questionário de doenças hemorrágicas.

À Dra. Sara Terezinha Ollala Saad, Dra. Maria de Fátima Sonati e Dr. Erich Vinícius de Paulla, pelas excelentes sugestões emitidas no exame de qualificação.

À Dra. Ana Marisa Tavassi e ao Dr. Erich Vinícius de Paula, pelas correções, orientações e valiosas sugestões emitidas durante a banca de defesa de tese.

Ao estatístico Roberto Zulli por toda atenção, ajuda e ensinamento com os infinitos cálculos e análises deste projeto, sempre muito prestativo e dedicado.

Às secretárias da pós-graduação, Teresa, Salete e Márcia por toda orientação e apoio.

Aos meus grandes amigos Sui e Paulo, que embarcaram neste sonho comigo quando ainda nem existia, pelas constantes ajudas diretas e indiretas ao longo deste caminhada, por serem meu ombro amigo e minha família aqui em Campinas.

À minha amada família, por todo incentivo e amor, e por mesmo estando tão longe, sempre os sentia tão perto.

Ao meu para sempre amado, por sua infinita compreensão e paciência pelo longo tempo de ausência, espera e companheirismo.

À FAPESP e CNPQ que viabilizaram financeiramente o desenvolvimento deste projeto.

“De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro.”

Fernando Sabino

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO	45
1.1- Hemostasia geral	47
1.2- Mecanismos reguladores da coagulação sanguínea	49
1.3- Sistema fibrinolítico	49
1.4- Polimorfismos genéticos e fibrinólise	53
1.4.1- Gene do TAFI.....	53
1.4.2- Gene da α_2 -AP.....	54
1.5- Alterações hemorrágicas raras	55
1.6- Trombose venosa profunda	58
2- OBJETIVOS	63
2.1- Gerais	65
2.2- Específicos	65
3- CASUÍSTICA	67
3.1- 1ª análise	69
3.1.1- Pacientes com TVP.....	69
3.1.2- Pacientes com alterações hemorrágicas.....	70
3.1.3- Grupo controle.....	71
3.2- 2ª análise	72
3.2.1- Cohort de pacientes com TVP.....	72
3.2.2- Grupo controle.....	73

4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
4.1- Coleta de sangue.....	77
4.2- Determinação das concentrações plasmáticas.....	77
4.2.1- Dosagem de α_2 -antiplasmina.....	77
4.2.2- Dosagem de plasminogênio.....	78
4.2.3- Dosagem do PAI-1.....	79
4.2.4- Dosagem do TAFI.....	80
4.2.5- Dosagem do FXIII.....	81
4.2.6- Dosagem do fibrinogênio.....	82
4.3- Avaliação global da atividade fibrinolítica.....	82
4.3.1- TLE.....	83
4.3.2- ALPF.....	83
4.4- Determinação dos polimorfismos.....	84
4.4.1- Extração de DNA de Sangue Periférico.....	84
4.4.2 Amplificação de seqüências gênicas específicas.....	85
4.4.3- Determinação de nucleotídeos polimórficos dos genes estudados..	86
4.4.3.1- TAFI.....	86
4.4.3.2- α_2 -AP Arg6Trp (C33T).....	89
4.5- Análise estatística.....	90
5- RESULTADOS.....	93
5.1- 1ª análise.....	95
5.1.1- Características clínicas.....	95
5.1.2- Dosagens plasmáticas.....	98

5.2- 2ª análise.....	104
5.2.1- Análise de polimorfismos genéticos.....	104
5.2.2- Determinação de variáveis preditoras de doença hemorrágica ou TVP.....	110
6- DISCUSSÃO.....	111
6.1- Características clínicas.....	114
6.2- Dosagens plasmáticas.....	115
6.2.1- Grupo hemorrágico.....	116
6.2.2- Grupo TVP.....	119
6.3- Avaliação global do sistema fibrinolítico.....	120
6.4- Polimorfismos e risco para TVP.....	123
6.4.1- Polimorfismos no gene do TAFI.....	123
6.4.2- Gene da α_2 -AP.....	125
6.5- Análises multivariadas.....	125
7- CONCLUSÕES.....	127
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
9- ANEXOS.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
α_2 - AP	“ α_2 -antiplasmin”, α_2 -antiplasmina
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
ALPF	Área de lise em placa de fibrina
APCE	Enzima de clivagem da α_2 -antiplasmina
Arg	Arginina
Asn- α_2 -AP	Sítio asparagina da α_2 - antiplasmina
ATIII	Antitrombina III
Ca ⁺⁺	Cálcio
DNA	“ <i>desoxyribonucleic acid</i> ”; ácido dextrorribonucléico
dNTP	deoxibucleotídeos trifosfato
ECAT	“ <i>European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study</i> ”
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodinitritetracético
ELISA	“ <i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i> ”
<i>et al.</i>	E outros (as)
FBG	Fibrinogênio
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 da coagulação
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
FXII	Fator XII da coagulação
FXIIa	Fator XII ativado
FXIII	Fator XIII da coagulação
FXIIIa	Fator XIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HMWK	Cinínogênio de alto peso molecular
Ile	Isoleucina
KCl	Cloreto de potássio
μL	Microlitro
μg/mL	Micrograma por mililitro
Met-α ₂ -AP	Sítio metionina da α ₂ -antiplasmina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

Mg/dl	Miligrama por decilitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
OR	“ <i>Odds Ratio</i> ”
PAI-1	“ <i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i> ”; inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
pb	Pares de bases
PBS	“ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ”, Tampão fosfato salino
pmol	Picomol
PCR	“ <i>Polymerase chain reaction</i> ”; reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PLG	Plasminogênio
P10	Pencentil 10
P90	Pencentil 90
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAFI	“ <i>Thrombin activable fibrinolysis inhibitor</i> ”; ativador da fibrinólise ativado pela trombina
TAFIa	Ativador da fibrinólise ativado pela trombina ativado

TBE	Trizma/ácido bórico/ EDTA
TFPI	“ <i>Tissue factor pathway inhibitor</i> ”; inibidor do fator tecidual
Thr	Treonina
TLE	Tempo de lise das euglobulinas
Trp	Triptofano
TVP	Trombose venosa profunda
TP	Tempo de protrombina
t-PA	“ <i>Tissue plasminogen activator</i> ”; ativador do plasminogênio do tipo tecidual
TT	Tempo de trombina
TTPAa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
u-PA	“ <i>Urokinase plasminogen activator</i> ”; ativador do plasminogênio do tipo uroquinase
UI/dl	Unidade internacional por decilitro
U/mL	Unidade por mililitro

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Descrição dos primers e enzimas de restrição que foram utilizadas na identificação dos polimorfismos do gene do TAFI....	86
Tabela 2- Características demográficas dos pacientes hemorrágicos e com trombose e do grupo controle.....	95
Tabela 3- Valores de referência dos parâmetros da fibrinólise.....	98
Tabela 4- Comparação das diversas variáveis entre os grupos controle e o grupo hemorrágico.....	99
Tabela 5- Comparação das medianas do TLE e ALPF (pré, pós e razão) entre o grupo hemorrágico e o grupo controle.....	101
Tabela 6- Correlação das variáveis TAFI, PLG, α 2-AP, PAI-1 e FBG com as variáveis TLE e ALPF pré e pós-oclusão, de acordo com os grupos de pacientes e controles.....	103
Tabela 7- Correlação das variáveis TLE e ALPF (pré e pós) em cada grupo.	104
Tabela 8- Prevalência dos polimorfismos no grupo controle e no grupo TVP.....	106
Tabela 9- Comparação da prevalência dos genótipos entre os grupos controle, hemorrágico e TVP.....	107
Tabela 10- Comparação dos polimorfismos TAFI -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile em relação à atividade do TAFI em cada grupo.....	108
Tabela 11- Comparação da prevalência dos genótipos entre os grupos controle, hemorrágico e TVP.....	109

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Vias de ativação da cascata da coagulação e sistema fibrinolítico.....	53
Figura 2- Organização do gene do TAFI e localização dos polimorfismos estudados.....	54
Figura 3- Mecanismo de ativação do FXIII e seu papel na estabilização do coágulo de fibrina.....	58
Figura 4- Representação da ALPF após o período de 18 horas em estufa a 37°C.....	84
Figura 5- Representação da ALPF após o período de 18 horas em estufa a 37°C.....	84
Figura 6- Digestão do polimorfismo -438 A/G no gene do TAFI.....	87
Figura 7- Digestão do polimorfismo 505G/A no gene do TAFI.....	88
Figura 8- Digestão do polimorfismo 1040C/T no gene do TAFI.....	89
Figura 9- Digestão do polimorfismo C/T no gene do TAFI.....	90

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1- Idade do paciente na época da trombose.....	96
Gráfico 2- Recorrência da trombose e história de antecedente familiar.....	96
Gráfico 3- Caracterização dos sangramentos nos pacientes hemorrágicos.....	97

RESUMO

Em uma parcela de pacientes com quadro clínico hemorrágico ou trombótico, nenhum diagnóstico etiológico é estabelecido. Os pacientes com doença hemorrágica, muitas vezes importante, podem apresentar todos os exames de triagem e dosagem específica de fatores da coagulação dentro dos valores da normalidade. Quanto à trombose venosa (TVP), o diagnóstico de trombofilia hereditária e adquirida somente é estabelecido em 70% dos pacientes, fato que sugere a presença de mecanismos adicionais raros ou ainda desconhecidos na etiologia da doença. Assim, a investigação de alterações da fibrinólise ou do FXIII, que são condições raras, torna-se interessante em pacientes selecionados.

Uma primeira análise avaliou a atividade do plasminogênio, da α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina ativado (TAFIa), do inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1), do fator XIII (FXIII); e o tempo de lise das euglobulinas (TLE) e a área de lise em placa de fibrina (ALPF) em 31 pacientes com TVP espontânea, sendo 12 (38,71%) do sexo masculino e 19 (61,29%) do sexo feminino, com idade mediana de 37 anos (20-61). O grupo de doenças hemorrágicas foi composto por 45 pacientes, 7 (15,6%) do sexo masculino e 38 (84,44%) do sexo feminino, com idade mediana de 32 anos (18-64). O grupo controle foi composto por 50 indivíduos, 23 (46%) do sexo masculino e 27 (54%) do sexo feminino, com idade mediana de 31 anos (18-53).

O grupo hemorrágico mostrou um aumento significativo do TAFIa ($p=0,008$), tanto em relação ao grupo controle como ao grupo TVP. Talvez esse aumento seja decorrente da ação da plasmina sobre o pró-TAFI, atuando como um mecanismo de *feedback* para equilibrar a menor ativação do mesmo pela trombina. A correlação positiva entre o TAFI e o TLE pré ($p=0,01$) e pós-oclusão ($p=0,04$) sugere que o aumento do primeiro acarreta hipofibrinólise. Contudo, mesmo com a análise de apenas algum dos componentes sugerindo hipofibrinólise, o resultado final nestes pacientes (TLE e ALPF) favorece um estado de aumento da fibrinólise.

Apesar de um grupo muito selecionado, apenas 1 paciente mostrou deficiência grave de PAI-1, 1 paciente com deficiência leve de FXIII e nenhum paciente com deficiência de α_2 -AP, evidenciando que são de ocorrência muito rara, pois a população de cobertura do Hemocentro é de aproximadamente 1,5 milhão de habitantes.

O grupo de TVP mostrou uma diminuição do TAFIa ($p < 0,001$), que talvez possa ser explicado pela menor geração de plasmina, uma vez que os mesmos apresentam hipofibrinólise caracterizado por um TLE aumentado ($p = 0,01$) e por uma ALPF diminuída ($p = 0,04$). O aumento do PAI-1 foi encontrado em 32% dos pacientes em comparação ao grupo controle, o que favorece a hipofibrinólise e corrobora os achados da literatura. Nenhum dos pacientes apresentou deficiência de plasminogênio, sugerindo que esta alteração não está associada a TVP. A atividade de FXIII estava significativamente aumentada nesses pacientes, e talvez este seja um mecanismo que contribui para a hipofibrinólise.

De todos os exames realizados neste estudo, os que avaliaram a atividade global do sistema fibrinolítico (TLE e ALPF) foram os que mais refletiram o quadro clínico dos pacientes hemorrágicos e trombóticos, decorrente da interação *in vivo* dos componentes da fibrinólise.

Uma segunda análise teve como objetivo investigar a prevalência dos polimorfismos Arg6Trp no gene da α_2 -AP e -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile no gene do TAFI, sua correlação com a atividade plasmática, assim como sua associação com o risco de TVP, em uma população brasileira. Inicialmente determinaram-se os genótipos do TAFI em um grupo controle, constituído por 352 indivíduos, com idade mediana de 32 anos (16-63), sendo 68 (19,32%) do sexo masculino e 284 (80,68%) do sexo feminino. Os polimorfismos foram determinados em um grupo de 278 pacientes com TVP, com idade mediana de 35 anos (13-63), sendo 106 (38,13%) do sexo masculino e 172 (61,87%) do sexo feminino. Os resultados não mostraram diferença na prevalência dos polimorfismos entre os grupos, e que os mesmos não estavam associados ao risco de trombose.

O polimorfismo Arg6Trp no gene da α_2 -AP foi determinado nesses mesmos grupos, com número reduzido de indivíduos. Assim, foram incluídos 167 indivíduos saudáveis, com idade mediana de 35 anos (16-63), sendo 51 (30,54%) do sexo masculino e 116 (69,46%) do sexo feminino. O grupo de TVP foi composto por 161 pacientes, com idade mediana de 36 anos (13-63) sendo 43 (26,71%) do sexo masculino e 118 (73,29%) do sexo feminino. Os resultados não mostraram nenhuma diferença entre os grupos estudados.

ABSTRACT

In a parcel of patients with hemorrhagic or thrombotic clinical picture, none etiologic diagnosis is established. The patients with hemorrhagic disorder, many times important, can present all inside the screening tests and specific dosage of factors of the coagulation of the values of normality. In relation to deep venous thrombosis (DVT), the diagnosis of thrombophilia hereditary and acquired only is established in 70% of the patients, fact that suggests the presence of mechanisms still adds rare or unknown in the etiology of the illness. So, the inquiry of alterations of fibrinolysis or the FXIII, that is rare conditions, becomes interesting in selected patients.

A first analysis evaluated the activity of plasminogen, of α_2 -antiplasmin (α_2 -AP), of active thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFIa), of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), of factor XIII (FXIII); and the euglobulin clot lysis time (ECLT) and the lysis area on fibrin plate (LAFP) and in 31 patients with spontaneous DVT, being 12 (38,71%) of masculine sex and 19 (61,29%) of the feminine sex, with medium age of 37 years (20-61). The group of hemorrhagic illnesses was composed for 45 patients, 7 (15,6%) of masculine sex and 38 (84,44%) of the feminine sex, with medium age of 32 years (18-64). The control group was composed for 50 healthy individuals, 23 (46%) of masculine sex and 27 (54%) of the feminine sex, with medium age of 31 years (18-53).

The hemorrhagic group showed a significant increase of the TAFIa ($p=0,008$), as much in relation to the control group as to group DVT. Perhaps this increase is decurrent of the action of the plasmin on pro-TAFI, acting like a mechanism of feedback to balance the lesser activation of exactly for the thrombin. The positive correlation between the TAFI and the ECLT before ($p=0,01$) and after-occlusion ($p=0,04$) suggests that the increase of the first one causes hypofibrinolysis. However, with the analysis of only some of the components suggesting hypofibrinolysis, the final result in these patients (ECLT and LAFP) favors a state of increase of fibrinolysis.

Although of a very selected group, only 1 patient showed to serious deficiency of PAI-1, 1 patient with light deficiency of FXIII and no patient with α_2 -AP deficiency, evidencing that they are of very rare occurrence, therefore the population of covering of the Hemocentro is of approximately 1,5 million of inhabitants.

The group of DVT showed a reduction of the TAFIa ($p < 0,001$) that perhaps it can be explained by the lesser generation of plasmin, a time that the same ones present hypofibrinolysis characterized by an increased ECLT ($p = 0,01$) and by a diminished LAFP ($p = 0,04$). The increase of the PAI-1 was found in 32% of the patients in comparison to the control group, what it favors the hypofibrinolysis and it corroborates the findings of literature. None of the patients presented plasminogen deficiency, suggesting that this alteration is not associated the DVT. The activity of FXIII significantly was increased in these patients, and perhaps this is a mechanism that contributes for hypofibrinolysis.

Of all the examinations carried through in this study, the ones that had evaluated the global activity of the fibrinolytic system (ECLT and LAFP) had been the ones that they had more reflected the picture clinical of the hemorrhagic and thrombotics patients, decurrent of the in vivo interaction in the components of fibrinolysis.

One second analysis had as objective to investigate the prevalence of the polymorphisms Arg6Trp in the gene of the α_2 -AP and -438G/A, Ala147Thr and Thr325Ile in the gene of the TAFI, its correlation with the plasmatic activity, as well its association with the TVP risk, in a Brazilian population. Initially the genotypes of the TAFI in the control group constituted of 352 individuals, was determined, with medium age of 32 years (16-63), being 68 (19,32%) of masculine sex and 284 (80,68%) of the feminine sex. The polymorphisms was determined in a group of 278 patients with DVT, medium age of 35 years (13-63), being 106 (38,13%) of masculine sex and 172 (61,87%) of the feminine sex. The results not showed difference in the prevalence of the polymorphisms between the groups, and that the same ones were not associates to the risk of thrombosis.

The polymorphisms Arg6Trp in the gene of the α_2 -AP was determined in these same groups, with reduced number of individuals. So, 167 healthful individuals was enclosed, with medium age of 35 years (16-63), being 51 (30,54%) of masculine sex and 116 (69,46%) of feminine sex. The group of TVP was composed for 161 patients, with medium age of 36 years (13-63) being 43 (26,71%) of masculine sex and 118 (73,29%) of the feminine sex. The results not showed no difference between the studied groups.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Hemostasia geral

O mecanismo hemostático baseia-se no equilíbrio entre a manutenção do sangue sob estado fluido, permitindo a oxigenação e nutrição dos tecidos; e, a capacidade de se deter o fluxo, no local lesionado, a fim de se evitar o sangramento. Esse mecanismo depende de uma completa inter-relação entre quatro componentes: o compartimento vascular, as plaquetas, as proteínas da coagulação e seus inibidores, e as proteínas do sistema fibrinolítico (Boon, 1993; Fiorini *et al*, 2003).

A coagulação sanguínea pode ser ativada em diversas situações em que ocorre dano vascular, processos inflamatórios, e alguns estados patológicos (Triplett, 2000).

Após exposição do colágeno subendotelial, ocorre a adesão plaquetária, mediada pelo fator de von Willebrand (FvW). Novas plaquetas vão se agregando às primeiras, formando o agregado plaquetário primário. A agregação secundária das plaquetas é desencadeada pela reação de liberação dos grânulos plaquetários. Toda esta seqüência de reações biológicas é designada hemostasia primária (Greaves, 2004; Colvin, 2004; Dahlbäch, 2005).

A etapa seguinte baseia-se na formação do coágulo de fibrina e conseqüente consolidação do tampão hemostático através do desencadeamento da coagulação. A cascata da coagulação é dividida em duas vias independentes que convergem na ativação do fator X (Morelli, 2001; Colvin, 2004).

A via intrínseca é iniciada pela fase de contato, a qual requer quatro proteínas plasmáticas: fator XII (FXII), fator XI (FXI), pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. Quando o plasma é exposto a uma superfície carregada negativamente, como o colágeno das estruturas subendoteliais, esses quatro fatores são prontamente ligados a essa superfície (Bloom, 1994; Dahlbäch, 2005).

Uma vez ligado à superfície, o FXII sofre uma proteólise limitada sendo convertido em fator XII ativado (FXIIa), o qual converte a pré-caliceína em caliceína, que por sua vez converte mais FXII em FXIIa. Quando uma quantidade suficiente de FXIIa é formada, este converte o fator XI em fator XI ativado (FXIa). O fator XIa, na presença de

íons cálcio, converte o fator IX (FIX) em fator IX ativado (FIXa), causando uma mudança conformacional na molécula do FIX. Então, o fator FIXa, também na presença de íons cálcio, converte o fator X (FX) em fator X ativado (FXa). O FXa juntamente com a trombina promovem a ativação do fator VIII (FVIII) através de uma proteólise seletiva (Boon, 1993; Dahlbäch, 2005).

A ativação da via extrínseca da coagulação ocorre pela exposição na circulação sanguínea de fator tecidual, que é uma glicoproteína de membrana expressa na superfície de células ativadas ou lesadas. Portanto, essa exposição ocorre quando um dano celular mecânico acompanha a lesão vascular, ou como consequência da ativação de citocinas inflamatórias (Franco, 2001; Dahlbäch, 2005).

O fator tecidual é o receptor celular e cofator do FVII, formando um complexo com esse fator, que é rapidamente ativado. Uma vez formado, o complexo fator VIIa/fator tecidual converte o FX em FXa. Além disso, esse complexo também ativa o FIX ampliando a produção de FXa por meio da via intrínseca (Bloom, 1994; Schenone *et al*, 2004).

O FXa irá formar um complexo ativador de protrombina (fator II da coagulação), que é um zimogênio vitamina K dependente. Esse complexo, também denominado protrombinase, é formado pelo FXa, fator V ativado (FVa), fosfolipídios de membrana - de plaquetas, células endoteliais, monócitos ou células tumorais - e íons de cálcio. Assim, a protrombina é clivada liberando a trombina e um pequeno fragmento denominado fragmento 1+2 da protrombina. O fator V (FV) é ativado, inicialmente pelo FXa, e posteriormente pela trombina (Bloom, 1994; Schenone *et al*, 2004; Dahlbäch, 2005).

Quando formada em quantidade suficiente, a trombina irá imediatamente converter o fibrinogênio em fibrina. A trombina age sobre as cadeias do fibrinogênio, convertendo-o em monômeros de fibrina que se polimerizam, formando filamentos de fibrina. Inicialmente, os filamentos de fibrina são ligados por ligações não-covalentes fracas, deixando o coágulo frágil; no entanto, o fator estabilizador de fibrina (fator XIII - FXIII), que é ativado pela trombina, torna o coágulo insolúvel formando

pontes de ligações covalentes entre os filamentos (Ritchie *et al*, 2000; Scott *et al*, 2004; Gregory & Cooper, 2006).

Desta maneira, é formado o coágulo, que consiste de uma rede de filamentos de fibrina que se estendem em todas as direções, aprisionando células sangüíneas, plaquetas e plasma.

1.2- Mecanismos reguladores da coagulação sangüínea

Um dos sistemas anticoagulantes mais importantes é representado pela via da proteína C. A trombomodulina, uma proteína de superfície das células endoteliais liga-se à trombina, e este complexo converte a proteína C em sua forma ativada. Na superfície de células endoteliais ou plaquetas, a proteína C ativada, complexada à proteína S, inativa os fatores VIII e V ativados (Ritchie *et al*, 2000).

Outro inibidor importante é a antitrombina (AT), uma proteína plasmática que inativa de modo eficaz a trombina, além de outros fatores de coagulação, como os fatores XIIa, XIa, Xa e IXa (Fiorini *et al*, 2003).

A via extrínseca é inativada pelo inibidor da via extrínseca da coagulação (TFPI - *tissue factor pathway inhibitor*). O TFPI é uma proteína que inibe, por *feedback*, o complexo FVIIa/fator tecidual, originando uma diminuição na ativação dos fatores IX e X (Schenone *et al*, 2004).

1.3- Sistema fibrinolítico

Uma vez que o processo de coagulação sanguínea foi completado e a integridade vascular foi recuperada, o coágulo deve ser removido, e o responsável por essa remoção é o sistema fibrinolítico. Sob condições normais, o sistema fibrinolítico está em equilíbrio com o de coagulação, a fim de manter a integridade do sistema vascular.

O principal papel do sistema fibrinolítico é remover a fibrina dos vasos sanguíneos, tecidos, ductos e líquidos orgânicos. Quando ocorre a conversão do fibrinogênio em fibrina, paralelamente há ativação da fibrinólise, com a conversão do plasminogênio em plasmina, para a rápida remoção da fibrina, de modo a prevenir complicações trombóticas. Assim sendo, a fibrinólise pode ser considerada um mecanismo essencial de defesa do organismo contra a oclusão vascular pelo coágulo de fibrina formado (Lourenço, 1997).

Esse sistema compreende os seguintes componentes: a proenzima plasminogênio, que sofre ativação transformando-se em plasmina; os ativadores do plasminogênio: ativador tissular do plasminogênio (t-PA), uroquinase (u-PA) e calicreína; e os inibidores do sistema fibrinolítico: a α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), e o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI – *thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor*), os quais rapidamente neutralizam a plasmina ou interferem na ativação do plasminogênio (Francis & Marder, 1994; Kolev & Machovich, 2003).

O plasminogênio é o precursor inativo da plasmina. Ele se liga à fibrina por meio de sítios de ligação para lisina. O t-PA também se liga à fibrina, e converte o plasminogênio em plasmina, uma serino-protease que cliva uma série de ligações peptídicas, degradando a molécula de fibrina (Bloom, 1994; Lijnen, 2001).

O t-PA é sintetizado predominantemente por células endoteliais e sua liberação estimulada pela trombina e outros agentes. Esse ativador possui baixa afinidade pelo plasminogênio livre, porém possui alta afinidade quando ambos, t-PA e plasminogênio encontram-se ligados à superfície de fibrina. Isso é importante porque limita a atividade fibrinolítica da plasmina à fibrina, evitando assim, que o fibrinogênio circulante seja alvo dessa molécula, o que causaria sangramento (Lijnen *et al*, 2001; Irène *et al*, 2000).

A u-PA é uma serino-protease liberada pelas células dos ductos excretórios, que tem a finalidade de mantê-los livres de fibrina, permitindo assim o fluxo dos fluídos secretados. Entretanto, ela também é liberada pelo endotélio e pelos macrófagos. Diferentemente do t-PA, a u-PA ativa igualmente o plasminogênio livre e o ligado à fibrina (Lijnen, 2001; Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

A calicreína é produzida pelo fígado, sendo responsável pela ativação de uma parcela menor da fibrinólise. Atua ativando diretamente o plasminogênio, transformando-o em plasmina. A diminuição de calicreína plasmática pode estar associada a trombose, mas esse ainda é um ponto não totalmente definido (Franco, 2001).

Na fibrinólise, dois inibidores específicos são importantes: o inibidor do ativador de plasminogênio, principalmente o do tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor* – PAI-1), que inibe o t-PA e o u-PA; e a α_2 -plasmina (α_2 -AP) que inibe a plasmina. Essas duas proteínas pertencem à família das serpinas (Bloom, 1994; Lijnen *et al*, 2000; Kitching *et al*, 2003).

O PAI-1 é considerado o inibidor mais importante do t-PA, apesar de apresentar uma concentração plasmática muito baixa. Esse inibidor é uma glicoproteína produzida pelas células endoteliais. Além disso, está presente nas plaquetas, sendo liberado em grandes quantidades quando essas são ativadas. A deficiência de PAI-1 foi descrita como associada a um quadro clínico hemorrágico, e os níveis elevados com o risco de trombose (Bloom, 1994; Takahashi *et al*, 1996; Morimoto *et al*, 2004; Repine & Oswald, 2004; Agren *et al*, 2005; Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

A α_2 -AP inibe a plasmina, sem necessidade de qualquer cofator. É um inibidor de ação rápida, que atua principalmente sobre a plasmina livre na circulação. A α_2 -AP possui uma forte afinidade pelo plasminogênio e plasmina, formando ligações não-covalentes com os chamados sítios de ligação de lisina do plasminogênio. Estes sítios de ligação são os mesmos de ligação com a fibrina. Conseqüentemente, a absorção de plasminogênio na fibrina, que consiste no primeiro passo para a fibrinólise endógena, é competitivamente inibida pela α_2 -AP. Sendo assim, a α_2 -AP retarda o início da fibrinólise endógena. A α_2 -AP também inibe a ação da plasmina *in situ*, uma vez que se liga à fibrina (Holmes *et al*, 1987; Favier *et al*, 2001; Aoki, 2004).

Entretanto, a produção efetiva da plasmina, pela ação do t-PA, depende da presença da fibrina. Portanto, a mais eficiente inibição da fibrinólise consiste no bloqueio da geração de plasmina, promovido, em primeira instância e fisiologicamente, pelo PAI-1 (Coelho *et al*, 2000).

Pequenas quantidades de plasmina são formadas no sangue continuamente, e caso não houvesse a α_2 -AP poderiam comprometer seriamente o sistema hemostático, por sua ação direta sobre alguns fatores de coagulação. Por esta razão, a concentração de plasmina deve aumentar acima de um nível crítico antes que ela se torne excessiva, pois a fibrinólise é determinada pelo balanço entre a formação e inibição de plasmina (Fiorini *et al*, 2003; Schneider & Nesheim, 2004; Aoki, 2004).

Um outro inibidor da fibrinólise é uma enzima tipo carboxipeptidase B, designado de TAFI, ou plasma procarboxipeptidase B. Este fator é sintetizado pelo fígado e circula no plasma sob a forma de zimógeno. *In vitro*, pode ser ativado por concentrações elevadas de trombina, tripsina ou plasmina ou, principalmente, pelo complexo trombina-trombomodulina (Bauer, 2001; Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). O TAFI regula a fibrinólise pela remoção dos sítios de lisina carboxi-terminal da fibrina. Estes sítios são essenciais para a ligação do plasminogênio e do t-PA à fibrina, portanto, sua remoção acarreta inibição da lise da fibrina (Wang *et al*, 1998; Guimarães *et al*, 2005; Mutch, 2007).

Recentemente, níveis elevados de antígenos de TAFI foram associados a um risco aumentado de trombose venosa profunda (TVP) (Van Tilburg *et al*, 2000).

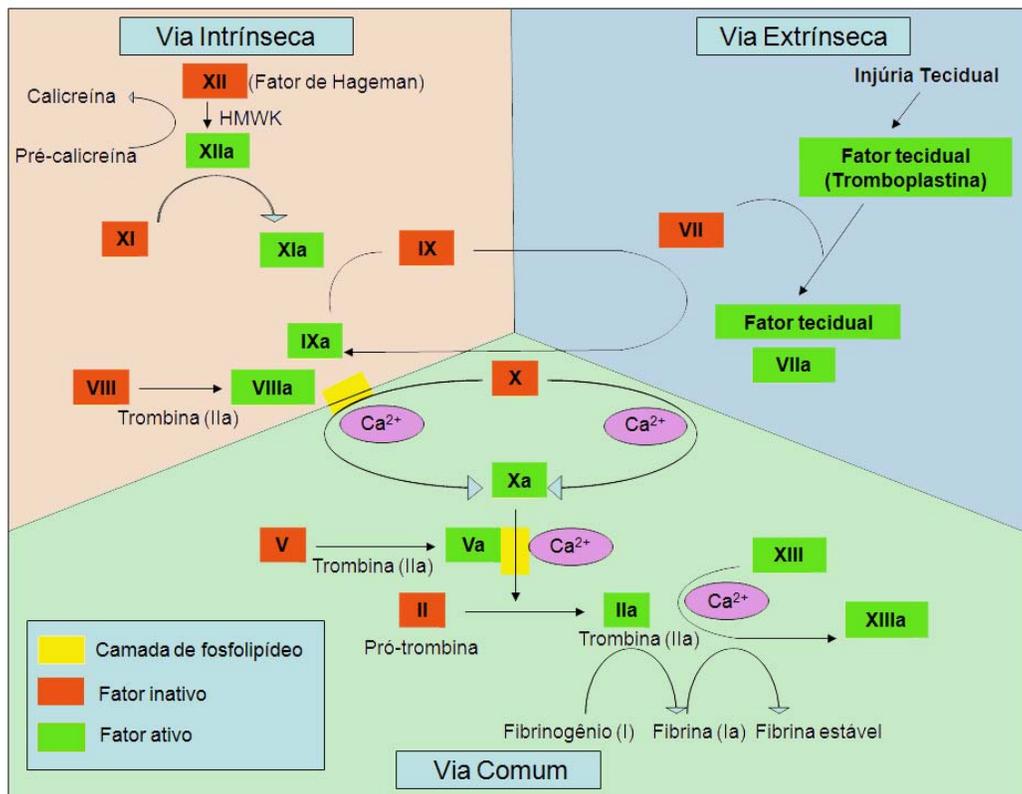


Figura 1- Vias de ativação da cascata da coagulação (<http://biovestigation.org/saude/prg1589> adaptada).

1.4- Polimorfismos genéticos e fibrinólise

O estudo de polimorfismos genéticos torna-se interessante, principalmente quando os mesmos têm relação com a concentração e atividade da proteína codificada.

1.4.1- Gene do TAFI

O gene do TAFI foi mapeado no cromossomo 13q14.11, tendo aproximadamente 48kb, e organizado em 11 exons separados por 10 íntrons (Boffa *et al*, 1999).

Já foram descritos 16 polimorfismos neste gene, mas os polimorfismos -438A/G na região promotora, 505G/A (substituição de uma alanina na posição 147 por uma trionina – Ala147Thr) e 1040C/T (substituição de uma trionina na posição 325 por uma isoleucina - Thr325Ile) na região codificadora foram associados aos níveis do antígeno do TAFI no plasma (Brouwers *et al*, 2001; Martini *et al*, 2006). Contudo, nenhum estudo analisou a associação desses polimorfismos com a atividade do TAFI no plasma, o que seria mais interessante, pois permitiria avaliar melhor essa correlação fisiológica.

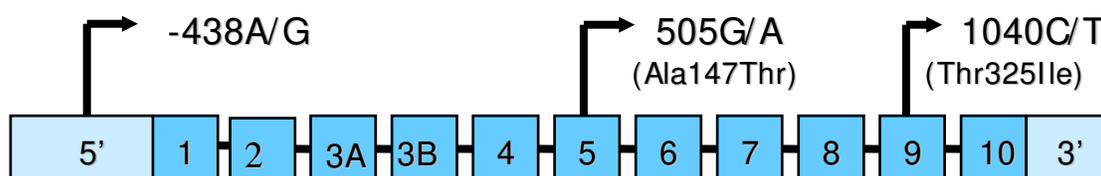


Figura 2- Organização do gene do TAFI e localização dos polimorfismos estudados (Leurs & Hendriks, 2005).

Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de TAFI apresenta uma ampla variabilidade. Entretanto, essa variação não está relacionada a fatores biológicos ou ambientais, sugerindo que os níveis plasmáticos de TAFI têm principalmente influência genética (Trégouet *et al*, 2001; Guimarães *et al*, 2004).

Dessa forma, torna-se interessante o estudo destes polimorfismos tanto em indivíduos saudáveis como na presença de patologias associadas à alteração da fibrinólise, correlacionando-os com a atividade plasmática do TAFI.

1.4.2- Gene da α_2 -AP

A α_2 -AP é o principal e mais potente inibidor direto da plasmina no plasma humano. Em humanos o gene da α_2 -AP está localizado no cromossomo 17, contendo 10 exons e 9 íntrons, medindo aproximadamente 16 kb. Até o momento foram descritas apenas

6 mutações neste gene, responsáveis pela deficiência da α_2 -AP (Koie *et al*, 1978; Kluft *et al*, 1987; Lind & Thorsen, 1999, Favier *et al*, 2001).

A α_2 -AP é secretada pelo fígado, tendo a metionina (Met- α_2 -AP) na região amino-terminal. Na circulação, após a clivagem pela enzima de clivagem da antiplasmina (APCE), há exposição do sítio asparagina (Asn- α_2 -AP), que tem uma afinidade 13 vezes maior pela fibrina e, conseqüentemente apresenta uma maior atividade inibitória sobre o início da fibrinólise (Koyama *et al*, 1994; Favier *et al*, 2001; Aoki, 2004).

A região Met- α_2 -AP é polimórfica, podendo conter tanto a arginina (Arg) quanto o triptofano (Trp) na posição do sexto aminoácido, sendo que ambas as formas foram encontradas em amostras de plasma humano. Estudo recente mostrou que o polimorfismo Arg6Trp (genótipos RR, RW, WW) está associado ao tempo de lise do coágulo de fibrina. A análise funcional revelou que a Met- α_2 -AP com os genótipos RW e RR tem maior tempo de lise do coágulo quando comparados às amostras de indivíduos WW. Isto porque a APCE cliva Met- α_2 -AP (Arg6) com uma velocidade 8 vezes maior em comparação a Met- α_2 -AP (Trp6), e conseqüentemente há maior incorporação da mesma à fibrina (Christiansen *et al*, 2007).

Assim, o estudo desse polimorfismo, quer em indivíduos normais como naqueles com doenças associadas a alterações da fibrinólise pode contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia nessas situações.

1.5- Alterações hemorrágicas raras

As doenças hemorrágicas mais freqüentes na população são a doença de von Willebrand, hemofilia, e púrpura trombocitopênica. Com exceção da doença de von Willebrand, que apresenta subtipos com alterações clínico-laboratoriais muito diversas, essas doenças têm parâmetros clínicos e laboratoriais bem estabelecidos para seu diagnóstico. Mesmo algumas doenças raras, como a deficiência dos fatores V, X, XII, XI, e trombopatias, podem ser caracterizadas laboratorialmente de uma forma precisa, logo no início da investigação.

Contudo, uma pequena parcela de pacientes com quadro hemorrágico, muitas vezes importante, exhibe todos os exames de triagem da coagulação e dosagem específica de fatores da coagulação dentro dos valores da normalidade. Nesses casos, a hiperfibrinólise e a deficiência de FXIII devem ser investigadas.

A hiperfibrinólise pode ser demonstrada por exames que avaliam a atividade global, e as deficiências de fatores que compõem o sistema fibrinolítico, por dosagens específicas dos mesmos, como a deficiência de α_2 -AP e de PAI-1.

A deficiência completa ou parcial da α_2 -AP é muito rara, e na literatura são poucos os relatos sobre as manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento (Aoki *et al*, 1979; Hayward, *et al*, 2005; Harish *et al*, 2006). Sua prevalência na população geral é desconhecida, porque a investigação de deficiência de α_2 -AP somente é realizada em pacientes com quadro clínico hemorrágico, em que os exames laboratoriais de rotina da coagulação não identificam qualquer alteração (Favier *et al*, 2001; Matsuno *et al*, 2003).

Nos casos de deficiência de α_2 -AP em homozigose, as hemorragias graves já ocorrem desde a infância, e em muitos casos, o sangramento umbilical é a primeira manifestação. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar apenas sangramentos moderados (Kluft *et al*, 1979; Aoki *et al*, 1983; Favier *et al*, 2001). Quanto à deficiência de α_2 -AP em heterozigose, a maior parte dos pacientes é assintomática, e o diagnóstico é firmado em estudos familiares, e raramente em casos isolados sem nenhum sangramento. Poucos pacientes podem apresentar sangramento em situações de risco, como trauma, cirurgia e extração dentária (Kordich *et al*, 1985; Ikematsu *et al*, 1996; Yoshinaga *et al*, 2000; Hanss *et al*, 2003).

Existem poucos casos de deficiência do PAI-1 e doença hemorrágica descritos na literatura (Takahashi *et al*, 1996; Morimoto *et al*, 2004; Repine & Oswald, 2004), e não há nenhum estudo sistemático da prevalência e importância desta condição na população geral. Apesar da descrição há mais de 15 anos, de casos clínicos com deficiência de PAI-1 e hemorragia, recentemente um estudo que incluiu um grande número de pacientes com doença hemorrágica definiu a diminuição do PAI-1 como um risco para o sangramento, leve, e sem manifestações clínicas específicas (Schleef *et al*, 1989; Agren *et al*, 2005; Agren *et al*, 2007).

A deficiência hereditária de FXIII é de caráter autossômico recessivo, sendo de ocorrência muito rara, e mais comum em famílias com consangüinidade. Na população geral sua prevalência consiste em 1 caso para 3 milhões de pessoas, com maior prevalência em áreas do sul-asiático, assim como naquelas com maior incidência de casamentos consangüíneos (Anwar *et al*, 2003; Bolton-Maggs *et al*, 2004; Onland *et al*, 2005; Ivaskevivius *et al*, 2007).

Esta deficiência é caracterizada por um quadro clínico de sangramento, dificuldade na cicatrização de feridas e abortos espontâneos (Ivaskevivius *et al*, 2007; Toshihiko *et al*, 2007). A primeira e mais marcante manifestação clínica nestes pacientes é o sangramento umbilical que ocorre em 80% dos casos, alguns dias após o nascimento. Outros sintomas freqüentes incluem equimoses superficiais, hematomas subcutâneos, intramusculares e hemorragias nas articulações, sangramentos pós-cirurgia e pós-extração dentária, e hemorragia intracraniana, maior causa de morte ou seqüelas (Burrows *et al*, 2000; Bolton-Maggs *et al*, 2004; Onland *et al*, 2005; Schroeder *et al*, 2007).

O Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp é o setor responsável pelo diagnóstico e acompanhamento de todos os pacientes provenientes da macro-região de Campinas, com quadro clínico ou laboratorial de doença hemorrágica sem um diagnóstico estabelecido, particularmente aquelas que necessitam de estudos mais especializados. Apesar da investigação de doenças hemorrágicas raras, como a deficiência dos fatores V, VII, X, XII, XI, e trombopatias, alguns pacientes encaminhados não apresentam nenhuma alteração laboratorial. Dessa forma, a avaliação da fibrinólise e do FXIII, torna-se importante, tanto para a pesquisa como para orientação clínica desses pacientes.

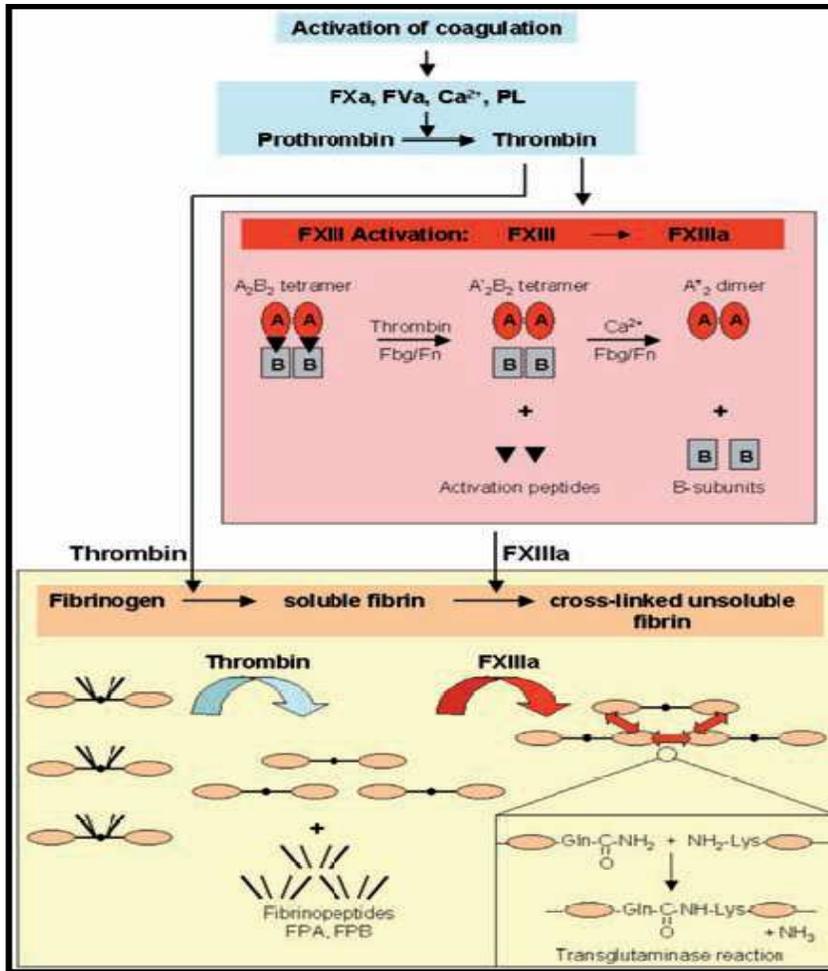


Figura 3- Mecanismo de ativação do FXIII e seu papel na estabilização do coágulo de fibrina. Após ativação da coagulação, a trombina formada converte o fibrinogênio em fibrina solúvel pela clivagem dos fibrinopeptídeos A e B, iniciando a ativação do FXIII que se dá pela dissociação das subunidades A e B induzidas pelo cálcio. O FXIIIa promove as ligações covalentes entre os filamentos de fibrina (Schoeder *et al*, 2007).

1.6- Trombose venosa profunda

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).

A incidência de TVP é de um para cada 1000 indivíduos, sendo considerada uma doença comum, constituindo um importante problema de saúde pública (Hanson *et al*, 1997; Silverstein *et al*, 1998). Na população brasileira estima-se uma prevalência de 0,6 a 1 caso por 1000 habitantes (Maffei, 1995).

Em geral o membro inferior é o sítio mais freqüentemente acometido e, a complicação mais grave é o tromboembolismo pulmonar (Maffei *et al*, 2001).

A TVP é uma doença multifatorial, desencadeada por fatores hereditários e adquiridos. Alguns fatores de risco adquiridos já estão bem estabelecidos como: imobilização, gravidez, câncer, anticoncepção ou reposição hormonal, trauma, cirurgia, presença de anticorpos antifosfolípidios, dentre outros (Rosendaal, 1999; Robertoroye & Rodgers, 2001).

A trombofilia hereditária decorre de defeitos genéticos em um ou mais mecanismos da anticoagulação: deficiência de proteína C, proteína S, antitrombina, mutação G1691A no gene do fator V (fator V de Leiden), mutação G20210A no gene da protrombina e disfibrinogenemia (Rosendaal, 1999; Robertoroye & Rodgers, 2001).

Nos últimos anos, outras anormalidades da coagulação têm sido descritas como potencialmente trombogênicas. Estas condições são representadas por níveis elevados de certos fatores da coagulação como o fibrinogênio, e fatores VIII, IX, X e XI (Kamphuisen *et al*, 2000; van Hylckama *et al*, 2000; Meijers *et al*, 2000; de Visser *et al*, 2001; Tsai *et al*, 2002; Weltterman *et al*, 2003). O aumento dos níveis plasmáticos destas proteínas levaria a uma excessiva geração de trombina, e conseqüentemente do coágulo de fibrina. No Brasil esses fatores já foram investigados e definidos em alguns estudos populacionais que analisaram pacientes com TVP (Arruda *et al*, 1997; Franco *et al*, 1999; Morelli, 2000; Annichino-Bizzacchi, 2003).

Portanto, a fisiopatologia das alterações sanguíneas associadas à trombose inclui o aumento dos fatores da coagulação, assim como a diminuição dos inibidores da coagulação e da atividade fibrinolítica.

É importante ressaltar que o diagnóstico de trombofilia hereditária e adquirida somente é estabelecido em 70% dos pacientes com TVP, fato que sugere a presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença (Heijboer *et al*, 1990; Rosendaal *et al*, 1995; Poort *et al*, 1996; Silverstein *et al*, 1998). A identificação de fatores de risco para trombose é interessante, tanto para o aconselhamento familiar como na orientação da conduta terapêutica do paciente, particularmente se definido um fator de risco grave para TVP.

Dados do papel da fibrinólise na etiologia da TVP são raros e há controvérsias quanto a associação da deficiência hereditária de plasminogênio e TVP (Brandt, 2002; Lisman *et al*, 2005; Schott *et al* 1998). Inclusive, um estudo recente mostrou que os indivíduos com deficiência de plasminogênio em heterozigose não apresentam risco aumentado de TVP (Schuster *et al*, 2007).

Os pacientes com deficiência do plasminogênio podem apresentar malformações do sistema nervoso central, dificuldade para cicatrização de feridas, infecções respiratórias recorrentes, e conjuntivites graves. Estes problemas são resolvidos rapidamente com a infusão do plasminogênio, mostrando a importância deste componente fibrinolítico na fibrinólise extravascular (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

O aumento do PAI-1 circulante no plasma pode representar um fator de risco independente para episódios artero-trombóticos e pode promover o desenvolvimento da doença vascular (Juhan-Vague *et al*, 2000; Vaughan, 2005). Além disso, o aumento da concentração plasmática de PAI-1 pode estar associado a TVP em pacientes submetidos à cirurgia e indivíduos com resistência à insulina. No entanto, o PAI-1 é um fator de fase aguda, e seu aumento pode na verdade ser consequência e não causa da patologia, ou refletir uma resposta inflamatória (Hajjar, 2003).

Recentemente, Lisman e colaboradores (2005) mostraram em um grupo de pacientes com TVP que a hipofibrinólise constitui o dobro do risco para a ocorrência de um evento trombótico.

Nos últimos 10 anos, no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, foram avaliados 400 pacientes com diagnóstico de TVP do Hospital das Clínicas da Unicamp, com investigação de trombofilia hereditária e adquirida. Aproximadamente 10% deles não apresentam trombofilia hereditária, anticorpos antifosfolipídios ou fatores de risco adquiridos, sendo classificados como TVP espontânea.

Assim, a investigação da hipofibrinólise, como um fator de risco para TVP nesse grupo selecionado de pacientes pode se revelar interessante. Também, o estudo de polimorfismos genéticos associados a hipofibrinólise pode contribuir para identificação de novos fatores de risco para TVP.

2- OBJETIVOS

2.1- Gerais

Avaliar a presença de alterações raras da hemostasia em pacientes selecionados com doença hemorrágica ou TVP espontânea.

Analisar em uma população brasileira, a prevalência de polimorfismos nos genes do TAFI e da α_2 -AP, sua correlação com a atividade plasmática, e investigar associação destes com o risco de TVP.

2.2- Específicos

1. Avaliar a fibrinólise global, seus componentes e o FXIII em pacientes com quadro clínico hemorrágico, nos quais foi excluído o diagnóstico de coagulopatias por deficiência dos fatores da coagulação ou das plaquetas;
2. Avaliar a fibrinólise global, seus diversos componentes e o FXIII, em pacientes com TVP espontânea;
3. Determinar a prevalência dos polimorfismos -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile, no gene do TAFI em pacientes com TVP espontânea, doença hemorrágica de etiologia não definida e controles normais, correlacionando-os com a atividade plasmática de TAFI;
4. Avaliar a prevalência dos polimorfismos -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile, no gene do TAFI em pacientes com TVP e controle pareado, determinando se há associação dos mesmos com o risco de TVP;
5. Determinar a prevalência do polimorfismo Arg6Trp no gene da α_2 -AP em pacientes com TVP pareado a um grupo controle, verificando se há associação do mesmo com o risco de TVP.

3- CASUÍSTICA

Neste projeto foram realizados dois tipos de análises. Na primeira, em que se investigou a fibrinólise e o FXIII, foram selecionados três grupos de indivíduos: (1) pacientes com TVP, (2) pacientes com doença hemorrágica, e (3) indivíduos saudáveis.

Na segunda análise, de avaliação dos polimorfismos genéticos, foram selecionados pacientes com TVP e controles, já incluídos em outros estudos caso-controle do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp.

3.1- 1ª análise

3.1.1- Pacientes com TVP

De um grupo de pacientes com diagnóstico de TVP e acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, no período de janeiro de 1997 a setembro de 2007, foram selecionados aqueles que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir.

Através da verificação de informações contidas nos prontuários médicos, os pacientes foram classificados como portadores de TVP espontânea, quando a mesma ocorreu na ausência de fatores de risco adquiridos e foi descartada trombofilia hereditária ou Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido. As alterações hereditárias relacionadas à trombofilia foram: deficiência de proteína C, proteína S e/ou AT, fator V de Leiden e mutação G20210A no gene da protrombina. Os fatores de risco adquiridos foram: cirurgia, hospitalização ou imobilização prolongada, puerpério, gravidez, uso de anticoncepcional hormonal ou terapia de reposição hormonal, viagem aérea com duração superior a 6 horas, antecedente pessoal ou familiar de TVP.

Somente foram incluídos os pacientes em que o sítio da trombose foram as veias dos membros inferiores, proximais ou distais, com idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos, e um tempo mínimo de 3 meses de descontinuação do anticoagulante.

A TVP foi comprovada por ultrassom com doppler ou flebografia.

Os critérios de exclusão adotados foram: presença de doença renal ou hepática, neoplasia maligna, uso de medicamentos que pudessem interferir com a coagulação ou fibrinólise.

3.1.2- Pacientes com alterações hemorrágicas

Os pacientes foram selecionados de um grupo de pacientes com doença hemorrágica, em acompanhamento no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, durante o período de setembro de 1997 a setembro de 2007.

Após consulta dos prontuários médicos, foram selecionados os pacientes com quadro clínico hemorrágico, com todos os exames de hemostasia dentro dos valores de normalidade. Esses exames incluíram tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), tempo de trombina (TT), dosagem dos fatores de coagulação II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII, fibrinogênio, tempo de sangramento, agregação plaquetária com ADP, adrenalina e ristocetina, e cofator de ristocetina. Muitos desses exames foram repetidos mais de uma ocasião, particularmente para exclusão do diagnóstico de doença de von Willebrand.

Foram incluídos pacientes com idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos, que apresentavam sangramento, espontâneo ou desencadeado por fatores diversos, caracterizado como: pós-procedimento cirúrgico (cirurgia, extrações dentárias), pós-parto, gastrintestinal, sistema nervoso central, menorragia (troca de absorvente no mínimo a cada duas horas), epistaxes, gengivorragia, muscular, osteo-articular, cutâneo.

Os pacientes responderam a um questionário, baseado no Questionário sobre Doenças Hemorrágicas (anexo 3), proposto pelo Working Group (Javier Battle, Jeroen Eikenboom, Augusto Federici, Jeanny Goudemand, Stefan Lethagen, Mike Makris) durante o MCMDM-1 Steering Committee Meeting (Milan, 13-14 November 2003).

Através das respostas obtidas, cada paciente recebeu uma pontuação, descrita a seguir: -1 indica ausência de sangramento apesar da exposição a fatores que predispõe um risco hemorrágico; 0 é para ausência de sintomas quando da exposição a fatores de risco para sangramento ou para sangramentos irrelevantes; 1 é atribuído para sintomas referidos pelo paciente sem nenhuma intervenção médica; e, 2 a 4 requerem condutas e intervenções médicas.

Como os indivíduos do sexo masculino não estão expostos a diversas situações de risco para sangramento, quando comparados às mulheres, há uma diferença na pontuação entre os 2 sexos.

Assim, a pontuação para o sexo masculino foi: -3 a -1 - exclusão do diagnóstico de doença hemorrágica, 0 - ausência de sintomas, 1 a 10 - leve, 11 a 20 - moderada; 21 a 30 - grave, e acima de 30 - muito grave.

Para o sexo feminino, em que se acrescentam os sangramentos pós-parto e menorragia, a pontuação de -3 a -1 significa exclusão do diagnóstico de doença hemorrágica, 0 indica ausência de sintomas, de 1 a 12 sangramento leve, de 13 a 24 sangramento moderado, de 25 a 36 sangramento grave, e acima de 36 sangramento muito grave.

Os critérios de exclusão foram alterações dos exames de hemostasia, com ou sem diagnóstico definido de coagulopatia ou trombopatia; uso de medicamentos que interferissem sobre a hemostasia, diagnóstico de doença renal, hepática, infecciosa, colagenose ou neoplásica.

Para classificação da etnia dos pacientes foi considerada a ascendência até a segunda geração e aspectos físicos (cor da pele, textura dos cabelos, formato nasal).

Todos os pacientes responderam a um questionário com informações relevantes ao estudo e assinaram ao termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta das amostras (anexos 1 e 2).

3.1.3- Grupo controle

Este grupo foi formado por 50 indivíduos saudáveis, doadores de sangue ou funcionários do Hemocentro, provenientes da mesma área geográfica dos pacientes. Foram elegíveis indivíduos com idade entre 18 a 50 anos.

Inicialmente foram excluídos os indivíduos que estivessem utilizando qualquer medicamento, que tivessem qualquer doença, mesmo em remissão, com antecedente pessoal ou familiar de sangramento espontâneo ou após procedimento cirúrgico, antecedente pessoal ou familiar de TVP.

Após a aplicação do questionário para averiguação das informações relevantes ao estudo (anexo1), coletou-se uma amostra de sangue para realização de hemograma, coagulograma, glicemia, colesterol e frações, uréia e creatinina e, somente foram incluídos os indivíduos com exames dentro da normalidade.

Para classificação da etnia foram considerados os mesmos critérios empregados para os pacientes.

3.2- 2ª análise

3.2.1- Cohort de pacientes com TVP

Todos os pacientes com diagnóstico de TVP, acompanhados no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, de julho de 1997 a julho de 2007, foram considerados elegíveis para este grupo de estudo.

A classificação desses pacientes foi a mesma empregada para o grupo de TVP da 1ª análise, e foram selecionados tanto aqueles com diagnóstico de TVP espontânea como desencadeada por um fator de risco adquirido, na ausência ou presença de trombofilia hereditária ou de anticorpos antifosfolípidos.

A TVP foi comprovada por ultrassom com doppler ou flebografia.

Os critérios de exclusão adotados foram a presença de doença neoplásica, renal ou hepática.

3.2.2- Grupo controle

O grupo foi formado por indivíduos saudáveis, doadores de sangue ou funcionários do Hemocentro da Unicamp, provenientes da mesma área geográfica dos pacientes. Foram elegíveis indivíduos com idade entre 18 e 65 anos.

Os indivíduos controles foram emparelhados por sexo, grupo étnico e idade aproximada (diferença de até 5 anos) dos pacientes, e os critérios de exclusão foram os mesmos do outro grupo controle.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Coleta de sangue

Foram coletados 14mL de sangue periférico em citrato de sódio 3,8%, na proporção 9:1, para dosagem de FXIII e de componentes da fibrinólise. Em seguida, o sangue foi rapidamente centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos, e o plasma foi dividido em alíquotas de 400µL e armazenado em *freezer* a -80°C, para ensaios posteriores.

Para o teste do tempo de lise da euglobulina (TLE) e da área de lise em placa de fibrina (ALPF) foram coletadas 6mL de sangue periférico, em 2 amostras de cada paciente: uma pré e outra pós-oclusão. A coleta da amostra pré-oclusão deu-se no braço direito sem o uso do garrote. Inicialmente, foi proposta a coleta da amostra pós-oclusão após uma pressão de 40mmHg por 20 minutos no braço esquerdo. Contudo, muitos pacientes não conseguiam completar o tempo necessário, apresentando um quadro de mal-estar e até perda da consciência. Assim, optou-se pela coleta após um período de 10 minutos, com a pressão estabelecida para cada paciente pelo cálculo abaixo discriminado:

$$\text{Valor da pressão sistólica} + \text{Valor da pressão diastólica} / 2 - 1$$

4.2- Determinação das concentrações plasmáticas

Para realização das análises laboratoriais as amostras foram descongeladas rapidamente a 37°C em banho-maria. A fim de minimizar a interferência das variações interensaios na comparação dos resultados, as amostras dos controles e pacientes foram analisadas concomitantemente.

4.2.1- Dosagem de α_2 -antiplasmina

A atividade plasmática da α_2 -antiplasmina foi determinada pelo método cromogênico, utilizando o *kit Berichrom α_2 -antiplasmina*® (Dade-Behring, Newark DE, USA).

O método baseia-se na inativação da α_2 -antiplasmina presente na amostra pela adição de plasmina do *kit*. Nesta mistura a α_2 -antiplasmina inativa a plasmina, restando a plasmina residual. Na presença do substrato cromogênico, a plasmina residual catalisa a p-nitroanilida (pNA) do substrato, havendo liberação de p-nitroanilina que é medida em um comprimento de onda de 405 nm.

A reação foi realizada em equipamento automatizado, o Coag-A-Mate-MTX (bioMérieux). A 12 μ L da amostra de plasma em uma diluição 1:20 de tampão imidazol, foram adicionados 180 μ L de plasmina. Essa mistura foi incubada durante 1 minuto a 37°C. Em seguida, adicionou-se 18 μ L do substrato de plasmina e, o tempo de leitura padronizado foi de 65 segundos.

A curva de calibração foi preparada através da diluição do plasma padrão da α_2 -antiplasmina nas proporções de 1:1, 1:2, 1:5, e 1:11, obtendo-se respectivamente 148,57%, 104%, 52%, e 26% da concentração de α_2 -antiplasmina.

O valor de referência para o teste de acordo com o fabricante é de 80 – 120%. Contudo, os resultados obtidos no grupo controle é que foram considerados como os de normalidade do laboratório - valor de referência para o Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.2- Dosagem de plasminogênio

Esta dosagem foi determinada por método cromogênico, utilizando-se o *kit Berichrom Plasminogen*® (Dade-Behring, Newark, DE, USA) para quantificação da atividade do plasminogênio no plasma.

O princípio do teste baseia-se na formação de um complexo entre o plasminogênio contido na amostra e o tampão contendo estreptoquinase, sendo este complexo responsável pela quebra do substrato cromogênico, liberando a p-nitroanilina que será medida na absorbância a 405 nm.

O aparelho utilizado para esta dosagem foi o Coag-A-Mate-MTX (bioMérieux). A uma amostra de 12µL de plasma diluído 1:20 em tampão imidazol, foi adicionada 180µL do reagente estreptoquinase. Essa mistura foi incubada durante 300 segundos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 18µL do substrato de plasmina e, o tempo de leitura padronizado em 125 segundos.

A curva de calibração foi preparada através da diluição do plasma padrão do plasminogênio nas proporções de 1:1, 1:2, 1:5, e 1:11, obtendo-se respectivamente 150%, 100%, 50%, e 25% da concentração do plasminogênio.

O valor de referência para o teste de acordo com o fabricante é de 75 – 100%. Da mesma maneira que para a dosagem de α_2 -antiplasmina, resultados obtidos no grupo controle é que foram considerados como os de normalidade do laboratório - valor de referência para o Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.3- Dosagem do PAI-1

Esta dosagem foi determinada pelo método cromogênico utilizando o *kit Berichrom PAI®* (Dade-Behring, Newark, DE, USA) para determinação da atividade do PAI no plasma.

O método baseia-se na inativação da uroquinase do reagente pela adição do PAI da amostra, restando uma uroquinase residual que é determinada através da transformação do plasminogênio em plasmina. A plasmina resultante é medida a 405nm, mediante desdobramento de um substrato cromogênico (plasminogenólise reforçada).

O aparelho utilizado para esta dosagem foi o Amax Destiny (Biotech Trinity). A partir de 50µL da amostra de plasma adicionou-se 100µL do reagente uroquinase. Essa mistura foi incubada durante 5 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 200µL do reagente plasminogênio e 200µL de um oxidante. Novamente, esta mistura foi incubada por mais 5 minutos a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 500µL do substrato de plasminogênio

e a leitura realizada em 60 segundos. Esta reação foi igual tanto para o grupo controle como para as amostras.

O valor de referência para o teste de acordo com o fabricante é de 0,3 – 3,5 U/mL. Adotaremos os resultados obtidos no grupo controle do nosso estudo (Hemocentro – UNICAMP). Os resultados foram expressos em U/mL.

4.2.4- Dosagem do TAFI

Para avaliar a atividade do TAFI no plasma foi empregado o método cromogênico, utilizando-se o *kit Actichrome® TAFI Activity kit* (American Diagnostica, Stamford, CT, USA).

A titulação deste teste foi feita em microplaca. As colunas 1 e 2 da placa foram reservadas para a posterior curva de calibração. Após distribuir 90µL de tampão em metade da placa, adicionou-se o plasma diluído 1:25 e acrescentou-se 10µL do TAFI *activation enhancer* e 15µL do reagente de ativação. Na outra metade da placa foi adicionado 115µL do tampão e 25µL do plasma diluído 1:25 sem os reagentes de ativação, e dessa forma, metade foi usada para controle do plasma inativo. A placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente em um agitador de placas.

Decorrido este tempo, adicionou-se 50µL do TAFI padrão e 250µL do tampão nos poços A1 e A2 e, a partir destes, foram feitas diluições seriadas até os poços E1/E2, removendo de cada poço 150µL e passando para o próximo, sendo que nos poços E1/E2 descartou-se 150µL, de forma que as concentrações fossem 2, 1, 0,5, 0,25 e, 0,125µg/mL. Os poços F1/F2 foram usados para o branco, com 150µL de tampão.

Foram adicionados 50µL do TAFI *developer* em toda placa e, em seguida, incubada por 30 minutos a 37°C. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 10µL de ácido sulfúrico. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro, em até uma hora, em comprimento de onda de 490nm.

Para determinar a atividade do TAFI nas amostras foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\Delta\text{Abs}_{490\text{nm}} (\text{TAFI}) = \Delta\text{Abs}_{490\text{nm}} (\text{plasma ativado}) - \Delta\text{Abs}_{490\text{nm}} (\text{plasma inativado})$$

Posteriormente, os resultados foram interpolados no gráfico e multiplicados pelo fator de diluição (25).

A atividade de TAFI no plasma estabelecida pelo fabricante é de aproximadamente 12-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O valor de referência do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp foi estabelecido por sua determinação nas amostras controles. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2.5- Dosagem do FXIII

A atividade plasmática do FXIII foi determinada pelo método cromogênico, utilizando o kit *Berichrom FXIII*® (Dade-Behring, Newark, DE, USA).

O princípio do método baseia-se na ativação do FXIII da amostra pela trombina, formando o FXIIIa. O FXIIIa é combinado a um substrato específico de peptídeo com éster etílico de glicina, liberando amoníaco. A diminuição de NADH é medida através da absorbância de 340nm.

Esta dosagem foi realizada em parceria com a Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto, no Hospital das Clínicas, Laboratório de Hemostasia, para utilização do aparelho BCS (Dade-Behring). Utilizou-se 100 μL da amostra e 1000 μL do reagente (reagente ativador misturado com reagente de detecção em partes iguais).

A curva de calibração foi realizada por 6 pontos conforme exigido pelo kit através do calibrador do fabricante.

De acordo o fabricante o valor de referência para o teste é de 70 – 140%. Foi adotado o valor de referência para o Laboratório de Hemostasia (Hemocentro – UNICAMP). Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.2.6- Dosagem do fibrinogênio

A atividade plasmática do fibrinogênio foi realizada por método coagulométrico conforme descrito por Clauss (Clauss, 1975), em que a atividade do fibrinogênio é inversamente proporcional ao tempo de coagulação após a adição de trombina concentrada ao plasma.

O kit comercial utilizado foi o da Amax (*Trinity Biotech*, Bray, CO, Ireland). A curva de calibração foi formada através de diluições seriadas do calibrador comercial em tampão imidazol e o tempo de formação do coágulo de fibrina das amostras foi interpolado nesta curva. Os resultados foram expressos em mg/dL. O valor de normalidade do laboratório é de 150 a 400 mg/dL.

Esta dosagem foi realizada para avaliação da sua correlação com os resultados do TLE e da ALPF.

4.3- Avaliação global da atividade fibrinolítica

A avaliação global da atividade fibrinolítica foi realizada pré e pós-oclusão venosa pelo TLE e pela ALPF, de acordo com o método do ECAT (*European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study* - 1985).

O TLE baseia-se na observação da dissolução espontânea do coágulo formado pela fração euglobulínica do plasma, precipitado pelo pH ácido. Nessa acidificação ocorre a precipitação isoelétrica dos componentes plasmáticos envolvidos na fibrinólise tais como: alguns fatores de coagulação, fibrinogênio, plasminogênio, ativadores do plasminogênio e os inibidores.

A ALPF baseia-se na medida, após um período de 18h em temperatura de 37°C, da área de lise em uma placa de fibrina, proporcionada pela fração euglobulínica. Esta análise tende a ser inversamente proporcional ao TLE, ou seja, quanto maior o TLE, menor será a ALPF e vice-versa.

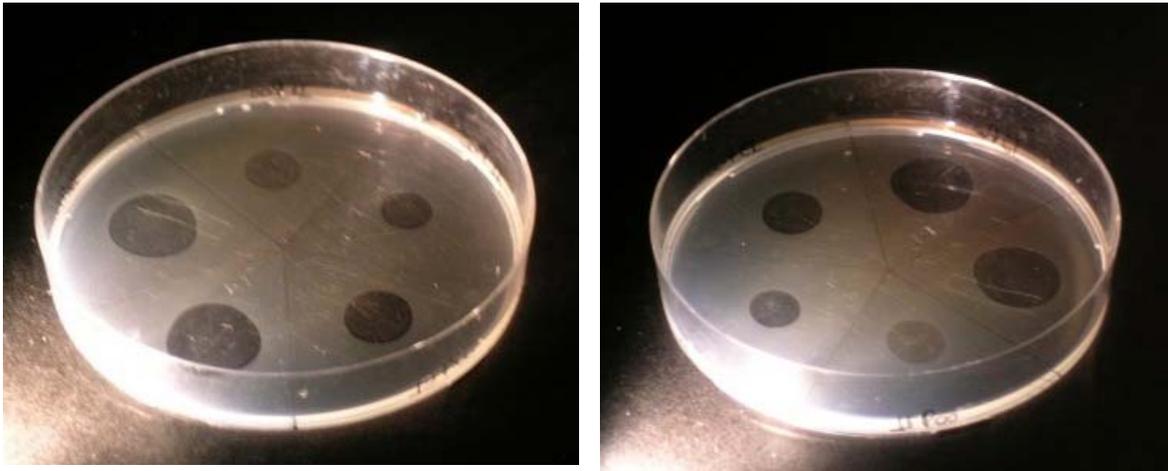
4.3.1- TLE

Misturou-se 200µL de plasma com 1,8µL de água destilada a 4°C. Para precipitação da fração euglobulínica adicionou-se 150µL de ácido acético a 0,25%, para estabelecer um pH de 5,9, mantendo-se a solução por 30 minutos a 4°C. Após este período, centrifugou-se a amostra a 3000rpm por 10 minutos, a 4°C, desprezando o sobrenadante por inversão. Para ressuspensão foi acrescentada a quantidade de 200µL de tampão Tris-Tween, pH 7,5. Posteriormente, adicionou-se 100µL de solução trombina e cloreto de cálcio para coagulação da mistura. Com a temperatura do tubo mantida a 37°C, observou-se o tempo para a dissolução total do coágulo. Os resultados foram expressos em minutos.

4.3.2- ALPF

A ALPF foi padronizada pelo método descrito por Astrup (1956a,b), com a modificação desenvolvida pelo Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, que estabelece a diluição do fibrinogênio em PBS 1:20.

A placa de fibrina é preparada com fibrinogênio humano, utilizando-se uma solução de 0,1% de proteína coagulável. Este fibrinogênio é obtido a partir de uma bolsa de plasma e precipitado com PEG (polietilenoglicol), posteriormente este precipitado é ressuspensionado em tampão PBS. A fração euglobulínica é preparada conforme a técnica para o TLE. Em seguida, o precipitado é ressuspensionado em 200µL de tampão barbital EDTA, e posteriormente, aplicam-se alíquotas de 30µL em pontos equidistantes, sobre a placa de fibrina. Os resultados foram expressos em mm², realizando-se a leitura dos diâmetros perpendiculares das áreas de lise após o tempo de 18 horas em estufa à 37°C.



Figuras 4 e 5- Representação da ALPF após o período de 18 horas em estufa a 37°C.

4.4- Determinação dos polimorfismos

4.4.1- Extração de DNA de Sangue Periférico

O DNA foi extraído de 8ml de sangue periférico citratado. Após centrifugação por 15 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foram adicionados 5 volumes de NH_4Cl 144mM e $\frac{1}{2}$ volume de NH_4HCO_3 10mM, sendo misturado por inversão, para lise das hemácias. As amostras foram centrifugadas a 2200 rpm durante 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o procedimento acima foi repetido.

O sobrenadante foi descartado e ao sedimento obtido adicionou-se 5mL de tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6 KCl 10mM, MgCl_2 10mM, EDTA 0,2mM) e 125 μL de Triton X10 (Sigma Chemical, CO, Steinheim, Alemanha). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 5mL TKM1 e centrifugado novamente. O sedimento obtido foi ressuspensão com 400 μL de TKM2 (NaCl 400mM, KCl 10mM, pH 7.6 MgCl_2 10mM) e 25 μL de SDS 10 (dodecil sulfato de sódio), para a lise dos leucócitos. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 30 minutos. Após este período, foram acrescentados 180 μL de NaCl 5M e homogeneizados com a própria

ponteira. Esperou-se o tempo de 20 minutos em temperatura ambiente com a finalidade de precipitar as proteínas. Após este tempo, centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga.

O sobrenadante contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 450 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico e 450 μ L de fenol bidestilado saturado com Tris-HCl pH 8.0, seguida de centrifugação à 12000 rpm por 5 minutos. Este processo foi repetido após a adição de 1mL de clorofórmio/álcool-isoamílico. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo fundo cônico de 1500 μ L. Acrescentou-se 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M pH 5.2 e 1mL de etanol absoluto gelado, e agitou-se por inversão para precipitação do DNA.

Em seguida, centrifugou-se por 3 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70% gelado, e uma nova centrifugação foi realizada. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente para secar. Depois de seco, o DNA foi ressuspense em aproximadamente 300 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5 EDTA 1mM) que permaneceu durante 16 horas sob refrigeração (4°C) para sua total dissolução.

4.4.2- Amplificação de seqüências gênicas específicas

As regiões gênicas de interesse foram amplificadas a partir de amostras de DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo procedimento descrito por Saiki *et al* (1988).

As reações de amplificação foram realizadas a partir de 8 μ L de DNA genômico, 1mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dntps: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 3 μ L de tampão da enzima polimerase (10 mM Tris pH 8.5), 1,2 mM MgCl₂, 0,5 μ M de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase. As reações foram submetidas a condições de ciclos pré-determinadas: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida de 35 ciclos de 96°C por 40 segundos, temperatura de anelamento dos primers (°C) por 40 segundos e 72°C por 1 minuto para a extensão do produto.

Para a realização das reações foi utilizado um termociclador automático de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA).

4.4.3- Determinação de nucleotídeos polimórficos dos genes estudados

Foram pesquisados três polimorfismos previamente identificados no gene do TAFI e um polimorfismo no gene da α_2 -antiplasmina. As amostras de DNA foram amplificadas pela PCR utilizando os oligonucleotídeos sintéticos descritos posteriormente.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, em tampão de corrida TBE (Trizma/ácido bórico/ EDTA).

4.4.3.1- TAFI

A identificação dos polimorfismos no gene do TAFI foi realizada conforme descrito anteriormente por Brouwers *et al* (2003), utilizando-se os pares de *primers* específicos e a temperatura de anelamento (C°) como exposto na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição dos *primers* e enzimas de restrição que foram utilizadas na identificação dos polimorfismos do gene do TAFI.

Polimorfismo	Sequência dos Primers	Temperatura de anelamento (°C)	Enzimas de restrição
-438 A/G	5'-CAGAGATCCTGTAATCATCC-3' 5'-CGCGAAGACATGCTGCTCAC-3'	58	<i>Hpy</i> CH4 IV
505 G/A	5'-ATCCTGAAGCTTATTGTTAC-3' 5'-TGAGTCTGACACAGGTGATC3'	62	<i>Fnu</i> 4H I
1040 C/T	5'-TGCTTCCAGTCTTAGTAGC-3' 5'-CAGTTGTATTACATGTGACC-3'	58	<i>Spe</i> I

Brouwers *et al*, 2003.

TAFI -438A/G

Para a identificação do polimorfismo -438A/G, localizado no exon 1 do cromossomo 17, foi realizada uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 600pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), e 3U da enzima *HpyCH4 IV* (MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. A enzima não reconhece o sítio do polimorfismo.

Após a digestão do produto amplificado, na presença do alelo mutante (G), observou-se um fragmento de 600pb através de eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Quando o alelo normal (A) está presente a enzima reconhece o sítio de restrição, apresentando os fragmentos de 520pb e 80pb. Assim, amostras heterozigotas (AG) apresentam três fragmentos de tamanhos 600pb, 580pb e 80 pb.

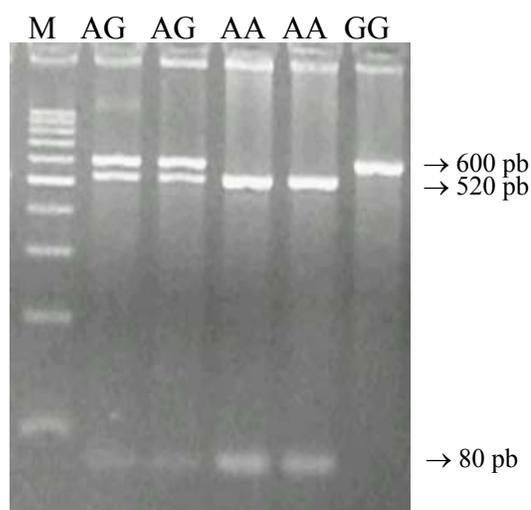


Figura 6- Digestão do polimorfismo -438 A/G no gene do TAFI (M=marcador).

TAFI 505G/A (Ala147Thr)

Para a identificação do polimorfismo 505G/A (Ala147Thr), localizado no éxon 6, foi realizada uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 225pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), e 3U da enzima *Fnu4H*

(MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. Esta enzima não reconhece o local do polimorfismo.

Da mesma forma, em seguida à digestão, o produto amplificado é observado através de eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Na presença do alelo mutante A (Thr), tem-se um fragmento de 225pb. Quando o alelo normal G (Ala) está presente a enzima reconhece dois sítios, possuindo os fragmentos de 152pb e 73pb. Amostras heterozigotas (GA) apresentam três fragmentos de tamanhos 225pb, 152pb e 73 pb.

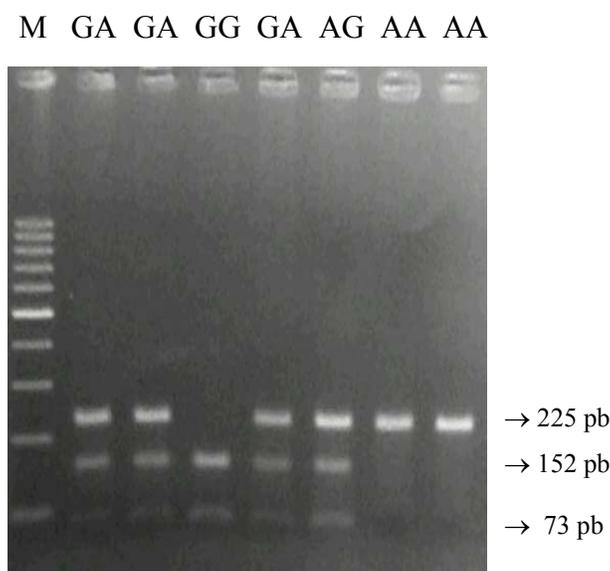


Figura 7- Digestão do polimorfismo 505G/A no gene do TAFI (M=marcador).

TAFI 1040C/T (Thr325Ile)

A identificação do polimorfismo 1040C/T (Thr325Ile), localizado no éxon 9, foi realizada a partir de uma reação com volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 217pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), 0,2µL de BSA e 3U da enzima *SpeI* (MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C. A enzima não reconhece o sítio do polimorfismo.

Na presença do alelo mutante T (Ile), tem-se um fragmento de 217pb. Quando o alelo normal C (Thr) está presente há clivagem do sítio de restrição, formando dois fragmentos, com 167pb e 49pb. Nos indivíduos heterozigotos (CT) verificaram-se a presença de três fragmentos com 217, 167 e 49pb. Este fragmento de menor tamanho normalmente é perdido no decorrer do processo de eletroforese, tornando difícil sua visualização.

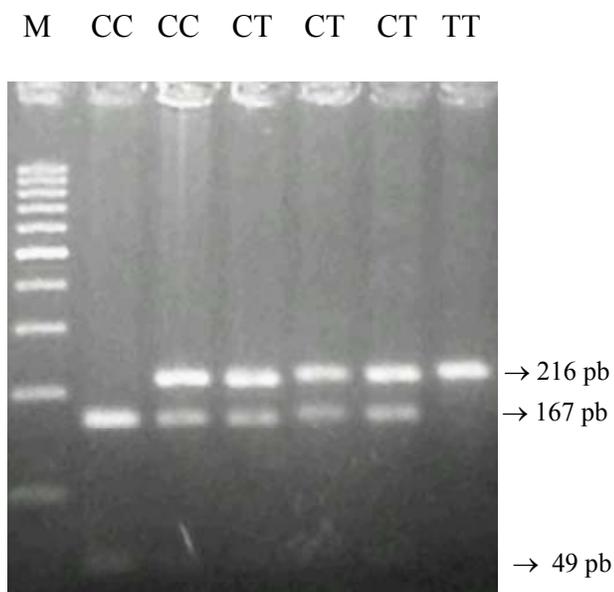


Figura 8- Digestão do polimorfismo 1040C/T no gene do TAFI (M=marcador).

4.4.3.2- α_2 -AP Arg6Trp (C33T)

A identificação do polimorfismo Arg6Trp (substituição de uma Citosina por uma Timina) no exon 3 do gene da α_2 -antiplasmina foi realizada conforme descrito por Lind & Thorsen (1999). A seqüência dos *primers* de nucleotídeos utilizada foi:

Sense: 5'- GATCGCGTGGGTAGGATTCC- 3'

Anti-sense: 5'- CCACTGGAGTACTGAGTTCC- 3'

A temperatura de anelamento estabelecida foi de 57C° e para detecção do polimorfismo foi utilizada a enzima de restrição *Msp I*.

A identificação do polimorfismo foi realizada em uma reação para um volume final de 15µL, contendo 6µL do produto amplificado de 1043pb, 1,5mM de Tris-HCl (pH = 7.4), e 3U da enzima *MspI* (MBI Fermentas, Lituânia). Esta reação foi incubada por 16 horas, em banho-maria a 37°C.

A enzima não reconhece o sítio polimórfico, portanto na presença do alelo mutante (T), evidência-se os fragmentos de 538pb, 326pb e 179pb. Quando o alelo normal (C) está presente há clivagem do sítio de restrição, formando quatro fragmentos de 538pb, 281pb, 179pb e 45pb. Nos indivíduos heterozigotos (CT) verificaram-se a presença de cinco fragmentos com 538pb, 326pb, 281pb, 179pb e 45pb.

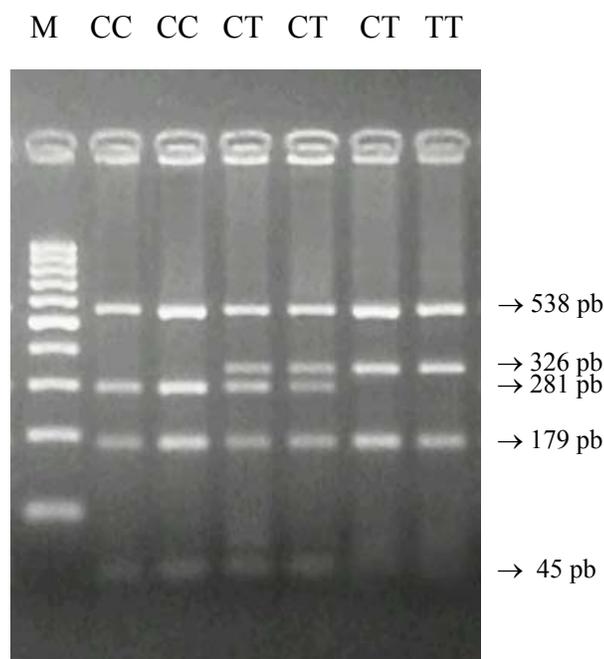


Figura 9- Digestão do polimorfismo Arg6Trp no gene da α_2 -AP (M=marcador).

4.5- Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra foram feitas tabelas das frequências das variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram descritas como mediana, valores máximo e mínimo, e estas foram comparadas pelo teste de *Mann-Whitney*. As variáveis fatoriais foram comparadas pelo teste *Fisher's exact test*.

Para correlação das variáveis, em cada grupo, foi utilizado o teste de *Spearman's rank correlation*.

A comparação dos parâmetros fibrinolíticos e o FXIII entre os grupos também foi realizada utilizando-se os valores dos percentis 10 e 90, medido nos controles.

O cálculo do risco dos polimorfismos para a TVP foi determinado pelo teste *Fisher's exact test* e expresso através do *odds ratio* (OR).

A comparação entre as concentrações de TAFI, nos diversos genótipos foi realizada através do teste de *Kruskal-Wallis rank sum test*. Para estudo da distribuição genotípica dos polimorfismos foi utilizado o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o cálculo do tamanho amostral.

Também foi empregado análise multivariada através do modelo de regressão logística para definir o grupo trombótico ou hemorrágico, a fim de delimitar as variáveis que determinassem estes grupos. Para analisar as variáveis que exercem influência sobre os resultados do TLE e ALPF foi empregada a regressão linear.

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 *R Development Core Team* (2007), versão 2,0.

5- RESULTADOS

5.1- 1ª análise

5.1.1- Características clínicas

Foram incluídos 31 pacientes com TVP, sendo 12 (38,71%) do sexo masculino e 19 (61,29%) do sexo feminino. No grupo com doenças hemorrágicas foram incluídos 45 pacientes, 7 (15,6%) do sexo masculino e 38 (84,44%) do sexo feminino. O grupo controle foi composto por 50 indivíduos, 23 (46%) do sexo masculino e 27 (54%) do sexo feminino.

A tabela 2 apresenta os dados relativos à mediana da idade, sexo e etnia dos pacientes e grupo controle.

Tabela 2- Características demográficas dos pacientes hemorrágicos e com trombose e do grupo controle.

	Controle	Grupo Hemorrágico	p*	Grupo TVP	p*
Sexo (Masculino/Feminino)	23/27	7/38	0,001	12/19	0,64
Idade – mediana	31	32	0,44	37	0,005
(mínimo – máximo)	(18 – 53)	(18 – 64)		(20 – 61)	
Etnia					
Descendente-Caucasóide	30 (60%)	24 (53,35%)	0,47	16 (51,60%)	0,72
Miscigenado	14 (28%)	11 (24,45%)		10 (32,26%)	
Afro-descendente	6 (12%)	10 (22,20%)		5 (16,14%)	

*Teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparação das variáveis contínuas e teste de *Fisher's exact test* para comparação entre as variáveis fatoriais, entre os grupos controle, hemorrágico, e TVP.

Analisando a variável sexo nos grupos estudados, observamos que tanto o grupo hemorrágico como o de TVP tem um predomínio de indivíduos do sexo feminino em relação ao grupo controle, mas somente estatisticamente significativo na comparação do primeiro grupo ($p=0,001$). A comparação do grupo hemorrágico com o grupo de TVP mostrou que há maior número de mulheres no primeiro grupo, com uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,03$).

O grupo com TVP apresentou a mediana de idade superior em relação ao grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$).

O gráfico 1 apresenta a classificação dos pacientes com TVP de acordo com a idade na época da trombose.

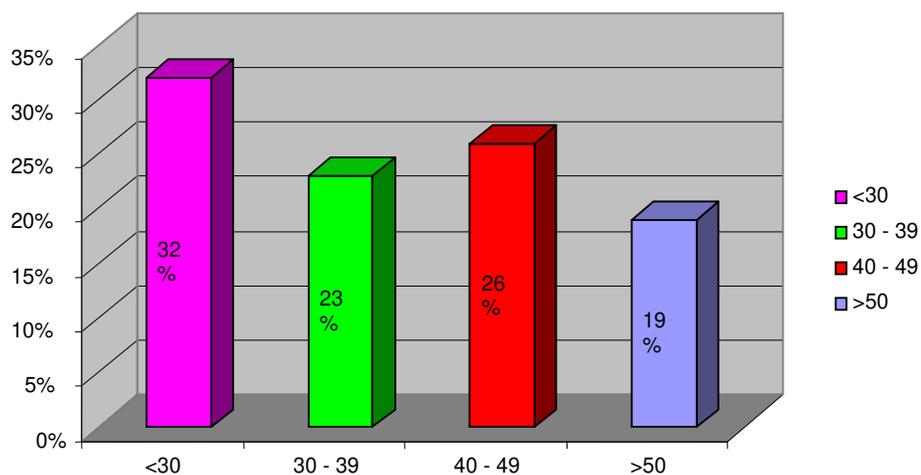


Gráfico 1- Idade do paciente na época da trombose

O gráfico 2 apresenta os dados clínicos referentes a recorrência e antecedente familiar de TVP.

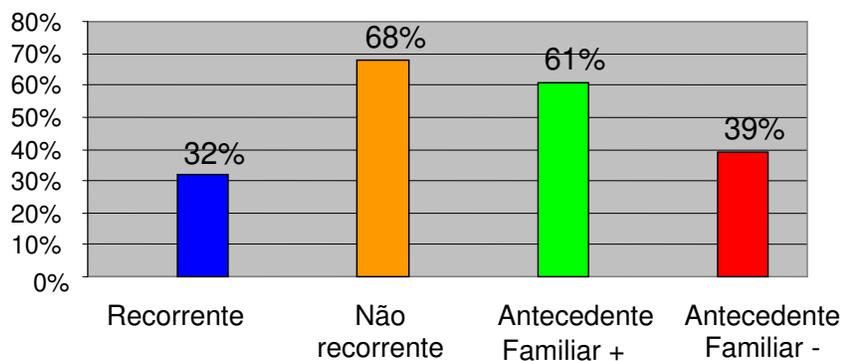


Gráfico 2- Recorrência da trombose e história de antecedente familiar

Nota-se que nestes pacientes de TVP, selecionados através de critérios muito excludentes, a trombose ocorreu em sua maioria, numa idade inferior a 50 anos, como episódio único e, com histórico familiar positivo para doença tromboembólica.

No grupo de pacientes com doença hemorrágica, 5 (11%) apresentaram sangramento espontâneo, 6 (13%) mantinham anemia crônica, e 20 (44%) receberam transfusão sanguínea apenas após procedimentos cirúrgicos.

De acordo com o Questionário sobre Doenças Hemorrágicas, 36 (80%) dos pacientes apresentavam hemorragia leve e 9 (20%) apresentavam hemorragia moderada.

O gráfico 3 apresenta a % de cada tipo de sangramento, evidenciando que um mesmo indivíduo apresentou mais de um deles e que a maior parte foi cutâneo-mucoso.

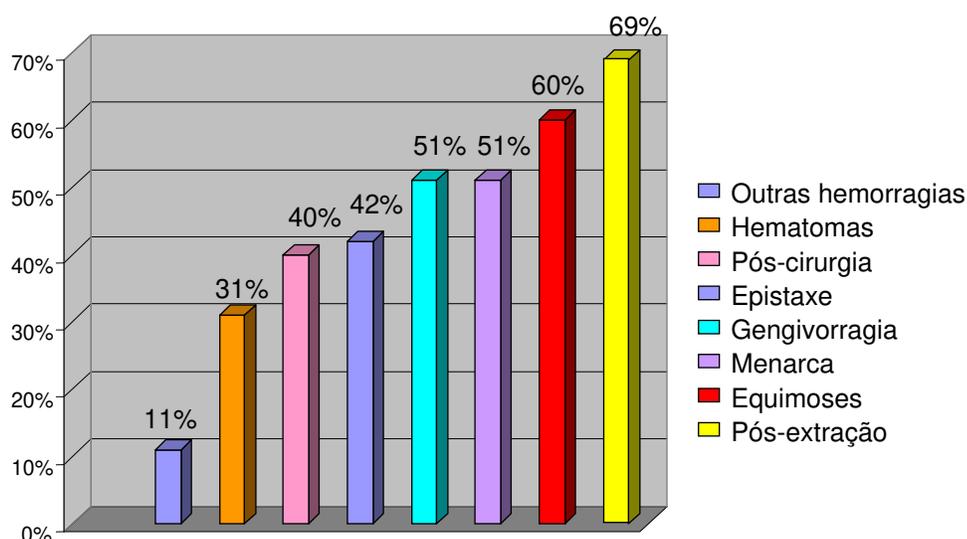


Gráfico 3- Caracterização dos sangramentos nos pacientes hemorrágicos

5.1.2- Dosagens plasmáticas

Inicialmente foi estabelecido o valor de referência para cada um dos componentes dosados nas amostras plasmáticas do grupo controle, pelo cálculo da mediana e dos valores máximo e mínimo. A tabela 3 mostra esses valores e os sugeridos pelo fabricante de cada *kit*, evidenciando que resultados muito diferentes podem ser obtidos.

Tabela 3- Valores de referência dos parâmetros da fibrinólise.

	Valor de referência do estudo	Valor sugerido pelo <i>kit</i>
Plasminogênio	86 – 170%	75 – 150%
α_2 -AP	96 – 152%	80 – 120%
TAFI	11,50 – 28,90 μ g/mL	12 - 20 μ g/mL
PAI-1	2 – 6,80U/mL	0,3 – 3,5U/mL
FXIII	52,50 – 156%	70 – 140%

A tabela 4 mostra os resultados da mediana, mínimo e máximo das concentrações de plasminogênio, α_2 AP, TAFI, PAI-1 e FXIII, nos pacientes e controles, e os percentis 10 e 90 encontrado no grupo controle.

Tabela 4- Comparação das diversas variáveis entre os grupos controle e o grupo hemorrágico.

	Grupo controle		Grupo hemorrágico		Grupo TVP		Hemorrágico X TVP
	P10	Mediana	Mediana	p*	Mediana	p*	p*
	P90	(Min – Máx)	(Min – Máx)		(Min – Máx)		
PLG	<=106,21	120,95	121,6	0,24	131,10	0,04	0,19
	>147,54	(86,1 – 169,9)	(73,8 – 406,1)		(94 – 159,7)		
α_2 -AP	<=114,4>	127,26	130,07	0,26	124,25	0,008	0,01
	140,04	(96,3 – 152,2)	(93,5 – 156,8)		(100,5 – 144,1)		
TAFI	<=13,55	19,45	21,24	0,008	16,27	<0,001	<0,001
	>23,13	(11,5 – 28,9)	(12,1 – 33,0)		(9,8 – 21,7)		
PAI-1	<=3,47	4,59	4,81	0,14	5,63	0,01	0,06
	>5,67	(1,9 – 6,8)	(0,0 – 7,3)		(1,9 – 8,6)		
FXIII	<=66,66	96,60	88,60	0,18	103,30	0,04	0,009
	>122,66	(52,5 – 156)	(50,2 – 156)		(62 – 156)		

* Teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparação das variáveis entre os grupos controle, hemorrágico e TVP.

A comparação das medianas do grupo hemorrágico e do grupo controle não mostrou diferença nas variáveis, com exceção do TAFI, que estava significativamente aumentado no grupo hemorrágico (p=0,008).

Em 15,55% dos pacientes com doença hemorrágica obtivemos um aumento da atividade do plasminogênio, mas sem diferença estatística em relação ao grupo controle.

A comparação do grupo hemorrágico e controle, pelos resultados dos percentis 90 e 10, para cada uma das variáveis analisadas mostrou diferença estatisticamente significativa apenas para o TAFI, que apresentava maior número de indivíduos com doença hemorrágica com atividade dessa proteína acima do P90 (OR 4.65; CI95% 1,43-18,1; p<0,001);

A análise de deficiências específicas revelou que um dos pacientes com doença hemorrágica apresentou como única alteração uma deficiência grave de PAI-1. Este indivíduo, do sexo feminino, 30 anos, relatava sangramento aumentado aos 7 anos, após tonsilectomia, sem investigação na época. Desde então, apresentou alguns hematomas subcutâneos espontâneos e foi encaminhada ao Hemocentro da Unicamp após hemorragia pós-extração dentária. Durante cesárea teve sangramento aumentado que ocasionou anemia, mas sem necessidade de transfusão sanguínea. Não tinha história de consangüinidade ou história familiar de sangramento.

Também, neste grupo de pacientes hemorrágicos foi estabelecido o diagnóstico de deficiência leve do FXIII (50,20%). Este indivíduo, do sexo masculino, 23 anos, apresentou sangramento aumentado em 3 extrações dentárias, em momentos diferentes. Relatava epistaxes (leve, 3 vezes ao ano com duração em torno de 7 minutos) somente na infância e aparecimento de equimoses espontâneas esporadicamente. Submeteu-se a cirurgia para correção de hérnia de disco, mas sem qualquer complicação hemorrágica. Na história familiar, referia que a mãe apresentava sintomas hemorrágicos, mas com diagnóstico de doença de von Willebrand.

O grupo de TVP quando comparado ao grupo controle mostrou aumento significativo do plasminogênio ($p=0,04$), do PAI-1 ($p=0,01$) e do FXIII ($p=0,04$) e, diminuição de α_2 -AP ($p=0,008$) e do TAFI ($p<0,001$).

No grupo de TVP não se estabeleceu nenhuma deficiência de plasminogênio.

A análise estatística comparando os grupos de pacientes revelou que, com exceção do plasminogênio e do PAI-1, houve diferenças significativas, com aumento do FXIII ($p=0,009$) e diminuição do TAFI ($p<0,001$) e da α_2 -AP ($p=0,01$) no grupo TVP em relação ao grupo hemorrágico.

A comparação dos resultados das variáveis nos grupos TVP e controle, pelos percentis 10 e 90, mostrou que o aumento do PAI-1 acima do percentil 90 foi um fator de risco para TVP (OR 6.30; CI95% 1,44-39,35; $p=0,007$).

Para avaliação global do sistema fibrinolítico comparou-se as medianas do TLE e da ALPF pré e pós oclusão; e, para análise do potencial de resposta fibrinolítica, analisou-se a razão entre os tempos do TLE e as áreas da ALPF pré e pós oclusão (tabela 5).

Tabela 5- Comparação das medianas do TLE e ALPF (pré, pós e razão) entre o grupo hemorrágico e o grupo controle.

	Grupo controle	Grupo hemorrágico		Grupo TVP		Hemorrágico X TVP
	Mediana (Min – Máx)	Mediana (Min – Máx)	p*	Mediana (Min – Máx)	p*	p*
TLE pré	250 (85 – 415)	175 (115 – 355)	0,003	295 (85 – 475)	0,01	<0.001
TLE pós	145 (25 – 325)	115 (10 – 355)	0,001	235 (25 – 385)	0,009	<0.001
TLE razão	1,43 (0,49 – 11,80)	1,77 (1,00 – 14,50)	0,008	1,23 (1,00 – 5,00)	0,06	<0.001
APLF pré	95 (30 – 240)	100 (42 – 255)	0,15	81 (30 – 192)	0,04	0,005
APLF pós	174,50 (80 – 550)	182 (90 – 702)	0,25	144 (70 – 416)	0,02	0,003
APLF razão	0,61 (0,10 – 1,01)	0,55 (0,18 – 0,93)	0,48	0,61 (0,19 – 0,59)	0,41	0,36

*Teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparação das variáveis entre os grupos controle e hemorrágico e TVP.

Os TLEs pré ($p=0,003$) e pós-oclusão ($p=0,001$) apresentavam-se significativamente diminuídos no grupo hemorrágico em relação ao controle; e, a razão do TLE mostrou-se significativamente aumentada ($p=0,008$) nos pacientes em relação aos controles.

As ALPFs pré e pós-oclusão estavam aumentadas nos pacientes com doença hemorrágica em relação aos controles, mas sem significância estatística. A razão pré e pós-oclusão da ALPF mostrou-se diminuída, mas não estatisticamente significativa.

O grupo TVP apresentou TLEs pré ($p=0,01$) e pós-oclusão ($p=0,009$) aumentados e ALPFs pré ($p=0,04$) e pós-oclusão ($p=0,02$) diminuídas em comparação ao grupo controle, todos estes dados mostrando significância estatística. A razão do TLE pré e pós-oclusão mostrou uma diminuição não significativa, e a razão da ALPF pré e pós-oclusão apresentou valor idêntico ao normal.

A comparação dos TLEs pré ($p<0.001$) e pós-oclusão ($p<0.001$) e da razão ($p<0.001$) desses tempos entre o grupo hemorrágico e o grupo TVP mostrou uma diminuição dos TLEs e aumento da razão estatisticamente significativos no primeiro grupo. As ALPFs pré ($p=0,005$) e pós-oclusão ($p=0,003$) estavam significativamente aumentadas nos pacientes hemorrágicos, mas a razão entre essas áreas não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Para avaliar a influência de cada um dos componentes da fibrinólise analisados neste estudo sobre o TLE e a ALPF, empregou-se a correlação de *Spearman*, em cada grupo. Também nesta correlação acrescentou-se o fibrinogênio para avaliar a sua influência sobre estes métodos.

Tabela 6- Correlação das variáveis TAFI, PLG, α_2 -AP, PAI-1 e FBG com as variáveis TLE e ALPF pré e pós-oclusão, de acordo com os grupos de pacientes e controles.

	Grupo Controle		Grupo Hemorrágico		Grupo TVP	
	Coefficiente de Correlação	p*	Coefficiente de Correlação	p*	Coefficiente de Correlação	p*
TAFI x TLE pré	-0,02	0,43	0,31	0,01	0,28	0,06
TAFI x TLE pós	-0,07	0,31	0,26	0,04	0,28	0,05
TAFI x ALPF pré	0,03	0,41	-0,08	0,27	-0,09	0,30
TAFI x ALPF pós	0,03	0,41	-0,11	0,22	-0,26	0,07
PLG x TLE pré	-0,13	0,17	0,07	0,31	0,26	0,07
PLG x TLE pós	-0,21	0,06	0,15	0,14	0,33	0,03
PLG x ALPF pré	0,21	0,06	-0,05	0,34	0,12	0,25
PLG x ALPF pós	0,26	0,03	-0,15	0,15	-0,02	0,44
α_2 AP x TLE pré	0,16	0,12	0,17	0,12	0,06	0,37
α_2 -AP x TLE pós	0	0,49	0,26	0,04	-0,08	0,33
α_2 -AP x ALPF pré	0	0,49	-0,24	0,05	0	0,49
α_2 -AP x ALPF pós	0,03	0,39	-0,18	0,10	0,28	0,05
PAI-1 x TLE pré	0,14	0,22	0,21	0,08	0,14	0,21
PAI-1 x TLE pós	0,31	0,04	0,15	0,15	0,08	0,33
PAI-1 x ALPF pré	0,07	0,35	0,01	0,46	0,14	0,21
PAI-1 x ALPF pós	-0,21	0,07	-0,14	0,16	0,18	0,15
FBG x TLE pré	-0,06	0,33	0,08	0,28	0,16	0,18
FBG x TLE pós	-0,02	0,43	0,11	0,22	0,05	0,38
FBG x ALPF pré	0,29	0,01	0,01	0,46	-0,11	0,26
FBG x ALPF pós	0,16	0,12	-0,09	0,27	-0,10	0,29

*Análise estatística pelo teste *Spearman's rank correlation*.

No grupo controle observou-se apenas uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o PLG e a ALPF pós-oclusão ($p=0,03$), o PAI-1 e o TLE pós-oclusão ($p=0,04$), e o FBG e a ALPF pré-oclusão ($p=0,01$).

No grupo hemorrágico houve uma correlação significativamente positiva entre o TAFI e os TLEs pré ($p=0,01$) e pós-oclusão ($p=0,04$), e a α_2 -AP e o TLE pós-oclusão ($p=0,04$). Notou-se uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a α_2 -AP e a ALPF pré-oclusão ($p=0,05$).

No grupo de TVP observou-se uma correlação significativamente positiva entre o TAFI e o TLE pós-oclusão (p=0,05), o PLG e o TLE pós-oclusão (p=0,03) e a α_2 -AP e a ALPF pós-oclusão (p=0,05).

A tabela 7 mostra a análise da correlação entre os TLEs e ALPFs pré e pós-oclusão, assim como entre os TLE e ALPF tanto pré como pós-oclusão.

Tabela 7- Correlação das variáveis TLE e ALPF (pré e pós) em cada grupo.

	Grupo Controle		Grupo Hemorrágico		Grupo Trombótico	
	Coefficiente de Correlação	p*	Coefficiente de Correlação	p*	Coefficiente de Correlação	p*
TLEpré x TLEpós	0,69	<0,001	0,75	<0,001	0,82	<0,001
TLEpré x ALPFpré	-0,52	<0,001	-0,63	<0,001	-0,30	0,04
TLEpós x ALPFpós	-0,80	<0,001	-0,83	<0,001	-0,50	0,001
ALPFpré x ALPFpós	0,58	<0,001	0,67	<0,001	0,34	0,02

*Análise estatística pelo teste *Spearman's rank correlation*.

A análise estatística mostrou uma correlação significativamente positiva do TLE e da ALPF pré e pós oclusão, tanto nos pacientes como nos controles. Também se observou uma significância estatística, com correlação negativa, entre o TLE e a ALPF pré ou pós oclusão, em todos os grupos analisados.

5.2- 2ª análise

5.2.1- Análise de polimorfismos genéticos

Neste estudo foram determinados três polimorfismos no gene do TAFI, -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile, que alguns pesquisadores demonstraram estar relacionados com a atividade plasmática do TAFI. Inicialmente determinaram-se os genótipos em um grupo controle, constituído por 352 indivíduos, com idade mediana de 32 anos (mínima de 16 e máxima de 63 anos), sendo 68 (19,32%) do sexo masculino e 284

(80,68%) do sexo feminino, classificados como 212 descendentes Caucásios (60,23%), 81 miscigenados (23,01%) e 59 Afro-descendentes (16,76%).

A distribuição dos genótipos dos três polimorfismos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O cálculo do tamanho amostral revelou que o número de indivíduos incluídos foi adequado. O n mínimo necessário com poder estatístico de determinar uma diferença entre os grupos analisados, com um erro de 20% foi de 268 indivíduos para o polimorfismo -438A/G, 178 indivíduos para o polimorfismo Ala147Thr, e 223 indivíduos para o polimorfismo Thr325Ile.

Os polimorfismos foram determinados em um grupo de 278 pacientes com TVP, com idade mediana de 35 anos (mínimo de 18 e máximo de 63 anos), sendo 106 (38,13%) do sexo masculino e 172 (61,87%) do sexo feminino, classificados como 164 descendentes Caucásios (58,99%), 64 miscigenados (23,02%), e 50 Afro-descendentes (17,99%).

A tabela 8 apresenta a prevalência dos genótipos de cada polimorfismo, e também a associação da prevalência de indivíduos portadores dos genótipos homocigoto mutante e heterocigoto, nos pacientes e controles. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa da prevalência entre os grupos, e que esses polimorfismos não estavam associados ao risco de trombose.

Tabela 8- Prevalência dos polimorfismos no grupo controle e no grupo TVP.

	Controles (n=352)	TVP (n=278)	p*	OR (IC 95%)
TAFI -438				
GG	190 (53,98%)	143 (51,44%)	0,81	
AG	138 (39,20%)	115 (41,37%)		
AA	24 (6,82%)	20 (7,19%)		
AA+AG	162 (46,02%)	135 (48,56%)	0,57	1,10 (0,79 – 1,53)
Ala147Thr				
Ala/Ala)	156 (44,32%)	131 (47,12%)	0,78	
(Ala/Thr)	145 (41,19%)	109 (39,21%)		
(Thr/Thr)	51 (14,49%)	38 (13,67%)		
Thr/Thr+Ala/Thr	199 (55,68%)	147 (52,88%)	0,51	0,89 (0,64 – 1,24)
Thr325Ile				
(Thr/Thr)	163 (46,31%)	141 (50,72%)	0,27	
(Thr/Ile)	166 (47,16%)	114 (41,01%)		
(Ile/Ile)	23 (6,53%)	23 (8,27%)		
Ile/Ile+Thr/Ile	189 (53,69%)	137 (49,28%)	0,29	0,83 (0,60 – 1,16)

*Análise estatística pelo teste *Fisher's Exact*.

Esses polimorfismos também foram determinados nos três grupos (controles, TVP e hemorrágicos) da 1ª análise, e estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9- Comparação da prevalência dos genótipos entre os grupos controle, hemorrágico e TVP.

	Controles N=50	Hemorragicos N=45	P*	OR (IC 95%)	TVP N=31	p*	OR (IC 95%)
TAFI -438							
GG	28 (56%)	27 (60%)	0,73		18 (58%)	0,80	
AG	20 (40%)	15 (33,30%)			11 (35,50%)		
AA	2 (4%)	3 (6,70%)			2 (6,50%)		
AA+AG	22 (44%)	18 (40%)	0,83	0,85 (0,35 - 2,08)	13 (42%)	1,0	0,92 (0,36 - 2,49)
Ala147Thr							
(Ala/Ala)	27 (54%)	16 (35,60%)	0,18		16 (51,60%)	0,86	
(Ala/Thr)	16 (32%)	22 (48,90%)			9 (29%)		
(Thr/Thr)	7 (14%)	7 (15,50%)			6 (19,40%)		
Thr/Thr+Ala/Thr	23 (46%)	29 (64%)	0,09	2,11 (0,86 - 5,28)	15 (48%)	1,0	1,09 (0,41 - 2,97)
Thr325Ile							
(Thr/Thr)	27 (54%)	25 (55,50%)	0,30		17 (54,80%)	0,30	
(Thr/Ile)	22 (44%)	16 (35,60%)			11 (35,50%)		
(Ile/Ile)	1 (2%)	4 (8,90%)			3 (9,70%)		
Ile/Ile+Thr/Ile	23 (46%)	20 (44%)	1,0	0,94 (0,39 - 2,28)	14 (45%)	1,0	0,96 (0,36 - 2,61)

*Análise estatística pelo teste *Fisher's Exact*.

Como pode ser observado, não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência dos três genótipos do TAFI entre os grupos, assim como entre os grupos hemorrágico e TVP.

Como foi descrito que esses polimorfismos têm correlação com a atividade plasmática do TAFI, avaliou-se essa correlação nesses três grupos, e os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10- Comparação dos polimorfismos TAFI -438G/A, Ala147Thr e Thr325Ile em relação à atividade do TAFI em cada grupo.

	Grupo controle		Grupo hemorrágico		Grupo TVP	
	Mediana (Min – Máx)	p*	Mediana (Min – Máx)	p*	Mediana (Min – Máx)	p*
TAFI -438						
GG	21,69 (20,65-22,73)	0,25	24,13 (21,75-32,99)	0,11	17,00 (16,56-17,44)	0,55
AG	19,06 (11,49-28,85)		23,18 (14,55-31,84)		16,44 (12,12-21,42)	
AA	19,45 (13,43-27,32)		20,31 (12,10-30,40)		14,78 (9,76-21,69)	
Ala147Thr						
(Ala/Ala)	20,95 (13,48-23,31)	0,28	19,35 (12,99-31,17)	0,73	15,32 (11,85-19,72)	0,61
(Ala/Thr)	19,00 (11,49-28,85)		21,60 (12,10-31,84)		17,08 (13,84-19,87)	
(Thr/Thr)	19,39 (19,39-27,32)		21,95 (12,12-32,99)		16,35 (9,76-21,69)	
Thr325Ile						
(Thr/Thr)	20,65 (20,65-20,65)	0,78	25,79 (21,75-32,99)	0,10	17,44 (16,56-18,51)	0,25
(Thr/Ile)	19,58 (11,49-28,85)		19,75 (12,12-31,84)		17,08 (12,12-21,69)	
(Ile/Ile)	19,43 (13,43-27,32)		21,02 (12,10-31,17)		15,01 (9,76-21,45)	

*Análise estatística pelo teste *Kruskal-Wallis rank sum*.

Os resultados não mostraram nenhuma relação entre a atividade do TAFI e os genótipos dos três polimorfismos tanto no grupo controle, como nos pacientes com TVP ou alteração hemorrágica.

Para avaliação da associação da atividade plasmática do TAFI com os polimorfismos neste gene realizou-se uma análise por regressão linear no grupo controle. Os resultados mostraram que a presença do polimorfismo TAFI -438A/G (homozigoto mutante + heterozigoto x homozigoto normal) ($p=0,02$) e Ala147Thr (homozigoto mutante x heterozigoto + homozigoto normal) tem influência sobre a atividade do TAFI.

Nos grupos de pacientes com doença hemorrágica e com TVP não houve nenhuma relação da atividade do TAFI com os polimorfismos neste gene.

O polimorfismo Arg6Trp no gene da α_2 -AP foi determinado nos mesmos grupos que constituíam a 2ª análise, porém em um número reduzido de indivíduos. Assim, foram incluídos 167 indivíduos saudáveis, com idade mediana de 35 anos (mínima de 18 e máxima de 63 anos), sendo 51 (30,54%) do sexo masculino e 116 (69,46%) do sexo feminino. Destes 93 (55,69%) eram descendentes Caucasóides, 44 (26,35%) miscigenados, e 30 (17,96%) Afro-descendentes. O grupo de TVP foi composto por 161 pacientes, com idade mediana de 36 anos (mínima de 13 e máxima de 63 anos) sendo 43 (26,71%) do sexo masculino e 118 (73,29%) do sexo feminino, e classificados como 92 (57,14%) descendentes Caucasóides, 38 (23,60%) miscigenados, e 31 (19,26%) Afro-descendentes.

A distribuição dos genótipos desse polimorfismo estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O tamanho da amostra foi adequado estatisticamente, sendo necessário um n mínimo, com um erro de 30%, de 131 indivíduos.

Na tabela 11, apresenta-se a prevalência dos genótipos do polimorfismo Arg6Trp, e também da associação da prevalência dos genótipos homocigoto mutante e heterocigoto, nos pacientes e controles.

Tabela 11- Comparação da prevalência dos genótipos entre os grupos controle, hemorrágico e TVP.

	Controles (n=167)	TVP (n=161)	<i>p</i> *	OR (IC 95%)
Arg/Arg	95 (56,89%)	104 (64,60%)	0,29	
Arg/Trp	62 (37,13%)	47 (29,19%)		
Trp/Trp	10 (5,98%)	10 (6,21%)		
Trp/Trp+ Arg/Trp	72 (43,11%)	57 (35,40%)	0,17	0,72 (0,45 – 1,15)

*Análise estatística pelo teste *Fisher's Exact*.

Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência dos genótipos no polimorfismo Arg6Trp entre os grupos, e o mesmo não apresenta associação com o risco de trombose.

5.2.2- Determinação de variáveis preditoras de doença hemorrágica ou TVP

Para avaliação das variáveis que pudessem definir o grupo hemorrágico ou trombótico foi realizado uma análise de regressão logística multivariada, incluindo-se as seguintes variáveis: sexo, idade, etnia, TLE e ALPF pré e pós-oclusão, as dosagens de plasminogênio, α_2 -AP, TAFI, PAI-1, e os genótipos dos polimorfismos do TAFI.

No modelo de avaliação para doença hemorrágica foram definidas com variáveis preditoras o sexo do gênero masculino, o TLE pós-oclusão, o polimorfismo Thr325Ile (homozigoto mutante x heterozigoto + homozigoto normal) e o PAI-1. Dentre estes, o sexo masculino e o aumento do TLE pós-oclusão podem ser considerados fatores de proteção, e o polimorfismo Thr325Ile em homozigose e os níveis elevados de PAI-1 como fatores de risco para a doença hemorrágica.

Para o modelo de avaliação da TVP as variáveis sexo do gênero masculino, TAFI, plasminogênio, TLE pré-oclusão e, α_2 -AP foram estabelecidas como preditoras. As variáveis relacionadas à proteção para a TVP foram o sexo masculino, a α_2 -AP e o TAFI. O aumento do plasminogênio e o TLE pré-oclusão indicam um fator de risco para o evento trombótico.

Para avaliação da influência da atividade da α_2 -AP, do plasminogênio, do TAFI, do PAI-1 e do FXIII, sobre o TLE e a ALPF empregou-se um modelo de regressão linear, incluindo-se idade e grupo étnico.

Esse modelo de regressão demonstrou, no grupo controle, que o aumento da concentração do PAI-1 ($p=0,02$) tem influência sobre o TLE pós-oclusão, e o aumento do plasminogênio sobre a ALPF pós-oclusão ($p=0,01$). Os resultados mostraram também que o aumento da atividade do TAFI está relacionado com uma diminuição do PAI-1 ($p=0,04$) e da α_2 -AP ($p= 0,01$).

O resultado da regressão linear no grupo hemorrágico revelou que a diminuição da atividade da α_2 -AP tem relação com o aumento da ALPF pós-oclusão ($p=0,02$).

No grupo trombótico, observou-se que o aumento do TAFI está relacionado a um aumento do plasminogênio ($p<0,001$).

6- DISCUSSÃO

Em conseqüência da falha no equilíbrio entre o sistema fibrinolítico e o sistema de coagulação, observa-se funções anti-coagulantes e pró-coagulantes desreguladas. Este desequilíbrio leva a uma expressão aumentada ou diminuída da atividade coagulante, podendo desencadear um processo hemorrágico ou trombótico respectivamente (Mann, 1999).

Para compreensão e análise da atuação do sistema fibrinolítico foram analisados grupos distintos de pacientes, a fim de abranger tanto um estado conhecido como hiperfibrinólise que pode culminar num quadro clínico de hemorragia, quanto o estado de hipofibrinólise que pode levar a um quadro clínico de trombose venosa espontânea.

Em uma parcela de pacientes com doenças hemorrágica ou trombótica espontânea a investigação laboratorial de rotina não revela nenhum fator etiológico responsável pela alteração. Assim, somente com um estudo específico para a fibrinólise estes casos podem ser investigados mais detalhadamente.

Vários estudos mostram a avaliação dos diversos fatores e inibidores deste sistema, porém na maioria dos casos, são relatados de forma isolados e independentes (Agreen *et al*, 2007), e ainda, correlacionando-os com outras doenças de base (Gerner *et al*, 2001; Adam *et al*, 2004).

Há também, uma grande relação de estudos que analisam os componentes do sistema fibrinolítico relacionando-os com casos de trombose venosa. A hipofibrinólise, definida como ausência ou deficiência da atividade fibrinolítica, tem sido demonstrada em pacientes que sofreram TVP por mais de 30 anos (Bauer, 2001; Vaughan, 2005; Schuster *et al*, 2007).

Por outro lado, a relação da fibrinólise com pacientes hemorrágicos sem um diagnóstico estabelecido, normalmente, é uma análise pouco investigada. A maioria dos diagnósticos estabelecido nestes pacientes envolve desordens da hemostasia primária, seguida por deficiências dos fatores da coagulação, enquanto que defeitos no sistema fibrinolítico raramente são identificados (Chin & Koong, 1990; Kadir *et al*, 1998; Dilley *et al*, 2001).

6.1- Características clínicas

A análise deste estudo requer que se ressalte a seleção dos pacientes incluídos. Para que se obtivesse uma casuística suficiente que permitisse uma análise comparativa entre os grupos, foram revisados os atendimentos no Ambulatório de Hemostasia do Hemocentro pelo período dos últimos 10 anos, pois os critérios de seleção eram muito excludentes. Por outro lado, um grupo tão selecionado pode favorecer o diagnóstico de alterações mais raras. Todos os pacientes, de ambos os grupos, já haviam sido amplamente investigados e nenhum diagnóstico etiológico para a patologia em questão foi estabelecido.

Observamos que tanto o grupo de pacientes com alterações hemorrágicas como o de TVP apresentavam um predomínio de indivíduos do sexo feminino, apesar dessa diferença ser significativa apenas no primeiro grupo. Isto pode ser explicado, nos casos de hemorragia, pelo fato das mulheres estarem expostas a fatores de risco exclusivos, como a menstruação e o parto.

Já no grupo trombótico, é interessante ressaltar, que mesmo tendo sido excluídos os fatores de risco relacionados ao sexo feminino, como anticoncepcionais hormonais, terapia de reposição hormonal, gestação e puerpério, houve um predomínio de mulheres, talvez indicando que outros fatores ainda não definidos possam favorecer o desenvolvimento de trombose venosa nesse grupo.

Apesar da idade ser uma fator de risco bem estabelecido para TVP, apenas 19% dos pacientes incluídos neste estudo apresentaram idade superior a 50 anos. Mais intrigante ainda é o fato de apenas terem sido incluídos pacientes com TVP espontânea. Esses dados sugerem que algum fator hereditário ou ambiental, como poluição, infecções assintomáticas, ainda não definidos, possam estar presentes como fatores desencadeantes do episódio trombótico. Favorece a hipótese da presença de fatores de risco genético, a presença de antecedente familiar de doença vascular oclusiva em 61% dos pacientes.

Quanto à recorrência da TVP, observamos que a maior parte dos pacientes apresentou episódio único de trombose. Isto talvez esteja relacionado ao fato dos pacientes fazerem tratamento regular no Hemocentro após o episódio trombótico, com orientações adequadas quanto à profilaxia de novos episódios, incluindo o uso regular de meia elástica.

Em relação à etnia, observamos a mesma proporção de descendentes-Caucasóides, miscigenados e Afro-descendentes nos grupos TVP e controle. No grupo hemorrágico, obteve-se um número maior de pacientes Afro-descendentes, mas sem uma diferença significativa. Estudos que avaliaram a relação entre doença hemorrágica e etnia não identificaram diferenças significativas entre Caucasóides e Afro-descendentes (Harlow *et al*, 1997; Werner *et al*, 1993; Romano & Hope, 1990).

A classificação dos pacientes com doença hemorrágica pelo Questionário sobre Doenças Hemorrágicas proposto pelo Working Group, revelou que a maior parte deles apresentava sangramentos considerados leves. Isto poderia suscitar a hipótese de que na verdade os mesmos não apresentavam doença hemorrágica, e sim, fossem pacientes que supervalorizavam sua história clínica, ou que fossem erroneamente entrevistados pelos médicos que os assistiram. Contudo, esse questionário foi proposto justamente para evitar interpretação subjetiva das respostas, por ser simples e reprodutível.

Ficou evidente neste estudo que com o emprego apenas do primeiro questionário, os pacientes teriam sido classificados como apresentando doença hemorrágica de maior gravidade. Isto ressalta a importância de se tentar padronizar a análise clínico-laboratorial dos pacientes com doenças hemorrágicas, quer nacional ou internacionalmente, para que dados obtidos nos diversos Centros possam realmente ser comparáveis.

Também não podemos afastar a hipótese de que os pacientes com doença mais grave, como sangramento do coto umbilical, hemorragias graves após procedimentos ou em sistema nervoso central tenham evoluído para o óbito, sem que tenham sido investigados por nenhum serviço médico quanto à etiologia.

6.2- Dosagens plasmáticas

Ao analisarmos as dosagens obtidas no nosso grupo controle em relação àquelas estabelecidas pelos *kits*, nota-se uma diferença bem pronunciada. Este fato pode ser decorrente do grupo controle ser composto por 50 indivíduos, mas não afasta variáveis

analíticas inerentes ao laboratório, além de diferenças populacionais. Portanto, ressalta que é fundamental que cada laboratório estabeleça o seu valor de referência local.

Também, os fabricantes dos *kits* utilizados, não informam o número de amostras avaliadas para definição do valor normal por eles sugeridos, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos.

Os programas de controle de qualidade em laboratórios internacionais com critérios, apesar de difíceis, consideram que para estabelecimento de uma variação normal de qualquer parâmetro deva-se incluir a determinação de 120 dosagens de indivíduos diferentes.

No início deste estudo, foi estabelecida a inclusão de 50 amostras. Ao se analisar os resultados dos componentes da fibrinólise nos grupos de pacientes foram verificados que alguns deles estavam com níveis acima ou abaixo dos limites de normalidade, mas muito próximos da variação normal. Isso mostra que se tivesse sido incluído um maior número de controles, talvez esses valores fossem considerados normais.

6.2.1- Grupo hemorrágico

Componentes fibrinolíticos

Os resultados obtidos com a análise de alguns componentes da fibrinólise no grupo hemorrágico revelou que apenas o TAFI estava significativamente aumentado, tanto em relação ao grupo controle como ao grupo TVP. O TAFI medido neste estudo representa o TAFIa, gerado pela ativação do TAFI por ação do complexo trombina/trombomodulina ou pela plasmina. Um estudo publicado recentemente mostrou que pacientes com hemofilia A ou doença de von Willebrand apresentavam aumento do TAFIa, sugerindo um aumento da conversão do pró-TAFI em sua forma ativada nessas doenças hemorrágicas. Como a geração de trombina está diminuída nessas doenças, a hipótese é que a plasmina seria a responsável por essa ativação, e que representaria um mecanismo de *feedback* para equilibrar a menor ativação do TAFI pela trombina. Portanto, nossos resultados poderiam

corroborar essa hipótese. Contudo, em nenhum desses pacientes foi firmado o diagnóstico de uma doença hemorrágica que sabidamente estivesse associada a menor geração de trombina. Nesse caso, teria sido interessante a análise de parâmetros que confirmassem essa hipótese, como o fragmento 1+2 da protrombina, teste de geração de trombina (Antovic *et al*, 2004).

O achado de uma correlação positiva entre o TAFI e o TLE pré e pós-occlusão sugere que o aumento do primeiro acarretaria uma hipofibrinólise, favorecendo a hipótese discutida anteriormente.

Contudo, mesmo com esses achados, a avaliação global da atividade fibrinolítica nos pacientes com doença hemorrágica, avaliada pelo TLE e ALPF mostraram uma hiperfibrinólise. Portanto, mesmo com análise de apenas algum dos componentes sugerindo hipofibrinólise, o resultado final nestes pacientes favorece um estado de aumento da fibrinólise.

Apesar de não haver diferença significativa, mesmo na comparação utilizando o P90, 7 (15,5%) pacientes com doença hemorrágica apresentaram aumento do plasminogênio plasmático. Talvez esse aumento favoreça um substrato para geração de grande quantidade de plasmina, e conseqüentemente do aumento da fibrinólise. Contudo, não houve correlação entre o plasminogênio e o TLE e a ALPF. Existe a possibilidade que o mecanismo de maior geração de TAFIa pela plasmina, possa explicar em parte essa falta de correlação.

Deficiências

Quando avaliamos os resultados dos parâmetros fibrinolíticos, buscando o diagnóstico de deficiências que justificassem o quadro hemorrágico, apenas encontramos um paciente com deficiência de PAI-1, levando a uma prevalência de 2,2%. Até hoje não está definida na literatura a prevalência da deficiência de PAI-1 na população geral. Contudo, levando-se em consideração que este estudo incluiu uma população muito selecionada do Hemocentro da Unicamp, que é responsável pelo atendimento da macro-

região de Campinas, com uma população estimada de 1,5 milhão de pessoas, essa deficiência seria considerada muito rara.

Um recente estudo que avaliou o PAI-1 em indivíduos normais, mas que na história clínica apresentavam tendência a sangramento, identificou uma prevalência elevada de PAI-1 diminuído. Contudo, nossos resultados não confirmaram esses achados. Mesmo a análise do P10 não foi diferente entre o grupo controle e hemorrágico. Assim, o papel do PAI-1 em pacientes com doença hemorrágica continua desconhecido (Fay *et al*, 1997; Santamaría *et al*, 2007).

Um outro achado que consideramos interessante, foi que apesar de nossa amostra populacional ser altamente selecionada, não encontramos nenhum paciente com deficiência de α_2 -AP. Apesar de ser uma deficiência muito rara, nossa hipótese inicial é de que teríamos pelo menos 1 caso de deficiência desse inibidor (Hayward *et al*, 2005).

Nossos resultados mostraram que apesar de não haver diferença na mediana da α_2 -AP entre os pacientes hemorrágicos e os controles, houve uma correlação positiva com o TLE pós-oclusão e negativa com a ALPF pré-oclusão, sugerindo que no mecanismo global da fibrinólise desses pacientes a α_2 -AP tem um papel relevante.

A análise do FXIII foi incluída neste trabalho, que avaliou principalmente os componentes da fibrinólise, porque a população estudada foi muito selecionada, e a deficiência desse fator é muito rara. O achado de uma diminuição não significativa do FXIII nos pacientes hemorrágicos poderia contribuir para a tendência hemorrágica, mas somente com o aumento da casuística seria possível confirmar esta hipótese.

Um dos pacientes analisados foi diagnosticado como deficiente leve de FXIII, com atividade plasmática de 50,2%, compatível com o quadro clínico caracterizado por pequena relevância clínica.

Até o momento existem 200 casos desta patologia descritos na literatura (Onland *et al*, 2005; Gregory & Cooper, 2006), e acredita-se que esta incidência possa estar subestimada, pois o método da uréia, empregado pela maioria dos laboratórios, apenas detecta casos graves da deficiência. Contudo, nossos resultados não favorecem essa

hipótese, uma vez que utilizamos um método funcional que permite o diagnóstico de deficiências de todos os graus, e mesmo assim não encontramos uma prevalência elevada. Nossos resultados mostraram que a prevalência na nossa macro-região é de 1 para 1,5 milhão de habitantes e que essa deficiência realmente é de ocorrência muito rara.

6.2.2- Grupo TVP

Componentes fibrinolíticos

Neste estudo investigamos um grupo de pacientes com TVP nos quais se excluiu todos os fatores genéticos e adquiridos associados a um risco de trombose. Portanto trata-se de uma população em que novos fatores de risco ou fatores muito raros podem ser encontrados.

Alguns estudos anteriores mostraram que o TAFI pode estar relacionado com quadro de TVP. Contudo nesses estudos o método empregado para dosagem do TAFI foi o ELISA, com quantificação da enzima precursora (Leurs e Hendriks, 2005; Martini *et al*, 2006). Em nosso estudo verificamos uma diminuição do TAFI, mas a metodologia por nós empregada avalia o TAFIa, o que pode explicar a diferença em relação a esses estudos.

Como os pacientes com TVP apresentam hipofibrinólise, a diminuição de plasmina pode contribuir para menor geração de TAFIa. Por outro lado, geralmente esses pacientes tem maior geração de trombina, o que teria um efeito inverso sobre o a geração de TAFIa. O achado deste estudo, de diminuição do TAFIa estimula investigações nesse sentido, para que um melhor entendimento desses mecanismos seja elucidado, inclusive sugerindo que a geração de TAFIa pela plasmina pode ter uma importância nos casos patológicos.

O achado de diminuição da α_2 -AP nesses pacientes não parece contribuir para a atividade global da fibrinólise. Inclusive verificou-se uma correlação positiva entre a α_2 -AP e a ALPF pós-oclusão, que fisiologicamente é de difícil explicação.

Estudos epidemiológicos têm identificado uma associação entre níveis elevados do PAI-1 e a trombose vascular. Neste estudo 32,25% dos pacientes com TVP apresentavam aumento do PAI-1 quando comparado ao grupo controle. Em vista deste inibidor agir especificamente no bloqueio do t-PA, e, portanto inibir a ação da fibrinólise, esses dados estão de acordo com o esperado e corroboram os achados da literatura (Lijnen *et al*, 1994; Juhan-Vague *et al*, 1996; Vaughan, 2005) .

Deficiências

Não existe um consenso entre a deficiência do plasminogênio e a sua relação com a TVP. Há vários relatos que indicam que esta deficiência não está correlacionada com risco para a trombose, mostrando que não há diferença na incidência da deficiência de plasminogênio entre pacientes com TVP e controles (Demarmels *et al*, 1998; Brandt, 2002). Os nossos achados favorecem essa hipótese, uma vez que mesmo analisando uma população com muitos critérios de exclusão, nenhum dos pacientes com TVP apresentou deficiência desse fator.

A estrutura do coágulo de fibrina é altamente dependente da atividade do FXIII, e na sua ausência os mesmos são instáveis e susceptíveis à fibrinólise. Neste estudo verificou-se um aumento da atividade do FXIII nos pacientes com TVP, e isto pode contribuir para o risco de trombose.

6.3- Avaliação global do sistema fibrinolítico

A avaliação da fibrinólise pelos métodos de TLE e ALPF é descrita em alguns estudos, porém como não há uma padronização na metodologia, há dificuldades na comparação entre os diversos resultados (Smith *et al*, 2004).

O TLE depende da concentração do fibrinogênio, do ativador do plasminogênio e do plasminogênio presentes na amostra de plasma do indivíduo. Com a ação dos inibidores do sistema fibrinolítico a lise do coágulo seria extremamente demorada, e dessa forma, nesta técnica precipita-se a porção euglobulínica do plasma, retirando-se a maioria dos inibidores que permanecem no sobrenadante.

Na preparação da placa de fibrina, o fibrinogênio e o plasminogênio já estão presentes e, portanto, a ALPF expressa a atividade do ativador do plasminogênio.

A padronização da coleta das amostras para realização desses exames também tem influência sobre a análise da fibrinólise, resultando em um aumento ou diminuição de pelo menos 10% do TLE (Mosnier *et al*, 1998). A fim de evitar qualquer influência sobre os resultados, uma vez que a atividade fibrinolítica obedece a uma flutuação circadiana, todas as amostras foram coletadas no período entre 8 e 11 horas da manhã e após um período de repouso de 30 minutos.

Já é bem definido que a ativação da fibrinólise após a oclusão venosa é um fenômeno local, sem repercussão sistêmica, de forma que não se observa alteração da fibrinólise quando o sangue é colhido do braço que não sofreu oclusão. A atividade fibrinolítica aumenta com o tempo de oclusão, sendo observada a partir de 5 minutos até o máximo de 20 minutos, não tendo alteração significativa após este período.

A proposta inicial contava com 20 minutos de oclusão, porém muitos pacientes sentiam mal-estar e desconforto local durante o processo. Como foi relatado em estudos anteriores que o tempo de 5 minutos não é ideal para esta análise, foi padronizado para este estudo o tempo de 10 minutos de oclusão.

De todos os exames realizados neste estudo, os que avaliam a atividade global do sistema fibrinolítico (TLE e ALPF) foram os que mais refletiram o quadro clínico dos pacientes, decorrente da interação *in vivo* dos componentes da fibrinólise.

Os pacientes com doença hemorrágica apresentaram redução do TLE tanto nas amostras obtidas na pré como na pós-occlusão, em relação ao grupo controle, e os pacientes com TVP apresentaram aumento desses tempos. Estas diferenças mostram-se mais pronunciadas ainda quando comparamos o grupo hemorrágico com o grupo trombótico, devidamente explicado pelo fato de se tratar de quadros clínicos opostos.

A razão entre o TLE pré e pós-occlusão avalia o potencial da resposta ao estímulo de oclusão, sendo significativa apenas no grupo hemorrágico quando comparado ao controle, ou entre os grupos de pacientes. Isto sugere que os pacientes com TVP podem apresentar uma alteração funcional do endotélio, na liberação do t-PA e/ou PAI-1.

Nascimento (2006) refere que pelo TLE ser um teste de alta sensibilidade, é um forte preditor negativo, ou seja, o resultado positivo não exclui outros diagnósticos, mas se normal (negativo), exclui o diagnóstico de alterações da fibrinólise.

Os valores da ALPF no grupo hemorrágico, apesar de não mostrarem diferenças estatisticamente significativas, foi maior neste grupo em relação ao grupo controle. No grupo TVP observamos o contrário: a ALPF encontra-se significativamente diminuída principalmente nas amostras pós-oclusão. Como este teste tem um valor padronizado de fibrinogênio e plasminogênio, e os pacientes com TVP freqüentemente apresentam aumento do fibrinogênio plasmático, talvez isto explique resultados significativos apenas nesses pacientes.

Como a razão ALPF não foi diferente entre os grupos analisados, isto sugere um importante papel do endotélio nessa análise.

Portanto, através dos dados obtidos, pode-se inferir que o TLE consiste em uma técnica mais sensível que a ALPF para a análise da fibrinólise *in vivo*.

A análise das correlações entre as variáveis que pudessem influenciar o TLE e a ALPF resultou em dados discrepantes do esperado, com exceção do TAFI e da α_2 -AP. O TAFI quando aumentado teve uma relação positiva tanto sobre o TLE pré como pós-oclusão no grupo de pacientes hemorrágicos, corroborando os achados da literatura (Mosnier *et al*, 1998; Schatteman *et al*, 1999). A α_2 -AP também apresentou uma correlação positiva com o TLE pós-oclusão, indicando que o aumento deste inibidor favoreceu uma hipofibrinólise.

As correlações dos TLEs e ALPFs pré e pós-oclusão (tabela 7), assim como entre os TLE e ALPF pré e pós-oclusão, mostraram-se de acordo com o esperado em todos os grupos. A análise da correlação do TLE/ALPF pré e pós-oclusão mostrou que quanto maior a atividade fibrinolítica pré-oclusão, maior a resposta pós-oclusão, sugerindo que a resposta pós-oclusão tem relação com a situação basal.

6.4- Polimorfismos e risco para TVP

6.4.1- Polimorfismos no gene do TAFI

Durante os últimos anos, um grande número de estudos tem investigado o papel do TAFI como um possível fator de risco para a doença trombotica. Todavia, esta hipótese ainda não está totalmente esclarecida. Altos níveis de TAFI têm sido relatados como fator de risco para TVP e sua recorrência, e acidente vascular cerebral isquêmico; contudo, outros estudos não confirmaram esses achados, ou ainda mostraram um efeito protetor (Franco *et al*, 2001; Willemse *et al*, 2007).

Até o momento, 16 polimorfismos foram identificados no gene do TAFI, e alguns destes têm sido associados com concentrações de TAFI no plasma (Brouwers *et al*, 2003; Leebeek *et al*, 2004).

Neste estudo analisamos 3 polimorfismos no gene do TAFI: um na região promotora, o -438A/G, e dois na região codificadora, o Ala147Thr e o Thr325Ile.

O polimorfismo -438A/G foi selecionado por estar na região promotora, podendo afetar a transcrição e regulação da expressão do gene. Além disso, este polimorfismo já foi analisado em uma população brasileira e associado ao aumento do risco para desenvolvimento de TVP (Franco *et al*, 2001; Zidane *et al*, 2003).

O polimorfismo Ala147Thr foi correlacionado com a concentração de TAFI e com um risco aumentado de trombose arterial (de Bruijne *et al*, 2007).

O polimorfismo Thr325Ile foi escolhido por ter sido descrito que pode ter influência positiva tanto na atividade do TAFI como em sua estabilidade *in vitro*, resultando em uma atividade antifibrinolítica aumentada (Brouwers *et al*, 2001; Scheneider *et al*, 2002; Ceresa *et al*, 2006).

Inicialmente avaliamos a prevalência destes polimorfismos em um grupo controle, com número suficiente, de acordo com o cálculo do tamanho amostral. A prevalência foi semelhante ao descrito em outras populações de origem étnica semelhante,

incluindo o estudo realizado na população brasileira (Franco *et al*, 2001; Brouwers *et al*, 2001; Henry *et al*, 2001; Falk *et al*, 2003).

Contudo, não observamos nenhuma correlação entre os polimorfismos e a atividade do TAFIa, assim como com o risco de TVP. Talvez esses achados possam ser explicados pelos métodos empregados na análise do TAFI, uma vez que a maior parte dos estudos empregou métodos quantitativos e não qualitativos. Assim, essa análise pode ser altamente influenciada pela escolha do método de análise (Guimarães *et al*, 2004; Morange *et al*, 2005).

Dependendo do método utilizado para análise do TAFI (ELISA ou cromogênico) resultados discrepantes podem ser observados. Isto pode ser explicado em parte, porque o anticorpo utilizado nas técnicas de ELISA, além de reconhecerem o antígeno TAFI, também reconhecem fragmentos do mesmo (Frère *et al*, 2005; Morange *et al*, 2005).

A associação entre os polimorfismos e os níveis plasmáticos de TAFI pode refletir a sensibilidade da análise para as isoformas, ao invés de refletir a diferença nos níveis de expressão (Gils *et al*, 2003). Entretanto, permanece desconhecida a proporção da presença dos polimorfismos no gene do TAFI que contribui para variações inter-individuais na concentração plasmática (Leurs e Hendriks, 2005).

Dessa forma, a técnica cromogênica é mais apropriada para análise do TAFI, motivo pelo qual foi utilizada neste estudo. Guimarães e colaboradores (2004) relataram que a análise cromogênica baseia-se na completa ativação do TAFI e numa similar atividade de todas as isoformas do TAFI contra o substrato sintético, evitando erros na interpretação dos resultados.

A maioria dos estudos utilizaram o método por ELISA para avaliar os níveis antigênicos de TAFI no plasma, impossibilitando a comparação com os nossos resultados. Assim, nossos resultados sugerem que não há contribuição destes polimorfismos no gene do TAFI para as variações na atividade do TAFI no plasma. Também é importante pontuar que os métodos que avaliam a atividade do TAFI no plasma têm melhor correlação com o estado *in vivo*, sendo mais interessantes para essa análise.

6.4.2- Gene da α_2 -AP

Em relação ao polimorfismo Arg6Trp estudado no gene da α_2 -AP, verificou-se que sua prevalência na população analisada foi similar ao descrito por Christiansen e colaboradores (2007). Contudo, também não verificamos nenhuma associação deste polimorfismo com o risco para TVP.

6.5- Análises multivariadas

Desde 1991 os estudos prospectivos não esclarecem se os fatores fibrinolíticos podem prever um risco para TVP espontânea. Crowther e colaboradores (2001) não encontraram nenhuma relação entre TVP e níveis de PAI-1 e TLE. Folsom e colaboradores (2003) sugerem que a variabilidade dos fatores fibrinolíticos não são determinantes para a ocorrência de TVP espontânea na população em geral. Entretanto, Schulman e Wiman (1996) reportaram uma associação positiva entre os níveis de PAI-1 e TVP espontânea. Nenhum estudo prospectivo relacionou TVP com níveis de α_2 -AP.

Nossos resultados na análise multivariada revelaram que o sexo do gênero masculino, a α_2 -AP e o TAFI são fatores protetores, e o plasminogênio e o TLE pré-oclusão são fatores de risco para TVP. Esses resultados são muito contrários ao esperado e podem ser decorrentes do pequeno número de indivíduos incluídos.

No modelo de avaliação das variáveis fibrinolíticas que pudessem ser consideradas como preditoras de doença hemorrágica, o sexo masculino e o aumento do TLE pós-oclusão foram considerados como protetores, e o polimorfismo TAFI Thr325Ile em homozigose e os níveis de PAI-1 como fatores de risco. Mais uma vez esses resultados foram inesperados, o que dificulta uma hipótese para explicá-los.

A avaliação da influência das variáveis fibrinolíticas sobre o TLE e a ALPF no grupo controle, revelou que o aumento da concentração do PAI-1 tem influência sobre o TLE pós-oclusão, e que o aumento do plasminogênio sobre a ALPF pós-oclusão. Esses resultados favorecem o mecanismo fisiológico da fibrinólise.

No grupo hemorrágico essa análise revelou que a diminuição da atividade da α_2 -AP tem relação com o aumento da ALPF pós-oclusão, conforme o esperado.

No grupo trombótico, observou-se que o aumento do TAFI está relacionado a um aumento do plasminogênio, e favorece o que foi discutido anteriormente sobre a ativação do TAFI pela plasmina.

7- CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, concluímos que:

- As alterações dos componentes da fibrinólise não estão associados a doença hemorrágica ou trombótica nesta população brasileira selecionada;
- A deficiência de FXIII e de α_2 -AP nos pacientes com doença hemorrágica confirmaram-se como doenças raras, com apenas o diagnóstico de 1 paciente com deficiência leve de FXIII;
- Os métodos laboratoriais de análise global da atividade fibrinolítica refletiram a interação *in vivo* dos componentes da fibrinólise e parecem ser os mais adequados para diferenciação dos pacientes com doença hemorrágica ou trombótica neste estudo;
- Apesar da hipótese de que alterações de alguns componentes da fibrinólise e do FXIII fossem definidos como fatores etiológicos em pacientes com critérios de seleção muito excludentes, nossos resultados mostraram que somente devem ser investigados como último recurso para elucidação diagnóstica.
- Os 3 polimorfismos estudados no gene do TAFI não tem correlação com a atividade do TAFIa e não são fatores de risco para TVP nessa população;
- O polimorfismo estudado no gene da α_2 -AP não estabelece fator de risco para TVP nessa população.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, D.J.; HAGGART, P.C.; LUDLAM, C.A.; BRADBURY, A.W. Coagulopathy and hiperfibrinolysis in ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Annals of Vascular Surgery Inc*, 18:572-577, 2004.

AGREN, A.; WIMAN, B.; STILLER, V.; LINDMARKER, P.; STEN-LINDER, M.; CARLSSON, A.; HOLMSTRÖM, M.; ODEBERG, J.; SCHULMAN, S. Evaluation of low PAI-1 activity as a risk factor for hemorrhagic diathesis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 4:201-208, 2005.

AGREN, A.; WIMAN, B.; SCHULMAN, S. Laboratory evidence of hyperfibrinolysis in association with low plasminogen activator inhibitor tye 1 activity. **Blood Coagulation Fibrinolysis**, 18(7):657-660, 2007.

ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Avaliação laboratorial e molecular de pacientes brasileiros portadores de trombose venosa. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas. Campinas – SP, 2003.

AOKI, N.; SAITO, H.; KAMIYA, T.; KOIE, K.; SAKATA, Y.; KOBAKURA, M. - Congenital deficiency of alpha 2-plasmin inhibitor associated with severe hemorrhagic tendency. **Journal of Clinical Investigation**, 63:877-884, 1979.

AOKI, N.; SAKATA, Y.; ICHINOSE, A. Fibrin associated plaminogen activation in alpha 2-plasmin inhibitor deficiency. **Blood**, 63:1118-1122, 1983.

AOKI, N. Discovery of α_2 -plasmin inhibitor and its congenital deficiency. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3:623-631, 2004.

ARRUDA, V.R.; ANNICCHINO-BIZZACCHI, J.M.; GONÇALVES, M.S.; COSTA, F.F. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. **Thrombosis and Haemostasis**, 78:1430-1433, 1997.

ASTRUP, T. Fibrinolysis in the organism. **Blood**, 11:781, 1956a.

ASTRUP, T. The biological significance of fibrinolysis. **Lancet**, IX:565, 1956b.

ANTOVIC, J.P. ; SCHULMAN, S. ; AN, S.S. ; GREENFIELD, R.S. ; BLOMBÄCK, M. Does an enzyme other than thrombin contribute to unexpected changes in the levels of the different forms of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in patients with hemophilia A, hemophilia B and von Willebrand? **Scand Journal Clinical Laboratorial of Investiation**, 64(8):745-751, 2004.

ANWAR, M.; IQBAL, M.; AYYUB, M.; ALI, W. Prevalence of factor XIII deficiency in patients presenting with a bleeding disorder in Pakistan. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1:2693-2694, 2003.

BOFFA, M.B.; REID, T.S.; JOO, E.; NESHEIM, M.E.; KOSCHINSKY, M.L. Characterization of the gene encoding human TAFI (Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor; plasma procarboxypeptidase B). **Biochemistry**, 38 :6547-6558, 1999.

BAUER, K.A. Conventional fibrinolytic assays for the evaluation of patients with venous thrombosis: don't bother. **Thromb Haemost**, 85:377-378, 2001.

BLOOM, A.L. Haemostasis and thrombosis. 3rded. New York: Churchill Livingstone, 1994.

BOLTON-MAGGS, P.H.B.; PERRY, D.J.; CHALMERS, E.A.; PARAPIA, L.A.; WILDE, J.T.; WILLIAMS, M.D.; COLLINS, P.W.; KITCHEN, S.; DOLAN, G.; MUMFORD, A.D. The rare coagulation disorders – review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation. **Haemophilia**, 10:593-628, 2004.

BOON, G.D. An overview of hemostasis. **Toxicol Pathol**, 21(2):170-179, 1993.

BRANDT, J.T.; Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. **Arch Pathology Laboratory Medical**, 126: 1376-1381, 2002.

BROUWERS, J.G., VOS, H.L., LEEBEEK, F.W.G., BULK, S., SCHNEIDER, S. BOFFA, M., KOSCHINSKY, M., VAN TILBURG, N.H., NESHEIM, M.E., BERTINA, R.M., GARCIA, E.B.G. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. **Blood**, 98(6):1992-1993, 2001.

BROUWERS, G.J. LEEBEEK, F.W.G. TANCK, M.W.T. JUKEMA, W. KLUFT, C. MAAT, M.P.M. Association between thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, 90:92-100, 2003.

BURROWS, R.F. ; RAY, J.G. ; BURROWS, E.A. Bleeding risk and reproductive capacity among patients with factor XIII deficiency : a case representation and review of the literature. **Obstetrical & Gynecological Survey**, 55:103-108, 2000.

CERESA, E.; de BORNE, K.V.; PEETERS, M.; LIJNEN, H.R.; DECLERCK, P.J.; GILS, A. Generation of a stable TAFIa (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor) variant. **Journal of Biological Chemistry**, 281(23):15878-15883, 2006.

CESARMAN-MAUS, G.; HAJJAR, A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British Journal of Haematology**, 129:307-321, 2005.

CHIN, N.S.; KOONG, P.L. A study of 31 patients with easy bruising from University Hospital, Kuaka Lumpur. **Medical Journal of Malaysia**, 45:325-328, 1990.

CLAUSS, A. Gerinungs physiologische schnell Methods zur bestimmung des fibrinogens. *Acta haematology*, 17:237, 1957.

COELHO, O.R.; UETI, A.A.; UETI, O.M. Hemostasia e do arterial coronária. **Revista da Sociedade Cardiológica do Estado de São Paulo**, 10(6):700-711, 2000.

COLVIN B.T. Physiology of haemostasis. **Vox Sanguinis**, 87(1):43-46, 2004.

CHRISTIANSEN, V.J., JACKSON, K.W., LEE, K.N., MCKEE, P.A. The effect of a single nucleotide polymorphism on human α_2 -antiplasmin activity. **Blood**, prepublished online February 22, 2007.

CROWTHER, M.A.; ROBERTS, J.; ROBERTS, R.; JOHNSTON, M.; STEVENS, P.; SKINGLEY, P.; PATRASSI, G.M.; SARTORI, M.T.; HIRSH, J.; PRANDONI, P.; WEITS, J.I.; GENT, M.; GINSBERG, J.S. Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. **Thrombosis Haemostasis** 85:390-394, 2001.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. **Journal of Internal Medicine**, 257:209-223, 2005.

DE BRUIJNE, E.L.E.; MURAD, S.D.; DE MAAT, P.M.; TANCK, M.W.T.; HAAGSMA, E.B.; VAN HOEK, B.; ROSENDAAL, F.R.; JANSSEN, H.L.A.; LEEBEEK, F.W.G. Genetic variation in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is associated with the risk of splanchnic vein thrombosis. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, 97:181-185, 2007

DEMARMELS, B.F. ; SULZER, I. ; STUCHI, B. ; WUILLEMIN, W.A. ; FURLAN, M. ; LAMMLE, B. Is plasminogen deficiency a thrombotic risk factor? A study on 23 thrombophilic patients and their family members. **Thrombosis Haemostasis**, 80/ ;167-170, 1998.

DE VISSER, M.C.H.; POORT, S.R.; VOS, L.H.; ROSENDAAL, F.R.; BERTINA, R.M. Factor X levels, polymorphisms in the region of factor X and the risk of venous thrombosis. **Thrombosis Haemostasis**, 85:1011-1017, 2001.

DILLEY, A., DREWS, C.; MILLER, C.; LALLY, C.; AUSTIN, H.; RAMASWAMY, D.; LURYE, D.; EVATT, B. von Willebrand disease and other inherited bleeding disorders in women with diagnosed menorrhagia. **Obstetrical & Gynecological Survey**, 97:630-636, 2001.

FALK, K.; BJÖRQUIST, P.; FALK, P. Antifibrinolytic proCPU is present in the peritoneal cavity during surgery. **Journal of Clinical Laboratory Investigation**, 63:287-296, 2003.

FAVIER, R.; AOKI, N.; DE MOERLOOSE, P. Congenital α_2 -plasmin inhibitor deficiencies: a review. **British Journal of Haematology**, 114:4-10, 2001.

FAY, W.P.; PARKER, A.C.; CONDREY, L.R.; SHAPIRO, A.D. Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene. **Blood**, 90:204-208, 1997.

FIORINI, V.C.C.; SCATTOLINI, M.; PALUMBO, M.N.; ROIZENBLATT, S.; LOPES, A.C. Hemostasia : fisiologia e farmacologia. In: Antonio Carlos Lopes. Tópicos em Clínica Médica. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora médica e científica; 2003. p.439-448.

FOLSOM, A.R.; CUSHMAN, M.; HECKBERT, S.R.; ROSAMOND, W.D.; ALEKSIC, N. Prospective study of fibrinolytic markers and venous thromboembolism. **Journal of Clinical Epidemiology**, 56:598-603, 2003.

FRANCIS, C.W.; MARDER, V.J. Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis. In: Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5ª edição. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1994. p.1076-1094.

FRANCO, R.F.; REITSMA, P.H.; LOURENÇO, D.; MAFFEI, F.H.; MORELLI, V.; TAVELLA, M.H.; ARAÚJO, A.G.; PICCINATO, C.E.; ZAGO, M.A. Factor XIII Val134Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. **Thrombosis Haemostasis**, 81-676-679, 1999.

FRANCO, R.F.; FAGUNDES, M.G.; MEIJERS, J.C.M.; REITSMA, P.H.; LOURENÇO, D.; MORELLI, V.; MAFFEL, F.H.; FERRARI, I.C.; PICCINATO, C.E.; SILVA-JR, W.A.; ZAGO, M.A. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma level and risk of venous thrombosis. **Haematology**, 86:510-517, 2001.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: Zago, M.A. Hematologia, fundamentos e práticas. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 740-748.

FRÈRE, C.; MORANGE, P.E.; SAUT, N.; TREGOUET, D.A.; GROSLEY, M.; BELTRAN, J.; JUHAN-VAGUE, I.; ALESSI, M.C. Quantification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene polymorphism effects on plasma levels of TAFI measured with assays insensitive to isoform-dependent artefact. **Thrombosis Haemostasis**, 94:373-9, 2005.

GERNER, C.; STEINKELLNER, W.; HOLZMANN, K.; GSUR, A. ; GRIMM, R.; ENSINGER, C.; OBRIST, P.; SAUERMAN, G. Elevated plasma levels of crosslinked fibrinogen gamma-chain dimer indicate cancer-related fibrin deposition and fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**, 85 :494-501, 2001.

GILS, A.; ALESSI, M.C.; BROUWERS, E. Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. **Arterioscler Thrombosis Vascular Biology**, 23:1122-1127, 2003.

GREAVES, M. Assessment of haemostasis. **Vox Sanguinis**, 87(1):47-50, 2004.

GREGORY, T.M.; COOPER, M. Case report an acquired factor XIII inhibitor: diagnosis and management. **Proc (Baylor University Medical Center Proceedings)**, 19:221-223, 2006.

GUIMARÃES, A.H.C.; VAN TILBURG, N.H.; VOS, H.L.; BERTINA, R.M.; RIJKEN, D.C. Association between thrombin activatable fibrinolysis inhibitor genotype and levels in plasma: comparison of different assays. **British Journal of Haematology**, 124:659-665, 2004.

GUIMARÃES, A.C.H.; BERTINA, R.M.; RIJKEN, D.C. A new functional assay of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, 3:1284-1292, 2005.

HAJJAR, K.A. The endothelium in thrombosis and hemorrhage. **Thrombosis and Hemorrhage**, 206-219, 2003.

HANSON, P.O. ; WERLIN, L. ; TIBLIN, G. ; ERIKSSON, H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. **Arch Intern Med**, 157 :1665-1670, 1997.

HANSS, M.M.L.; FARCIS, M.; FFRENCH, P.O.; DE MAZANCOURT, P.; DEHAVANNE, M. A splicing donor site point mutation in intron 6 of the plasmina inhibitor (α_2 antiplasmin) gene with heterozygous deficiency and a bleeding tendency. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, 14:107-111, 2003.

HARISH, V.C.; ZHANG, L.; HUFF, J.D.; LAWSON, H.; OWEN, J. Isolated antiplasmin deficiency presenting as a spontaneous bleeding disorder in a 63-year-old man. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, 17:673-675, 2006.

HARLOW, S.D.; CAMPBELL, B.; LIN, X.; RAZ, J. Ethnic differences in the length of the menstrual cycle during the postmenarcheal period. **American Journal of Epidemiology**, 146(7):572-80, 1997.

HAYWARD, C.P.M.; CINÀ, C.S.; STAUNTON, M. JURRIAANS, E. Bleeding and thrombotic problems in a patient with alpha2 plasmin inhibitor deficiency. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, 3(2):399-401, 2005.

HEIJBOER, H., BRANDJES, D.P.M., BULLER, H.R., STURK, A., TEM-CATE, J.W. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in out patients with deep-vein thrombosis. **New England Journal of Medicine**, 323:1512-1516, 1990.

HENRY, M.; AUBERT, H.; MORANGE, P.E.; NANNI, I.; ALESSI, M.C.; TIRET, L.; JUHAN-VAGUE, I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. **Haemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 97(7):2053-2058, 2001.

HOLMES, W.E.; NELLES, L.; LIJNEN, H.R.; COLLEN, D. Primary structure of human α_2 -antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). **Journal of Biological Chemistry**, 4:1659-1664, 1987.

IKEMATSU, S.; FUKUTAKE, K.; AOKI, N. Heterozygote for plasmin inhibitor deficiency developing tendency with advancing age. **Thrombosis Research**, 82:129-136, 1996.

IRÈNE, J.V.; CHRISTINE, A.M.; PIERRE, M.E. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. **Annals of Medicine**, 32(1):78-84, 2000.

IVASKEVICIUS, V.; SEITZ, R.; KOHLER, H.P.; SCHROEDER, V.; MUSZBEK, L.; ARIENS, R.A.; SEIFRIED, E.; OLDENBURG, J. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, 97:914-921, 2007.

JUHAN-VAGUE, I.; PYKE, S.D.; ALESSI, M.C.; JESPERSEN, J.; HAVERKATE, F.; THOMPSON, S.G. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT study group. European concerted action on thrombosis and disabilities. **Circulation**, 94:2057-2063, 1996.

JUHAN-VAGUE, I.; ALESSI, M.C.; MORANGE, P.E. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. **Annals of Medicine**, 32(1):78-84, 2000.

KADIR, R.A.; ECONOMIDES, D.L.; SABIN, C.A.; OWENS, D.; LEE, C.A. Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. **Lancet**, 351:485-489, 1998.

KAMPHUISEN, P.W.; LENSEN, R.; HOWING-DUISTERMAAT, J.J.; EIKENBOON, J.C.J.; HARVEY, M. Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. **British Journal of Haematology**, 109:519-522, 2000.

KITCHING, A.R.; TURNER, A.L.; O'SULLIVAN, K.M.; DEWERCHIN, M.; LIJNIN, H.R. Endogenous α_2 -antiplasmin does not enhance glomerular fibrin deposition or injury in glomerulonephritis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1:1992-1999, 2003.

KOEI, F.; OGATA, K.; KAMIYA, T.; TAKAMATSU, J. α_2 -plasmin-inhibitor deficiency (Miyasato disease). **Lancet**, 2:1334-1336, 1978.

KOLEV, K.; MACHOVICH, R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**, 89:610-621, 2003.

KORDICH, L.; FELDMAN, L.; PORTERIE, P.; LAGO, O. Severe hemorrhagic tendency in heterozygous α_2 -antiplasmin deficiency. **Thrombosis Research**, 40:645-651, 1985.

KOYAMA, T.; KOIKE, Y.; TOYOTA, S. MIYAGI, F. SUZUKI, N.; AOKI, N. Different NH₂-terminal form with 12 additional residues of alpha 2-plasmin inhibitor from human and culture media of Hep G2 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 200:417-422, 1994.

KLUFT, C.; VELLENGA, E.; BROMMER, E.J.P. Homozygous α_2 -antiplasmin deficiency. **Lancet II**, 206 , 1979.

KLUFT, C.; NIEWENHUISE H.K.; RIJKEN, D.C.; GROENEVELD, E.; WIJNGAARDS, G.; VAN BERKEL, W.; DOIJEWARD, G.; SIXMA, J.J. Alpha2-antiplasmin enzyme : dysfunctional alpha2-antiplasmin molecule associated with an autosomal recessive hemorrhagic disorder. **Journal of Clinical Investigation**, 80:1391-1400, 1987.

LEEBEEK, F.W.G.; VAN GOOR, M.P.J.; GUIMARÃES, A.H.C.; BROUWERS, G.J.; DE MAAT, M.P.M.; DIPPEL, D.W.J.; RIJKEN, D.C. High functional levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3:2211-2218, 2005.

LEURS, J.; HENDRIKS, D. Carboxypeptidase U (TAFIa): a metalloproteinase with a distinct role in haemostasis and a possible risk factor for thrombotic disease. **Thrombosis and Haemostasis**, 94:471-487, 2005.

LIJNEN, H.R.; VAN HOEF, M.; DEWERCHIN, M.; COLLEN, D. α_2 -antiplasmin gene deficiency in mice does not affect neointima formation after vascular injury. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, 20 :1488-1492, 2000.

LIJNEN, H.R.; BACHMANN, F. ; COLLEN, D. ; ELLIS, V. ; PANNEKOEK, H. ; RIJKEN, D.C. ; THORSEN, S. Mechanisms of plasminogen activation. **Journal Internal Med**, 236 :415-424, 1994.

LIJNEN, H.R. Elements of the fibrinolytic system. **Annals of New York Academic Science**, 936:226-236, 2001.

LIND, B.; THORSEN, S. A novel missense mutation in the human plasmin inhibitor (α_2 -antiplasmin) gene associated with a bleeding tendency. **British Journal of Haematology**, 107:317-322, 1999.

LISMAN, T.; DE GROOT, G.P.; MEIJERS, J.C.M.; ROSENDAAL, F.R. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. **Blood**, 105:1102-1105, 2005.

LOSCALZO, J. Pathogenesis of thrombosis. In: Williams WJ. Hematology. 5th Edition. New York: McGraw-Hill; 1995. p.1525-1531.

LOURENÇO, D.M. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. **Revista da Sociedade Cardiológica do Estado de São Paulo**, 7(3):333-339, 1997.

MAFFEI, F.H. Trombose venosa profunda dos membros inferiores: incidência, patologia, fisiopatologia e diagnóstico. In: Maffei, F.F.A. ; Lastoria, S. ; Yoshioda, W.B. ; Rollo, H.A. Doenças vasculares periféricas. 2^a edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 856-878.

MAFFEI, F.H.A. ; ROLLO, H.A. ; LASTORIA, S. Tromboses venosas. In: Zago, M.A. Hematologia, fundamentos e práticas. 1^a edição. Rio de Janeiro: Medsi.1995. p. 841-862.

MANN, K.G. Biochemistry and physiology of blood coagulation. **Thrombosis and Haemostasis**, 82:165-174, 1999.

MARTINI, C.H.; BRANDTS, A.; DE BRUIJNE, E.L.E.; VAN HYLCKAMA VLIEG, A. LEEBEEK, F.W.G., LISMAN, T.; ROSENDAAL, F.R. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. **British Journal of Haematology**, 134:92-94, 2006.

MATSUNO, H.; OKADA, K.; UESHIMA, S. MATSUO, O.; KOZAWA, O. α_2 -antiplasmin plays a significant role in acute pulmonary. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1:1734-1739, 2003.

MEIJERS, J.C.; TEKELENBURG, W.L.; BOUMA, B.N.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. **New England Journal of Medicine**, 342(10):696-701, 2000.

MORANGE, P.E.; TREGOUET, D.A. FRERE; C.; ARVEILER, D.; FERRIERES, J.; AMOUYEL, P.; EVANS, A.; DUCIMETIERE, P.; CAMBIEM, F.; TIRET, L.; JUHAN-VAGUE, I. TAFI gene haplotypes, TAFI plasma levels and future risk of coronary heart disease : the PRIME study. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3 :1503-1510, 2005.

MORELLI, V.M. 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, V.M. Estrutura e função das plaquetas e das células endoteliais. In: Zago, M.A. Hematologia, fundamentos e práticas. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 732-737.

MORIMOTO, Y.; YOSHIOKA, A.; IMAI, Y.; TAKAHASHI, Y.; MINOWA, H.; KIRITA, T. Haemostatic management of intraoral bleeding in patients with congenital deficiency of alpha2-plasmin inhibitor or plasminogen activator inhibitor-1. **Haemophilia**, 10:669-674, 2004.

MOSNIER, L.O.; von dem BORNE, A.K.; MEIJERS, J.C.M.; BOUMA, B.N. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. **Thrombosis and Haemostasis**, 80:829-835, 1998.

MUTCH, J., THOMAS, L., MOORE, N.R., LISIAK, K.M., BOOTH, N.A. TAFIa, PAI-1 and α 2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 5:812-817, 2007.

NASCIMENTO; A.C.K.V. Distúrbios de vasos e plaquetas. In: Lopes, A.C. tratado de Clínica Médica. 1ª edição. Rio de Janeiro : Ed. Roca; 2006. p. 1990-1997.

ONLAND, W. BÖING, A.N.; MEIJER, A.B.; SCHAAP, M.C.L.; NIEUWLAND, R.; HAASNOOT, K.; STURK, A.; PETERS, M. Congenital deficiency of factor XIII caused by two missense mutations in a Dutch family. **Haemophilia**, 11:539-547, 2005.

POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M. 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**, 88:3698-3703, 1996.

REPINE, T.; OSSWALD, M. Menorrhagia due to a qualitative deficiency of plasminogen activator inhibitor-1: case report and literature review. **Clinical Application Thrombosis Haemostatic**, 10:293-296, 2004.

RITCHIE, H.; LAWRIE, L.C.; CROMBIE, P.W.; MOESSONT, M.W. BOOTH, N.A. Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and α 2-antiplasmin to fibrin(ogen). **Journal of Biological Chemistry**, 275(32):24915-24920, 2000.

ROBERTORYE R.S., RODGERS, G.M. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. **American Journal of Haematology**, 68:256-268, 2001.

ROMANO, P.E.; HOPE, G.M. The effect of age and ethnic background on the natural rebleed in untreated traumatic hyphema in children. **Metab Pediatr Syst Ophthalmol**, 13(1):26-31, 1990.

ROSENDAAL, F.R., KOSTER, T., VANDENBROUCKE, J.P. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood**, 85: 1504-1508, 1995.

ROSENDAAL, F.R. Risk factors for venous thrombotic disease. **Thrombosis and Haemostasis**, 82(2):610-619, 1999.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:487-491, 1988.

SANTAMARIA, A.; BORRELL, M.; MATEO, J.; VALLVE, C.; FONTCUBERTA, J. What is the clinical impact of low plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity? A case report and study of the incidence of low PAI-1 antigen in a healthy population. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 5:1565-1566, 2007

SCHATTEMAN, K.A.; GOOSSENS, F.J.; SCHARPÉ, S.S.; NEELS, H.M.; HENDRIKS, D.F. Assay of procarboxypeptidase U, a novel determinant of the fibrinolytic cascade, in human plasma. **Journal Clinical of Chemistry**, 45(6):807-813, 1999.

SCHENONE, M.; FURIE, B.C.; FURIE, B. The blood coagulation cascade. **Current Opinion in Hematology**, 11:272-277, 2004.

SCHLEEF, R.R.; HIGGINS, D.L.; PILLEMER, E.; LEVITT, L.J. Bleeding diathesis due to decreased functional activity of type 1 plasminogen activator inhibitor. **Journal Clinical of Investigator**, 83:1747-1752, 1989.

SCHNEIDER, M.; BOFFA, M.; STEWART R.; RAHMAN, M.; KOSCHINSKI, M.; NESHEIM, M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, 277:1021-1030, 2002.

SCHNEIDER, M.; NESHEIM, M. A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(14):13333-13339, 2004.

SCHOTT, D.; DEMPFLER, C.E.; BECK, P.; LIERMANN, A.; MOHR-PENNERT, A.; GOLDBERGER, M.; MEHLEM, P.; AZUMA, H.; SCHUSTER, V.; MINGERS, A.M.; SCHWARZ, H.P.; KRAMER, M.D. Therapy with a purified plasminogen concentrate in an infant with ligneous conjunctivitis and homozygous plasminogen deficiency. **New England Journal of Medicine**, 339:1679-1686, 1998.

SCHROEDER, V.; DURRER, D.; MEILI, E.; SCHUBIGER, G.; KOBLER, H.P. **Swiss Med Wkly**, 137:272-278, 2007.

SCHUSTER, V.; HÜGLE, B.; TEFS, K. Plasminogen deficiency. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 5:2315-2322, 2007.

SCHULMAN, S.; WIMAN, B. The significance of hipofibrinolysis for the risk of recurrence of venous thromboembolism. Duration of anticoagulation (DURAC) Trial Study Group. **Thrombosis and Haemostasis**, 75:607-611, 1996.

SCOTT, E.M.; ARIËNS, R.A.S., GRANT, P.J. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function. **Arterioscler Thrombosis Vascular Biology**, 24:1558-1566, 2004.

SILVERSTEIN, M.D.; HEIT, J.A.; MOHR, D.N.; PETTERSON, T.M.; O'FALLON, W.M.; MELTON, L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **Archives Internal Medicine**, 158:585-593, 1998.

SMITH, A.A.; JACOBSON, L.J.; MILLER, B.I.; HATHAWAY, W.E.; MANCO-JOHNSON, M.J. A new euglobulin clot lysis assay for global fibrinolysis. **Thrombosis Research**, 112:329-337, 2004.

TAKAHASHI, Y.; TANAKA, T.; MINOW, H.; OOKUBO, Y.; SUGIMOTO, M.; NAKAJIMA, M.; MIYAUCHI, Y.; YOSHIOKA, A. Hereditary partial deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 associated with a lifelong bleeding tendency. **International Journal of Haematology**, 64:61-68, 1996.

TOSHIHIKO, A.; TAKAO, K.; KINYA, T.; NAOHIRO, K. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and successful deliveries: a review of the literature. **Obstetrical & Gynecological Survey**, 62(4):225-260, 2007.

TSAI, A.W.; CUSHMAN, M.; ROSAMOND, W.D.; HECKBERT, S.R.; TRACY, R.P.; ALEKSIC, N.; FOLSON, A.R. Coagulation factors, inflammations markers, and venous thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). **American Journal of Haematology**, 113:636-642, 2002.

TRÉGOUET, D.A., AUBERT, H., HENRY, M., MORANGE, P., VISVIKIS, S., JUHAN-VAGUE, I., TIRET, L. Combine segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphisms. **Hum. Genet**, 109:191-197, 2001.

TRIPLETT, D.A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. **Clinical Chemistry**, 46(8):1260-1269, 2000.

VAN HYLCKAMA, A.V.; VAN DER LINDEN, I.K.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. **Blood**, 95(12):3678-3682, 2000.

VAN TILBURG, N.H., ROSENDAAL, F.R., BERTINA, R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. **Blood**, 95:2855-2859, 2000.

VAUGHAN, D.E. PAI-1 and atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3:1879-1883, 2005.

ZIDANE, M.; DE VISSER, M.C.; TEN WOLDE, M.; VOS, H.L.; DE MONYE, W.; BERTINA, R.M.; HUISMAN, M.V. frequency of the TAFI -438G/A and factor XIII Val34Leu polymorphisms in patients with objectively proven pulmonary embolism. **Thrombosis and Haemostasis**, 90:439-445, 2003.

WANG, W.; BOFFA, M.B.; BAJZAR, L.; WALKER, J.B.; NESHEIM M.E. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, 273:27176-27181, 1998.

WELTERMANN, A.; EICHINGER, S.; BIALONCZYK, C.; MINAR, E.; HIRSCHI, M.; QUEHENBERGER, P.; SCHONAUER, V.; KYRLE, P.A. The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1:28-32, 2003.

WERNER, E.J.; BROXSON, E.H.; TUCKER, E.L.; GIROUX, D.S.; SHULTS, J.; ABSHIRE, T.C. Prevalence of von Willebrand disease in children a multiethnic study. **Journal of Pediatric**, 123(6):893-8, 1993.

WILLEMSE, J.L., MATUS,V., HEYLEN, E., MEZZANO, D., HENDRIKS, D.F. Influence of the Thr325Ile polymorphism on procarboxypeptidase U (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor) activity-based assays. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Letters to the Editor; 5:872-875, 2007.

YOSHINAGA, H.; HIROSAWA, S.; CHUNG, D.H.; MIYASAKA, N.; FAVIER, R. A novel point mutation of the splicing donor site in the intron 2 of the plasmin inhibitor gene. **Thromb Haemost**, 84:307-311, 2000.

9- ANEXOS

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO – Data da Coleta: __/__/__

Nome do Voluntário:

HC:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo: Feminino Masculino

Origem étnica: Caucasiano Afro descendente Asiático Obs.:

História Pessoal de trombose venosa profunda (TVP), ou acidente vascular cerebral (AVC), ou infarto agudo do miocárdio (IAM): Sim Não. Qual?.....

História Familiar de TVP, ou AVC, ou IAM: Sim Não. Qual?.....

Grau de parentesco:.....; Idade:

Sofre de algumas destas doenças:

Hipertensão arterial: Sim Não

Diabetes: Sim Não

Síndrome Convulsiva: Sim Não

Hipotireoidismo: Sim Não

Neoplasia: Sim Não

Doença Renal Sim Não

Doença Hepática Sim Não

Síndrome do anticorpo antifosfolípido Sim Não

Outras _____

Fumo: Sim Não. Quanto tempo? _____ Quantos cigarros? _____

Faz uso de algum medicamento? Sim Não. Qual? _____

Faz uso de bebida alcoólica? Sim Não Freqüência _____

Pesquisa de queixas Hemorrágicas:

Equimoses: Sim Não Espontânea Pós-trauma

Hematomas: Sim Não Espontânea Pós-trauma

Extração dentária: Sim Não Espontânea Pós-trauma

Epistaxe: Sim Não Espontânea Pós-trauma

Gengivorragia: Sim Não Espontânea Pós-trauma

Cirurgia: Sim Não Sangramento em cirurgia

Transfusão sanguínea: Sim Não

História de sangramento na família:

Filho Pais Irmãos Tios

Obs.: _____

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DA FIBRINÓLISE EM PACIENTES
COM TROMBOSE VENOSA E ALTERAÇÕES HEMORRÁGICAS.**

Responsáveis pelo projeto: GRAZIELA SILVEIRA ARAÚJO
Profª. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

Eu, _____, idade: _____, Data
de Nascimento: _____, RG: _____, HC: _____, Residente à
Rua/Av.: _____
_____, Telefone: _____.

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a)
dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,
Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,
Residente à Rua/Av. _____,
_____. Telefone: _____.

Trata-se de um estudo que pretende identificar se existe alguma relação nos parâmetros
da coagulação e da fibrinólise com trombose dos vasos ou sangramento; será realizada com
voluntários que foram diagnosticados como portadores de trombose venosa ou alterações
hemorrágicas.

Deveremos coletar aproximadamente 20 mL de sangue para a análise genética bem como os outros exames para comprovar alguma alteração da fibrinólise (dosagem de plasminogênio, PAI-1, α_2 -AP e TAFI).

É essencial que o senhor (a) tenha feito jejum de 8 horas antes da coleta para maior confiabilidade nos resultados dos exames. E, eventualmente, o senhor(a) será reconvidado a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o voluntário estará sujeito ao participar do estudo são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá ao voluntário outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Outras informações:

- a. Haverá reembolso de gastos com transporte, em conseqüência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
- b. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
- c. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
- d. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que este material possa ser armazenado.
- e. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do CEP.
- f. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
- g. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, Fone: (19) 3788.8936.

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Graziela Silveira Araújo

Profa. Dra. Joyce M. Annicchino-Bizzachi

Aluna de pós-graduação
Fone: (19) 3521-4838

Orientadora
Fone: (19) 3521-8601

ANEXO 3

BLEEDING QUESTIONNAIRE

Patient Information

Name _____

Address _____

Phone Number _____ Email _____

Gender Male Female

Age _____ Date of Birth _____ (DD/MO/YYYY)

Ethnic Background _____

Presenting complaint of bleeding or bruising today Yes No

Personal history of bleeding or bruising Yes No

Ever been diagnosed with a bleeding disorder? Yes No
Diagnosis: _____

Family history of bleeding (at least one family member) Yes No

If yes, what was the diagnosis? _____

Pedigree:

Are you currently taking Oral Contraceptive Pills? Yes No

If yes, brand name _____

Are you pregnant? _____ Gestation time _____

Specify any herbals and/or medications that you have taken in the past 30 days:

Name	Dose	Route	Frequency	Duration
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

Nosebleeds

Yes

No

Number of episodes/year

< 1

6 - 12

1 - 5

> 12

Duration of average episode

< 1 minute

1 - 10 minutes

> 10 minutes

Medical attention

Yes

No

Consultation only

Cauterization/packing

Antifibrinolytics

DDAVP

Transfusion/Replacement

Bruising

Yes

No

Location

Exposed sites

Unexposed sites

Size of average

< 1 cm

1 - 5 cm

> 5 cm

Minimal or no trauma

Yes

No

Medical attention

Yes

No

If yes, please specify _____

Bleeding from minor wounds

Yes

No

Number per year

< 1

1 - 5

6 or more

Duration of average episode

< 5 minutes

> 5 minutes

- Medical attention Yes No
- Consultation only
 - Surgical hemostasis
 - Blood transfusion/DDAVP/Replacement

Oral cavity bleeding Yes No

- Tooth eruption
- Gums, spontaneous
- Gums, after brushing
- Bites to lip and tongue

- Medical attention Yes No
- Consultation only
 - Surgical hemostasis/Antifibrinolytic
 - Blood transfusion/DDAVP/Replacement

Post-dental extraction Yes No

- No bleeding in at least 2 extractions
- None done, or no bleeding in 1 extraction

- Medical attention Yes No
- Consultation only
 - Resuturing or packing
 - Blood transfusion/DDAVP/Replacement

Gastrointestinal Bleeding Yes No

- Ulcer, portal hypertension, hemorrhoids
- Spontaneous
- Surgery/Blood transfusion/DDAVP/Antifibrinolytic

Surgery

Yes

No

- No bleeding in at least 2 surgeries
- None done, or no bleeding in 1 surgery

Post-op medical attention

Yes

No

- Consultation only
- Surgical hemostasis/Antifibrinolytic
- Blood transfusion/DDAVP/Replacement

Menorrhagia

Yes

No

Duration of average menstruation _____ days

Duration of heavy menstruation _____ days

How often do you change your pads/tampons

on heaviest days _____ hours

on average days _____ hours

What type of feminine product do you use? (i.e. panty liner, super absorbency tampon etc.)

Medical attention

Yes

No

- Consultation only
- Pill use/Antifibrinolytics
- Dilatation & curettage
- Iron therapy
- Blood transfusion/DDAVP/Replacement
- Hysterectomy

Post-partum hemorrhage

Yes

No

- No bleeding in at least 2 deliveries
- No deliveries, or no bleeding in 1 delivery

Medical attention Yes No
 Consultation only
 D&C/Iron therapy/Antifibrinolytics
 Blood transfusion/DDAVP/Replacement
 Hysterectomy

Muscle hematomas Yes No

 Post-trauma, no therapy
 Spontaneous, no therapy
 Spontaneous or traumatic requiring DDAVP
or Replacement
 Spontaneous or traumatic requiring surgical
Intervention or transfusion

Hemarthrosis Yes No

 Post-trauma, no therapy
 Spontaneous, no therapy

Spontaneous or traumatic requiring DDAVP
 or Replacement
 Spontaneous or traumatic requiring surgical
Intervention or transfusion

Central Nervous System Bleeding Yes No

 Subdural, any intervention
 Intracerebral, any intervention

Other

Medical attention Yes No
 Consultation only
 Surgical hemostasis/Antifibrinolytic
 Blood transfusion/DDAVP/Replacemen

ANEXO 4

Symptom	SCORE					
	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 10'	Consultation only	Packing or Cauterization or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Cutaneous	-	No or trivial (<1 cm)	> 1 cm and no trauma	Consultation only	-	-
Bleeding minor wounds	-	No or trivial (less than 5)	> 5 or more than 5'	Consultation only	Surgical hemostasis	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Oral cavity	-	No	Referred at least one	Consultation only	Surgical hemostasis or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
GI bleeding	-	No	Associated with ulcer, portal hyp., hemorrhoids, angiodysplasia	Spontaneous	Surgical hemostasis, Blood transf, Replacement therapy, Desmopressin, Antifibrinolytic	
Tooth extraction	No bleeding in at least 2 extraction	None done or no bleed. in 1 extraction	Referred in <25% of all procedures	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Resuturing or packing	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Surgery	No bleeding in at least two surgeries	None done or no bleed. in 1 surgery	Referred in <25% of all surgeries	Referred in >25% of all procedures, no intervention	Surgical hemostasis or Antifibrinolytic	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin
Menorrhagia	-	No	Consultation only	Antifibrinolytics, Pill use	D & C, Iron therapy	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin or Hysterectomy
Post-partum hemorrhage	No bleeding in at least two deliveries	No deliveries or no bleeding in 1 delivery	Consultation only	D & C, Iron therapy, Antifibrinolytics	Blood transf or Replacement therapy or Desmopressin	Hysterectomy
Muscle hematomas	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	-	Never	Post trauma no therapy	Spontaneous, no therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Desmopressin or Replacement therapy	Spontaneous or traumatic, requiring Surgical intervention or blood transfusion
CNS bleeding	-	Never	-	-	Subdural, any intervention	Intracerebral, any intervention