

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES**  
**Doutorado em Saúde Pública**

Maria Emília dos Santos

**MARCADORES DE TROMBOFILIA EM  
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME**

**RECIFE**  
**2010**

---

**Maria Emília dos Santos**

**Marcadores de Trombofilia em portadores de Anemia Falciforme**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientadores**

Yara de Miranda Gomes

Eduardo Maia Freese de Carvalho

Wayner Vieira de Souza

**Recife**

**2010**

---

---

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

S237 Santos, Maria Emília dos.  
M Marcadores de trombofilia em portadores de anemia falciforme / Maria Emília dos Santos. — Recife: M. E. dos Santos, 2010.  
127 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadores: Yara de Miranda Gomes, Eduardo Maia Freese de Carvalho, Wayner Vieira de Souza.

1. Trombofilia. 2. Anemia Falciforme. 3. Acidente Cerebral Vascular. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Carvalho, Eduardo Maia Freese de. III. Souza, Wayner Vieira de. IV. Título.

---

CDU 616.15

---

---

**MARIA EMÍLIA DOS SANTOS**

**MARCADORES DE TROMBOFILIA EM PORTADORES DE ANEMIA  
FALCIFORME**

Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado em Saúde Pública do Centro  
de Pesquisas Aggeu Magalhães –  
Fundação Oswaldo Cruz para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra Yara de Miranda Gomes  
CPqAM/FIOCRUZ

---

Dr Aderson Silva Araújo  
Fundação HEMOPE

---

Dr Marcos A C Bezerra  
CCB - UFPE

---

Maria da Conceição B Correia  
Fundação HEMOPE  
CCS - UFPE

---

Dra Silvia Montenegro  
CPqAM/FIOCRUZ

---



A Alcides  
*in memoriam*

---

## Agradecimentos

Ao paciente, sujeito da pesquisa

Dra Flávia Bandeira

Dr Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dra Conceição Barros Correia

Dra Paula Loureiro

A Macia e Eliene, bibliotecárias do CPqAM e HEMOPE, respectivamente  
Orientandas Monik Duarte, Viviane Hora, Camila Brito, Rafaela Melo, Renata Vieira,  
Zaine Lyra, Gabi, sucesso para vocês!

Aos diletos colegas do Laboratório HEMOPE: Aninha, Vera, Chico Chicó, LG,  
Fabinha, Emília Borges, Ivonisete, com muito carinho!!

A Benedito Marques

Aos professores Zé Luiz, Ricardo Tavares, Fred Abath (*in memoriam*), Cida  
Nogueira, Edgar Assis Carvalho, Djalma Agripino

Toda minha admiração e respeito.

Ao CPqAM/FIOCRUZ

À FACEPE/DECIT/SUS

À Fundação HEMOPE

Aos meus pais

Minhas filhas

**Primeiramente e finalmente,**

**A Deus e Nossa Senhora**

---

---

*“...que sua observação abarca  
com a imaginação certos detalhes  
e apaga outros sem significação, estilizando  
pela conjugação caótica desses novos  
detalhes, um quadro que é a tradução sintética  
da realidade.”*

Josué de Castro

---



O tempo do SUS ideal é aquele que fazemos agora.  
E esse tempo transcende para aquele SUS que queremos.

*A autora*

---

*“O fundamental é ser aprendiz para sempre e não ter vergonha disso.”*

Flávio Gikovate

---

---

SANTOS, Maria Emília. **Marcadores de trombofilia em portadores de anemia falciforme**. 2010. Tese. (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

## RESUMO

**Introdução:** Os indivíduos afetados por trombofilia adquirida ou hereditária têm mais propensão a tromboembolismo venoso e arterial. Portadores de anemia falciforme (AF) são suscetíveis a episódios trombóticos e têm nas crises vaso-oclusivas (CVO) a principal manifestação clínica, com gravidade variável entre pacientes. **Objetivo:** Identificar marcadores de trombofilia em portadores de AF com relação aos eventos vaso-oclusivos (EVO): síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral isquêmico (AVC), necrose asséptica de cabeça de fêmur (NACF), priapismo, síndrome mão-pé (SMP) e CVO. **Metodologia:** Após consentimento informado, foi coletada amostra de sangue de 100 indivíduos portadores de AF, em *steady state*, e estudadas as variáveis: faixa etária, sexo, os marcadores de trombofilia: anticorpos antifosfolipídios - anticardiolipina (ACA), anti $\beta$ 2 glicoproteína I (A $\beta$ 2GPI), antifosfatidilserina (aPS), antilúpico (AL) -, Fator V de Leiden (FVL), Fator II G2021A (PM), polimorfismo C677T da MTHFR (MTHFR), deficiência de antitrombina (AT) e FVIII elevado. **Resultado:** Idade e sexo não apresentaram associação com EVO; a idade média do grupo estudado foi de 19,8 anos; 55% eram do sexo feminino e 45% eram do sexo masculino. Trombofilia foi identificada em 62% e mostrou associação significativa com CVO, enquanto A $\beta$ 2GPI mostrou associação com AVC. MTHFR apresentou associação significativa para CVO. A deficiência de AT aumentou o risco para SMP, sem significância estatística. FVIII elevado apresentou associação significativa com EVO. Apenas 1 (1,15%) foi heterozigoto para o FII G20210A, enquanto que FVL não foi identificado. **Discussão:** A $\beta$ 2GPI estão associados com risco para AVC na população em geral. A virtual ausência do FVL e do FII G20210A indica que não representam risco para complicações na AF na população estudada. A deficiência de AT sugere ativação da coagulação na AF, apesar de terem sido selecionados pacientes fora de crise. **Conclusão:** FVL e PM não são indicados como marcadores de risco para EVO, ou mesmo de TEV na AF. Recomenda-se pesquisa do A $\beta$ 2GPI IgG para risco de AVC, do polimorfismo C677T da MTHFR para risco de CVO e dosagem do fator VIII para EVO na AF.

**Palavras-chave:** anemia falciforme, acidente vascular cerebral, trombofilia.

---

---

SANTOS, Maria Emilia. **Markers for thrombophilia in patients with sickle cell anemia**. 2010. Thesis. (Doctorate in Public Health) - Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2010.

### ABSTRACT

**Introduction:** Individuals affected by hereditary or acquired thrombophilia are more prone to arterial and venous thromboembolism. Sickle cell anemia (SCA) patients tend to develop thrombotic episodes, whose main clinical manifestation are vaso-occlusive crisis (VOC), with variable severity among patients. **Objective:** Identify markers of thrombophilia in patients with SCA and its relation with the following vaso-occlusive events (VOE): acute chest syndrome (ACS), stroke, aseptic necrosis of femoral head (ANFH), priapism, hand-foot syndrome (HFS) and VOC. **Methodology:** After informed consent, blood samples were collected from 100 individuals in steady state from this group, and age, sex, thrombophilia markers: antiphospholipid antibodies - anticardiolipin (ACA), anti $\beta$ 2 glycoprotein I (A $\beta$ 2GPI), antiphosphatidylserine (APS), lupus anticoagulant (LA) - Factor V Leiden (FVL), G2021A Factor II (FII G20210A), MTHFR C677T polymorphism (MTHFR) deficiency of antithrombin (AT) and high FVIII were analyzed. **Results:** The average age of the studied group was 19.8 years; 55% of them were female and 45% of them were male. Thrombophilia was identified in 62% of the population of the study and it was correlated with VOC, while A $\beta$ 2GPI showed association with strokes. MTHFR was significantly associated to CVO. AT deficiency increased the risk for HFS, although there was no statistical significance for this. High FVIII was associated with VOE. Only 1 (1.15%) were heterozygotes for the FII G20210A, whereas FVL was not identified. **Discussion:** A $\beta$ 2GPI are associated with stroke risk in general population. Virtual absence of FVL and FII G20210A indicates that it does not represent risk for complications in SCA in the studied population. AT deficiency suggests the existence of coagulation activation in SCA, although patients were out of crisis when selected. **Conclusion:** FVL and FII G20210A are not indicated as risk markers for VOE, or even of VTE in SCA. It is recommended to research the A $\beta$ 2GPI IgG regarding to the risk of stroke, and also of C677T polymorphism to risk of VOC, besides the dosage of factor VIII for VOE in SCA.

**Keywords:** sickle cell anemia, stroke, thrombophilia.

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Distribuição de portadores de AF analisados para marcadores de trombofilia segundo a faixa etária e o sexo, atendidos no Hospital HEMOPE.	34
2	Prevalência de eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	34
3	Prevalência de anticorpos antifosfolípides em portadores de AF atendidos no Hospital HEMOPE (n=30)	35
4	Prevalência de deficiência de Antitrombrina e de Trombofilia em 100 portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE	35
5	Trombofilia em relação a eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	36
6	Avaliação de trombofilias frente à síndrome torácica aguda em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	37
7	Avaliação de trombofilias frente a acidente vascular cerebral isquêmico em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE	38
8	Avaliação das trombofilias frente à necrose asséptica de cabeça de fêmur em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	39
9	Distribuição de priapismo em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE, segundo a faixa etária	39
10	Avaliação das trombofilias frente a priapismo em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	40
11	Avaliação das trombofilias frente à síndrome mão-pé em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	41
12	Marcadores de trombofilia em relação a crises vaso-oclusivas em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE	42
13	Marcadores de trombofilia em relação a eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.	43

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAF	Anticorpos Antifosfolipídios
A $\beta$ 2GPI	Anticorpo anti(2 glicoproteína I
ACA	Anticorpo anticardiolipina
AF	Anemia Falciforme
Aps	Anticorpo antifosfatidilserina
AL	Anticorpo ou anticoagulante Lúpico
AVC	Acidente vascular cerebral
AT	Antitrombina
CVO	Crise vaso-oclusiva
DF	Doença falciforme
EP	Embolia pulmonar
EVO	Evento vaso-oclusivo
FVIII	Fator VIII
FIIG20210A	Fator II G20210A
FVL	Fator V Leiden
GPL	Unidades de IgG
HbS	Hemoglobina S
MPL	Unidades de IgM
MTHFR	Metilenotetrahidrofolatoredutase
NACF	Necrose asséptica de cabeça de fêmur
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RR	Risco Relativo
SAF	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
SMP	Síndrome mão-pé
STA	Síndrome torácica aguda
TA	Trombose Arterial
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tromboembolismo
TEV	Tromboembolismo venoso
TV	Trombose venosa
TVVRD	Teste do Veneno de Víbora Russel Diluído

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Definição do objeto</b>	15
<b>2</b>	<b>Estado da arte</b>	16
2.1	Marcadores de Trombofilia	16
2.2	Anemia Falciforme	21
<b>3</b>	<b>Justificativa</b>	25
<b>4</b>	<b>Pergunta condutora da pesquisa</b>	26
<b>5</b>	<b>Definição de Objetivos</b>	27
5.1	Geral	27
5.2	Específicos	27
<b>6</b>	<b>Metodologia</b>	28
6.1	Local e Período do Estudo	28
6.2	População alvo	28
6.3	Desenho do Estudo	28
6.4	Critérios de Inclusão	28
6.5	Critérios de Exclusão	29
6.6	Eventos vaso-oclusivos	29
6.7	Variáveis do Estudo	30
6.8	Análise dos dados	31
6.9	Considerações éticas	31
6.10	Testes laboratoriais	32
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	34
<b>8</b>	<b>Discussão</b>	44
<b>9</b>	<b>Conclusões</b>	59
<b>10</b>	<b>Recomendações</b>	60
	<b>Referências</b>	61
	<b>APÊNDICES</b>	73
	APÊNDICE A - FORMULÁRIO PESQUISA DE PRONTUARIO	73
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para menores	74
	APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para adultos	75

---

APÊNDICE D - Descrição de pacientes portadores de AF com teste A $\beta$ 2GPI reagente com relação a história de AVC.	76
APÊNDICE E - Pesquisa dos Anticorpos Antifosfolípides.	77
APÊNDICE F - Pesquisa dos Marcadores Moleculares - Fator V de Leiden, Fator II G20210A, polimorfismo C677T MTHFR.	84
APÊNDICE G - Pesquisa de deficiência de atividade de Antitrombina.	89
APÊNDICE H - Dosagem do Fator VIII	91
<b>ANEXOS</b>	94
ANEXO A - Pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE	94

---

## **1 Definição do objeto**

Indivíduos afetados por trombofilia adquirida ou hereditária têm mais propensão a tromboembolismo (TE) venoso e arterial. Trombofilia pode estar presente concomitantemente a outras patologias, como a anemia falciforme (AF), cujos pacientes cursam com eventos vaso-oclusivos (EVO) de repetição, e maior risco para TE venoso e arterial. Do mesmo modo, trombose tem um destacado papel em várias complicações da AF (ATAGA *et al.*, 2008; BLANN *et al.*, 2003; DRISCOLL *et al.*, 2003; GLADWIN; KATO, 2008; PEGELOW *et al.*, 2002).

A identificação de marcadores de trombofilia em portadores de AF, sua prevalência e impacto na gravidade da doença não são bem elucidadas. Destarte, os relatos disponíveis sobre o papel da trombofilia na AF no agravamento clínico dos portadores desta doença são conflitantes e inconclusivos.

---

## 2 Estado da Arte

### 2.1 Marcadores de Trombofilia

Os fenômenos tromboembólicos venosos e arteriais representam uma das primeiras causas de morbimortalidade no mundo ocidental, sendo mais significativas que as causas hemorrágicas. No Brasil, as doenças do aparelho circulatório causaram mais de 300 000 mortes em 2006, representando a principal causa de morte para ambos os sexos (BRASIL, 2008; CAMPOLIM, 2009; GUIMARÃES *et al.* 2009). Por conta disso e também devido aos avanços bioquímicos e moleculares da ciência, a hemostasia e a trombogênese têm sido cada vez mais estudadas. Constata-se a existência de estados pró-trombóticos, transtornos adquiridos ou hereditários que conferem hipercoagulabilidade ou estado trombofílico. Os indivíduos afetados têm mais propensão a tromboembolismo venoso e arterial que a população em geral (RAFFINI, 2009).

A patogenia da trombose venosa (TV) é multifatorial, resulta da interação de variáveis ambientais e de atributos inerentes à pessoa, como idade, obesidade, trauma, imobilização prolongada, cirurgia, trombose prévia, cirurgia ortopédica, gravidez, puerpério, uso de anticoncepcional oral, neoplasia, sepsis, cardiopatias, diabetes, câncer, trombofilia congênita ou adquirida e outras situações (FURIE, 2009).

A trombose e a tromboembolia foram descritas pela primeira vez em 1856 por Virchow, que propôs sua conhecida tríade, com alterações na parede do vaso, na coagulação e no fluxo sanguíneo. A participação das plaquetas foi estabelecida no final do século XIX, e nas últimas décadas foram acumulados conhecimentos de grande importância a respeito dos mecanismos moleculares da hemostasia e trombose (KYRLE; EICHINGER, 2009).

O coágulo deve ser autolimitado, localizado e transitório, afinal o sistema hemostático é um mecanismo de defesa. Para isto, existem pelo menos quatro sistemas de regulação antitrombótica. O primeiro é o sistema da AT, que inibe os fatores da coagulação ativados: IIa, Xa, IXa, XIa e XIIa. O segundo consiste no

sistema da proteína C (PC), trombomodulina e proteína S (PS), que inibe os fatores Va e VIIIa, os quais fazem parte da ativação de X e II. Os dois primeiros sistemas limitam a geração de trombina e fibrina. O terceiro é o da prostaciclina, que limita o depósito de plaquetas ao coágulo em formação, e o quarto é o sistema fibrinolítico, que causa dissolução do coágulo formado através da digestão enzimática da fibrina (ADAMS; BIRD, 2009).

Distúrbios congênitos relacionados a risco para TV e arterial incluem níveis elevados dos fatores de coagulação da via intrínseca (fator VIII, IX e XI), (GREEN, 2009). Para tromboembolismo venoso (TEV), são descritas as deficiências de AT, PC, PS, o Fator V Leiden, a resistência à proteína C ativada (RPCA), o FII G20210A (protrombina mutante) e outros (Quadro 1), (RAFFINI, 2009).

Por outro lado, condições adquiridas também podem interferir com o sistema da hemostasia, aumentando o risco trombótico, como por exemplo, a síndrome do anticorpo antifosfolípideo, estados infecciosos, idade, obesidade, dislipidemias, fumo e o câncer (DEVRESSE, PEERLINCK, HOYLAERTS, 2010; GOLDENBERG; MANCO-JOHNSON, 2008; KATE; VAN DER MEER, 2008;).

<b>Fator de risco</b>	<b>População em geral (%)</b>	<b>História de TEV (%)</b>	<b>Risco Relativo</b>
<b>Def. de AT</b>	0.02	2-3	12-20
<b>FVL heterozigoto</b>	0.05-4*	18-40	7.0
<b>FVL homozigoto</b>	0.02	1.5	80
<b>FII G20210A</b>	0.06-2.7*	10-15	2.7-3.8
<b>FVIII elevado</b>	10-15	20-35	4.8
<b>AAF</b>	1.0-5	10-30	2-10

**Quadro 1. Trombofilia na população em geral e em pacientes com história de TEV.**

Fonte: Adaptado de Marlar; Fink; Miller (2007).

Nota: \* Percentual menor em asiáticos e afro-descendentes. Percentuais maiores em descendentes de caucasianos.

A deficiência congênita de AT é uma doença autossômica dominante, sendo a maioria heterozigota, com AT plasmática normal e anormal. Afeta ambos os sexos igualmente e não possui preferência por etnia (KHAN; DICKERMAN, 2006; PATNAIK; MOLL, 2008).

A AT pode estar diminuída por deficiência adquirida. Neste caso, ocorre em sepsis, coagulação intravascular disseminada, trombose venosa, embolia pulmonar, e eventos trombo-oclusivos difusos venosos ou arteriais, por consumo; na insuficiência hepática e neonatos, por baixa produção; uso de estrógenos e anticoncepcional oral, L-asparaginase, heparina; na pré-eclâmpsia e eclâmpsia; na síndrome nefrótica e na doença inflamatória intestinal, por perda protéica (KHAN; DICKERMAN, 2006; PATNAIK; MOLL, 2008).

A partir do relato de Dahlbäck *et al.*, (1993), descobriu-se novo fator de risco para trombose: a resistência à Proteína C Ativada (RPCA). Cerca de 90% dos casos de RPCA se devem à substituição de uma guanina por uma adenina (G1691A) no gene do fator V, ocasionando uma substituição de um resíduo de arginina no códon 506 por uma glutamina na molécula do fator V, um dos sítios de ligação com a proteína C ativada. O fator resultante é chamado Fator V de Leiden (FVL) (BERTINA *et al.*, 1994).

O fator Va é inativado pela proteína C e seu cofator a proteína S mediante proteólise, nas posições Arg 506, Arg 306 e Arg 679. A clivagem na posição Arg 506 não inativa completamente o fator Va; é na segunda clivagem (Arg 306) que ocorre total inativação. No caso do FVL não ocorre a clivagem na Arg 506, então a clivagem na posição Arg 306 é pelo menos dez vezes mais lenta, causando resistência parcial à inativação (THORELLI; KAUFMAN; DAHLBÄCK, 1999).

A mutação FVR506Q não só confere resistência parcial do fator Va à proteína C ativada, prejudicando a inativação do FVa, como também reduz a degradação do fator VIIIa porque esta requer a função sinérgica de cofator da proteína S e do fator V proteoliticamente modificados pela proteína C ativada (THORELLI; KAUFMAN; DAHLBÄCK, 1999). No entanto, o fator V defeituoso conserva sua atividade pró-coagulante. Os indivíduos afetados têm tendência trombótica, e essa enfermidade atualmente é o mais comum fator genético de risco para TV (RAFFINI, 2009; RODEGHIERO; TOSETTO, 1999), mais freqüente que a deficiência de proteína C, proteína S ou AT.

A resistência à proteína C ativada devido ao FVL é uma doença autossômica dominante, com prevalência entre 2 a 7% na população em geral, mais comum em caucasóides europeus e norte-americanos. Sua incidência varia no mundo ocidental, a Suécia apresenta 15%, a Alemanha, 10%, a Holanda, o Reino Unido e Estados Unidos, de 3 a 5%. Na América do Sul, o Chile apresentou na população 3,8%, a Argentina, 5,1% (Buenos Aires), e o Brasil (São Paulo), 2%. Entre indivíduos de raça negra, asiáticos e indígenas americanos o FVL é raro (GREGG; YAMANE; GRODY, 1997; REES; COX; CLEGG, 1995). Em Pernambuco foi encontrada prevalência de 2% na população assintomática, e 18% em pacientes com trombose (RAMOS *et al.*, 2006).

A variante alélica da protrombina, Fator II G20210A, uma mutação na região 3' não codificante do gene da protrombina (POORT *et al.*, 1996) consiste na substituição de uma guanina por uma adenina na posição 20210. Não ocorre síntese de protrombina mutante e sim maior estabilidade de seu RNA mensageiro, além de um aumento da concentração plasmática de protrombina, o que parece ser o mecanismo pelo qual predispõe à ocorrência de trombose (RAFFINI, 2009).

O FVL e o Fator II G20210A contribuem para aumentar a trombina por estimular a formação do complexo protrombinase por diferentes vias, sendo ambos os fatores de risco hereditários mais comuns para tromboembolismo venoso (GUIMARÃES *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

A mutação FIIG20210A está presente em cerca de 1 a 3% da população caucasóide e, assim como descrito para o FVL, é rara nas populações negras e asiáticas (FRANCO, 2004). Em pacientes com história de trombose há relatos de uma prevalência em torno de 16 a 18%, sendo a segunda mais comum causa de trombofilia genética (RAMOS *et al.*, 2008).

Portadores do alelo G20210A do Fator II têm risco aumentado para trombose, o que varia entre 2,7 a 3,8 vezes e é associado com trombose venosa cerebral. A presença simultânea do FVL e da mutação G20210A do Fator II aumenta o risco para TV quando comparado com o risco entre portadores heterozigotos para FVL (POORT *et al.*, 1996).

A MTHFR é uma enzima chave no metabolismo da homocisteína. O seu gene tem 77 kb com 11 éxons e 10 íntrons e está localizado no braço curto do cromossomo 1, região 36 (1p36) (FROSST *et al.*, 1995). A mutação do tipo

*missense* no gene da MTHFR promove a substituição do nucleotídeo citosina por timina (C→T no nucleotídeo 677, éxon 4) (Mc CULLY, 1996), o que leva à troca do aminoácido alanina para a valina no gene da MTHFR; esta mutação é ,também, associada a uma forma de enzima termo lábil de baixa atividade biológica. Altos níveis de homocisteína no soro ou plasma foram atribuídos à presença do polimorfismo C677T da MTHFR, em associação com baixos níveis de folato e vitamina B12 (COUTO *et al.*, 2004b). A homocisteína é um aminoácido não essencial, formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo.

O polimorfismo C677T da MTHFR associado com elevação da homocisteína representa fator de risco para eventos tromboembólicos venosos e arteriais. Além disso, o polimorfismo C677T da MTHFR tem sido associado com necrose asséptica de cabeça de fêmur em pacientes com doença falciforme (COUTO *et al.*, 2004a; FROSST *et al.*, 1995; KUTLAR *et al.*, 2001).

Grandes estudos prospectivos têm reportado associação entre concentração de fator VIII elevada e eventos cardiovasculares (GREEN, 2009). O fator VIII, conhecido como fator antihemofílico (FVIII), é um pró-cofator não enzimático da coagulação que circula no plasma complexado com uma proteína multimérica que o estabiliza e protege de degradação, o Fator de Von Willebrand. Sintetizado no fígado, o FVIII é ativado a FVIIIa pela trombina, ligando-se ao FIX, formando um complexo que catalisa a conversão do Fator X a Fator Xa. Esta etapa é crítica para produzir a fase de propagação da geração de trombina (BRUMMEL-ZIEDINS *et al.*, 2004). O gene do FVIII localiza-se no braço longo do cromossomo X na banda Xq28. É constituído de 186 kilobases (kb) e codifica uma cadeia polipeptídica de 2.351 aminoácidos a qual dará origem ao fator VIII, uma proteína de 2.332 aminoácidos (FRANCO, 2004).

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune e consiste na trombofilia adquirida mais comum; cursa com a presença de anticorpos antifosfolípidos (AAF), tais como anticorpos anticardiolipina (ACA), antiβ2glicoproteína I (Aβ2GPI), antifosfatidilserina (aPS), anticoagulante lúpico (AL); clinicamente apresenta trombose recorrente, arterial ou venosa, aborto de repetição, plaquetopenia, dentre outros sintomas. Promove um estado de hipercoagulabilidade, associando-se a trombose venosa profunda e arterial (flebite, veia cava, renal),

embolia pulmonar, trombose coronária, trombose na artéria retiniana, eventos neurológicos (derrame cerebral), trombose cutânea (gangrena distal, *livedo reticularis* - lesão cutânea reticulada indolor de cor vermelho-azulada, sendo mais comum em extremidades), aborto recorrente e plaquetopenia (DEVRESSE; PEERLINCK; HOYALAERTS, 2010).

*“Mas a morte zomba dos enigmas. Ela é que os propõe.”*  
Maurice Druon

## 2.2 Anemia Falciforme

Aproximadamente 270 milhões de pessoas portam genes que determinam presença de hemoglobinas anormais no mundo. A anemia falciforme (AF) é uma das hemoglobinopatias mais comumente encontradas no mundo, na África subsahariana, freqüentemente no Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. No Brasil, cerca de 4% da população é portadora do traço falciforme, nascendo anualmente 3,5 mil crianças com a forma homozigótica e mais de 8 000 afetados (BRASIL, 2002; CANÇADO; JESUS, 2007; WANG, 2004).

As síndromes falciformes englobam toda condição onde há presença da hemoglobina S, resulta da troca do, aminoácido glutamina por valina ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) no gene da cadeia beta-globina da hemoglobina. Existem diversas variantes, desde o heterozigoto que herda um gene de hemoglobina beta A, e outro gene de globina beta S. Este é o traço falciforme, que tem maior importância no aconselhamento genético (BANDEIRA *et al.*, 2007; MURAO; FERRAZ, 2007). As variantes comuns de doença falciforme são a anemia falciforme homozigota (AF) - doença da hemoglobina SS – HbSS -, a doença falciforme com dupla heterozigose para hemoglobina C e S (doença da hemoglobina SC – HbSC), e as  $\beta$ -talassemias falciformes, que são a coexistência do gene S e da talassemia, outra anemia hemolítica hereditária, podendo se apresentar comumente nas formas HbS  $\beta^0$  e  $\beta^+$ .

No final do século XV e início do XVI, a Europa estava no seu apogeu em virtude do domínio da navegação. Os conquistadores europeus – especificamente

espanhóis e portugueses – iniciaram a colonização da América recém descoberta implementando um sistema produtivo baseado na mão-de-obra escrava (KALCKMANN *et al.*, 2007). Assim, cerca de 3,6 milhões de negros africanos foram trazidos, o que disseminou o gene S no Brasil (BRASIL, 2002), (Figura 1). Devido à miscigenação ocorrida no Brasil, a doença falciforme pode ser identificada também em brancos (BRASIL, 2002).



Figura 1. Origem e dispersão do gene S no Brasil.  
Fonte: Salzano (1986)

A AF caracteriza-se por episódios de crises vaso-oclusivas (CVO) que respondem por alta morbi-mortalidade na infância (BRASIL, 2009).

Sabe-se que vários fatores modulam a doença, tais como os haplótipos e os níveis de hemoglobina fetal (HbF), um dos modificadores da doença, pois níveis elevados de HbF melhoram o quadro clínico da AF (FIGUEIREDO, 2007; LETTRE *et al.*, 2008). Os níveis de HbF estão relacionados com o haplótipo associado ao gene da HbS. O haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF (> 15%) e curso clínico menos grave da doença; o Benin, a níveis medianos de HbF (5% a 15%) e curso clínico intermediário; o Bantu ou República Centro Africana, a níveis diminuídos de HbF (<5%) e quadro clínico mais grave; e o haplótipo Árabe-Indiano, que apresenta níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo. O haplótipo Benin (BEN) tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro

Africana (CAR) à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico-Occidental; o Árabe-Indiano à Índia e Península Arábica e o Camarões à Costa Ocidental Africana. Segundo BEZERRA *et al.*, (2007), o estado de Pernambuco apresenta alta frequência do haplótipo Bantu, que apresenta curso clínico mais grave.

A doença se manifesta com anemia crônica, dor constante, CVO recorrentes, como também crise aplástica, crise de sequestração esplênica, acidente vascular cerebral (AVC), lesões oftálmicas, cardíacas, pulmonares e renais, colelitíase, necrose asséptica de cabeça de fêmur (NACF), priapismo, úlcera de perna e alterações no crescimento e desenvolvimento. As dores recorrentes e complicações causadas pela doença interferem com aspectos da vida dos pacientes, restringindo sua qualidade e expectativa de vida (BRASIL, 2009).

Têm sido descritas evidências de ativação da coagulação, das plaquetas e endotélio na AF, além de hipercoagulabilidade (ATAGA *et al.*, 2008; ATAGA; CAPELLINI; RACHMILEWITZ, 2007; ATAGA, 2009a ; BEZERRA, 2009; BLANN *et al.*, 2003; BLUM *et al.*, 2005; GLADWIN; KATO, 2008; NSIRIL *et al.*, 1996; SETTY *et al.*, 2008; WUN *et al.*, 1997).

Pacientes com DF e  $\beta$ -talassemia apresentam níveis reduzidos de proteínas anticoagulantes, como proteína C, antitrombina, proteína S, além de marcadores de geração de trombina aumentados e ativação plaquetária (BEZERRA, 2009; SHIMIZU, 2001; WUN *et al.*, 1997). Foram demonstrados níveis elevados de marcadores de ativação plaquetária e plasmáticas, tanto em *steady state* como nas crises vaso-oclusivas, além de elevação dos níveis de ativação de protrombina por Xa por hemácias com hemoglobina SS, SC e AS (BEZERRA, 2009).

Pacientes com AF manifestam complicações trombóticas, AVC trombótico, TVP e EP, causados por obstruções extensas de vasos com trombose sobrepostas. Várias publicações demonstram a presença de trombose venosa e arterial. Séries de autópsias mostraram evidências de trombos recentes e antigos na vasculatura pulmonar (DOWLING *et al.*, 2009; PLATT *et al.*, 1994; STEIN *et al.*, 2006).

Estudos sobre o impacto da trombofilia para a sintomatologia da DF são controversos, com desenhos que incluem portadores das várias formas de DF, inclusive o traço falciforme. Além disso, a trombofilia hereditária tem distribuição étnica, com relatos de prevalência variável em pacientes de DF (ADEKILE *et al.*,

2001; ANDRADE *et al.*, 1998; BAYAZIT & KILINÇ, 2001; KORDES, *et al.*, 2002; KUTLAR *et al.*, 2001; RAHIMI *et al.*, 2008).

Os indivíduos afetados por trombofilia adquirida ou hereditária têm mais propensão a tromboembolismo venoso e arterial. Portadores de anemia falciforme (AF) são suscetíveis a episódios trombóticos. Desse modo, não existem informações acerca de marcadores para trombofilia em pacientes falciformes atendidos no HEMOPE. No Brasil e no mundo estes dados são insuficientes para afirmar que o impacto da trombofilia no agravamento clínico das doenças falciformes é conhecido.

### **3 Justificativa**

Nascem no Brasil cerca de 3 000 crianças com AF. O Hospital de Hematologia do HEMOPE tem cadastrados cerca de 1200 pacientes portadores de anemia falciforme, condição das mais prevalentes no estado de Pernambuco.

A AF evolui cronicamente causando danos físicos e emocionais às pessoas acometidas, considerada um problema de saúde pública e uma prioridade dos governos estadual e federal (BRASIL, 2001). Até o presente momento não se dispõe de tratamento curativo.

Embora tenha a mesma causa genética, afeta o corpo de maneira diferente de pessoa para pessoa. Considerando que todos os componentes da prevenção e tratamento da AF devem ser analisados de forma multidisciplinar, bem como o impacto de fatores de risco e comorbidades, evidencia-se a necessidade de pesquisas no campo dos marcadores de risco para fenômenos vaso-oclusivos na AF

#### **4 Pergunta condutora da pesquisa**

Qual a importância de trombofilia na relação entre HbS em homozigose e crise vaso-oclusiva?

## **5 Definição de Objetivos**

### **5.1 Geral**

Identificar marcadores de trombofilia em portadores de anemia falciforme com relação a eventos vaso-oclusivos.

### **5.2 Específicos**

- a) Determinar a prevalência de eventos vaso-oclusivos em portadores de AF.
- b) Determinar a prevalência de marcadores de trombofilia em portadores de AF.

## **6 Metodologia**

### **6.1 Local e período do estudo**

O estudo foi realizado entre março de 2005 a agosto de 2009, no Hospital Hemope, no Laboratório Especializado de Hemostasia, com a contribuição do Laboratório de Hemoglobinopatias e do Arquivo Médico.

### **6.2 População alvo**

Foi constituída pelos 1161 pacientes portadores de anemia falciforme cadastrados no Hospital Hemope.

Entre março de 2005 a agosto de 2009, pacientes portadores de Anemia Falciforme cadastrados no Hemope foram captados consecutivamente por busca ativa na Coleta Ambulatorial do Hospital Hemope.

Após consentimento informado, amostras de sangue e dados de prontuário (APÊNDICE A) foram coletados.

### **6.3 Desenho do Estudo**

Estudo tipo série de casos. Foram captados durante o período citado acima, sob demanda, pacientes com AF no Ambulatório do Hospital Hemope.

### **6.4 Critérios de Inclusão**

Pacientes portadores do gene S em homozigose, HbSS, que concordassem em participar do estudo, fora de crise falciforme – em *steady state*, após dado o consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou seu responsável (no caso de menor).

### 6.5 Critérios de exclusão

Pacientes HbSS em crise hemolítica ou vaso-oclusiva, no curso de infecções agudas, uso de medicamentos tais como anticoagulante, contraceptivo oral ou antiagregante plaquetário.

Pacientes cujos prontuários não tinham informações consistentes quanto ao seu diagnóstico e acompanhamento no Hospital Hemope.

Foram excluídos 10 pacientes porque na consulta do prontuário o diagnóstico de anemia falciforme não foi confirmado.

Pacientes que estivessem sendo assistidos no Serviço de Pronto Atendimento do Hemope.

Pacientes que se recusassem em participar do estudo.

### 6.6 Eventos vaso-oclusivos

Os eventos da AF analisados neste estudo têm como base fisiopatológica a vaso-oclusão (BANDEIRA, 2004).

Considerou-se eventos vaso-oclusivos (EVO) nesse estudo episódios de síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral isquêmico (AVC), necrose asséptica de cabeça de fêmur (NACF), priapismo, síndrome mão-pé (SMP), e a referência explícita em prontuário de 'crise vaso-oclusiva' (CVO).

Foram definidos cada um desses EVO da seguinte forma:

- a) Síndrome torácica aguda: dor torácica, infecção, infiltrado pulmonar respiratório recente no raio-X e febre;

- b) Acidente vascular cerebral isquêmico: diagnosticado a partir de relato em prontuário médico confirmado por avaliação neurológica clínica, ou por imagem;
- c) Necrose óssea ou asséptica de cabeça de fêmur: diagnosticada por exame de imagem ou parecer ortopédico;
- d) Priapismo: ereção dolorosa do pênis que pode ocorrer em episódios breves e recorrentes, ou episódios longos, podendo causar impotência sexual;
- e) Síndrome mão-pé: crise de dor, dactilite, inflamação nos dedos, que ocorre nos pequenos ossos das mãos e pés, com edema destes membros;
- f) Crise vaso-oclusiva: admissão hospitalar por episódio doloroso na ausência de outra causa que não a doença de base, requerendo uso de medicação narcótica.

Segundo Pegelow *et al.*, (2002), há pacientes com anemia falciforme que podem apresentar crise vaso-oclusivas silenciosas, sub-clínicas. Neste estudo, foi considerado paciente com EVO aquele que apresentou relato em prontuário, a partir de diagnóstico clínico.

## 6.7 Variáveis do Estudo

A presença de marcadores de trombofilia e eventos vaso-oclusivos.

- a. Anticorpos antifosfolípidos:
  - i. Anticorpo anticardiolipina IgG/IgM: presente ou ausente;
  - ii. Anticorpo Anti $\beta$ 2glicoproteína I IgG/IgM: presente ou ausente;
  - iii. Anticorpo antifosfatidilserina IgG/IgM: presente ou ausente;
  - iv. Anticorpo ou anticoagulante lúpico: presente ou ausente;
  - v. Mutação R506Q Fator V de Leiden: como heterozigoto, homozigoto ou ausente;
- b. Mutação do Fator II G20210 A: interpretados e categorizados como heterozigoto, homozigoto ou ausente;
- c. Polimorfismo C677T na metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR): heterozigoto, homozigoto ou ausente;

- d. Atividade de antitrombina: reduzida ou normal;
- e. Fator VIII: elevado ou normal.
- f. Idade: até 12 anos; de 13 a 18 anos; de 19 a 29 anos; de 30 a 40; e > de 40 anos;
- g. Sexo: masculino e feminino;
- h. Crise vaso-oclusiva: sim ou não;
- i. Síndrome torácica aguda: sim ou não;
- j. Acidente vascular cerebral isquêmico: sim ou não;
- k. Necrose óssea ou necrose asséptica de cabeça de fêmur: sim ou não;
- l. Priapismo: sim ou não.
- m. Síndrome mão-pé: sim ou não.

## 6.8 Análise dos dados

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais (técnicas de estatística descritiva) e foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher quando aplicável; nas Tabelas bivariadas, obteve-se o risco relativo para cada um dos eventos vasos oclusivos com intervalo de 95% de confiança (técnicas de estatística inferencial).

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

## 6.9 Considerações éticas

Os pacientes selecionados eram informados sobre o teor do projeto e, após consentimento informado do paciente ou responsável (APÊNDICES B, C), a coleta das amostras e dos dados era utilizada. Os pacientes foram esclarecidos que a não-

concordância em participar da pesquisa ou se, a qualquer momento, quisessem sair do estudo, não acarretaria em prejuízos para o seu acompanhamento e tratamento no HEMOPE.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE (ANEXO A).

#### 6.10 Testes laboratoriais

Após consentimento informado (APÊNDICE B, C), amostras de sangue periférico foram coletadas com mínimo de estase e assim distribuídas: um tubo de 4,5 ml de sangue sem anticoagulante para os testes de enzimaímoensaio; um tubo de 4,5 ml de sangue anticoagulado com ácido etilenotetradiaacético (EDTA) para os testes moleculares e um tubo de 3,6 ml contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2% (0,109M) na proporção de 1:9 (9 partes de sangue para 1 de anticoagulante) para os testes em hemostasia. (ADCOCK; KRESSIN; MARLAR, 1997).

Testes de triagem - tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e determinação do fibrinogênio - foram realizados.

As amostras de plasma e soro foram então congeladas em alíquotas em ultracongelador (*freezer* a  $-80^{\circ}$  C) até a realização dos testes. Nesta temperatura, os analitos testados são estáveis por mínimo de seis meses.

As seguintes determinações foram feitas: anticorpos antifosfolípides - AAF - (anticoagulante lúpico, anticorpo anticardiolipina, anticorpo antifosfatidilserina, anticorpo anti $\beta$ 2 glicoproteína I), pesquisa da mutação G20210A do fator II, fator V de Leiden, polimorfismo G677T da MTHFR, atividade de antitrombina e dosagem do Fator VIII.

Os AAF ACA (BioSystems, Barcelona Espanha), A $\beta$ 2GPI, APS (ORGENTEC Diagnostica GmbH, Mainz, Alemanha), foram pesquisados por enzimaímoensaio para IgG e IgM. O AL foi investigado por técnica coagulométrica utilizando veneno de víbora Russel diluído, (Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

As pesquisas das mutações G20210A do fator II, fator V de Leiden, polimorfismo G677T da MTHFR foram realizadas por análise gênica com amplificação de DNA por PCR-RFLP e reconhecimento da mutação por digestão enzimática específica (BERTINA *et al.*, 1994; POORT *et al.*, 1996).

A atividade de antitrombina foi determinada por técnica cromogênica funcional (Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

A dosagem do Fator VIII foi realizada pela técnica coagulométrica em 1 estágio.

As técnicas estão descritas na Seção APÊNDICE.

## 7 Resultados

A população estudada tinha, em sua maioria, entre 2 a 29 anos. Apenas 6 pacientes tinham mais de 40 anos. Pouco mais da metade era do sexo feminino (Tab. 1).

Tabela 1 – Distribuição de portadores de AF analisados para marcadores de trombofilia segundo a faixa etária e o sexo, atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	n	%
<b>• Faixa etária</b>		
Até 12	32	32,0
13 a 18	18	18,0
19 a 29	25	23,0
30 a 40	19	19,0
Acima de 40	6	6,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>• Sexo</b>		
Masculino	45	45,0
Feminino	55	55,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>

A prevalência de eventos vaso-oclusivos (EVO) foi 88%. O evento CVO foi o mais freqüente, seguido de STA e SMP (Tab. 2).

Tabela 2 – Prevalência de eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

EVO	Sim		Não	
	N	% <sup>(1)</sup>	N	% <sup>(1)</sup>
Síndrome Torácica Aguda	35	35,0	65	65,0
Acidente Vascular Cerebral isquêmico	15	15,0	85	85,0
Necrose Asséptica de Cabeça de Fêmur	6	6,0	94	94,0
Priapismo <sup>(2)</sup>	7	15,6	38	84,4
Síndrome Mão Pé	30	30,0	70	70,0
Crise Vaso-Oclusiva	79	79,0	21	21,0
<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>88,0</b>	<b>12</b>	<b>12,0</b>

(1): O cálculo dos percentuais foi retirado com base no número total de pacientes analisados (n = 100) exceto para priapismo.

2): O cálculo foi obtido com base no número de pacientes do sexo masculino.

A prevalência de AAF foi elevada, predominando os A $\beta$ 2GPI do tipo IgG (Tab. 3, APENDICE D). Não foram identificados pacientes com ACA do tipo IgM.

Tabela 3 – Prevalência de anticorpos antifosfolípedes em portadores de AF atendidos no Hospital HEMOPE (n=30)

AAF	Positivo		Negativo		NR	
	N	%	n	%	n	%
ACA IgG	8	8,0	69	69,0	23	23,0
A $\beta$ 2GPI	12	12,0	78	78,0	10	10,0
aPS IgG	9	9,0	82	82,0	9	9,0
Anticoagulante lúpico	8	8,0	82	82,0	10	10,0
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>37</b>	<b>65</b>	<b>65,0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Os pacientes analisados não apresentaram a mutação R506Q do Fator V, Fator V de Leiden. Apenas 1 paciente apresentou a mutação G20210A da Protrombina em heterozigose. Foram heterozigotos para o polimorfismo C677T da MTHFR 41,0% dos pacientes testados.

A deficiência de AT foi identificada em 5% dos pacientes. A maioria dos pacientes apresentou trombofilia (Tab. 4).

Tabela 4 – Prevalência de deficiência de Antitrombrina e de Trombofilia em 100 portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	n	%
<b>Antitrombrina</b>		
Normal	89	89,0
Reduzida	5	5,0
NR	6	6,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Trombofilia</b>		
Presente	62	62,0
Ausente	38	38,0
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>

Nas Tabelas 5 a 13 são apresentados estudo da associação entre a ocorrência de cada EVO com cada uma das variáveis: faixa etária, sexo, trombofilia, ACAIgG, A $\beta$ 2GPI, aPS IgG, Anticoagulante lúpico, MTHFR, deficiência de Antitrombina, FVIII elevado.

Tabela 5 – Trombofilia em relação a eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

	<b>RR (IC a 95%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>STA</b>	1,17 (0,66 - 2,08)	p <sup>(1)</sup> = 0,574
<b>AVCi</b>	1,43 (0,56 – 3,62)	p <sup>(1)</sup> = 0,453
<b>NACF</b>	1,63 (0,35 – 7,68)	p <sup>(1)</sup> = 0, 671
<b>Priapismo</b>	3,31 (0,44 – 25,13)	p <sup>(1)</sup> = 0,393
<b>SMP</b>	1,69 (0,84 – 3,40)	p <sup>(1)</sup> = 0,177
<b>CVO</b>	1,25 (0,98 – 1,59)	p <sup>(1)</sup> = 0,042*
<b>EVO</b>	1,07 (0,91 – 1,26)	p <sup>(1)</sup> = 0,364

Nota: (1): Qui-quadrado de Pearson.

\*Associação significativa a 5,0%

RR: risco relativo STA: síndrome torácica aguda AVC: acidente vascular cerebral NACF: necrose asséptica de cabeça de fêmur SMP: síndrome mão-pé CVO: crise vaso-oclusiva EVO: eventos vaso-oclusivos

STA não apresentou associação com nenhuma das trombofilias analisadas (Tab. 6).

Tabela 6 – Avaliação de trombofilias frente à síndrome torácica aguda em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	STA				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	N	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	3	37,5	5	62,5	8	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,00
Negativo	26	37,7	43	62,3	69	100,0		
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>37,7</b>	<b>48</b>	<b>62,3</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		1,00 (0,39 a 2,58)
<b>• Aβ2GPI</b>								
Positivo	6	50,0	6	50,0	12	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,527	1,34 (0,71 a 2,54)
Negativo	29	37,2	49	62,8	78	100,0		
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>38,9</b>	<b>55</b>	<b>61,1</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• aPS IgG</b>								
Positivo	3	33,3	6	66,7	9	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,17 (0,45 a 3,07)
Negativo	32	39,0	50	61,0	82	100,0		
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>38,5</b>	<b>56</b>	<b>61,5</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	2	20,0	8	80,0	10	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,308	2,00 (0,56 a 7,11)
Ausente	32	40,0	48	60,0	80	100,0		
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>37,8</b>	<b>56</b>	<b>62,2</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• MTHFR</b>								
Normal	12	27,9	31	72,1	43	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,103	1,00
Heterozigoto	18	43,9	23	56,1	41	100,0		
Homozigoto	-	-	4	100,0	4	100,0		
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>34,1</b>	<b>58</b>	<b>65,9</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		1,57 (0,87 a 2,84) **
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	33	37,1	56	62,9	89	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,00
Reduzida	2	40,0	3	60,0	5	100,0		
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>37,2</b>	<b>59</b>	<b>62,8</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		1,08 (0,36 a 3,26)
<b>• FVIII</b>								
Normal	11	52,4	10	47,6	21	100,0	p <sup>(2)</sup> = 0,075	1,00
Elevado	12	29,3	29	70,7	41	100,0		
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>37,1</b>	<b>39</b>	<b>62,9</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		1,79(0,96,a 3,35)

Notas: (1): Testa exato de Fisher. (2): Teste Qui-quadrado de Pearson. (\*\*): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.

Das trombofilias estudadas, Aβ2GPI apresentou associação significativa com AVCi. O risco relativo foi elevado (Tab. 7).

Tabela 7 – Avaliação de trombofilias frente a acidente vascular cerebral isquêmico em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	AVC – anterior				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	N	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	-	-	8	100,0	8	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,587	**
Negativo	10	14,5	59	85,5	69	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>10</b>	<b>13,0</b>	<b>67</b>	<b>87,0</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Aβ2GPI</b>								
Positivo	5	41,7	7	58,3	12	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,026*	3,25 (1,34 a 7,87)
Negativo	10	12,8	68	87,2	78	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>15</b>	<b>16,7</b>	<b>75</b>	<b>83,3</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• Anti-PSIgG</b>								
Positivo	2	22,2	7	77,8	9	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,639	1,40 (0,37 a 5,25)
Negativo	13	15,9	69	84,1	82	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>15</b>	<b>16,5</b>	<b>76</b>	<b>83,5</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	1	10,0	9	90,0	10	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,75 (0,26 a 11,93)
Ausente	14	17,5	66	82,5	80	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>15</b>	<b>16,7</b>	<b>75</b>	<b>83,3</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		1,00
<b>• MTHFR</b>								
Normal	9	20,9	34	79,1	43	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,453	1,00
Heterozigoto	5	12,2	36	87,8	41	100,0		
Homozigoto	-	-	4	100,0	4	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>14</b>	<b>15,9</b>	<b>74</b>	<b>84,1</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		0,58 (0,21 a 1,59)
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	15	16,9	74	83,1	89	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Reduzida	-	-	5	100,0	5	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>15</b>	<b>16,0</b>	<b>79</b>	<b>84,0</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	2	9,5	19	90,5	21	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,705	1,00
Elevado	6	14,6	35	85,4	41	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>8</b>	<b>12,9</b>	<b>54</b>	<b>87,1</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		1,54 (0,34 a 6,97)

Nota: (\*): Associação significativa à 5,0 %.

(\*\*): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.

(1): Teste Exato de Fisher.

Das variáveis apresentadas na Tabela 8 nenhuma mostra associação significativa com NACF ( $p > 0,05$ ).

Tabela 8 – Avaliação das trombofilias frente à necrose asséptica de cabeça de fêmur em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	NACF				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	n	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	1	12,5	7	87,5	8	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,431	2,16 (0,27 a 17,01)
Negativo	4	5,8	65	94,2	69	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>5</b>	<b>6,5</b>	<b>72</b>	<b>93,5</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Aß2GPI</b>								
Positivo	1	8,3	11	91,7	12	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,587	1,30 (0,17 a 10,19)
Negativo	5	6,4	73	93,6	78	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>6,7</b>	<b>84</b>	<b>93,3</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• aPS IgG</b>								
Positivo	-	-	9	100,0	9	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Negativo	6	7,3	76	92,7	82	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>6,6</b>	<b>85</b>	<b>93,4</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	-	-	10	100,0	10	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Ausente	6	7,5	74	92,5	80	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>6,7</b>	<b>84</b>	<b>93,3</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• MTHFR</b>								
Normal	3	7,0	40	93,0	43	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,402	1,00
Heterozigoto	2	4,9	39	95,1	41	100,0		0,70 (0,12 a 3,97)
Homozigoto	1	25,0	3	75,0	4	100,0		3,58 (0,48 a 26,96)
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>6,8</b>	<b>82</b>	<b>93,2</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	6	6,7	83	93,3	89	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Reduzida	-	-	5	100,0	5	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>6,4</b>	<b>88</b>	<b>93,6</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	-	-	21	100,0	21	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,290	**
Elevado	4	9,8	37	90,2	41	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>4</b>	<b>6,5</b>	<b>58</b>	<b>93,5</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (\*\*): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.  
(1): Teste Exato de Fisher.

A Tabela 9 mostra que a prevalência de priapismo foi nula entre os pacientes que tinham de 13 a 18 anos e variou de 18,8% a 19,0% nas outras duas faixas etárias.

Tabela 9 – Distribuição de priapismo em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE, segundo a faixa etária

Faixa etária	Priapismo				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	n	%	n	%		
Até 12	3	18,8	13	81,3	16	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,644	1,00
13 a 18	-	-	8	100,0	8	100,0		**
19 ou mais	4	19,0	17	81,0	21	100,0		1,02 (0,26 a 3,91)
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>15,6</b>	<b>38</b>	<b>84,4</b>	<b>45</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (\*\*): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.  
(1): Teste Exato de Fisher.

Embora diferenças elevadas na prevalência de priapismo tenham sido verificadas em algumas variáveis, entretanto devido ao reduzido número de pacientes em algumas categorias não se comprova associação significativa entre priapismo e as trombofilias (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação das trombofilias frente a priapismo em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	Priapismo				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		N	%		
	N	%	N	%	N	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	2	40,0	3	60,0	5	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,169	3,30 (0,80 a 13,56)
Negativo	4	12,1	29	87,9	33	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>6</b>	<b>15,8</b>	<b>32</b>	<b>84,2</b>	<b>38</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Aβ2GPI</b>								
Positivo	1	25,0	3	75,0	4	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,523	1,63 (0,26 a 10,34)
Negativo	6	15,4	33	84,6	39	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>16,3</b>	<b>36</b>	<b>83,7</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anti-PSIgG</b>								
Positivo	-	-	3	100,0	3	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Negativo	7	17,5	33	82,5	40	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>16,3</b>	<b>36</b>	<b>83,7</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	2	33,3	4	66,7	6	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,290	1,00
Ausente	5	15,2	28	84,8	33	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>17,9</b>	<b>32</b>	<b>82,1</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>		
<b>• MTHFR</b>								
Normal	2	11,8	15	88,2	17	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,597	1,00
Heterozigoto	4	23,5	13	76,5	17	100,0		
Homozigoto	1	25,0	3	75,0	4	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>18,4</b>	<b>31</b>	<b>81,6</b>	<b>38</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	7	17,5	33	82,5	40	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	**
Reduzida	-	-	3	100,0	3	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>16,3</b>	<b>36</b>	<b>83,7</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	1	9,1	10	90,9	11	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,631	1,00
Elevado	4	20,0	16	80,0	20	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>5</b>	<b>16,1</b>	<b>26</b>	<b>83,9</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>		
<b>• AAF</b>								
Presente	4	30,8	9	69,2	13	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,172	3,08 (0,80 a 11,85)
Ausente	3	10,0	27	90,0	30	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>7</b>	<b>16,3</b>	<b>36</b>	<b>83,7</b>	<b>43</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (\*\*): Não foi possível determinar devido a ocorrência de frequência nula. (1): Teste Exato de Fisher.

Não foi verificada associação significativa de nenhum dos marcadores de trombofilia com síndrome mão-pé (Tabela 11).

Tabela 11 – Avaliação das trombofilias frente à síndrome mão-pé em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	SMP				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	N	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	3	37,5	5	62,5	8	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,682	1,36 (0,51 a 3,60)
Negativo	19	27,5	50	72,5	69	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>22</b>	<b>28,6</b>	<b>55</b>	<b>71,4</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Aβ2GPI</b>								
Positivo	4	33,3	8	66,7	12	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,747	1,13 (0,47 a 2,70)
Negativo	23	29,5	55	70,5	78	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>27</b>	<b>30,0</b>	<b>63</b>	<b>70,0</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anti-PSIgG</b>								
Positivo	3	33,3	6	66,7	9	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,14 (0,43 a 3,04)
Negativo	24	29,3	58	70,7	82	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>27</b>	<b>29,7</b>	<b>64</b>	<b>70,3</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	3	30,0	7	70,0	10	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,04 (0,38 a 2,86)
Ausente	23	28,8	57	71,3	80	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>26</b>	<b>28,9</b>	<b>64</b>	<b>71,1</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• MTHFR</b>								
Normal	9	20,9	34	79,1	43	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,193	1,00
Heterozigoto	16	39,0	25	61,0	41	100,0		
Homozigoto	1	25,0	3	75,0	4	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>26</b>	<b>29,5</b>	<b>62</b>	<b>70,5</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	26	29,2	63	70,8	89	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,00
Reduzida	1	20,0	4	80,0	5	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>27</b>	<b>28,7</b>	<b>67</b>	<b>71,3</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	5	23,8	16	76,2	21	100,0	p <sup>(2)</sup> = 0,308	1,00
Elevado	15	36,6	26	63,4	41	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>20</b>	<b>32,3</b>	<b>42</b>	<b>67,7</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		
<b>• AAF</b>								
Presente	11	35,5	20	64,5	31	100,0	p <sup>(2)</sup> = 0,371	1,34 (0,71 a 2,50)
Ausente	17	26,6	47	73,4	64	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>28</b>	<b>29,5</b>	<b>67</b>	<b>70,5</b>	<b>95</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (1): Teste Exato de Fisher.

(2): Teste Qui-quadrado de Pearson.

Das variáveis contidas na Tabela 12, MTHFR em heterozigose demonstrou associação significativa com CVO.

Tabela 12 – Marcadores de trombofilia em relação a crises vaso-oclusivas em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE

Variável	CVO				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	N	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	6	75,0	2	25,0	8	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,632	1,00
Negativo	57	82,6	12	17,4	69	100,0		1,10 (0,73 a 1,67)
<b>Grupo Total</b>	<b>63</b>	<b>81,8</b>	<b>14</b>	<b>18,2</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Aβ2GPI</b>								
Positivo	10	83,3	2	16,7	12	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,03 (0,78 a 1,36)
Negativo	63	80,8	15	19,2	78	100,0		1,00
<b>Grupo Total</b>	<b>73</b>	<b>81,1</b>	<b>17</b>	<b>18,9</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anti-PSIgG</b>								
Positivo	8	88,9	1	11,1	9	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,10 (0,86 a 1,42)
Negativo	66	80,5	16	19,5	82	100,0		1,00
<b>Grupo Total</b>	<b>74</b>	<b>81,3</b>	<b>17</b>	<b>18,7</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	6	60,0	4	40,0	10	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,108	1,38 (0,82 a 2,30)
Ausente	66	82,5	14	17,5	80	100,0		1,00
<b>Grupo Total</b>	<b>72</b>	<b>80,0</b>	<b>18</b>	<b>20,0</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• MTHFR</b>								
Normal	28	65,1	15	34,9	43	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,016*	1,00
Heterozigoto	37	90,2	4	9,8	41	100,0		1,39 (1,09 a 1,76)
Homozigoto	3	75,0	1	25,0	4	100,0		1,15 (0,63 a 2,11)
<b>Grupo Total</b>	<b>68</b>	<b>77,3</b>	<b>20</b>	<b>22,7</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		
Normal	72	80,9	17	19,1	89	100,0	p <sup>(1)</sup> = 1,000	1,01 (0,64 a 1,59)
Reduzida	4	80,0	1	20,0	5	100,0		1,00
<b>Grupo Total</b>	<b>76</b>	<b>80,9</b>	<b>18</b>	<b>19,1</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	14	66,7	7	33,3	21	100,0	p <sup>(1)</sup> = 0,107	1,00
Elevado	35	85,4	6	14,6	41	100,0		1,28 (0,92 a 1,78)
<b>Grupo Total</b>	<b>49</b>	<b>79,0</b>	<b>13</b>	<b>21,0</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		
<b>• AAF</b>								
Presente	25	80,6	6	19,4	31	100,0	p <sup>(2)</sup> = 0,944	1,00
Ausente	52	81,3	12	18,8	64	100,0		1,01 (0,82 a 1,24)
<b>Grupo Total</b>	<b>77</b>	<b>81,1</b>	<b>18</b>	<b>18,9</b>	<b>95</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (\*): Associação significativa à 5,0%.

(1): Teste Exato de Fisher.

(2): Teste Qui-quadrado de Pearson.

Das variáveis contidas na Tabela 13, níveis de FVIII aumentados mostraram associação significativa com EVO ( $p < 0,05$ , entretanto o intervalo para RR inclui o valor 1,00).

Tabela 13 – Marcadores de trombofilia em relação a eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme atendidos no Hospital HEMOPE.

Variável	EVO				TOTAL		Valor de p	RR (IC a 95%)
	Sim		Não		n	%		
	n	%	N	%	n	%		
<b>• ACAIgG</b>								
Positivo	8	100,0	-	-	8	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	**
Negativo	63	91,3	6	8,7	69	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>71</b>	<b>92,2</b>	<b>6</b>	<b>7,8</b>	<b>77</b>	<b>100,0</b>		
<b>• A<math>\square</math>2GPI</b>								
Positivo	10	83,3	2	16,7	12	100,0	$p^{(1)} = 0,343$	1,00 1,09 (0,84 a 1,42)
Negativo	71	91,0	7	9,0	78	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>81</b>	<b>90,0</b>	<b>9</b>	<b>10,0</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• AntiPSIgG</b>								
Positivo	8	88,9	1	11,1	9	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	1,00 1,02 (0,80 a 1,29)
Negativo	74	90,2	8	9,8	82	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>82</b>	<b>90,1</b>	<b>9</b>	<b>9,9</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Anticoagulante lúpico</b>								
Presente	7	70,0	3	30,0	10	100,0	$p^{(1)} = 0,079$	1,00 1,30 (0,86 a 1,97)
Ausente	73	91,3	7	8,8	80	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>80</b>	<b>88,9</b>	<b>10</b>	<b>11,1</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>		
<b>• MTHFR</b>								
Normal	34	79,1	9	20,9	43	100,0	$p^{(1)} = 0,083$	1,00 1,20 (1,02 a 1,42) **
Heterozigoto	39	95,1	2	4,9	41	100,0		
Homozigoto	4	100,0	-	-	4	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>77</b>	<b>87,5</b>	<b>11</b>	<b>12,5</b>	<b>88</b>	<b>100,0</b>		
<b>• Antitrombina</b>								
Normal	80	89,9	9	10,1	89	100,0	$p^{(1)} = 0,438$	1,12 (0,72 a 1,75) 1,00
Reduzida	4	80,0	1	20,0	5	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>84</b>	<b>89,4</b>	<b>10</b>	<b>10,6</b>	<b>94</b>	<b>100,0</b>		
<b>• FVIII</b>								
Normal	17	81,0	4	19,0	21	100,0	$p^{(1)} = 0,041^*$	1,00 1,21 (0,97 a 1,49)
Elevado	40	97,6	1	2,4	41	100,0		
<b>Grupo Total</b>	<b>57</b>	<b>91,9</b>	<b>5</b>	<b>8,1</b>	<b>62</b>	<b>100,0</b>		

Nota: (\*): Associação significativa a 5,0%.

(\*\*): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.

(1): Teste Exato de Fisher.

## 8 Discussão

A presença de trombofilia na AF não aumentou o risco relativo para EVO de modo significativo, quando considerados juntos todos os tipos de trombofilias e eventos estudados. No entanto, ao se avaliar as trombofilias separadamente, observou-se associação significativa entre determinadas trombofilias e EVO específico.

Há que se fazer considerações a respeito desses resultados gerais antes de analisá-los detalhadamente. Os marcadores pesquisados no presente trabalho fazem parte do perfil de investigação de trombofilia recomendados atualmente e os resultados encontrados aqui sugerem que a trombofilia hereditária tem baixo impacto no desenvolvimento de EVO na AF.

A AF é usualmente encontrada em negros ou afro-descendentes, e a maioria das pesquisas com trombofilia foram sendo conduzidas em populações caucasianas. Todavia, história familiar de TE é tão comum em negros quanto em caucasianos, aliás, alguns estudos reportam incidência maior de TV em afro-americanos (CUSHMAN, 2007). Ademais, dispõe-se de escassa informação da epidemiologia da trombose na África, região do mundo onde está concentrada a maior população negra.

Apenas 9,1% de causas genéticas para trombose foram identificados em estudo com 142 casos de pacientes negros (PATEL *et al.*, 2003a). No Brasil, a prevalência do traço falciforme em grupos de anticoagulação oral parece ser semelhante a da população em geral (KANG; CARDOSO; MACHRY, 2009), o que evidencia que nos afro-descendentes a incidência de eventos TE se semelhante a outras etnias.

Portanto, os testes comumente utilizados para trombofilia hereditária têm um valor limitado na população negra (CUSHMAN, 2007; DOWLING *et al.*, 2003; PATEL; PATH; ARYA, 2003b). Ainda assim, vivemos num país com população miscigenada, donde Ramos *et al.*, (2006) e Ramos *et al.*, (2008) encontraram prevalência de marcadores de trombofilia semelhante aos relatos da literatura, em estudos conduzidos em pacientes atendidos na demanda do Hospital HEMOPE. Os indivíduos tinham etnia na sua maioria parda e branca, enquanto que os pacientes falciformes do presente estudo eram pardos ou negros, embora a DF possa ser

encontrada em brancos (BRASIL, 2002). Pela dificuldade de classificação de raça, optou-se no presente estudo em não considerar a cor/raça.

A partir das evidências acima, é possível que a falta de conhecimentos vigentes sobre quais fatores de risco para trombofilia investigar na população negra pode ter sido um fator limitante do presente estudo.

Por outro lado, o próprio estado de portador do traço falciforme parece representar risco para TEV. Estudo com 515 casos de afro-americanos hospitalizados, e 555 afro-americanos controles da clínica médica, encontrou prevalência do alelo S maior entre os pacientes com TEV (OR 1,8), indicando que o portador do traço falciforme tem quase o dobro de chance de TEV que aqueles com hemoglobina AA (AUSTIN *et al.*, 2007). No caso da população falciforme parece haver dificuldade de estabelecer valores seguros de referência para outros fatores de risco de eventos TE, como hipertensão, uma vez que na AF a pressão arterial normal parece ser mais baixa que na população em geral. Estudo mostrou que hipertensão sistólica em relação aos valores normais para portadores de AF aumentou o risco para ataque isquêmico, embora estivesse dentro dos limites de normalidade para a população não portadora de AF (PEGELow *et al.*, 1997). Além disso, os intervalos de referência precisam ser estabelecidos para os testes funcionais de trombofilia, como deficiência de Proteína C, Proteína S e Antitrombina para a população negra (JERRARD-DUNNE *et al.*, 2003).

O próprio Ministério da Saúde admite a lacuna de conhecimento científico para subsídios à tomada de decisões no campo da saúde da população negra, o que fere o princípio da equidade no SUS. A população negra representa metade da população brasileira e possui demandas e problemas específicos nas questões de saúde (BRASIL, 2005). No entanto, o acesso aos serviços de saúde varia para os diferentes grupos étnicos com maior desvantagem para os negros. Por exemplo, a esperança de vida ao nascer para as mulheres negras é menor que para as mulheres brancas. Além disso, a esperança de vida ao nascer na nossa região é de 73 anos, onde está concentrada a maior parte da população negra, enquanto nas regiões Sul e Sudeste é de 78 anos (BRASIL, 2008). Obviamente que há outras variáveis que interferem nessa diferença, que não são objetos do presente estudo, no entanto, este fato merece atenção. Sabe-se que um portador de AF nos Estados Unidos vive quase o dobro do que o mesmo indivíduo no Brasil. O fato de a AF ser

associada com o conceito de raça, uma “doença de negros” pode inconscientemente reforçar uma atitude negativa e estereótipos sobre negros – vistos como geneticamente deficientes -, e AF – exclusiva de negros (BEDIAKO; HAYWOOD, 2009). Desse modo, o estado de traço falciforme pode ser subestimado em brancos por eles próprios por não se identificarem com a DF, e pelos profissionais de saúde, lembrando que a AF também é encontrada em brancos no Brasil.

Não por acaso, os negros e pardos no Brasil representam 70% dos mais pobres, têm baixa escolaridade, e ainda são passíveis do persistente racismo institucional (BEDIAKO; HAYWOOD, 2009; BRASIL, 2007; CORDEIRO; FERREIRA, 2009; KALCKMANN *et al.*, 2007). A verdade é que o quadro de exclusão da população negra envolve múltiplos fatores históricos, e determina o agravamento de suas condições (como a AF), levando principalmente a prematuridade dos óbitos tanto para homens como para mulheres.

Outra questão a ser considerada aqui é que se estudaram fatores de risco (marcadores de trombofilia) para EVO. Ora, EVO são eventos que ocorrem por conta da falcização das hemácias SS sob desoxigenação, que é suficiente e responsável pelas manifestações patológicas vaso-oclusivas na AF, até por que o fenômeno da falcização é exclusivo da hemoglobina S. Sabe-se que a oclusão vascular na AF é constituída de massas de hemácias falcizadas. No entanto, grandes vasos podem estar obstruídos na AF por coágulos de fibrina (BENNET, 2006). Além de que, dados histopatológicos de autópsia demonstram que o trombo falciforme consiste de hemácias, recoberto por coágulo. Episódios de trombose têm papel importante na AF, cujos pacientes apresentam AVC trombótico, TVP e EP causadas por obstrução extensa de vasos com trombose sobrepostas (DOWLING *et al.*, 2009; PLATT *et al.*, 1994; STEIN *et al.*, 2006). Séries de autópsias de pacientes falciformes mostraram trombos recentes e antigos na vasculatura pulmonar. Assim, embora EVO pareçam não ter relação com fenômenos trombóticos, há evidências de que a coagulação seja ativada e contribua para aumentar o risco de vaso-oclusão, e a presença de trombofilia pode ser um agravante neste contexto clínico.

O conhecimento da coagulação como modelo celular e não como uma cascata de reações, considerando interação entre plaquetas, endotélio, vaso sanguíneo e proteínas da coagulação, coincide com o entendimento da fisiopatologia do EVO na AF como mecanismo multifatorial, que envolve não só a

falcização da hemácia, mas ativação plaquetária, moléculas de adesão como o Fator de von Willebrand, e o próprio vaso. Estudo em crianças portadoras de AF com AVC mostrou hiperplasia da íntima da parede vascular com trombose superposta de grandes artérias cerebrais, bem como que a osteonecrose de medula tipicamente ocorre em áreas onde há uma circulação colateral e podem envolver trombose intravascular e hipofibrinólise (QARI *et al.*, 2007).

A hipercoagulabilidade da AF é multifatorial, por meio de conexões de inflamação vascular com vaso-oclusão e trombose, possíveis alvos terapêuticos para interromper esses processos (BENETT, 2006). Estudos clínicos com anticoagulantes têm sido conduzidos, por exemplo, um duplo-cego utilizando heparina de baixo peso molecular, tinzaparin, em 253 portadores de AF mostrou redução das crises vaso-oclusivas, de sua severidade e da duração (QARI *et al.*, 2007). A heparina e HBPM demonstraram ação de aumentar a duração do inibidor da via do fator tissular e aumento do óxido nítrico, potente vasodilatador, que inibe a agregação, ativação e secreção plaquetária, bem como inibe adesão das células falcizadas ao endotélio *in vitro*.

Por outro lado, terapias com anticoagulantes orais normalizam o estado de hipercoagulabilidade na AF, mas não mostrou redução nas crises, presumindo-se então que TEV não seria fator etiológico nas complicações vaso-oclusivas da AF. No entanto, uma vez que há comprometimento da coagulação na fisiopatologia da doença, o TEV contribui substancialmente para a morbidade e mortalidade na AF (BENETT, 2006).

Estudos sobre o papel da trombofilia para a sintomatologia da AF são escassos e controversos, incluem várias formas da doença falciforme (até mesmo o traço falciforme). Além disso, a trombofilia hereditária tem distribuição étnica e geográfica, alguns estudos demonstraram alta prevalência de trombofilia na doença falciforme, enquanto outros não encontraram associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de CVO e herança de alelo predisponente a trombose (ADEKILE *et al.*; 2001; KORDES *et al.*, 2002; KUTLAR *et al.*; 2001; MOREIRA *et al.*; 2009; RAHIMI *et al.*; 2008; ZIMMERMAN; WARE, 1998).

O presente trabalho identificou trombofilia em portadores de AF, tanto genética quanto adquirida. Muito embora o risco relativo das trombofilias estudadas

tenha sido 1,14 para crises vaso-oclusivas na AF, quando analisadas isoladamente representaram associação significativa com determinados eventos vaso-oclusivos, conforme será discutido adiante.

Dentre os EVO, CVO foi o evento mais freqüente, ocorrido em 79,0%, seguido de STA (35,0%) e SMP (30,0%). A freqüência de EVO foi de 88,0%.

Embora seja uma doença monogênica, a AF apresenta variabilidade clínica significativa. Em Pernambuco predomina o haplótipo Bantu, cuja característica é ter curso clínico grave. Como se pode ver nesses resultados, onde quase todos os pacientes estudados têm eventos vaso-oclusivos, muitas vezes mais de um tipo de evento, com freqüência e severidade variável entre pacientes e eventos. Estudo epidemiológico das crises dolorosas em grupo grande de portadores de DF encontrou taxa média de 0,8 episódio/paciente/ano na AF.

Considerações conceituais a respeito de crise vaso-oclusiva na AF são necessárias para entendimento dos critérios adotados neste trabalho. Crise vaso-oclusiva (CVO) é definida por Costa (2004) como crise dolorosa grave que exige tratamento hospitalar com analgésico parenteral por mais de quatro horas. Tomer *et al.*, (2001) em estudo com anemia falciforme, considerou CVO como evento de dor aguda envolvendo extremidades – pulmão e/ ou abdômen, que requeiram necessariamente analgesia parenteral. Para Wun *et al.*, (2002), crise álgica consiste em dor que requeira admissão hospitalar para analgesia com narcótico. Para Bandeira *et al.*, (2004) crise vaso-oclusiva consiste em admissão hospitalar por episódio doloroso na ausência de outra causa que não a doença de base, requerendo uso de medicação narcótica. Wang (2004) identificou crise falciforme como ataque recorrente de dor envolvendo o esqueleto, pulmão, abdômen ou os três, numa variedade de sintomas que são tipicamente recorrentes e potencialmente catastróficos. O critério adotado no presente estudo para CVO foi o de Bandeira *et al.*, (2004).

A prevalência de STA foi de 35%, semelhante ao relatado na literatura. Cerca de 40% dos portadores de AF experimentam pelo menos um episódio STA na vida (ELGHETANY; BANKI, 2007). Estudo com 3 751 casos de DF mostrou que 29,2% dos pacientes tinham pelo menos um episódio de STA (CASTRO *et al.*, 1994). É uma causa freqüente de admissão hospitalar, e a causa líder de mortalidade em adultos jovens (STUART; NAGEL, 2004). Estima-se que cerca de metade dos

pacientes adultos com AF presente pelo menos um evento de STA durante a vida, com taxa de mortalidade de 3% (GUALANDRO; FONSECA; GUALANDRO, 2007).

O diagnóstico de STA no Hospital HEMOPE é feito geralmente no Serviço de Pronto Atendimento do Hospital HEMOPE, utilizando critérios clínicos - presença de dispnéia, dor torácica forte, febre, prostração, hipoxemia - e, complementarmente, o raio X de tórax com infiltrados recentes. Bandeira *et al.*, (2004) define síndrome torácica aguda (STA) como dificuldade respiratória acompanhada de dor torácica com surgimento de infiltrado pulmonar recente ao raio X de tórax. Foi considerado STA no presente trabalho todo relato textual em prontuário de “síndrome torácica aguda”. Portanto, pode haver viés de informação, pela dificuldade no diagnóstico da síndrome, que pode ser confundida com pneumonia, embolia pulmonar e hipertensão pulmonar, esta última comum na AF.

Aproximadamente 10% de crianças portadoras de AF desenvolvem AVC isquêmico clínico antes dos 20 anos de idade, e outros 22% têm infartos silenciosos (DRISCOLL *et al.*, 2003; PEGELOW *et al.*, 2002). Ocorre em crianças, por oclusão arterial intracraniana, e, nos adultos, por trombose ou hemorragia. Neste estudo encontramos 15% de pacientes com história prévia de AVC clínico, isto é, aquele com relato no prontuário, confirmado por parecer do neurologista. Todavia, enfarto cerebral silencioso ocorre em mais de 35% de crianças com AF (DOWLING *et al.*, 2009), cujo risco é extremamente alto, representa importante fator de risco de morbimortalidade. O mecanismo que causa não está bem explicado. Eventos clínicos agudos, anemia aguda, efeitos hemodinâmicos da AF nas artérias cerebrais são alguns dos fatores múltiplos sinérgicos importantes para promover infarto cerebral na anemia falciforme. Leucocitose periférica, episódios de STA, e outros fatores são implicados no risco para AVC na AF. Mais adiante será discutido o papel da trombofilia no AVC na população estudada.

O presente estudo não identificou associação entre trombofilia e NACF, além de que a prevalência de NACF encontrada foi inferior aos relatos da literatura. A necrose avascular ou necrose asséptica afeta principalmente cabeça de fêmur e úmero, atinge cerca de 10% dos pacientes falciformes (COSTA, 2004). Conforme será discutido, marcadores como o polimorfismo C677T da MTHFR não mostrou associação com NACF no nosso estudo. Por volta dos 35 anos, metade dos

pacientes de AF tem tido NACF (HAGAR; VICHINSKY, 2008). No nosso estudo, dos seis pacientes com história de NACF, apenas 2 tinham menos de 18 anos.

Conjetura-se que os pacientes ao apresentarem sintomas de priapismo geralmente demandam as grandes emergências públicas, não procuram o Pronto Atendimento do Hospital HEMOPE, podendo informar ou não ao seu médico na ocasião da consulta de rotina no HEMOPE. No entanto, a prevalência encontrada foi semelhante à relatada na literatura para pacientes com AF. De qualquer modo, a trombofilia não apresentou associação significativa com priapismo na AF no presente estudo.

Existe um pico bimodal de incidência de priapismo na AF, que atinge crianças entre cinco e dez anos e adultos entre vinte e cinquenta anos (BRASIL, 2002). Nossos resultados coincidem com a literatura, pois não foram encontrados pacientes na faixa etária entre 12 e 18 anos com relato de priapismo, os pacientes com história tinham entre 2 e 12 anos, e de 18 a 40 anos.

A prevalência de SMP encontrada está em conformidade com a literatura (BRASIL, 2001), e trombofilia não mostrou associação com SMP.

A freqüência de AAF em pacientes com eventos tromboembólicos varia entre 4 e 14%. No presente estudo, a prevalência foi elevada (37%) de todos os AAF em 30 pacientes, em média de 9% para cada um isoladamente. Ressalte-se que neste estudo AAF foram pesquisados em única coleta, e o protocolo para diagnóstico de SAF recomenda mínimo de duas testagens com intervalos de dois meses entre elas (MIYAKIS *et al.*, 2006). Recorde-se que o objetivo do estudo era pesquisar AAF na AF, e sua relação com EVO.

Os critérios para diagnóstico de SAF incluem a pesquisa do AL pelo veneno de víbora Russel, do ACA e o A $\beta$ 2GPI, IgG e IgM. Cerca 30 a 40% dos pacientes com SAF têm TEV ou TA. O AL e A $\beta$ 2GPI estão fortemente relacionados com risco trombótico.

AAF foram relatados em portadores de AF, em outras populações (ATAGA; ORRINGER, 2003; SANTAMARIA *et al.*, 2005). Os AAF são encontrados em todas as populações, com algumas variações na freqüência, bem como de complicações clínicas. Fatores ambientais e genéticos contribuem para a variabilidade étnica e a susceptibilidade para AAF (UTHMAN; KHAMASHTA, 2005).

Os mecanismos de ação dos AAF na indução de trombose são apenas parcialmente conhecidos. Estudos “*in vitro*” demonstram que estes anticorpos causam interferência na ativação da Proteína C e na inativação do Fator V pela Proteína C ativada, inibição da produção da prostaciclina endotelial e estimulam a função plaquetária. Além disso, relatos mostram aumento das moléculas de adesão VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule – 1*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule – 1*), selectina endotelial (E-SEL), aumento da expressão de fator tecidual e indução do estado pró-coagulante/pró-inflamatório nas células endoteliais (PIERANGELI, 2004).

A faixa etária de pacientes com AF mais acometida com AAF foi até os 18 anos. SANTAMARIA *et al.*, (2005) relata predominância de ACA entre indivíduos jovens e adultos. Nossos resultados em portadores de AF foram semelhantes aos relatos da literatura para AAF em pacientes não falciformes. Estudo na população de pacientes com TEV atendidos no HEMOPE mostrou frequência de 5,6% de ACA (ANDRADE; SANTOS, 2004).

A distribuição de ACA foi ligeiramente maior no sexo feminino. Cervera, *et al.*, (2002) encontrou predominância de ACA no sexo feminino na população não falciforme. Estudo conduzido no HEMOPE em pacientes sob investigação de trombofilia encontrou maior frequência de ACA em mulheres, numa proporção 2,75:1 (ANDRADE; SANTOS, 2004).

Anticorpos antifosfolípidos podem ser encontrados transitoriamente em algumas patologias, ou podem se comportar como um epifenômeno em outras doenças. Podem ser induzidos por drogas como procainamidas, quinina, contraceptivos orais e fenotiazinas, e infecções como sífilis. A prevalência e patogenicidade dos AAF induzidos por drogas de um modo geral são baixas, embora AAF induzidos por procainamida estejam associados com trombose (PIERANGELI; GHARAVI, 2006). Os pacientes deste estudo não faziam uso das citadas drogas, e sim de hidroxiuréia, ácido acetil salicílico, ácido fólico, tylex, dipirona e outras, variando de paciente para paciente. No momento, as drogas conhecidas que podem induzir a formação de AAF são as citadas acima, que sejam: procainamidas, quinina, contraceptivos orais e fenotiazinas. Estudo de avaliação do uso de hidroxiuréia por 5 anos tempo em crianças com AF não faz menção ao surgimento de AAF (HANKINS *et al.*, 2005).

AAF autoimunes – patogênicos - podem ser gerados por imunização com produtos de bactérias e vírus, após incidental exposição ou infecção (PIERANGELI; GHARAVI, 2006). Pacientes portadores de AF podem ser portadores do vírus da hepatite C, e outras infecções, embora não tenha sido objeto de estudo deste trabalho determinar a prevalência de hepatite C ou outras doenças infecciosas. De qualquer modo, nem todos AAF gerados por imunização infecciosa são patogênicos, podendo vir a ser em pacientes predispostos geneticamente (PIERANGELI; GHARAVI, 2006). Com efeito, todos os pacientes com AL eram em nível ‘moderado’, e não apresentou associação com nenhum EVO.

Note que ACA do tipo IgG foi identificado na AF. Os anticorpos do isotipo IgG apresentam maior relevância clínica e maior significado com relação a trombose. Anticorpos do tipo IgM são de fase aguda, e desaparecem com o passar do tempo, e do tipo IgG são anticorpos de memória, e se mantém na circulação. ACA são detectados em 1-2% de indivíduos assintomáticos. A presença crônica de ACA está associada com um risco de TE de 30% arterial ou venosa, incluindo AVC e infarto do miocárdio. São encontrados em aproximadamente 10% dos pacientes com eventos tromboembólicos e associados com diversos quadros clínicos, como úlceras de membros inferiores (RODGERS; DEITCHER, 2004).

Os títulos de ACA considerados clinicamente são acima de 40 GPL (MIYAKIS *et al.*, 2006). Todos os pacientes com resultados positivos para ACA no presente estudo tinham títulos abaixo de 30 GPL.

O RR da presença de anti $\beta$ 2GPI para AVC foi de 3,25. Em populações não falciformes, AAF representam fator de risco independente para AVC em mulheres jovens e jovens adultos (BREY *et al.*, 2002; BREY, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

A  $\beta$ 2GP1, também conhecida como apolipoproteína H, glicoproteína de cadeia simples, produzida no fígado e na placenta, composta por seqüência de 326 aminoácidos, com peso molecular de 50kDa. A  $\beta$ 2GP1 liga-se a superfícies de cargas negativas, incluindo ácido desoxirribonucléico, membranas celulares, células endoteliais, macrófagos e fosfolipídios ácidos. O V domínio da  $\beta$ 2GP1 tem sido sugerido como o sitio de ligação para fosfolipídios. Essa glicoproteína exerce atividade anticoagulante e pró-coagulante. A interferência de AAF na interação fisiológica da  $\beta$ 2GPI com fatores de coagulação constitui possível mecanismo patogênico para a ocorrência de trombose na SAF. Essa glicoproteína é membro de

uma superfamília de proteínas que controla o sistema complemento. Além disso, os anticorpos anti $\beta$ 2GPI alteram a cinética das reações anticoagulantes e pró-coagulantes, ligam-se a vários tipos celulares, tais como células endoteliais, monócitos e plaquetas.

A presença dos anticorpos A $\beta$ 2GPI mostrou associação forte com AVC na AF. Considerações a respeito de causalidade e associação são necessárias, nesse caso. Levando em conta a intensidade de associação, segundo Almeida FILHO; Rouquayrol, (2003), fundamentada no pressuposto de que quanto maior o valor numérico que mensura a associação, no caso o RR, mais provável será a existência de associação entre a possível causa - anti $\beta$ 2GPI na AF, e o efeito AVC. Adotando os critérios de Bradford Hill (ALMEIDA FILHO; ROUQUAYROL, 2003) para causalidade, anti $\beta$ 2GPI na AF como fator de risco para AVC atende aos seguintes critérios: a intensidade da associação citada acima (RR 3,25), significância estatística ( $p < 0,05$ ), consistência da associação e coerência científica: vários estudos mostram associação dos anticorpos anti $\beta$ 2GPI com AVC em pacientes não falciformes (BREY *et al.*, 2002; GALLI *et al.*, 2003). No entanto, devido ao desenho do estudo, a relação temporal não era conhecida no momento da coleta de dados, não sendo possível estabelecer relação causal, e sim, de associação.

AVC parece ser mais comum em mulheres com AAF (JARA *et al.*, 2005). Neste estudo, o RR para AVC no sexo feminino com relação ao masculino foi de 1,64 (não significativo). A razão de prevalência entre pessoas do sexo feminino e masculino em relação a AVC foi 1,259. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de AVC entre pacientes do sexo feminino e masculino na AF nesse estudo.

Esse é o primeiro estudo que encontra associação significativa de A $\beta$ 2GPI com AVC na AF. Serão necessários estudos prospectivos em outras populações falciformes, com etnia semelhante e diversa, e também nas outras formas de DF.

Seis pacientes apresentaram múltiplos AAF. Vários estudos reportam testes anormais para AL e ACA em 2-15% de indivíduos aparentemente assintomáticos da população em geral, muitos desses anticorpos são transitórios (GALLI *et al.*, 2003). A persistência de AL, no entanto, está associada com risco de aproximadamente

30% de desenvolvimento de sintomas característicos de SAF (MARLAR; FINK; MILLER, 2007).

Portadores de AF podem apresentar resposta humoral inadequada às infecções, por disfunção do baço, ou mesmo não funcionamento deste. A habilidade de clarificar bactérias pelo sistema reticuloendotelial neste caso fica comprometida, o que faz com o paciente falciforme tenha uma maior susceptibilidade às infecções (MARLAR; FINK; MILLER, 2007). Desse modo, o sistema de reconhecimento e destruição do não-próprio (*non self*) está comprometido nestes pacientes, podendo levar ao surgimento de AL ou outros AAF em níveis moderados, provavelmente não relacionados com EVO.

No presente estudo, aPS não apresentou associação significativa com eventos vaso-oclusivos na AF. Os aPS não estão incluídos nos critérios de investigação de SAF, entretanto, e sua relação com trombose ainda não é clara. A sua pesquisa foi incluída, uma vez que portadores de AF apresentam distribuição irregular de fosfolipídios de membrana, com exposição anormal de fosfatidilserina (STYPULKOWSKY; MANFREDINI, 2010). Dados sugerem que a produção de AAF em pacientes falciformes ocorre devido à exposição de fosfatidilserina na superfície dos eritrócitos falciformes, que levam a ligação de proteínas envolvidas com a hemostasia, como anexina V,  $\beta$ 2-glicoproteína I e protrombina (WESTERMAN *et al.*, 1999). No entanto, não se observou associação entre aPS e EVO na AF.

Apesar de ter sido evidenciada uma freqüência de 6% de FII G2021A em indivíduos sob investigação de trombofilia na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) (RAMOS *et al.*, 2008) o presente estudo verificou a presença desta mutação na forma heterozigota em apenas 1 paciente.

O estudo Leiden Trombofilia, de base populacional, demonstrou uma prevalência do alelo G20210A que varia de 6,2% entre os pacientes com trombose venosa e 2,3% entre os controles saudáveis (KHAN; DICKERMAN, 2006). É encontrada em 2% a 4% dos caucasianos sendo extremamente raro em populações não caucasianas (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Existem vários estudos que mostram evidências para o FVL relacionado com evento de trombose entre a população caucasiana. A prevalência de heterozigose para a mutação no FVL em europeus, israelenses, árabes, canadenses varia de 1

para 8,5%. Por outro lado, a mutação não está aparentemente presente em africanos negros, chineses ou japoneses (KHAN; DICKERMAN, 2006).

No Brasil, diversas pesquisas indicaram que a frequência do FVL poderia variar de 1,6% a 2,6% na população assintomática, e em indivíduos com trombose está presente em 13,3% dos casos (RAMOS *et al.*, 2006), o que não foi observado nesta população falciforme estudada, já que nenhum dos 86 pacientes com anemia falciforme pesquisados apresentou a mutação.

A população brasileira é bastante miscigenada, não sendo diferente em Pernambuco, que tem ascendência negra, holandesa, portuguesa, índia, e até italiana, com predomínio de pardos e brancos, talvez por isso seja identificada DF em pacientes brancos (BRASIL, 2002; KORDES *et al.*, 2002). Portanto, justifica-se a inclusão do FVL no estudo. RAMOS, *et al.*, (2006) encontraram frequência de FVL em pacientes atendidos no HEMOPE semelhante à literatura de países caucasianos (SELIGSHON; LUBETSKY, 2001). Nesta tese, a etnia não foi considerada por ser difícil de definir, pois a cor da pele não define o padrão de herança étnico, apenas sugere. Além disso, a cor pode ser determinada a partir de como o sujeito se vê, onde ele verbaliza sua cor, e/ou pelo observador. Estas duas maneiras envolvem elementos subjetivos, que poderiam causar viés de informação no estudo, por esses motivos a etnia ou cor não foi considerada.

No Brasil, foi conduzido em Campinas (SP) estudo de prevalência de marcadores genéticos para trombofilia (Fator V Leiden, polimorfismo C677T da MTHFR, e a mutação Fator II G20210A) na DF, que incluiu 73 pacientes, distribuídos em 53 portadores de AF (HbSS), 16 portadores de hemoglobinopatia SC e 4 Sbeta-talassemia, onde se concluiu que a trombofilia hereditária teve baixo impacto clínico no desenvolvimento de trombose e na mortalidade entre os pacientes estudados (ANDRADE *et al.*, 1998). Esse trabalho não incluiu trombofilia adquirida, além de ter sido estudo descritivo, com tamanho de amostra limitado, além de incluir três variantes da DF, cuja evolução clínica é variada. Além disso, a constituição étnica do povo brasileiro varia entre as regiões.

Estudo conduzido em São Paulo identificou heterozigose para FVL em apenas um portador de DF, enquanto que o polimorfismo C677T da MTHFR esteve presente em 19(34%) de uma população de 53 portadores de DF, assim distribuídos: 29 SS e

24 SC. A protrombina mutante G20210A não foi identificada nestes pacientes (MOREIRA NETO *et al.*, 2006).

A ausência do FVL nos indivíduos do presente estudo e outros estudos brasileiros citados acima (ANDRADE *et al.*, 1998; MOREIRA NETO *et al.*, 2006), indica que, nesta população, provavelmente, não houve miscigenação caucasiana, portanto o FVL não representa risco para complicações na AF, não sendo indicado como parâmetro para investigação de pacientes com maior risco de eventos vaso-occlusivos, ou mesmo de tromboembolismo na AF.

O genótipo MTHFR C677T foi detectado em 46,6% dos pacientes, sendo diferente da prevalência relatada por outros estudos. Balasa *et al.* (2002), encontrou prevalência de 1% para este genótipo entre 110 negros americanos. Entre caucasianos a prevalência varia de 10 a 20%, dependendo da distribuição geográfica. No Brasil, apesar da grande miscigenação, parece não haver uma alta prevalência, uma vez que Morelli *et al.* (2002) relataram uma prevalência do alelo C677T de 9%. Na Bahia, estudo com 69 portadores de AF, (COUTO *et al.*, 2004b) mostrou o polimorfismo C677T da MTHFR como fator de risco independente para doença vascular, com 18,6% de heterozigotos e 5,7% de homozigotos. A mutação G20210A não foi encontrada nesta população.

O alelo C677T da MTHFR apresentou maior RR para complicações vaso-occlusivas em pacientes com AF. Zimmerman e Ware, (1998) avaliaram a ocorrência de acidente vascular cerebral em pacientes falciformes, mas não encontraram associação entre MTHFR C677T e manifestações clínicas. Eles mostraram que embora o polimorfismo C677T na MTHFR e a mutação C1565T no gene da glicoproteína plaquetária IIIa sejam relativamente comuns em pacientes com DF, nenhum dos dois foi independentemente associado com o risco aumentado de desenvolver crise vaso-occlusiva e necrose avascular (ZIMMERMAN; WARE, 1998).

Foi identificada a prevalência 5% de deficiência de AT em portadores de AF no presente estudo. A prevalência de deficiência adquirida de antitrombina depende da frequência da doença ou condição a ela associada (gravidez, coagulação vascular disseminada, sepse, doença hepática, extensa cirurgia, queimaduras, tumores malignos, estrógenos, contraceptivos orais, anemia hemolíticas agudas, síndrome do anticorpo antifosfolípide, insuficiência renal, entre outras (PATNAIK; MOLL, 2008).

Episódios de trombose aguda, CVO, crises hemolíticas, terapia com heparina, podem mascarar o real nível de AT acusando transitoriamente níveis baixos (PATNAIK; MOLL, 2008). Um fator importante na pesquisa foi o cuidado na coleta das amostras, seleção de cada participante, na tentativa de evitar resultados falso-positivos. Assim, o método escolhido, cromogênico funcional, detecta a deficiência adquirida ou hereditária, quantitativa ou qualitativa.

É importante que todas as causas de deficiência adquirida sejam afastadas antes de classificar a redução como deficiência hereditária. É possível que a deficiência de AT encontrada seja adquirida pelo fato que a própria AF é uma doença inflamatória crônica e uma anemia hemolítica, contribuindo para o consumo maior desta proteína, já que a mesma participa também da inflamação (PATNAIK; MOLL, 2008). Além disso, as complicações da AF, como a insuficiência hepática e renal, favorecem distúrbios na produção e depuração da antitrombina, acarretando também à sua redução plasmática (CRIADO *et al*, 2008).

De qualquer modo, a deficiência adquirida representa mau prognóstico quando os níveis estão abaixo de 50-60%, todavia não está bem claro quais são os níveis de antitrombina clinicamente relevantes, parece estar também relacionado com a causa da deficiência (MACLEAN; TAIT, 2007).

Apesar da deficiência de AT ser um importante marcador de trombofilia na população em geral, este estudo não encontrou resultado estatisticamente significativo com relação a EVO. Este não é o primeiro relato de deficiência de AT na AF. Um dos primeiros trabalhos de que se tem notícia relacionando deficiência de AT e AF foi um relato de caso de úlcera maleolar tratado com antitrombina com sucesso (CACCIOLA *et al.*, 1989). Posteriormente, outros trabalhos mostraram redução significativa de AT na AF (BAYAZIT; KILINÇ, 2001) em *steady state*. Outro estudo não encontrou diferença entre os níveis de AT em pacientes em *stady state* e durante crises (NSIRIL *et al.*, 1996).

Na deficiência hereditária, o risco de trombose aumenta quando a atividade funcional da AT se reduz para menos do que 80% do normal, com maior risco quando os níveis são inferiores a 60%. O nível da AT em heterozigotos geralmente varia entre 40 e 70%. A homozigose em geral determina letalidade no embrião. Na deficiência heterozigótica, a chance para ocorrência de TEV é cerca de 10 vezes

maior e quando os níveis chegam a ser inferiores a 50%, os primeiros sintomas clínicos começam a se manifestar (CRIADO *et al*, 2008).

O FVIII elevado mostrou associação com EVO na AF. Sabe-se que os níveis elevados de fator VIII nestes pacientes podem contribuir para o desenvolvimento de resistência à proteína C ativada, gerando uma falha na resposta a esta molécula, que predispõe à formação de fibrina e contribui com a vaso-occlusão (WRIGHT *et al.*, 1997). Níveis de FVIII elevado têm sido relacionados como fator de risco para TEV em negros e outras etnias (PATEL; PATH; ARYA, 2003; CUSHMAN, 2007; CUSHMAN *et al.*, 2009).

## 9 Conclusões

1. Trombofilia hereditária e adquirida estão presentes na AF e aumentam o risco para EVO.
2. Anticorpos anti $\beta$ 2GPI, o polimorfismo C677T da MTHFR, e FVIII elevado mostraram associação significativa com AVC, CVO e EVO, respectivamente.
3. O FVL e FII G20210A não são indicados como marcadores para investigação de risco para EVO, TEV ou TA na AF.
4. Conclui-se que algumas trombofilias estão presentes na AF e que deve ser considerada na identificação de pacientes com maior risco de desenvolver EVO.

## **10 Recomendações**

1. A implantação de exames indicados de trombofilia em serviços de referência do SUS, e conseqüente acompanhamento de pacientes falciformes com trombofilia, como estratégia de aumentar a expectativa e qualidade de vida de pacientes falciformes.
2. Desenvolvimento de estudos semelhantes para AAF em pacientes com outras formas da DF.
3. Além disso, estudos na população negra e parda do Brasil são recomendados para identificação de marcadores de trombofilia próprios.

---

## Referências

- ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, Carlton, n. 14, p. 462-470, 2009.
- ADCOCK, D. M.; KRESSIN, D. C.; MARLAR, R. A. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v.107, p. 105-110, 1997.
- ADEKILE, A. D. *et al.* Frequency of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Kuwaiti sickle cell disease patients. **American Journal of Hematology**, New York, v. 66, p. 263-266, 2001.
- ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. Análise de Dados Epidemiológicos. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 184-190.
- ANDRADE, A. V. G.; SANTOS, M. E. **Freqüência de Anticorpos Anticardiolipina em Pacientes Encaminhados Para Investigação de Trombofilia**. 2004. Monografia (Curso Graduação em ciências biomédicas) - Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- ANDRADE, F. L. *et al.* Prothrombin mutant, factor V Leiden, and Thermolabile variant of Methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil. **American Journal of Hematology**, New York, v. 59. p. 46-50, 1998.
- ATAGA, K. I.; ORRINGER, E. P. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: A Curious Paradox. **The American Journal Medicine**, New York, v. 115. p. 721-728, 2003.
- ATAGA, K. I.; CAPELLINI, M. D.; RACHMILEWITZ, E. A. Thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 139, n.1. p. 3-13, Oct. 2007
- ATAGA, K. I. *et al.* Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. **Haematologica**, Pavia, v. 93, n.1. p.20-26, 2008.

ATAGA, K. I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias. **Haematologica**, Pavia, v.94, n.11, p.1481-1484, 2009.

AUSTIN, H. *et al.* Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. **Blood**, New York, v.110. p.908-912, 2007.

BANDEIRA, F. M. G. C. *et al.* Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital HEMOPE, Recife-PE. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.26, n.3, p.189-194, 2004.

BANDEIRA F. M. G. C. *et al.* Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 171-176, 2007.

BAYAZIT, A. K.; KILINÇ, Y. Natural coagulation inhibitors (protein C, protein S, antithrombin) in patients with sickle cell anemia in a steady state **Pediatrics International**, Carlton, v.43, n.6, p.592–596, 2001.

BEDIAKO, S. M.; HAYWOOD, C. J. Sickle cell disease in a “Postracial” America. **Journal of the National Medical Association**, New York, v.101, n.10, p.1065-1066, 2009.

BENETT, J. S. Vasoocclusion in Sickle Cell Anemia Are Platelets Really Involved? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.26, p.1415, 2006.

BERTINA, R. M., *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**. London, v. 369, p.64-67, May. 1994.

BEZERRA, M. A. C. *et al.* Molecular variations linked to the grouping of  $\beta$ - and  $\alpha$ -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, New York, v.31, n.1, p.83-8, 2007.

BEZERRA, M. A. C. **Determinação das propriedades adesivas e funcionais em glóbulos vermelhos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ $\beta$  Talassemia e Talassemia intermediária.** 2009. (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2009.

BLANN, A. D. *et al.* Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, Oxford, v.14, n.3, p. 255-259, Apr. 2003.

BLUM, A. *et al.* Endothelial function in patients with Sickle Cell Anemia during and after sickle cell crisis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Dordrecht, v.19, n.2, p.83-86, 2005.

BRASIL. Portaria nº 822, de 6 de junho de 2001. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 7 jun. 2001. Seção 1, p.162.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, DF: ANVISA, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A Saúde da população negra e o SUS: ações afirmativas para avançar na equidade**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Saúde Integral da População Negra**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_saude\\_populacao\\_negra.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_saude_populacao_negra.pdf)>. Acesso em: 6 maio 2010.

BRASIL. Rede Interagencial de Informações para a Saúde. **Anos de vida esperados, por ano, segundo Região e UF Brasil, 2000-2007 Sexo feminino**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2008/a11fb>>. Acesso em: 29 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de Eventos Agudos em Doença Falciforme**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2009.

BREY, R. L. *et al.* Antiphospholipid antibodies and stroke in young women. **Stroke**, Dallas, v. 33, n.10, p.2396-400, 2002.

BREY, R. L. Antiphospholipid antibodies in young adults with stroke. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Dordrecht, v.20, p.105-112, 2005.

BRUMMEL-ZIEDINS, K. *et al.* Blood coagulation and fibrinolysis. In: GREER, J. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2004. p.701-703.

CACCIOLA, E. *et al.* Antithrombin III concentrate for treatment of chronic leg ulcers in sickle cell-beta thalassemia: A pilot study. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.11, p.1534, 1989.

CAMPOLIM, S. Mais velhos e suscetíveis. **Pesquisa Médica**, Porto Alegre, n. 9, p. 9-13, jan./mar. 2009.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.29, n.3, p.203-206, 2007.

CASTRO, O. *et al.* The acute chest syndrome in sickle cell disease. **Blood**, New York, v.2, p.643-9, 1994.

CERVERA, R. *et al.* Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1 000 patients. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 46, p.1019-1027, 2002.

CORDEIRO, F. C.; FERREIRA, S. L. Discriminação racial e de gênero em discursos de mulheres negras com anemia falciforme. **Escola Anna Nery Revista Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.13, n.2, p.352-58, abr./jun. 2009.

COSTA, F. F. Anemia Falciforme. In: ZAGO MA,; FALCÃO RP,; PASQUINI R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

COUTO, F. D. *et al.* C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.2, n. 20, p. 529-533. mar./abr. 2004a.

COUTO, F. D. *et al.* A C677T Methylene tetrahydrofolate Redutase (MTHFR) Polymorphism and G20210A Mutation in the Prothrombin Gene of Sick Cell Anemia Patients from Northeast Brazil. **Hemoglobin**, New York, v. 28, n. 3, p.237-241. 2004b.

CRIADO, P. R. *et al.* Manifestações cutâneas das trombofilias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.83, n.6, p.491-506, 2008.

CUSHMAN, M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. **Seminars in Hematology**, New York, v.44, n.2, p.62-69, 2007.

CUSHMAN, M, et al. Coagulation factors IX through XIII and the risk of future venous thrombosis: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. **Blood**, New York, v.114, p.2878-2883, 2009.

DAHLBÄCK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P. J. Familial thrombophilia due a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: a prediction of a cofactor to activated protein C. **Proceeds of National Academy of Science of the United States of America**, Stanford, v.90, n.3, p.1004-1008, 1993.

DEVRESSE, K.; PEERLINCK, K.; HOYALAERTS, M. F. Thrombotic risk assessment in the antiphospholipid syndrome requires more than the quantification of lupus anticoagulants. **Blood**, New York, v.115, p.870-878, 2010.

DOWLING, M. M. *et al.* Acute silent cerebral infarction in children with sickle cell anemia. **Pediatrics Blood & Cancer**, Hoboken, p.1-4, 2009.

DRISCOLL, M. C. *et al.* Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. **Blood**. New York, v.101, p.2401-2404, 2003.

ELGHETANY, M. T.; BANKI, K. Erythrocytic Disorders. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 21. ed. New York: Saunders Elsevier, 2007. p. 524-526.

FIGUEIREDO, M. S. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, n.29, v.3, p.215-21, 2007.

FRANCO, R. F. Trombofilia: Bases Hereditárias. In: ZAGO, M. A. *et al.* **Hematologia, Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 844-46.

FROSST, P. *et al.* A candidate genetic risk for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, New York, v.10, n.1, May, p.111-3, 1995.

FURIE, B. Pathogenesis of thrombosis. In: **HEMATOLOGY American Society of Hematology Education Program Book**, Washington:American Society of Hematology, Dec. 2009. p.255-258. Disponível em:  
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/reprint/2009/1/255>

GALLI, M. *et al.* Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. **Blood**, New York, v.101, p.1827-1832, 2003.

GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! **Haematologica**, Pavia, v.93, n.1, p.1-3, 2008.

GOLDENBERG, N. A.; MANCO-JOHNSON, M. J. Protein C deficiency. **Haemophilia**, Londres, 14, p.1214–1221, 2008.

GREEN, D. Risk of future arterial cardiovascular events in patients with idiopathic venous thromboembolism. In: **HEMATOLOGY American Society of Hematology Education Program Book**, Washington:American Society of Hematology, Dec. 2009. p.259-266. Disponível em:  
<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/reprint/2009/1/259>

GREGG, J. P.; YAMANE, A.J.; GRODY W. W. Prevalence of the Factor V-Leiden Mutation in Four Distinct American Ethnic Populations. **American Journal of Medical Genetics**, New York, v.73, p.334-336, 1997.

GUALANDRO, S. F.M.; FONSECA, G. H. H.; GUALANDRO, D. M. Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.29, n.3, p.291-298, 2007.

GUIMARÃES, S.P. *et al.* Mutações predisponentes à trombofilia em indivíduos de Minas gerais – Brasil com suspeita clínica de trombose. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.1, p.19-24, 2009.

HAGAR, W.; VICHINSKY, E. Advances in clinical research in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.141, p.346-356, 2008.

HANKINS, J. S. *et al.* Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: the HUSOFT extension study. **Blood**, New York, v.106, p.2269-2275, 2005.

JARA, L. J. *et al.* The impact of gender on clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome. **Lupus**, Houndmills, n.8, p.607-12, 2005.

JERRARD-DUNNE, P. *et al.* Ethnic Differences in Markers of Thrombophilia Implications for the Investigation of Ischemic Stroke in Multiethnic Populations: The South London Ethnicity and Stroke Study. **Stroke**, Dallas, v.34, p.1821-1827, 2003.

KALCKMANN, S. *et al.* Racismo institucional: um desafio para a equidade no SUS? **Saúde Sociedade São Paulo**, São Paulo, v.16, n.2, p.146-155, 2007.

KANG, H. C.; CARDOSO, C.; MACHRY, L. Frequência de portadores de hemoglobinopatias em ambulatórios de anticoagulação oral e oncohematologia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, sup. 4, p.7-16, set. 2009.

KATE, M. K.T.; VAN DER MEER, J. Protein S deficiency: a clinical perspective. **Haemophilia**, Londres, v.14, p.1222-1228, 2008.

KHAN, S.; DICKERMAN, J. D. Hereditary thrombophilia. **Thrombosis Journal**, London, v.4, n.15, p.1-17, 2006.

KORDES, U. *et al.* Homozygous Factor V Leiden mutation in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.116, p.236-238, 2002.

KUTLAR, A. *et al.* The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease. **Hemoglobin**, New York, v.25, n.2, p.213-7, 2001.

KYRLE, P. A.; EICHINGER, S. Is Virchow triad complete? **Blood**, New York, v.114, n.6, aug. 2009.

LETTRE, G. *et al.* DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and  $\beta$ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, p.11869-11874, 2008.

MACLEAN, P. S.; TAIT, C. Hereditary and acquired antithrombin deficiency Epidemiology, pathogenesis and treatment options. **Drugs**, New York, v.67, n.10, p.1429-1438, 2007.

MARLAR, R. A.; FINK, L. M.; MILLER, J. L. Laboratory approach to thrombotic risk. In: McPherson, R. A.; Pincus, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 21. ed. New York: Saunders Elsevier, 2007. p. 772.

McCULLY, K. S. Homocysteinemia and vascular disease. **Natural Medicine**, Basel, v. 2, p.386-389, 1996.

MIYAKIS, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford, v. 4, p.295-306, 2006.

MOREIRA, A. M. *et al.* Fatores de risco associados a trombose em pacientes do estado do Ceará. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.3, p.132-136, 2009.

MOREIRA NETO, F. *et al.* The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of SCD. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, n.39, p.1291-95, 2006.

MORELLI, V. M. *et al.* Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, Oxford, v.13, p.271-275, 2002.

MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.29, n.3, p.223-225, 2007.

NSIRIL, B. *et al.* Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in homozygous sickle cell disease. **Hematology and Cell Therapy**, Heidelberg, v.38, p.279-284, 1996.

PATEL, R. K. *et al.* Risk factors for venous thrombosis in the black population. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.90, n.5, p.835-8, 2003a.

PATEL, R. K.; PATH, M. R. C.; ARYA, R. Tests for Hereditary Thrombophilia Are of Limited Value in the Black Population. **Stroke**, Dallas, v.34, 2003b.

PATNAIK, M. M.; MOLL, S. Inherited antithrombin deficiency: a review. **Haemophilia**, Londres, v.14, p.1229-1239, 2008.

PEGELow, C. H. *et al.* Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. **American Journal of Medicine**, New York, v.102, p.171-177, 1997.

PEGELow, C. H. *et al.* Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. **Blood**, New York, v.99, n.815, p. 3014-3018, 2002.

PIERANGELI, S. S. Antiphospholipid antibodies: a mosaic of pathogenic effects? **Blood**, New York, v.104, n.9, p.2619-2620, 2004.

PIERANGELI, S. S.; GHARAVI, A. E. Infection and Drug-induced Antiphospholipid Antibodies. In: KHAMASHTA, M. A. **Hughes Syndrome Antiphospholipid Syndrome**. 2. ed. London: Springer Verlag Limited, 2006. p. 532-541.

PLATT, O. S. *et al.* Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.330, p.1639–1644, 1994.

POORT, S. R. *et al.* A common genetic variation in the 3'untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, New York, vol. 88, n.10, p.3698-3703, 1996.

QARI, M. H. *et al.* Reduction of painful vaso-occlusive crisis of sickle cell anaemia by tinzaparin in double-blind randomized trial. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.98, p.392-396, 2007.

RAFFINI, L. Diagnosis of inherited thrombophilia in pediatrics. **Clinical Advances in Hematology Oncology**, New York, v.7, n.11. 2009.

RAHIMI, Z, *et al.* Thrombophilic mutations among Southern Iranian patients with sickle cell disease: high prevalence of factor V Leiden. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, Oxford, v.25, n.3, p.288-292, 2008.

RAMOS, C. P. S. *et al.* Frequência do fator V Leiden em indivíduos sob investigação de trombofilia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.28, p.131-134, 2006.

RAMOS, C. P. S. *et al.*, Protrombina mutante em indivíduos sob investigação de trombofilia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.44, n.2, p.79-82, 2008.

REES, D. C.; COX, M.; CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, London, v.346, p.1133-1134, 1995.

RODEGHIERO, F.; TOSETTO, A. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden Mutation Are Independent Risk Factors for Venous Thromboembolism. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.130, p.643-650, 1999.

RODGERS, G. M.; DEITCHER, S. R. Thrombosis and Antithrombotic Therapy. In: GREER, J. P. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2004, p.1713-1758.

SANTAMARIA, J. R. *et al.* Síndrome Antifosfolípide. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.80, n.3, 2005. Disponível em <<http://www.anaisdedermatologia.org.br/public/edicao.aspx?id=3&volume=80>> Acesso em: 4 ago. 2008.

SANTOS, M. S. F. *et al.* Síndrome Antifosfolípide: uma Causa de Neuropatia Periférica? **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 47, n.4, p. 281-285, jul/ago, 2007.

SANTOS, M. E. *et al.* Trombose venosa em criança **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.45, n.3, p. 195-199, jun. 2009.

SELIGSOHN, U.; LUBETSKY, A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.344, n.16, p.1222-31, 2001.

SETTY, B. N. Y. *et al.* Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford, v.6, p.2202-2209, 2008.

SHIMIZU *et al.* Recurrent leg ulcers and arterial thrombosis in 33 years old homozygous variant of antithrombin. **American Journal of Hematology**, New York, v.66, Issue 4, p.285-291, 2001.

STEIN, P.D. *et al.* Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Hospitalized Patients with Sickle cell disease. **The American Journal of Medicine**, New York, v.119, n.10, p.897, 2006.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, London, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.32, n.1, p.56-62, 2010.

THORELLI, E.; KAUFMAN, R. J.; DAHLBÄCK, B. Cleavage of Factor V at Arg 506 by Activated Protein C and the Expression of Anticoagulant Activity of Factor V. **Blood**, New York, v.93, n.8, p. 2552-2558, 1999.

TOMER, A. *et al.* Reduction of pain episodes and prothrombotic activity in sickle cell disease by dietary n-3 fatty acids. **Thrombosis and Hemostasis**, Stuttgart, v.85, p.966-74, 2001.

UTHMAN, I.; KHAMASHTA, M. A. Ethnic and geographic variation in antiphospholipid (Hughes) syndromes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 64, n.12, p.1671–1676, 2005.

WANG, W. C. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: GREER, J. *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. v.1, p. 1263-1297.

WESTERMAN, M. P. *et al.* Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.134, n.4, p.329-330, 1999.

WRIGHT, J. G. *et al.* Activated protein C resistance in homozygous sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.96, n.4, p.854-856, 1997.

WUN, T. *et al.* Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **The Journal of Laboratory e Clinical Medicine**, St Louis, v.129, n.5, p. 507-516, 1997.

WUN T, *et al.* Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v.24, p.81-88, 2002.

ZIMMERMAN, S. A.; WARE, R. E. Inherited DNA Mutations contributing to thrombotic complications in patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, New York, v.59, p.267-272, 1998.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - FORMULÁRIO PESQUISA DE PRONTUÁRIO

#### FORMULÁRIO PESQUISA DE PRONTUÁRIO

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
 Nº da Ficha: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( ) Data Nascimento \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ - Fone: \_\_\_\_\_

	Evento vaso-oclusivo	Ausente	Presente
<b>STA</b>	Síndrome torácica aguda: dor torácica, infecção, infiltrado pulmonar respiratório recente no raio-X e febre		
<b>AVCi</b>	Acidente vascular cerebral isquêmico: diagnosticado a partir de relato em prontuário médico confirmado por avaliação neurológica clínica ou por imagem;		
<b>NACF</b>	Necrose óssea ou asséptica de cabeça de fêmur: diagnosticada por exame de imagem ou parecer ortopédico;		
<b>Priapismo</b>	Priapismo: ereção dolorosa do pênis que pode ocorrer em episódios breves e recorrentes, ou episódios longos, podendo causar impotência sexual.		
<b>SMP</b>	Síndrome mão-pé: crise de dor, dactilite que ocorre nos pequenos ossos das mãos e pés, com edema destes membros.		
<b>CVO</b>	crise vaso-oclusiva consiste em admissão hospitalar por episódio doloroso na ausência de outra causa que não a doença de base, requerendo uso de medicação narcótica.		

Uso de drogas (AAS, Tylex, Hidréia, HU, Folato, Marevan) ( ) sim ( ) não Qual(is):

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para menores)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Para menor)** (Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário (a) da pesquisa e pelo responsável). Resolução nº196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde.

Eu \_\_\_\_\_ aceito que meu filho(a) participe como voluntário(a) do estudo sobre marcadores de trombofilia, recebi da Dra. Maria Emília Santos, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dúvidas os seguintes aspectos:

1. O objetivo deste estudo é procurar marcadores de trombofilia, que é maior tendência a trombose, em pessoas com anemia falciforme.
2. Esta pesquisa poderá ou não trazer benefícios a minha pessoa no momento e, no entanto, ajudará futuros pacientes.
3. Que esse estudo será feito da seguinte maneira: serão retiradas do braço do meu filho(a) 3 (três) tubos (equivalente a uma colher de sopa) de sangue para exame com material descartável da mesma maneira que se colhe sangue para hemograma, o que não acarreta danos mínimos, pois é um exame comum, coleta-se sangue do braço onde raramente pode acontecer, no local da punção, uma mancha roxa devido um extravasamento do sangue, que será espontaneamente absorvido.
4. Que o prontuário será consultado quanto a dados clínicos.
5. Que eu sempre que desejar, terei esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo, e que poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar meu consentimento, sem que isso traga qualquer prejuízo ao meu tratamento no HEMOPE.
6. Que as informações conseguidas através de minha participação não permitirão identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto, nos meios científicos.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do responsável pela pesquisa:

Maria Emília dos Santos Instituição: Laboratório de Hemostasia do HEMOPE

Endereço: RUA JOAQUIM NABUCO, 171 GRAÇAS RECIFE-PE

Telefone para contato: 3182 4659 / 9213 2185

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE.

Rua Joaquim Nabuco, 171; 2º ANDAR.

Fone: 3182 4771

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão datiloscópica do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1.

\_\_\_\_\_  
Testemunha 2.

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para adultos)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**(Para adultos)** (Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário (a) da pesquisa e pelo responsável). Resolução nº196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar como voluntário (a) do estudo sobre marcadores de trombofilia, recebi da Dra. Maria Emília Santos, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dúvidas os seguintes aspectos:

7. O objetivo deste estudo é procurar marcadores de trombofilia, que é maior tendência a trombose, em pessoas com anemia falciforme.
8. Esta pesquisa poderá ou não trazer benefícios a minha pessoa no momento e, no entanto, ajudará futuros pacientes.
9. Que esse estudo será feito da seguinte maneira: serão retiradas do meu braço 3 (três) tubos (equivalente a uma colher de sopa) de sangue para exame com material descartável da mesma maneira que se colhe sangue para hemograma, o que não acarreta danos mínimos, pois é um exame comum, coleta-se sangue do braço onde raramente pode acontecer, no local da punção, uma mancha roxa devido um extravasamento do sangue, que será espontaneamente absorvido.
10. Que meu prontuário será consultado quanto a dados clínicos.
11. Que eu sempre que desejar, terei esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo, e que poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e, também, poderei retirar meu consentimento, sem que isso traga qualquer prejuízo ao meu tratamento no HEMOPE.
12. Que as informações conseguidas através de minha participação não permitirão identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto, nos meios científicos.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do responsável pela pesquisa:

Maria Emília dos Santos      Instituição: Laboratório de Hemostasia do HEMOPE

Endereço: RUA JOAQUIM NABUCO, 171 GRAÇAS RECIFE-PE

Telefone para contato: 3182 4659 / 9213 2185

**ATENÇÃO:** Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE.

Rua Joaquim Nabuco, 171; 2º ANDAR.

Fone: 31824771

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário(a)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo (Rubricar as demais páginas)

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1

\_\_\_\_\_  
Testemunha 2

APÊNDICE D - Descrição de pacientes portadores de AF com teste A $\beta$ 2GPI reagente com relação a história de AVCi.

Descrição de pacientes portadores de AF com teste A $\beta$ 2GPI reagente com relação a história de AVCi.

Paciente	Faixa etária	Sexo	A $\beta$ 2GPI		AVC s/n
			(Unidades GPL)	(Unidades MPL)	
10	18 a 40	Fem	-	60	Não
22	13 a 18	Mas	15	90	Sim
75	13 a 18	Fem	49	-	Sim
77	2 a 12	Fem	24	-	Não
78	2 a 12	Fem	32	-	Sim
81	18 a 40	Fem	95	11	Não
82	2 a 12	Mas	15	-	Sim
86	2 a 12	Fem	9	-	Não
88	2 a 12	Mas	12	-	Não
91	18 a 40	Fem	60	-	Sim
92	41 ou mais	Fem	Maior que 100	-	Não
93	13 a 18	Mas	15	-	Não

Valor de Referência: > 5 GPL ou MPL.

## APÊNDICE E - Pesquisa dos Anticorpos Antifosfolípides.

### **Anticorpos antifosfolípidos**

Os Anticorpos antifosfolípidos (AAF) Anticardiolipina, beta2glicoproteína 1, antifosfatidilserina, foram pesquisados por ensaio imunoenzimático para IgG e IgM.

A pesquisa do Anticorpo Lúptico foi feita por meio de testes coagulométrico, por triagem e confirmatório usando veneno de víbora Russel diluído (GARCIA&FRANCO, 2004).

### **1 Anticorpo Anticardiolipina IgG/IgM**

Teste de ensaio imunoenzimático, (BioSystems, Barcelona, Spain), onde os anticorpos anticardiolipina (ACA) do soro, na presença de  $\beta$ 2-glicoproteína I, reconhecem a cardiolipina ligada na superfície da parede da microplaca. Anticorpos anti-humanos IgG ou IgM conjugados a peroxidase, são então adicionados. Finalmente, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) com peróxido de hidrogênio são adicionados como substrato, após desenvolvimento de cor, a reação é parada com ácido sulfúrico. O produto final de cor amarela mensurado a 450nm, é proporcional a concentração de ACA na amostra.

Execução da pesquisa de ACA: os reagentes foram colocados à temperatura ambiente, assim como os soros foram retirados do freezer a  $-80^{\circ}$  C e descongelados para o teste. As amostras, controles, e calibradores foram diluídos em 1/50 em tampão fosfato 10mmol/l, e foram distribuídas na microplaca, juntamente com um branco de reação, constituído do tampão diluente de amostras. Após 30 de incubação à temperatura ambiente em câmara úmida, o conteúdo da placa foi aspirado e esta foi lavada 4 vezes com 300  $\mu$ l de tampão fosfato-salina de lavagem. O conjugado IgG ou IgM, foi pipetado – 50  $\mu$ l. Após 30 minutos de incubação, a microplaca foi lavada seguindo o protocolo anterior de lavagem, para a remoção dos conjugado não-ligado. Após a pipetagem de 50  $\mu$ l de substrato, a microplaca foi incubada por 10 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente. Terminada a incubação, 100  $\mu$ l da solução de ácido sulfúrico, para parada da reação foi adicionada e a absorbância do conteúdo de cada poço da microplaca foi lida a 450 nm, utilizando o calibrador com concentração zero de ACA ou o branco de reação (tampão diluente) como o zero de ajuste.

Os cálculos foram feitos plotando os valores da absorbância dos calibradores versus a concentração de ACA de cada um deles (GPL para IgG, ou MPL para IgM). Após a validação do teste com a confirmação dos controles, a concentração de ACA das amostras era obtida pela interpolação da absorbância do paciente na curva.

A garantia da qualidade do teste se baseava nos controles positivo e negativo fornecidos no kit, além do uso de tampão de amostras. A absorbância do calibrador 0 GPL ou MPL deveria ser sempre abaixo de 0,4. A concentração do controle positivo deveria ser sempre maior que 40 GPL ou MPL, e do controle negativo deveria ser abaixo de 12 GPL ou MPL.

Os valores de referência foram definidos da seguinte forma: amostras com concentração acima de 18 GPL ou MPL eram consideradas positivas. Amostras com concentrações abaixo de 12 GPL ou MPL, eram consideradas negativas. As amostras com resultados entre 12 e 18 GPL ou MPL, eram classificadas como *borderline*, a técnica recomenda retestagem, inclusive pesquisar outros AAF, o que já estava previsto no protocolo. Neste estudo, amostras com resultados entre 12 e 18 GPL e MPL, foram consideradas como negativas. Apenas os pacientes com valores acima de 18 GPL ou MPL foram tidos como positivos.

Valores de referência para pesquisa de Anticorpos Anticardiolipina por enzimaímmunoensaio.

#### Anti-β2-glicoproteína I

IgG (U/ml)	IgM (U/ml)
< 12	< 12
12 - 18	12 - 18
> 18	> 18

## 2 Anticorpos Anti β2-glicoproteína I IgG/IgM

### Princípio

Teste imunoenzimático (ORGENTEC Diagnostica GmbH, Mainz, Germany), destinado ao doseamento quantitativo dos auto-anticorpos de classe IgG e IgM contra a β2-glicoproteína I.

### Reagentes do kit:

Microplaca constituída por 12 tiras fracionáveis com 8 poços revestidos com  $\beta$ 2-glicoproteína I humana altamente purificada.

Calibradores de anticorpos anti-  $\beta$ 2-glicoproteína I IgG e IgM em matriz soro-tampão (PBS/BSA), contendo IgG e IgM, nas seguintes concentrações: 0; 6,3; 12,5; 25; 50 e 100ml.

Controles anti- $\beta$ 2-glicoproteína I em matriz soro/tampão (PBS/BSA) positivo e negativo, com concentrações conhecidas.

Diluyente de amostras (tampão Tris), concentrado (5x) contendo BSA em tampão PBS.

Conjugado enzimático contendo um antisoro policlonal anti-h-IgG-IgG de coelho, marcado com uma peroxidase em matriz PBS/BSA.

Conjugado enzimático contendo um antisoro policlonal anti-h-IgM-IgG de coelho, marcado com uma peroxidase em matriz PBS/BSA.

Substrato para a peroxidase.

Solução de parada (ácido hidrocloreídrico 1M).

Solução de lavagem (PBS), concentrada (50x).

#### **Preparo das amostras:**

As amostras, soro ou plasma, foram diluídas no tampão diluyente 1:100 – 10  $\mu$ l de amostra para 990 de tampão.

#### **Execução do teste**

1. Pipetou-se 100  $\mu$ l dos calibradores, controles e amostras pré-diluídas em tampão nos poços.
2. Incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente.
3. Descartou-se o conteúdo das placas e lavar três vezes com 300  $\mu$ l de solução de lavagem.
4. Pipetou-se 100  $\mu$ l do conjugado em cada poço.
5. Incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Repetiu-se a operação 3.
7. Pipetou-se 100  $\mu$ l de solução de TMB em cada poço.
8. Incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente.
9. Adicionou-se 100  $\mu$ l de solução de parada em cada poço e deixou-se de repouso, sem agitar, por 5 minutos.
10. A densidade óptica foi lida, a 450 nm e calculados os resultados.

### Controle de qualidade

O teste foi validado se a densidade óptica a 450 para o controle positivo e controle negativo, assim como o calibrado A e F, estava de acordo os valores respectivos indicados no kit.

### Valores de Referência

Valores de referência para pesquisa de Anti- $\beta$ 2-glicoproteína I por enzimaímmunoensaio.

		Anti- $\beta$ 2-glicoproteína I	
		IgG	IgM
		(U/ml)	(U/ml)
Normal		< 5	< 5
Bordeline	(zona cinzenta)	5 – 8	5 – 8
Positivo		> 8	> 8

### 3 Anticorpos Antifosfatidilserina IgG/IgM

A pesquisa de anticorpos antifosfatidilserina (APS) é um ensaio imunoenzimático de fase sólida indireta (ELISA). É designado para a determinação quantitativa dos auto anticorpos da classe IgG/IgM dirigida contra os fosfolípidos carregados negativamente. A microplaca estava recoberta com fosfatidilserina altamente purificada. Os APA necessitam da  $\beta$ 2Glicoproteína I como cofator para a ligação, portanto, a microplaca então estava saturada com  $\beta$ 2 Glicoproteína I humana.

#### Fase1:

Os calibradores, controles e amostras pré diluídas do paciente foram pipetadas nos poços da microplaca. Após incubação por 30 minutos, a microplaca foi lavada com solução de lavagem para remover os componentes não reativos do soro.

#### Fase 2:

O conjugado (anticorpos anti-IgG/IgM humano conjugados à peroxidase) foi pipetado nos poços da microplaca para que reconhecessem os auto-anticorpos

ligados aos antígenos imobilizados. Após incubação de 15 minutos, foi feita a lavagem para remoção de conjugado não especificamente ligados.

Fase 3:

Solução de substrato cromogênico contendo TMB (3,3',5,5' – Tetrametil – benzidina) foi dispensada nos poços. Durante uma incubação de 15 minutos a cor da solução mudava para o azul. O desenvolvimento da cor foi encerrado através da adição de 1M de ácido hidrocloreto como solução de parada. A cor mudava para amarelo. A intensidade da cor era diretamente proporcional à concentração de anticorpos antifosfatidilserina IgG/IgM presente na amostra original.

A densidade óptica da microplaca foi lida em uma leitora de microplacas com filtro de 450nm. Medidas bi-cromáticas com referência 600-690 nm foram realizadas.

Os valores de referência para anticorpos antifosfatidilserina são:

Anticorpos Antifosfatidilserina		
	IgG [GPL U/ml]	IgM [MPL U/ml]
Normal:	< 10	< 10
Elevado:	≥ 10	≥ 10

#### 4 Pesquisa do Anticorpo Lúpico

O Teste de Veneno de Víbora de Russel Diluído (TVVRD) foi o teste escolhido para a detecção do Anticoagulante ou Anticorpo Lúpico (AL) nesta pesquisa por ser mais específico. No teste do TVVRD é feito inicialmente um teste de triagem, cujo reagente possui uma concentração baixa de fosfolipídios, o que faz com que seja altamente sensível à presença do AL, alargando o tempo de coagulação na presença deste. Por outro lado, uma alta concentração de fosfolipídios no reagente da etapa de confirmação, neutraliza o AL e encurta os tempos de coagulação.

Além disso, por apresentar em sua composição o Veneno de Víbora de Russel, o qual, na presença de cálcio, ativa diretamente o fator X da amostra, este teste não é alterado por anormalidades nos fatores de contato, déficits de fatores VII,

VIII e IX, inibidores ou ainda por níveis de heparina até 1U/ml, uma vez que esta é neutralizada pelo prolibreno presente na composição do reagente.

Foi realizado no coagulômetro automatizado ACL 200 (Instrumentation Laboratory, USA).

Para o cálculo dos resultados dos exames foi utilizado o seguinte método:

$$\text{Relação do AL Triagem} = \frac{\text{Tempo de coagulação Plasma Paciente}}{\text{Tempo de coagulação Plasma Pool}}$$

$$\text{Relação do AL Confirmatório} = \frac{\text{Tempo de coagulação Plasma Paciente}}{\text{Tempo de coagulação Plasma Pool}}$$

$$\text{Relação Final} = \frac{\text{Relação do AL Triagem}}{\text{Relação do AL}}$$

A interpretação do resultado da pesquisa de AL está na tabela 3. No presente estudo, foi considerado como positivo para AL, todo aquele paciente com resultados moderados ou forte presença de AL. Aqueles que apresentavam fraca presença de AL foram considerados como negativos, pois este é um teste que sofre interferência de uso de medicamentos e doenças inflamatórias. O resultado final foi expresso como uma relação, de acordo com a tabela 3 abaixo.

Interpretação dos Resultados do TVVRD para pesquisa de AL

Relação Final	Presença de AL
>2,0	Forte presença de AL
1,5 – 2,0	Moderada presença de AL
1,2 – 1,5	Fraca presença de AL
<1,2	Ausência de AL

Fonte: Laboratório de Hemostasia do HEMOPE  
TVVRD – Teste do Veneno de Víbora Russel Diluído  
AL – anticorpo lúpico

APÊNDICE F - Pesquisa dos Marcadores Moleculares - Fator V de Leiden, Fator II G20210A, polimorfismo C677T MTHFR

Pesquisa dos Marcadores Moleculares - Fator V de Leiden, Fator II G20210A, polimorfismo C677T MTHFR

A pesquisa foi feita por análise gênica com amplificação do DNA por PCR-RFLP e reconhecimento da mutação por digestão enzimática específica (Bertina, et al., 1994; Poort, et al., 1996; Franco, 2004).

**Extração do DNA**

O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pela técnica padrão de fenol-clorofórmio (Lahiri & Nurnberger, 1991).

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo tampão de lise (tabela 4), ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M), e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado.

Materiais para preparação do Tampão de Lise dos eritrócitos.

$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloreto de amônio 144M
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Bicarbonato de amônio 0,01M

A seguir, a solução denominada TKM1 (tabela 5), (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 20mM), foi adicionada ao precipitado juntamente com 100 $\mu\text{l}$  de Triton X-100.

Materiais utilizados para a preparação da solução TKM1 de precipitação dos leucócitos.

10mM TRIS-HCl pH 7,6	2,5ml do 2M
10mM Kcl	5ml do 1M
10Mm $\text{MgCl}_2$	5ml do 1M
20mM EDTA	5ml do 0,2M
Qsp	500ml

As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400µl da solução TKM2 (tabela 7) (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM), e 25 µl de SDS 10% e incubado à 55°C durante 30 minutos.

Materiais utilizados para a preparação da solução de lise dos leucócitos TKM2.

10mM TRIZ-HCl pH 7,6	2,5ml do 2M
10mM Kcl	5ml do 1M
0,4M NaCl	40ml do 5M
10mM MgCl <sub>2</sub>	5ml do 1M
20mM EDTA	5ml do 0,2M
Qsp	500ml

Após esse período, 180µl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1) (figura 14), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com etanol 70% gelado. Ao final, o DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril. Todas as soluções utilizadas foram autoclavadas antes do uso.

*As soluções de estoque foram preparadas conforme protocolo da tabela abaixo, e posteriormente autoclavadas.*

*Preparo das soluções de estoque para o PCR.*

TRIZ-HCl pH 7,6 - 2M	Peso Molecular - 121,1 g/mol, foi pesada 121,1g para 500ml de água destilada
KCl 1 M - 74,55 g/mol	Para obter 5ml 1M pesou-se 3,727g para 50ml de água destilada
MgCl <sub>2</sub> 1M tinha PM - 203,30 g/mol	Pesou-se 10,165g de MgCl <sub>2</sub>
EDTA 0,2M PM - 372,24 g/mol	Para obter 5ml do 1M, foi pesado 7,44g para 100ml de água destilada
NaCl 5M PM - 58,44 g/mol	Foi pesado 292,2g para 1000ml de água destilada
SDS 10%	Foi pesado 10g para 100ml de água destilada. (Autoclavação foi feita somente da água, pois o SDS precipita)
Acetato de Sódio 3M pH 5,2	Merck → PM - 136,08 g/mol, pesou-se 163,29g para 400ml de água destilada. Sigma → PM - 82,03 g/mol, pesou-se 98,436g para 400ml de água destilada. Foi acertado o pH.
<u>TE</u> - Tampão TRIS - EDTA	Foi pesado 1,211g de TRIS, 0,372g de EDTA, qsp água destilada 1000ml
Clorofórmio - Álcool Isoamílico	Misturou-se 24 partes de clorofórmio para 1 parte de álcool isoamílico. (960ml de clorofórmio + 40ml de álcool isoamílico). Foi conservado em geladeira (4° C) até o uso.

*Acetato de Sódio 3M pH 5,2* Merck → PM - 136,08 g/mol, pesou-se 163,29g para 400ml de água destilada.  
Sigma → PM - 82,03 g/mol, pesou-se 98,436g para 400ml de água destilada.  
Foi acertado o pH.

TE - Tampão TRIS - EDTA Foi pesado 1,211g de TRIS, 0,372g de EDTA, qsp água destilada 1000ml

### **Realização dos testes de PCR**

**Fator V de Leiden:** A identificação da troca de uma G por uma A na posição 1691 do gene do fator V foi realizada como descrito previamente por Bertina *et al.*,1994.

O FVL mutação foi pesquisado pela amplificação do exon 10 do gene do fator V usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos sense 5'-TCA GGC AGG AAC AAC ACC AT-3' e antisense 5'-GGT TAC TTC AAG GAC AAA ATA CCT GTA AAG CT-3' seguido por digestão do produto da PCR com endonuclease Mnl I.

As condições da reação de PCR consistiram em 40 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 56°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, precedidos de um passo inicial de desnaturação a 94°C por dez minutos e finalizados com uma etapa de 72°C por cinco minutos. O produto de PCR de 241pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição Mnl I. A presença da mutação cria uma seqüência que a enzima Mnl I reconhece e leva à quebra do fragmento em duas partes, uma de 209pb e outra de 32pb. Indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam três fragmentos (241, 209 e 32pb) e indivíduos homozigotos apresentam dois fragmentos (209 e 32pb). O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 3%.

**Mutação da Protrombina ou FII G20210A:** A identificação da troca de uma G por uma A na posição 20210 do gene do fator II foi realizada como descrito previamente por Poort *et al.*,1996.

A reação de PCR foi executada utilizando-se os oligonucleotídeos 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3' e 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C-3'. As condições da reação de PCR consistiram em 40 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 56°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, precedidos de um passo inicial de desnaturação a 94°C por dez minutos e finalizados com um passo de 72°C por cinco minutos.

O produto de PCR de 345pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hind III*. A presença da mutação cria uma seqüência que a enzima *Hind III* reconhece e leva à quebra do fragmento em duas partes, uma de 322pb e outra de 23pb. Indivíduos heterozigotos para a mutação apresentam três fragmentos (345, 322 e 23pb) e indivíduos homozigotos apresentam dois fragmentos (322 e 23pb). Quando o alelo normal estava presente, não houve clivagem para *HindIII* e o fragmento de 345 pb, permaneceu intacto. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 3%.

**Polimorfismo da MTHFR C677T:** A identificação da troca de uma C por uma T na posição 677 do gene da MTHFR foi realizada como descrito previamente por Poort *et al.*,1996.

Avaliação do polimorfismo de MTHFR C677T foi realizada inicialmente por análise do fragmento de restrição após reação em cadeia da polimerase (PCR). O fragmento do gene foi amplificado usando os primers antisense 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GGC-3' e sense 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG TTG AGC-3'.

O produto da PCR de 198 pb, foi digerido pela endonuclease *Hinf I* resultando em fragmentos de 175 e 23 pb no estado homozigoto (TT) e 198, 175 e 23 pb em heterozigotos (CT) (Froost *et al.*,1995).

## APÊNDICE G- Pesquisa de deficiência de atividade de Antitrombina

### Pesquisa de deficiência de atividade de Antitrombina

Utilizou-se a técnica cromogênica funcional, (coagulômetro ACL 200, IL- Instrumentation Laboratory, Milão, Itália), atualmente mais indicada para identificação das deficiências hereditárias e adquiridas de antitrombina. Determina deficiências quantitativas e qualitativas. As técnicas moleculares não são primeira linha, pois são descritos muitos tipos de alterações genéticas que promovem deficiência de AT (Franco, 2004). A AT é inibidor de trombina, Fator Xa, além de Fator IXa, XIa, XIIa, plasmina e calicreína. O princípio de medição cromogênico baseia-se na desativação do Fator Xa fornecida no reagente pela Antitrombina do plasma-teste. A Para-nitroanilina (substrato cromogênico) liberada é medida cineticamente a 405 nm, sendo o seu nível inversamente proporcional à atividade da AT da amostra.

#### Materiais e reagentes (IL, Milão, Itália):

- Substrato cromogênico Para-nitroanilina S-2765, N- $\alpha$ -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl;
- Reagente Fator Xa bovino, heparina, tampão e albumina de soro bovino;
- Plasma *Pool* calibrador comercial;
- Tampão diluente Imidazol pH 7,4%;
- Solução de limpeza do ACL;
- Plasma controle normal e deficiente em antitrombina;

#### Calibração

Uma calibração foi feita, diluído o *pool* calibrador comercial 1:41 em tampão diluente de fator, homogeneizado em vórtex e colocado na posição '*pool*' do prato de amostras do ACL. O teste antitrombina foi selecionado no Menu e programada a calibração, informando a concentração de antitrombina do *pool* calibrador e número de lote dos reagentes.

Feita a calibração, os plasmas-teste e controles normal e deficiente eram diluídos 1 : 41 (25 $\mu$ l plasma:1ml de tampão imidazol). Ao término das análises, os resultados eram validados se os controles normal e anormal estivessem dentro do intervalo esperado.

#### Avaliação das características do desempenho do kit para AT:

a) Especificidade: a metodologia cromogênica funcional utilizando Fator Xa como substrato para a antitrombina do plasma-teste detecta as deficiências quantitativas e a maioria das deficiências qualitativas (ZWICKER & BAUER, 2002).

b) Reprodutibilidade: testes de reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio eram feitos com amostras de pacientes e plasmas controles normais e anormais. Esse era o controle interno de qualidade.

c) Controle externo de qualidade era feito por meio de UK NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Scheme para Coagulação Sanguínea, Programa de Garantia da Qualidade para Laboratórios de Hemostasia recomendado pela Organização Mundial de Saúde, do qual o HEMOPE participa.

O procedimento de determinação da AT no ACL 200 consistiu em duas etapas:

1. Incubação do plasma-teste com Fator Xa, na presença de excesso de heparina.

2. Quantificação da atividade do Fator Xa residual por sua ação amidolítica na síntese de substrato cromogênico sintético.

A quantidade de Fator Xa, neutralizado no primeiro passo da reação, é proporcional ao nível de AT presente no plasma testado, visto que o Fator Xa residual, no segundo passo da reação (medido pela Para-nitroanilina) é inversamente proporcional ao nível de AT do plasma-teste.

A linearidade da curva era entre 20 e 150%.

Os valores de referência variam entre 76 a 122%.

Amostras ictéricas, lipêmicas e hemolisadas podem falsear os resultados. Uso de heparina promove falsos resultados, deve-se evitar a coleta quando o paciente estiver tomando esta medicação. Portadores de anemia falciforme geralmente têm plasma ictérico e/ou hemólise, característica que se agrava nas crises falciformes. Como descrito na casuística, evitou-se pacientes em crise falciforme e/ou vaso-oclusiva. Além disso, o fabricante do equipamento ACL afirma que resultados de AT no ACL 200 não são afetados por valores de hemoglobina até 100 mg/dL, bilirrubina até 20 mg/dL e triglicerídeos até 1 200 mg/dL.

## APÊNDICE H – Dosagem do Fator VIII

### Dosagem do Fator VIII

O ensaio compara a capacidade do plasma-teste com o plasma calibrador comercial em corrigir o TTPA de um plasma que sofre depleção de FVIII (chamado plasma deficiente ou substrato), mas que possui todos os demais fatores necessários para uma coagulação normal.

O método utilizado foi de substituição em um estágio, baseado na habilidade de uma amostra de paciente encurtar o tempo de coagulação em um meio que adiciona plasma deficiente de FVIII:C, reagente para TTPA (fosfolípido e ativador de contato) e cálcio. Devido a todos os fatores estarem em excesso em relação ao FVIII, o tempo de coagulação desta mistura é principalmente afetado pela atividade de FVIII:C da amostra-teste.

#### Materiais e Reagentes

- Tubos plásticos
- Pipeta automática
- Banho de gelo
- Cefalina com ativador (sílica, caolim ou ácido elágico)
- Plasma deficiente em fator VIII:C
- Tampão imidazol salino pH 7,4
- Cloreto de cálcio 0,025M
- Plasma calibrador com valor de FVIII conhecido.
- Coagulômetro ST4 (Stago, Paris, França).

#### Procedimentos

1. Diluições 1:5 (100%), 1:10 (50%), 1:20 (25%), 1:40 (12,5%), do plasma calibrador foram feitas utilizando tampão imidazol.
2. Conforme recomendado, as diluições foram feitas em tubos plásticos e mantidas em banho de gelo, uma vez que o fator VIII:C é lábil.
  - Adicionou-se na cubeta do coagulômetro ST4 50 µl de plasma deficiente em fator VIII:C, 50 µl de cada diluição da curva de calibração ou do plasma-teste diluído, 50 µl de cefalina ativada
  - Incubou-se no equipamento durante 3 minutos a 37°C
  - 50 µl de cloreto de cálcio foi adicionado ao término da incubação.
  - Os tempos de coagulação foram registrados.

#### Curva de Calibração

Os resultados foram representados sobre um papel logarítmico (concentração de F VIII:C do calibrador x tempo de coagulação); a curva de calibração foi traçada.

Plasmas-controle conhecidos normal e anormal foram testados para validar a curva.

Validada a curva, os plasmas dos pacientes foram testados em três diluições (1:10, 1:20, 1:40), uma vez que a linearidade da curva está limitada a 2,00 U/ml. Os valores de Referência para FVIII:C são de 0,4 a 2,0 U/ml (40 a 200 U/dl).

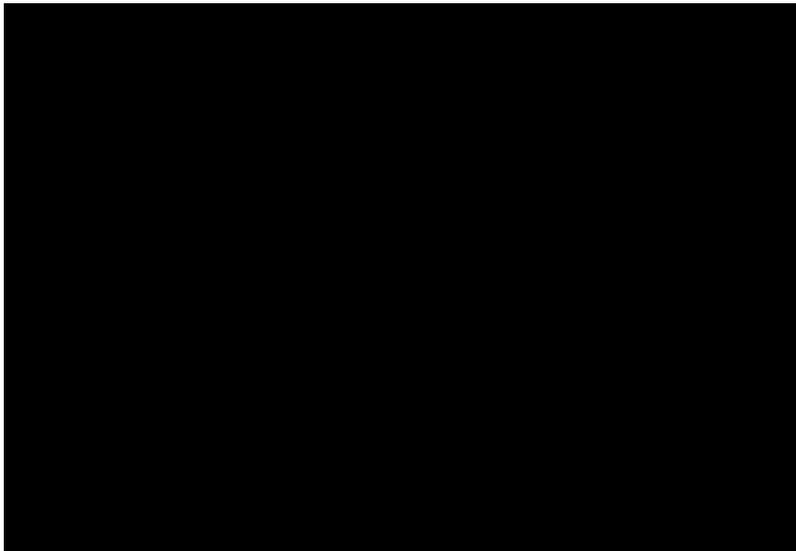


Figura 12 – Gráfico da curva de calibração de dosagem de Fator VIII:C.

Fonte: Laboratório de Hemostasia do Hospital HEMOPE.

## **ANEXOS**

**ANEXO A - Pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos  
do HEMOPE**



**Relatório do Comitê de Ética em Pesquisa  
sobre Projetos de Pesquisa**

**1 - DADOS SOBRE O PROJETO**

**PARECER No 211004-A**

**Título do Projeto: "Marcadores de Trombofilia em Portadores de Síndromes Falciformes"**  
**Instituição Solicitante: Fundação HEMOPE**  
**Local de desenvolvimento do projeto: Fundação HEMOPE**  
**Responsável: Flávia Miranda Gomes de Constantino Bandeira**  
**Identidade: 1835843 - SSP-PE**  
**CPF: 694553334-49**  
**Endereço: Rua José Trajano, 351/302- Boa Viagem- Recife- PE- CEP 51020-320**  
**Telefone: (81) 3326-0909**

**2 - PARECER DO RELATOR**

Pretende-se avaliar a presença de alguns marcadores de trombofilias entre portadores de síndrome falciforme, atendidos no Hospital HEMOPE.

Será realizado estudo descritivo do tipo corte-transversal, com obtenção de medidas de frequência para análise dos resultados e utilização dos testes estatísticos t Student e o Qui-quadrado para observância de diferenças estatísticas.

Quanto à população do estudo, do universo de 1200 pacientes com síndromes falcêmicas cadastrados no Hospital HEMOPE, 100 serão selecionados, aleatoriamente através de sorteio. Os que aceitar participar do estudo assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, quando declaram estar cientes da realização da pesquisa. Após consentimento serão coletadas amostras de sangue periférico, para detecção de anticardiolipina, anticoagulante lúpico, antitrombina, Fator V de Leiden, Fator II 20210<sup>A</sup> e mutação C677T (MTHFR). Os resultados serão divulgados em revistas científicas e congressos.

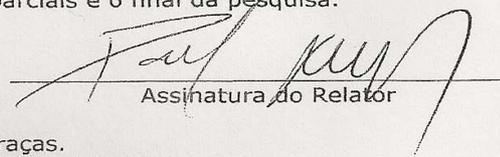
Entendemos que o projeto de pesquisa analisado não colide, aparentemente, com os princípios básicos da Bioética: a não maleficência, a beneficência, a autonomia e justiça, além do sigilo.

Assim sendo, estamos de acordo com o projeto em estudo, contando com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE. Uma vez que este cumpre na íntegra as exigências estabelecidas nos termos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Finalmente, pelas razões acima expostas, proponho a aprovação do projeto ficando, desde já, responsáveis, na obrigação de enviar relatórios parciais e o final da pesquisa.

É o parecer.  
Recife(PE), 18/10/2004.

Nome do Relator: Paula Loureiro  
Endereço/Telefone: Rua Joaquim Nabuco 171, Graças.  
CEP: 52011-000 Recife-PE Fone: (081) 34216946 / 3416-4660

  
Assinatura do Relator



Comitê de Ética em Pesquisa

Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE  
CEP: 52011.000- Tel.: (81) 3182-4771  
C- eletrônico: cep. hemope@gmail.com

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 036/2009

**Título do Projeto:** Marcadores de trombofilia em portadores de doença falciforme.

**Instituição Solicitante:** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz.

**Pesquisadora:** Maria Emília dos Santos

**Identidade:** 3217877 SSP/PE **CPF:** 484.507.234-4 **Telefone:** 81 – 3182-4659

**Finalidade:** Tese de Doutorado em Saúde Pública

**Orientadora:** Yara de Miranda Gomes

**Local de Desenvolvimento do Projeto:** Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE – Laboratório de Coagulação - Unilabe.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

**Objetivo:** Avaliar a presença de marcadores de trombofilia em portadores de doença falciforme.

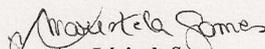
**Objetivos Específicos:** Pesquisar anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico; Pesquisar a mutação C677T na MTHFR; Pesquisar a mutação G20210A na protombina; Pesquisar a mutação R506Q Fator V Leiden; Determinar atividade da antitrombina e Verificar prováveis associações de marcadores de trombofilia e eventos como: Acidente vascular cerebral, úlceras e necrose óssea.

**3 - PARECER DO RELATOR:** O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as modificações apresentadas ao relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 036/09, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 16/9/2009

  
Ana Lúcia de Sena

Coordenadora

Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

