Louise Cominato

**Obesidade infantil como fator trombogênico e
de risco cardiovascular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Durval Damiani

**São Paulo
2021**

Louise Cominato

Obesidade infantil como fator trombogênico e de risco cardiovascular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Durval Damiani

**São Paulo
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cominato, Louise

Obesidade infantil como fator trombogênico e de
risco cardiovascular / Louise Cominato. -- São
Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientador: Durval Damiani.

Descritores: 1.Obesidade pediátrica 2.Índice de
massa corporal 3.Fibrinólise 4.Coagulação 5.Dímero D
6.Adiponectina

USP/FM/DBD-033/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Enrico e Luca, minhas maiores alegrias, pelo incentivo e compreensão durante todo o tempo em que me dediquei à execução deste projeto.

Ao meu marido Mauricio, pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Durval Damiani, pela competência e estímulo à carreira acadêmica.

Aos meus pais, Cleide e Atílio, por todo amor, apoio e dedicação.

Ao Dr. Jorge David Aivazoglou Carneiro, pela confiança e estímulo constante para a realização deste projeto.

Ao Laboratório de Hemostasia/Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Dra. Tania Rubia Flores da Rocha, pelas análises laboratoriais e todo apoio científico durante o projeto.

Ao Dr. Alexandre Archanjo Ferraro, pelos ensinamentos e pela valorosa contribuição na análise estatística deste trabalho e à minha querida amiga Ana Paula Sousa pelo apoio e revisão do texto.

Aos assistentes da unidade de endocrinologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo incentivo, cooperação e compreensão nos momentos de minha ausência nas atividades do grupo a fim de me dedicar a este projeto. De modo especial, à Leandra Steinmetz, amiga de todas as horas, e à Ruth Rocha Franco pelo apoio, incentivo e ajuda na execução desta pesquisa.

Aos residentes, complementandos, *fellows* e pós graduandos da unidade de endocrinologia do Instituto da Criança pelo estímulo ao estudo e à execução desse projeto e de tantos outros projetos acadêmicos.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1	1
INTRODUÇÃO.....	
.....	
2	13
OBJETIVOS.....	
.....	
3	CASUÍSTICA E 15
MÉTODO.....	
4	20
RESULTADOS.....	
.....	
5	30
DISCUSSÃO.....	
.....	
6	35
CONCLUSÕES.....	
.....	
7	37
ANEXOS.....	
.....	
8	41
REFERÊNCIAS.....	
.....	

LISTA DE ABREVIATURAS

DM2 Diabetes tipo 2

FT Fator tecidual

FV Fator V

FVII Fator VII

FVIII Fator VIII

FIX Fator IX

FX Fator X

FXI Fator XI

HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HOMA-IR *Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance*

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFMA Ensaio Imunofluorimétrico

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de massa corporal

LIM 42 Laboratório de investigação médica número

42

OMS Organização Mundial de Saúde

PAI-1 Inibidor do ativador do plasminogênio

PCR Proteína C reativa

POF Pesquisa de orçamentos familiares

t-PA Ativador de plasminogênio do tipo tecidual

TG Teste de Geração de trombina

TFPI Inibidor da via do fator tecidual

TNF α Fator de necrose tumoral do tipo alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da mediana das variáveis clínicas e hemostáticas do grupo de crianças com obesidade (OB) com o grupo controle (C)..... 22

Tabela 2: Comparação da mediana das variáveis metabólicas do grupo de crianças com obesidade (OB) com o grupo controle (C)..... 23

Tabela 3: Comparação da mediana das variáveis clínicas e hemostáticas das crianças com obesidade antes e após perda de peso..... 25

Tabela 4: Comparação da mediana das variáveis metabólicas do grupo de crianças com obesidade pré e pós perda de peso..... 26

Tabela 5: Variação do Dímero D com a variação entre o IMC inicial e final.... 27

Tabela 6: Correlação entre o índice de massa corpórea e insulina e as variáveis hemostáticas.....
..... 28

Tabela 7: Correlação entre as variáveis..... 29

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Esquema inicial da
coagulação..... 4

Figura 2: Esquema simplificado da geração de trombina e formação
de fibrina.
.....
..... 6

Figura 3: Teste de Geração de
trombina.....11

RESUMO

CominatoL. *Obesidade infantil como fator trombogênico e de risco cardiovascular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A obesidade leva a um risco maior de fenômenos tromboembólicos em adultos. Poucos estudos avaliaram a relação de obesidade com risco trombogênico na infância. O objetivo desse trabalho foi avaliar o estado pró trombótico de crianças obesas e comparar com crianças saudáveis, além de comparar a evolução das variáveis metabólicas e de hemostasia após perda de peso e correlacionar com as seguintes adipocinas: leptina e adiponectina. Foram realizados Teste de Geração de Trombina, Fibrinogênio, Dímero D, além de parâmetros metabólicos, em 72 crianças pré púberes, 47 obesas e 25 eutróficas. Foi encontrado um aumento significativo da geração de trombina, fibrinogênio, dímero D e dislipidemia entre os pacientes obesos, confirmando a hipótese de que um estado pró trombótico em crianças obesas já se inicia na fase pré púbere. Ao comparar as variáveis pré e após perda de peso observamos diminuição na geração de trombina, diminuição do dímero D, assim como melhora nos marcadores metabólicos. Houve correlação positiva entre o Índice de massa corpórea e as variáveis hemostáticas, porém não encontrado correlação com insulina. A adiponectina foi a adipocina com melhor correlação com os marcadores pró trombóticos, confirmando sua importância antitrombótica já na infância. O IMC mostrou-se mais relevante do que a resistência insulínica como fator trombogênico. Medidas preventivas contra a obesidade, além de

tratamento precoce devem ser iniciados já na infância para proteção de eventos trombóticos e cardiovasculares.

Descritores: Obesidade pediátrica; Índice de massa corporal; Fibrinólise; Coagulação; Dímero D; Adiponectina.

ABSTRACT`

Cominato L. *Obesity as a thrombogenic and cardiovascular risk factor in children* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Obesity leads to increased risk of thromboembolic events in adults but few studies have addressed the relationship between obesity and thrombogenic risk during childhood. The aim of this study was to evaluate the prothrombotic state of obese children in comparison to healthy children. We also studied the effect of weight loss on metabolic and hemostatic variables, and how it correlates with the levels of two major adipokines, leptin and adiponectin. Thrombin generation, fibrinogen, and D-dimer levels, along with metabolic parameters, were measured in 72 prepubertal children, of which 47 were obese, and 25 eutrophic. A significant increase in thrombin generation, fibrinogen, D-dimer, and dyslipidemia was found among obese patients, confirming the hypothesis that a prothrombotic state develops early in life, during prepubertal phase. Comparison of variables before and after weight loss showed a reduction in thrombin generation and D-dimer values, and an improvement in metabolic markers, associated with weight loss. There was a positive correlation between body mass index (BMI) and hemostatic variables, although no correlation was found between BMI and insulin. Adiponectin was more strongly associated with prothrombotic markers than leptin, supporting its key anti-thrombotic role already in childhood. In addition, BMI was shown to be a more important prothrombotic risk

factor than insulin resistance. Our findings highlight the importance of implementing childhood obesity preventive measures, in addition to early treatment strategies, in order to protect children from thromboembolic events.

Descriptors: Pediatric obesity; Body mass index; Fibrinolysis; Dimer- D; Adiponectin.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tem aumentado em todas as faixas etárias pediátricas. Entre os anos de 1980 e 2013, a prevalência de sobrepeso e obesidade combinada aumentou globalmente de 27,5% para adultos e 47,1 % para crianças. Houve aumento substancial na prevalência entre crianças e adolescentes nos países em desenvolvimento: de 8,1% para 12,9 % entre os meninos e de 8,4% para 13,4 % em meninas. (NG; FLEMING; ROBINSON; THOMSON *et al.*, 2014).

No Brasil, dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostram um aumento importante no número de crianças acima do peso no país, principalmente na faixa etária entre 5 e 9 anos de idade. O número de meninos acima do peso mais que dobrou entre 1989 e 2009, passando de 15% para 34,8%, respectivamente. Já o número de obesos teve um aumento de mais de 300% nesse mesmo grupo etário, indo de 4,1% em 1989 para 16,6% em 2008-2009. Entre as meninas, a variação foi ainda maior: 2,4 em 1989 para 11,8 em 2009. (IBGE, 2011).

Recentemente, foram publicados dados de crianças de 1 ano de idade das coortes de nascimentos de Pelotas (Brasil), de 1982 a 2015, mostrando um aumento do excesso de peso de 88%, com um aumento particularmente mais rápido após 2004. (GONÇALVES; BARROS; BUFFARINI; HORTA *et al.*, 2019).

O IMC é calculado através do peso dividido pela altura em metro elevado ao quadrado (kg/m^2) e é considerado a forma mais prática e eficaz de determinar sobrepeso na infância a partir de 2 anos de idade. Obesidade na infância é definida como: IMC acima do percentil 95 ou acima do escore $Z+2$, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS). (BARLOW, 2007; MEI; GRUMMER-STRAWN; PIETROBELLI; GOULDING *et al.*, 2002).

O excesso de peso e acúmulo de tecido adiposo resultam em processos patológicos tais como resistência insulínica, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, que estão associados ao

desenvolvimento de aterosclerose. A coexistência de alterações metabólicas e hemostáticas serve de base para a doença coronariana no adulto. Estudos clínicos e epidemiológicos têm claramente estabelecido a relação entre a obesidade e doenças cardiovasculares, trombose, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (DM2). (Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, 2000; YUSUF; HAWKEN; OUNPUU; BAUTISTA *et al.*, 2005).

A hemostasia depende da interação entre plaquetas, vasos sanguíneos, proteínas da coagulação do sangue, anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial representa processo crítico para a manutenção da integridade vascular. A geração da enzima trombina, cujo precursor é a protrombina, é o evento central no processo de formação do coágulo de fibrina. (RF, 2001) (ORKIN; FISHER; GINSBURG; LOOK *et al.*, 2015).

A coagulação é um mecanismo integrado celular/ humoral que age por meio de dois mecanismos opostos: pró-coagulantes e anticoagulantes. O primeiro, representado pelos fatores pró-coagulantes, é desencadeado pelo fator tecidual (FT). Quando ocorre lesão vascular, a proteína que está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, denominada fator tecidual (FT), fica exposta à corrente sanguínea e ao fator VII (FVII), formando o complexo FT + FVII. (TRIPODI, 2016).

O complexo FT + FVII ativa os fatores X e IX. O FIX ativado combina-se com o fator VIII para formar a segunda via de ativação do FX. O FX une-se ao fator V formando o complexo protrombinase, que ativa a protrombina gerando a formação de trombina. A molécula de fibrinogênio (solúvel) é convertida, através da ação da trombina, em monômeros de fibrina (insolúvel) que são estabilizados pela ação do fator XIII e se ligam ao tampão plaquetário, formando o coágulo. A trombina também amplifica esse processo ativando os fatores VIII e

V. (ORKIN; FISHER; GINSBURG; LOOK *et al.*, 2015) (FERREIRA; SOUSA; DUSSE; CARVALHO, 2010).

Figura1: Esquema inicial da coagulação.

Figura adaptada de Souza, MR, 2012. FVII: fator VII, FVIIa: fator VII ativado. FIX: fator IX. FIXa: fator IX ativado. FVIIIa: Fator VIII ativado. FX: fator X, FXa: fator X ativado. FVa: Fator V ativado. (Souza MR, 2012).

A formação da coagulação precisa ser regulada para que não haja excesso de ativação do sistema, aumento inadequado da formação de trombina e risco de oclusão vascular. O mecanismo anticoagulante tem papel fundamental nesse processo de equilíbrio hemostático. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína produzida pelas células endoteliais, age inibindo o fator Xa e o fator VIIa/FT. A proteína S é uma proteína anticoagulante essencial que atua como um cofator para TFPI. A anticoagulação também se origina em parte na geração da trombina, que uma vez complexada com seu receptor endotelial trombomodulina ativa a proteína C plasmática. A proteína C ativada atua, por sua vez, como um anticoagulante potente que, em combinação com a proteína S, diminui a geração de trombina por meio da inibição dos fatores VIII ativado e V ativado. (PERARAMELLI; ROSING; HACKENG, 2012)

O mecanismo anticoagulante acontece conjuntamente a partir da presença de antitrombina no plasma que, em complexo com moléculas endoteliais semelhantes à heparina (glicosaminoglicanos), inibem a trombina direta e indiretamente por meio da inativação de X ativado. Finalmente, a formação de trombina é inibida também pela diminuição do FT plasmático, que inibe o complexo FT-fator VII ativado e fator X ativado. O equilíbrio entre os mecanismos pró e anticoagulantes é essencial para proteger contra a indesejada formação de trombina e deposição de fibrina em condições fisiológicas. (TRIPODI, 2016; 2017).

Figura 2: Esquema simplificado da geração de trombina e formação de fibrina (A). Ativação da proteína C (B). Ação dos anticoagulantes naturais (C).

Figura adaptada de Tripodi, 2017. EPCR: receptor da proteína endotelial; TM: trombomodulina; PC: proteína C; T: trombina; APC: proteína C ativada; PS: proteína S; AT: antitrombina; TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*. FXI: fator XI. FXIa: fator XI ativado FVII: fator VII, FVIIa: fator VII ativado. FIX: fator IX. FIX: fator IX ativado. FVIIIa: Fator VIII ativado. FX: fator X, FXa: fator X ativado. FVa: Fator V ativado. (TRIPODI, 2017).

O sistema de fibrinólise também é fundamental para a manutenção da hemostasia: quando há diminuição na quebra de fibrina, predispõe-se ao excesso de coagulação. (RF, 2001) . A fibrina é degradada através da ação da plasmina, ativada pela interação de plasminogênio e o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) sob influência do PAI-1 (Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1). A fibrinólise leva à degradação do coágulo e formação de produtos como o dímero D, considerado um marcador da hemostasia e degradação contínua de fibrina, além de um importante marcador inflamatório. A concentração aumentada de PAI-1 circulante leva à hipofibrinólise, um estado em que a remoção de trombos do sistema vascular é prejudicada. (BALAGOPAL; DE FERRANTI; COOK; DANIELS *et al.*, 2011) (ADAM; KEY; GREENBERG, 2009).

Um estado de hipercoagulabilidade, ou pró trombótico, associado à obesidade já foi bem estabelecido em adultos. A obesidade é considerada um fator de risco significativo para o desenvolvimento de tromboembolismo venoso. Os elementos que geram o aumento de risco para tromboembolismo venoso em pacientes obesos incluem inflamação, diminuição da fibrinólise, aumento da geração de trombina e hiperatividade plaquetária. As alterações da hemostasia em obesos se devem principalmente à hiperativação da coagulação e à inadequação da fibrinólise. Essa hiperativação decorre do envolvimento de proteínas plasmáticas como fator tecidual (FT), fibrinogênio, fator VII e VIII. O

comprometimento da fibrinólise envolve principalmente o PAI-1 e t-PA. (STEIN; BEEMATH; OLSON, 2005).

A perda de peso leva à redução das concentrações de mediadores pró-trombóticos, como o PAI-1, fator tecidual (TF), além de melhorar inflamação crônica e disfunção plaquetária. (SAMAD; RUF, 2013).

Recentemente vem sendo estudada a relação entre obesidade e aumento do risco pró trombótico entre crianças e adolescentes, assim como fatores associados ao excesso de peso e doenças cardiovasculares futuras. Estudos demonstrando aumento de concentração de fibrinogênio, Dímero D, PAI-1, protrombina, fatores VII e VIII foram realizados em crianças e adolescentes obesos. (CIMENTI; MANGGE; HAIDL; ZACH *et al.*, 2006) (GIORDANO; DEL VECCHIO; CECINATI; DELVECCHIO *et al.*, 2011).

O tecido adiposo, além de ser o principal reservatório energético do organismo, pode ser considerado um verdadeiro órgão endócrino, produtor de hormônios e citocinas associados ao balanço energético, metabolismo glicêmico, lipídico e à coagulação, denominadas adipocitocinas ou adipocinas.

A leptina foi a primeira adipocina estudada. Trata-se de um hormônio anorexígeno descoberto em 1994, produto do gene *ob*, identificado no estudo de camundongos obesos (*ob/ob*) que apresentavam deficiência desse hormônio, que atua em um complexo mecanismo de regulação do apetite localizado no hipotálamo ventromedial. Em humanos obesos, a leptina geralmente é alta, sugerindo um estado de resistência, e não de deficiência, como apresentavam os ratos. (BLUHER; MANTZOROS, 2004) (AHIMA, 2006) (TRIAANTAFYLLOU; PASCHOU; MANTZOROS, 2016).

Citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 (IL-6) também são produzidas no tecido adiposo e estão associadas à resistência à ação da insulina e comorbidades cardiovasculares. Outras adipocinas estão envolvidas

na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio), homeostase vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1: PAI -1) e homeostase glicêmica (adiponectina). (KERSHAW; FLIER, 2004) (PLOGGAARD; KELLER; KELLER; PEDERSEN, 2005).

As principais adipocinas liberadas pelo tecido adiposo e amplamente estudadas são a leptina e a adiponectina, que afetam processos metabólicos e têm sido associadas à morbidade de doenças cardiovasculares. Estudos recentes têm demonstrado que a adiponectina tem propriedades antitrombóticas, enquanto a leptina apresenta um efeito pró trombótico. (MROZINSKA; CIESLIK; BRONIATOWSKA; UNDAS, 2018).

A leptina atua primariamente como reguladora do apetite e do gasto energético, mas age também modulando a angiogênese, a inflamação e a secreção insulínica. A obesidade é tipicamente caracterizada por altas concentrações de leptina devido a uma resistência à sua ação, constituindo um fator de risco independente para doença cardiovascular. Estudos em animais mostraram que ratos com concentrações elevadas de leptina possuíam prejuízo da fibrinólise e estimulação da coagulação. (WALLACE; MCMAHON; PACKARD; KELLY *et al.*, 2001) (KONSTANTINIDES; SCHÄFER; KOSCHNICK; LOSKUTOFF, 2001).

A adiponectina atua aumentando a sensibilidade insulínica e tem também propriedades antiateroscleróticas e anti-inflamatórias. Em pacientes obesos têm sido observadas concentrações reduzidas desta adipocina. (KATO; KASHIWAGI; SHIRAGA; TADOKORO *et al.*, 2006).

A associação entre concentrações de adiponectina e ativação plaquetária tem sido estudada: foi observada hiper-reatividade plaquetária nos casos de resistência insulínica e hipo-adiponectinemia. Em ratos com *nocaut* da adiponectina, houve formação acelerada de trombos, demonstrando seu efeito antitrombótico, enquanto sua suplementação diminuiu a tendência à trombogênese. Além disso, a detecção de transcrição de receptores

de adiponectina em plaquetas de ratos e megacariócitos humanos indica um possível efeito direto na função plaquetária. (LIHN; PEDERSEN; RICHELSEN, 2005).

A proteína C reativa (PCR) é um marcador inflamatório muito associado com a liberação de múltiplas citocinas pelo tecido adiposo e está aumentada na obesidade e na síndrome metabólica. É um fator de correlação importante entre adiposidade e distensão arterial em adolescentes e relaciona-se ao desenvolvimento de doença cardiovascular e DM-2. (WHINCUP; GILG; DONALD; KATTERHORN *et al.*, 2005).

O fator tecidual (FT), estimulado pela leptina e outros estímulos inflamatórios, é o principal iniciador da cascata de coagulação, culminando, juntamente com o fator VII ativado, na ativação dos fatores IX e X e, conseqüentemente, na produção de trombina, principal formador do coágulo. Em obesos, especialmente nos intolerantes à glicose, há mais fator tecidual circulante. A perda de peso resulta em diminuição significativa dessas concentrações. Embora o tecido adiposo não produza fatores de coagulação como fibrinogênio, fatores VII e VIII, a liberação de adipocinas e citocinas pelas células adiposas disfuncionais induzem à formação hepática desses fatores. Estudos envolvendo DM2 mal controlado também mostraram maiores concentrações de FT circulantes com conseqüente diminuição após melhora do controle glicêmico. (SAMAD; RUF, 2013; SAMBOLA; OSENDE; HATHCOCK; DEGEN *et al.*, 2003) (FONTANA; EAGON; TRUJILLO; SCHERER *et al.*, 2007)

O fibrinogênio, substrato para ação da trombina, é o precursor da fibrina, sendo elemento-chave na cascata de coagulação. Promove aterogênese e trombogênese e é um fator de risco independente para doença cardiovascular. Sabe-se que a síntese de fibrinogênio nos estados inflamatórios é mediada por IL-6 e que o tecido adiposo visceral é um importante produtor dessa interleucina. Concentrações aumentadas de fibrinogênio correlacionam-se diretamente com risco

cardiovascular. (BALAGOPAL; DE FERRANTI; COOK; DANIELS *et al.*, 2011; KOENIG, 2003).

Estudos *in vitro* mostram que PAI-1 é regulado por vários fatores, incluindo citocinas, fatores de crescimento e insulina. O IMC e os triglicerídeos também influenciam sua produção. A redução de peso, por sua vez, resulta em menores concentrações de PAI-1. (SIMPSON; BOOTH; MOORE; BENNETT, 1991) (BASURTO; SÁNCHEZ; DÍAZ; VALLE *et al.*, 2019; PLOMGAARD; KELLER; KELLER; PEDERSEN, 2005).

O ensaio de geração de trombina (GT) é cada vez mais reconhecido como uma ferramenta de diagnóstico versátil no campo de trombose e hemostasia. É bem aceito que o perfil de GT no plasma coagulado é um melhor parâmetro do sistema hemostático do que os ensaios baseados no tempo de coagulação, por exemplo, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). O TP e TTPA são testes estáticos nos quais o plasma coagula logo após 5% da quantidade total de trombina ser gerada, deixando os 95% restantes sem a devida análise. (NINIVAGGI; APITZ-CASTRO; DARGAUD; DE LAAT *et al.*, 2012).

A geração de trombina é resultante da ativação de fatores pró-coagulantes e inibição dos fatores anticoagulantes em determinado tempo. Um sinal fluorescente é gravado por um *software* de computador que calcula a atividade da trombina em comparação com um padrão interno. Os parâmetros analisados são: o tempo de latência (LAG TIME/ min), fase que segue a ativação até o início da geração de trombina; o pico de geração da trombina (PEAK- expresso como nmol / L); a área sob a curva, definido como potencial de trombina endógena (ETP) (expresso como nmol / L trombina min) (Figura 3). O LAG TIME representa o equivalente ao tempo de coagulação em um teste de coagulação tradicional, mas é mais sensível porque o sistema é muito mais diluído. O PEAK representa a maior concentração de trombina gerada. O potencial de trombina endógena (ETP) representa a quantidade total de trombina que uma

amostra de plasma pode gerar sob a ação de dois condutores opostos (pró e anticoagulante). A introdução de trombomodulina solúvel ao ensaio torna o método representativo do processo de coagulação “in vivo”, atuando como anticoagulante. (TRIPODI, 2016) (AL DIERI; DE LAAT; HEMKER, 2012; BRUMMEL-ZIEDINS; VOSSEN; ROSENDAAL; UMEZAKI *et al.*, 2005) (BRUMMEL-ZIEDINS; EVERSE; MANN; ORFEO, 2014) (DUARTE; FERREIRA; RIOS; REIS *et al.*, 2017).

Figura 3: Teste de Geração de trombina.

TIME: tempo de latência. PEAK: o pico de geração da trombina. ETP: potencial de trombina endógena. (DUARTE; FERREIRA; RIOS; REIS *et al.*, 2017).

Brummel-Ziedins *et al.* (2005) observaram que adultos com IMC acima de 26 kg/m^2 apresentaram maiores taxas de trombina total e taxas mais rápidas de geração de trombina em comparação com indivíduos com um IMC $<26 \text{ kg/m}^2$. Estudos populacionais mostraram que a perda de 5% de peso leva à melhora metabólica e à diminuição do risco de doença cardiovascular. (BRUMMEL-ZIEDINS; VOSSEN; ROSENDAAL; UMEZAKI *et al.*, 2005) (BARBATO; MARTINS RDE; RODRIGUES MDE; BRAGA *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

Objetivo principal

- Avaliação do estado pró-trombótico em crianças pré-púberes, obesas em comparação com crianças saudáveis.

Objetivos secundários

- Comparar as variáveis iniciais e após perda de peso (IMC, fibrinogênio, dímero D, fator VIII, t-PA, PAI-1, teste de geração de trombina, colesterol total e frações, triglicérides, glicemia, adiponectina, insulina, HOMA IR, leptina).
- Avaliar a correlação do estado pró-trombótico dos pacientes obesos com suas adipocinas e marcadores metabólicos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Foram convidadas a participar do estudo 50 crianças com obesidade acompanhadas no Ambulatório de Obesidade da Unidade de Endocrinologia do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcantara” do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre 7 e 10 anos de idade, impúberes no período de outubro de 2012 a dezembro de 2015. A amostragem foi definida por conveniência.

Outras 25 crianças saudáveis acompanhadas no ambulatório de pediatria do Instituto da Criança “Prof. Pedro de Alcantara” do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) foram convidadas a participar do estudo como controles, mantendo a distribuição etária e de sexo.

Três pacientes abandonaram o estudo no início do acompanhamento; e 47 crianças de 7 a 10 anos e 25 controles concordaram em participar do estudo. O termo de consentimento livre e esclarecido específico foi assinado pelos responsáveis, que autorizaram a participação. (Anexo I e II).

O projeto foi aprovado pela CAPPesq (número 0138/10) e recebeu apoio financeiro da FAPESP (número 2011/08101-5 - Projeto de Pesquisa - Regular).

Os critérios de inclusão foram: crianças de 7 a 10 anos, impúberes, com obesidade ($IMC > \text{escore } Z +2$ segundo critérios da OMS (DE ONIS, 2007)). Foram utilizados para caracterização da puberdade os Critérios de Tanner. (EMMANUEL; BOKOR, 2020).

Já os critérios de exclusão foram: pacientes púberes, em uso de corticosteroides, anticoncepcionais orais ou medicamentos anticoagulantes, pacientes síndrômicos, com antecedente pessoal de coagulopatias, neoplasias ou DM-2.

Ao todo, 21 pacientes foram acompanhados clinicamente em nosso serviço até atingirem a perda de, no mínimo, 5% do índice de massa corpórea. A partir daí, foram reavaliados com novos exames

laboratoriais.

Acompanhamento clínico

Todos os pacientes foram acompanhados em ambulatório uma vez por mês num período que variou de quatro a 12 meses. Houve orientação nutricional adequada para a faixa etária e estímulo para a prática de atividade física.

Coletas laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue de todos os participantes para realização de exames laboratoriais no início do estudo e após perda de 5% de IMC entre os pacientes que completaram o estudo.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e no Laboratório de Coagulação do Hospital das Clínicas FMUSP.

Para avaliação do estado pró-trombótico foram realizadas a medida da geração de trombina, fibrinogênio, Fator VIII, PAI-1, dímero-D e ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA).

Os seguintes critérios foram utilizados para a coleta do material:

1. Os exames foram coletados pela manhã, após jejum de 12 horas.
2. A coleta de sangue foi realizada por meio de punção de veia periférica calibrosa do membro superior, com garroteamento apenas durante a punção. A primeira seringa foi destinada a outros testes que não de hemostasia.

3. Para os testes de hemostasia foram necessários 10,8 ml de sangue total, ou seja, três tubos de citrato de sódio 3,2% com capacidade de 3,6 ml.

4. O plasma pobre em plaquetas foi separado após centrifugação a 2500G, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, aliqotado em tubos de poliestireno e estocado a -80°C. As amostras de plasma pobre em plaquetas foram descongeladas à temperatura de 37°C, imediatamente antes da realização das dosagens.

5. O material foi separado e encaminhado para laboratório específico: LIM 42, Bioquímica ou Laboratório de Hemostasia/Hematologia.

No Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da biologista-chefe, Valéria S. Lando, foi utilizado o equipamento auto-Delfia - Wallac - 1235 Automatic Imunoassay System.

- As dosagens de insulina foram realizadas pelo método IFMA - ensaio imunofluorimétrico, com kit fluorimétrico (AutoDefia).
- As dosagens de leptina e adiponectina foram realizadas pelo método ELISA.

No Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade de Dr. Nairo Massakazu Sumita, foram realizadas:

- A dosagem da Proteína C Reativa (PCR) pelo método Nefelometria.
- A dosagem da glicemia pelo Método Enzimático colorimétrico-GOD-PAP.
- A dosagem do colesterol total conforme o método: Colesterol - Enzimático colorimétrico CHOD/PAP, o HDL segundo o método enzimático - colorimétrico em fase homogênea e o LDL pelo colorimétrico enzimático homogêneo.

No Laboratório de Hemostasia/Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da chefe do laboratório, Dra. Tânia Rubia Flores da Rocha, foram dosados:

- O dímero-D pelo método ELISA clássico pelo Kit da empresa Horiba ABX que representa a marca Stago.
- O fibrinogênio pelo Método de Clauss modificado utilizando-se o conjunto de reagentes Fibriquik®.
- O fator VIII que é baseado no Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado e foi feito com o equipamento ACL da marca IL.
- O PAI-1 e t-PA pelo método ELISA clássico pelo Kit da marca Tecnoclone.
- A medida da geração de trombina foi realizada com a utilização do equipamento Fluorômetro para leitura em microplacas modelo Fluoroskan Ascent, marca Thermo Scientific. Análise com e sem trombomodulina.

O critério de resistência à insulina foi definido pelo índice HOMA-IR $>2,5$ [insulinemia de jejum (mU/L) x glicemia de jejum (mg/dL) /405)].

Análise Estatística

Inicialmente foram calculadas as frequências das variáveis categóricas, expressas em seus números de observações e porcentagens.

A distribuição das variáveis contínuas foi expressa por suas medianas e intervalo interquartil, uma vez que a distribuição da maioria não era gaussiana.

Foi realizado o teste de Mann Whitney para comparação das medianas das variáveis de crianças com obesidade e o grupo controle e para comparação das medianas das variáveis antes e após perda de peso. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para avaliar a correlação entre as variáveis, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman.

Foram construídos modelos lineares generalizados tendo como variáveis pendentes as medidas hematológicas e como variável independente a diferença entre o Z escore de IMC inicial e final.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das variáveis categóricas:

O grupo OB (obesidade), composto de 47 crianças, apresentou mediana de idade de 9 anos, 29 delas do sexo masculino (61,7%) e mediana do escore-Z de IMC: +3.3.

O grupo C (controles), composto por 25 crianças, apresentou mediana de idade de 8 anos, 13 delas do sexo masculino (52%) e mediana de escore-Z de IMC: +0,2.

Entre os pacientes do grupo OB (n: 47), cinco (10,6%) apresentaram fibrinogênio elevado e nove (19%) apresentaram dímero D acima dos valores normais. No grupo controle e entre os pacientes que perderam peso não houve alteração de fibrinogênio ou de dímero D

Na avaliação metabólica do grupo OB, 40 pacientes apresentaram dislipidemia (85%), sendo que 33 (70%) apresentaram alteração na concentração de colesterol total, 14 (30%) apresentaram HDL menor que 40 mg/dL, 31 com aumento de LDL (66%) e triglicérides elevados em 24 crianças (51%). Entre os pacientes com obesidade também foi observado resistência à insulina em 26 crianças (55%) com elevação do HOMA-IR. Elevação de PCR (> 5 mg/L) foi observado em nove pacientes (19%).

4.2: Comparação da mediana das variáveis entre o grupo de crianças com obesidade (OB) e o grupo controle (C).

Na comparação das medianas entre grupo OB e o grupo C, houve aumento de fibrinogênio entre os pacientes com obesidade ($p=0.0003$) (Tabela 1).

Na avaliação da geração de trombina, houve queda no tempo de latência (LAG time) com e sem trombomodulina ($p= 0.0001$) no grupo OB, indicando início precoce de formação de trombina. No que diz respeito ao potencial de trombina endógena (ETP) e o pico (PEAK)

do teste com TM, houve aumento no grupo OB ($p=0.01$ e $p=0.008$) (Tabela 1).

Também foi observado aumento significativo do colesterol total e triglicérides ($p= 0.0003$, $p= 0,05$ e $p= 0.007$, respectivamente) entre os pacientes com obesidade, além de HDL diminuído ($p=0.02$). (Tabela 2)

Tabela 1: Comparação da mediana das variáveis clínicas e hemostáticas do grupo de crianças com obesidade (OB) com o grupo controle (C). (ANEXO 1)

Variável (Valor de normalidade)	OB	C	p
Número (sexo)	47 (29♂)	25 (13♂)	(0.42)
idade	9	8	0.16
IMC (kg/m^2)	28,0	16.4	0.0001*
Z IMC (>-1 e <1)	3.3	0.2	0.0001*
Fibrinogênio (150-400mg/dL)	321	262	0.0003*
LAG TIME min	3.3	4.2	0.0001*
ETP nmol / L trombina min	1286	1361	0.17
PEAK nmol / L	254	262	0.24
LAG TIME TM	3.9	6.9	0.0001*
ETP TM	588	372	0.01*
PEAK TM	142	79	0.008*

* $p<0.05$. TM: Com trombomodulina. LAG TIME: tempo de latência. PEAK: o pico de geração da trombina. ETP: potencial de trombina endógena.

Tabela 2: Comparação da mediana das variáveis metabólicas do grupo de crianças com obesidade (OB) com o grupo controle (C). (Anexo1)

Variável (Valor de normalidade)	OB (Obesidade)	C (Controles)	p
Colesterol total (< 170 mg/dL)	169	146	0.05
HDL (> 40 mg/dL)	43	55	0.02*
LDL (< 100 mg/dL)	110	90	0.26
Triglicérides (< 100 mg/dL)	102	64	0.007*
Glicemia (60-100mg/dL)	81	88	0.01*
PCR (< 5 mg/L)	1.8	0.7	0.29

* $p < 0.05$. PCR: proteína C reativa.

4.3 Comparação da mediana das variáveis inicial (pré) e após perda de peso (pós).

Vinte e uma crianças com obesidade foram acompanhadas e reavaliadas após perda de, no mínimo, 5% do IMC. Na comparação das medianas das variáveis pré e pós perda de peso, houve queda significativa do IMC ($p < 0.0001$), tendência à queda do FVIII, fibrinogênio, dímero D e t-PA, glicemia, adiponectina, leptina, PCR, insulina e HOMA-IR. Houve ainda diminuição significativa de colesterol total ($p = 0.01$), LDL ($p = 0.04$), triglicérides ($p = 0.01$); tendência a aumento de HDL e adiponectina. E, por fim, houve aumento significativo de PAI-1 ($p < 0.0001$). (Tabela 3)

Na comparação do teste de geração de trombina pré e pós perda de peso, houve diminuição do LAG TIME sem trombomodulina ($p=0.03$) e com trombomodulina ($p=0.02$), aumento do PEAK sem trombomodulina ($p=0.03$) e tendência ao aumento do pico de potencial de trombina endógena com e sem TM.

Tabela 3: Comparação da mediana das variáveis clínicas e hemostáticas das crianças com obesidade antes e após perda de peso: (ANEXO 2)

Variável (Valor nominal)	Pré	Pós	p
Número	21	21	
Z IMC (>-1 e <1)	3.2	2.6	0.0001*
Fibrinogênio (150-400mg/dL)	324	312	0.16
Dímero D (0-250 ng/mL)	123	91	0.13
FATOR VIII (50-150%)	129	124	0.31
t-PA (2-8ng/mL)	5.4	3.4	0.62
PAI-1 (1-7U/mL)	2.1	6.3	0.0001*
LAG TIME min	3.3	3.2	0.03*
ETP nmol / L trombina min	1351	1359	0.50
PEAK nmol / L	254	278	0.03*
LAG TIME (com TM)	3.9	3.7	0.02*
ETP (com TM)	598	617	0.09
PEAK (com TM)	149	137	0.29

* $p < 0.05$. TIME: tempo de latência. PEAK: o pico de geração da trombina. ETP: potencial de trombina endógena.

Tabela 4: Comparação da mediana das variáveis metabólicas do grupo de crianças com obesidade pré e pós perda de peso. (ANEXO 2)

Variável (Valor de normalidade)	Pré	pós	p
Colesterol total (< 170mg/dL)	174	164	0.01*
HDL (>40 mg/dL)	40	46	0.15
LDL (<100 mg/dL)	115	94	0.04*
Triglicérides (<100 mg/dL)	117	84	0.01*
Glicemia (60-100 mg/dL)	81	78	0.31
PCR (<5 mg/L)	1.8	1.5	0.26
Adiponectina (11,6 a 16,0 mg/L)	15.8	19.7	0.15
Leptina (2- 11,1 ng/mL)	14.3	10.9	0.58
Insulina (2,6- 24,9 µU/mL)	16	13.7	0.19
HOMA IR (<2,5)	3.1	2.6	0.15

*p<0.05. PCR: proteína C reativa.

A queda do IMC foi acompanhada pela queda do dímero D ($p < 0.001$). (Tabela 5).

Tabela 5- variação média do Dímero D com a queda de 1 desvio padrão do IMC (inicial e final). (Anexo 3)

ANÁLISE UNIVARIADA*				
Coeficiente				
	te	P	IC95%	
Dímero D		<0,001	250,2	848,4
	-549,33	1	6	0

* Ajustada para idade e sexo

4.4 Correlações:

Houve correlação positiva entre índice de massa corpórea e as variáveis hemostáticas: potencial de trombina endógena (ETP), pico, fibrinogênio e dímero D. Correlação negativa com o LAG time. Não houve correlação significativa entre a insulina e as variáveis hemostáticas.

TABELA 6: Correlação entre o índice de massa corpórea e insulina e as variáveis hemostáticas.

	LAG TIME TM	ETP TM	PEAK TM	FIBRINOGENI O	DIMERO D
IMC (rho) p	0,42 07 0,00 03	0,37 16 0,00 17	0,38 5 0,00 11	0,2369 0,0467	0,24 91 0,03 48
Insulina (rho) p	-0.01 0.4	0,01 0,9	0,10 0,5	0,02 0.8	-0,01 0,9

rho: coeficiente spearman. TM: Com trombomodulina. TIME: tempo de latência. PEAK: o pico de geração da trombina. ETP: potencial de trombina endógena.

Adiponectina correlacionou-se negativamente com as seguintes variáveis: ETP, ETP com trombomodulina e pico com trombomodulina. O fibrinogênio correlacionou-se positivamente com o dímero D. houve também correlação positiva entre leptina e o pico com trombomodulina.

Tabela 7: Correlação entre as variáveis.

Variável	Correlação(rho)	p
Fibrinogênio X Dímero		
D	0.69	<0.001
Adiponectina X ETP	-0.37	0.01
Adiponectina X ETP CT	-0.29	0.04
Adiponectina x PEAK		
CT	-0.32	0.02
Leptina X pico PEAK CT	0.30	0.03

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo avaliou marcadores hemostáticos, metabólicos e inflamatórios em crianças pré púberes com obesidade e comparou-os com os de crianças saudáveis. Também acompanhou as crianças obesas até perda de peso e reavaliou todos os marcadores. Observamos fibrinogênio e dímero D elevados (10% e 19% dos pacientes obesos respectivamente), além da dislipidemia, encontrada em grande parte dessas crianças (85%). A maioria das crianças com obesidade, apesar de serem pré púberes, já apresentavam resistência insulínica, com índice HOMA-IR elevado em 55% delas. A dislipidemia, resistência à insulina, aumento de dímero D e fibrinogênio, acompanhados do aumento do PCR foram achados relevantes, compatíveis com a literatura e que reforçam a hipótese de que a obesidade infantil está associada a um estado pró trombótico e risco cardiovascular. (BALAGOPAL; DE FERRANTI; COOK; DANIELS *et al.*, 2011; GIORDANO; DEL VECCHIO; CECINATI; DELVECCHIO *et al.*, 2011).

Ao comparar esses resultados com dados de crianças saudáveis, observamos aumento significativo de fibrinogênio e triglicérides entre os pacientes com obesidade, além de diminuição do HDL, dados também compatíveis com a literatura. (BALAGOPAL; DE FERRANTI; COOK; DANIELS *et al.*, 2011; HAFEZ; EL-MASRY; MUSA; FATHY *et al.*, 2016).

O teste de geração de trombina é um melhor determinante da função global do sistema hemostático do que os ensaios tradicionais, como, por exemplo, o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Dentre as variáveis analisadas, o potencial de trombina endógena é o mais robusto, porque é determinado a partir do nível final da quantidade de produto fluorogênico que é produzido pela trombina livre. Já o pico é mais sensível a variações no mecanismo de geração de trombina. A introdução da trombomodulina (receptor endotelial que ativa a proteína C plasmática, diminuindo a geração de trombina) proporciona ao teste uma mimetização mais fisiológica das condições

in vivo. (NINIVAGGI; APITZ-CASTRO; DARGAUD; DE LAAT *et al.*, 2012) (AL DIERI; DE LAAT; HEMKER, 2012) (BRUMMEL-ZIEDINS; VOSSEN; ROSENDAAL; UMEZAKI *et al.*, 2005; BRUMMEL-ZIEDINS; EVERSE; MANN; ORFEO, 2014) (TRIPODI, 2016).

Ao comparar os resultados de geração de trombina entre crianças com obesidade e crianças saudáveis, encontramos queda estatisticamente significativa no tempo de latência com e sem trombomodulina ($p=0.0001$), o que demonstra um início precoce da geração de trombina. Observamos também um aumento significativo do potencial de trombina endógena e do pico no teste com TM entre as crianças com obesidade, ($p=0.01$ e $p=0.008$), confirmando a hipótese de que crianças pré-púberes obesas geram mais trombina que as crianças saudáveis, o que aumenta o risco trombogênico nessas crianças.

CIMENTI *et al.* (2006) demonstraram, pela primeira vez, um aumento do potencial de trombina endógena em crianças e adolescentes com obesidade grave em comparação com crianças com peso normal. Posteriormente, FRITSCH *et al.* (2010) e SIKLAR *et al.* (2011) também observaram hipercoagulabilidade, demonstrada com o aumento da geração de trombina em crianças e adolescentes obesos, porém a maioria dos pacientes obesos eram púberes. Nosso trabalho confirma a hipótese de que existe um estado hipercoagulável nas crianças com obesidade, com aumento da geração de trombina, mesmo antes da puberdade. (FRITSCH; KLEBER; ROSENKRANZ; FRITSCH *et al.*, 2010) (SIKLAR; ÖÇAL; BERBEROĞLU; HACIHAMDIOĞLU *et al.*, 2011).

Nós também encontramos correlação positiva entre o IMC e a geração de trombina (ETP e PEAK), fibrinogênio e dímero D, assim como correlação negativa entre o IMC e tempo de latência, confirmando que o aumento da massa corpórea está correlacionado ao aumento do estado pró-trombótico. HAFEZ *et al.* (2016) avaliaram 40 crianças obesas e 40 crianças não obesas e também encontraram elevação importante de fibrinogênio e correlação positiva com IMC

em crianças obesas. FRITSCH *et al.* (2010) também encontraram correlação positiva entre IMC, geração de trombina e fibrinogênio em crianças obesas. Estudos em adultos mostram que a resistência à insulina tem correlação positiva com o aumento de geração de trombina. (AZIZ; SIDELMANN; WISSING; FABER *et al.*, 2015). Nós, no entanto, assim como FRITSCH *et al.* (2010), não encontramos correlação positiva entre a insulina e as variáveis hemostáticas na infância. Nossos achados demonstram que o IMC é um fator mais robusto para alterar a coagulação do que a resistência insulínica na infância, confirmando o achado de Fritsch.

Além da avaliação inicial e da comparação com crianças saudáveis, também acompanhamos crianças obesas e as reavaliamos após a perda de peso. BARBATO *et al.* (2006) observaram que a perda de 5% do peso em adultos obesos, mesmo sendo considerada uma perda modesta, foi capaz de proporcionar melhora hemodinâmica e metabólica nesses indivíduos. A queda do IMC leva à diminuição da geração de trombina em adultos. (TRIPODI; PRIMIGNANI; BADIALI; DE RUBERTO *et al.*, 2019). Como essas crianças estão em fase de crescimento e constante mudança de IMC, usamos a queda de IMC em, ao menos 5%, para inclusão nessa segunda fase do estudo. Observamos que a perda de IMC levou à diminuição dos marcadores hemostáticos, assim como dos marcadores metabólicos. Houve queda significativa do colesterol total, LDL, triglicérides, bem como diminuição da geração de trombina, confirmando nossa hipótese de melhora metabólica e diminuição do estado de hipercoagulação com a perda de peso.

Constatamos um aumento de PAI-1, com tendência à queda do t-PA, o que nos faz inferir que a hipofibrinólise foi mantida mesmo após perda de peso. Embora tenha havido melhora metabólica e diminuição da geração de trombina, a perda de peso não foi suficiente para melhorar a hipofibrinólise. Observamos, ao contrário do esperado, um aumento do PAI-1, o que é incompatível com os achados da literatura em adultos, cuja perda de peso leva à

diminuição das concentrações de PAI-1. (TSCHONER; STURM; ENGL; KASER *et al.*, 2012). BALAGOPAL *et al.* (2008) também observaram o aumento de PAI-1 pós perda de peso, assim como nossos resultados, sua hipótese foi a de que, para melhora do sistema fibrinolítico, seria necessário uma maior perda de adiposidade e melhora da resistência à insulina. Novos estudos focados em obesidade e fibrinólise em crianças são necessários para melhor entendimento desse processo.

O fibrinogênio correlacionou-se positivamente com o dímero D, o que é compatível com a fisiologia, já que o fibrinogênio atua na formação de fibrina e o dímero D é formado a partir da fibrinólise. A queda do IMC foi acompanhada, de forma significativa, da queda do dímero D. BALAGOPAL *et al.* (2008) também observaram queda do dímero D após perda de peso e sugeriram que essa queda estava relacionada à diminuição da geração de trombina, sendo, portanto, uma mudança benéfica (BALAGOPAL; GEORGE; SWEETEN; MANN *et al.*, 2008). Nossa hipótese é a de que o dímero D em crianças obesas tenha um papel maior como marcador inflamatório do que marcador de fibrinólise. Novos estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

Encontramos ainda correlação negativa entre adiponectina e geração de trombina. Adiponectina é uma adipocina sintetizada quase exclusivamente pelo tecido adiposo com papel anti-inflamatório e protetor contra aterosclerose. A correlação negativa entre crianças obesas, com maior circunferência abdominal, e resistência insulínica e estágios iniciais de aterosclerose já tem sido demonstrada (BEAULOYE; ZECH; TRAN; CLAPUYT *et al.*, 2007; ORLANDO; NAVA; GIUSSANI; GENOVESI, 2019). Poucos estudos correlacionam adiponectina com hipercoagulabilidade. GIORDANO *et al.* (2011) também observaram essa correlação entre adiponectina e aumento da geração de trombina entre crianças e adolescentes e sugeriram que esse achado poderia ser reflexo da diminuição da adiponectina fisiológica da puberdade. Nosso estudo comprova a correlação negativa significativa entre essa adipocina e a geração de

trombina em crianças com obesidade mesmo antes da puberdade, confirmando o papel da adiponectina na prevenção do estado pró trombótico nessa faixa etária. Além disso, nosso estudo evidenciou que a adiponectina foi o marcador metabólico com maior correlação com a geração de trombina. É possível inferir, a partir de tal evidência, que essa adipocina pode ser um bom marcador de geração de trombina. Novos estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Nossos resultados mostram que a obesidade infantil está associada ao estado pró trombótico, além das alterações metabólicas (aumento de colesterol total, triglicérides e diminuição do HDL), com aumento significativo de fibrinogênio e geração de trombina. Esses resultados estão de acordo com os achados na literatura que mostram alterações no sistema de coagulação em crianças obesas. Até o momento, este é o primeiro estudo que desmonstra alteração na geração de trombina em crianças pré puberes com obesidade. O estado pró trombótico confirmado nesse estudo poderá levar a doenças cardiovasculares precoces, além de significar um risco aumentado de eventos trombóticos já na infância. Medidas preventivas contra a obesidade, além de tratamento precoce, devem ser iniciados já na infância.

6 CONCLUSÕES

- Nosso estudo mostrou um início precoce da geração de trombina (queda significativa do LAG time) e aumento da formação de trombina (aumento do ETP e do pico) em crianças com obesidade, confirmando a hipótese de que crianças pré púberes obesas geram mais trombina que crianças saudáveis. Também constatamos aumento de dímero D e fibrinogênio entre as crianças com obesidade, reforçando nossa conclusão de que há um aumento do estado pró-trombótico em crianças obesas em comparação com crianças saudáveis.
- Ao comparar as variáveis iniciais e após perda de peso, observamos diminuição na geração de trombina, diminuição do dímero D assim como melhora nos marcadores metabólicos.
- O IMC mostrou-se mais importante do que a resistência insulínica como fator pró trombótico. Entre as adipocinas, a adiponectina demonstrou melhor correlação (negativa) com o estado pró trombótico, confirmando o papel dessa adipocina na prevenção do estado pro trombótico nessa faixa etária.

7 ANEXOS

1- Comparação OBESOS X CONTROLES.

Variável	Unidade	OBESOS (n=47)			CONTROLES (n=25)			p
		mediana	P25	P75	mediana	P25	P75	
zIMC		3,3	3,0	3,9	0,2	-0,9	0,7	0,0001
Fib pre	mg/dL	321,0	282,8	349,5	262,0	232,3	300,3	0,0003
DD pre	ng/mL	123,6	85,1	201,0	262,0	189,0	321,5	0,0001
LAGT pre	min	3,3	3,0 1161,	3,7 1526,	4,2	3,8 1207,	4,6 1665,	0,0001
ETP pre	nmol / L trombina min	1286,0	0	0	1361,5	8	5	0,1756
PEAK pre	nmol / L	254,0	207,5	286,5	262,8	225,2	304,8	0,2442
LGTpre	min	3,9	3,4	4,3	6,9	5,2	7,5	0,0001
c ETPpre	nmol / L trombina min	588,0	431,5	834,0	372,8	163,8	697,4	0,0111
c PEAKpr	nmol / L	142,0	98,0	192,0	79,9	35,3	178,6	0,0085
ec CT pre	mg/dL	169,0	145,0	198,0	146,0	138,5	156,5	0,0589
HDLPR	mg/dL	43,0	36,0	52,0	55,0	47,5	59,0	0,0208
E LDLPRE	mg/dL	110,0	89,0	129,0	90,0	78,5	108,0	0,2693
TRIGPR	mg/dL	102,0	73,0	153,0	64,0	47,0	88,0	0,0074
E GLICPR	mg/dL	81,0	74,5	87,0	88,0	84,0	90,0	0,0103

zIMC: escore Z de índice de massa corporea. Fib pre: fibrinogenio. DD pre: Dimero D. LAGT pre: tempo de latência. PEAK pre: o pico de geração da trombina. ETP pre: potencial de trombina endógena.

LAGTprec: tempo de latência com trombomodulina . PEAKprec: o pico de geração da trombina com trombomodulina. ETPprec: potencial de trombina endógena com trombomodulina. CT pre: colesterol total. HDLPRE: HDL, LDLPRE: LDL, TRIGLPRE: triglicerídeos, GLICPRE: glicemia.

2- Comparação antes e após perda de 5% de IMC.

Varíavel	Unidade	OBESOS PRÉ (n=21)			OBESOS PÓS (n=21)			p
		mediana	25	75	50	25	75	
zIMC		3,2	2,9	3,5	2,6	2,4	3,0	0,0001
FVIII	%	129,0	98,5	175,5	124,0	98,0	153,8	0,3134
fib	mg/dL	324,0	275,0	373,0	312,0	283,3	333,8	0,1615
DD	ng/mL	123,6	88,9	152,9	91,4	82,5	107,5	0,1396
tpa	ng/mL	5,4	2,9	6,9	3,4	1,9	6,4	0,6265
PAI-1	U/mL	2,1	1,7	2,6	6,3	5,0	11,7	0,0001
LAGT	min	3,3	3,0	3,8	3,2	3,0	3,6	0,0329
ETP	nmol / L trombina min	1351,0	5	0	1359,0	1242,0	1582,5	0,5089
PEAK	nmol / L	254,0	230,5	291,5	278,0	241,5	311,0	0,0325
LGT CT	min	3,9	3,5	4,4	3,7	3,3	4,1	0,0223
ETP CT	nmol / L trombina min	598,0	441,0	725,0	617,0	474,5	779,5	0,0918
PEAKC								
T	nmol / L	149,0	100,5	169,0	137,0	112,8	182,8	0,2959
CT	mg/dL	174,0	141,0	203,5	164,0	141,5	190,0	0,0113
HDL	mg/dL	40,0	35,0	50,0	46,0	37,5	52,0	0,1569
LDL	mg/dL	115,0	83,5	134,5	94,0	80,5	124,5	0,0472
TRIG	mg/dL	117,0	77,5	191,5	84,0	62,5	111,5	0,0124
GLIC	mg/dL	81,0	74,5	86,5	78,0	74,0	83,5	0,3137
PCR	mg/L	1,8	0,7	3,5	1,5	0,7	2,6	0,2695
adipo	mg/L	15,8	12,5	21,0	19,7	12,1	25,0	0,1506
leptina	ng/mL	14,3	5,6	25,3	10,9	5,8	18,4	0,5862
insulin								
a	μU/mL	16,0	10,3	32,3	13,7	9,4	18,1	0,1997
HOMAI		3,1	2,1	6,4	2,6	1,9	3,5	0,1579

zIMC: escore Z de índice de massa corpórea. FVIII: Fator VIII Fib: fibrinogênio. DD: Dimero D. tpa: ativador de plasminogênio do tipo tecidual. PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1. LAGT : tempo de latência. PEAK: o pico de geração da trombina. ETP: potencial de trombina endógena. LAGTCT: tempo de latência com trombomodulina . PEAKCT: o pico de geração da trombina com trombomodulina. ETPCT: potencial de trombina endógena com trombomodulina. CT: colesterol total. TRIG: triglicerídeos, GLIC:glicemia. PCR: proteína C reativa. Adipo: adiponectina. HOMAIR: HOMA-IR.

Anexo 3: Variação média das medidas hematológicas com a queda de um desvio padrão de IMC.

	ANÁLISE UNIVARIADA				ANÁLISE AJUSTADA *			
	Coeficiente		IC95%		Coeficiente		IC95%	
	te	P			te	P		
			-					
			109,6					
fviii	-18,37	0,69	1	72,87	-	-	-	-
			-					
			192,5					
fib	-65,96	0,31	5	60,64	-	-	-	-
		<0,0	258,2	823,5		<0,00	250,2	848,4
dd	-540,90	01	5	5	549,33	1	6	0
tpa	-4,81	0,29	-4,18	13,81	-	-	-	-
pail	3,69	0,52	-15,07	7,68	-	-	-	-
lgt	0,43	0,21	-0,24	1,10	-	-	-	-
			-					
			202,8	518,6				
etps	-157,90	0,39	1	0	-	-	-	-
peaks	-113,14	0,76	-70,15	96,42	-	-	-	-
lgtc	0,50	0,28	-0,41	1,41	-	-	-	-
etpc	-108,53	0,46	-	178,6	-	-	-	-

			395,6					
			6	0				
peac	-9,85	0,80	-84,13	64,43	-	-	-	-

* Ajustada para idade e sexo

8 REFERÊNCIAS

ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*, 113, n. 13, p. 2878-2887, Mar 26 2009.

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* (Silver Spring), 14 Suppl 5, p. 242s-249s, Aug 2006.

AL DIERI, R.; DE LAAT, B.; HEMKER, H. C. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev*, 26, n. 5, p. 197-203, Sep 2012.

AZIZ, M.; SIDELMANN, J. J.; WISSING, M. L.; FABER, J. *et al.* Endogenous thrombin potential in polycystic ovary syndrome: the association to body mass index, insulin resistance, and inflammation. *Gynecol Endocrinol*, 31, n. 9, p. 720-724, 2015.

BALAGOPAL, P.; GEORGE, D.; SWEETEN, S.; MANN, K. J. *et al.* Response of fractional synthesis rate (FSR) of fibrinogen, concentration of D-dimer and fibrinolytic balance to physical activity-based intervention in obese children. *J Thromb Haemost*, 6, n. 8, p. 1296-1303, Aug 2008.

BALAGOPAL, P. B.; DE FERRANTI, S. D.; COOK, S.; DANIELS, S. R. *et al.* Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 123, n. 23, p. 2749-2769, Jun 14 2011.

BARBATO, K. B.; MARTINS RDE, C.; RODRIGUES MDE, L.; BRAGA, J. U. *et al.* [Effects of greater-than-5% weight reduction on hemodynamic, metabolic and neuroendocrine profiles of grade I obese subjects]. *Arq Bras Cardiol*, 87, n. 1, p. 12-21, Jul 2006.

BARLOW, S. E. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics*, 120 Suppl 4, p. S164-192, Dec 2007.

BASURTO, L.; SÁNCHEZ, L.; DÍAZ, A.; VALLE, M. *et al.* Differences between metabolically healthy and unhealthy obesity in PAI-1 level: Fibrinolysis, body size phenotypes and metabolism. *Thromb Res*, 180, p. 110-114, Aug 2019.

BEAULOYE, V.; ZECH, F.; TRAN, H. T.; CLAPUYT, P. *et al.* Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, n. 8, p. 3025-3032, Aug 2007.

BLUHER, S.; MANTZOROS, C. S. The role of leptin in regulating neuroendocrine function in humans. *J Nutr*, 134, n. 9, p. 2469s-2474s, Sep 2004.

BRUMMEL-ZIEDINS, K.; VOSSEN, C. Y.; ROSENDAAL, F. R.; UMEZAKI, K. *et al.* The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *J Thromb Haemost*, 3, n. 7, p. 1472-1481, Jul 2005.

BRUMMEL-ZIEDINS, K. E.; EVERSE, S. J.; MANN, K. G.; ORFEO, T. Modeling thrombin generation: plasma composition based approach. *J Thromb Thrombolysis*, 37, n. 1, p. 32-44, Jan 2014.

CIMENTI, C.; MANGGE, H.; HAIDL, H.; ZACH, D. *et al.* Thrombin generation in severely obese children. *In: J Thromb Haemost*. England, 2006. v. 4, p. 1834-1836.

DE ONIS, M. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization*, 85, n. 09, p. 660-667, 2007-09-01 2007.

DUARTE, R. C. F.; FERREIRA, C. N.; RIOS, D. R. A.; REIS, H. J. D. *et al.* Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 39, n. 3, p. 259-265, Jul-Sep 2017.

EMMANUEL, M.; BOKOR, B. R. Tanner Stages. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC., 2020.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. D. O.; DUSSE, L. M. S. A.; CARVALHO, M. D. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32, p. 416-421, 2010.

FONTANA, L.; EAGON, J. C.; TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. *et al.* Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, 56, n. 4, p. 1010-1013, Apr 2007.

FRITSCH, P.; KLEBER, M.; ROSENKRANZ, A.; FRITSCH, M. *et al.*
Haemostatic alterations in overweight children: associations between
metabolic syndrome, thrombin generation, and fibrinogen levels.
Atherosclerosis, 212, n. 2, p. 650-655, Oct 2010.

GIORDANO, P.; DEL VECCHIO, G. C.; CECINATI, V.; DELVECCHIO, M. *et al.*
Metabolic, inflammatory, endothelial and haemostatic markers in a
group of Italian obese children and adolescents. *Eur J Pediatr*, 170, n.
7, p. 845-850, Jul 2011.

GONÇALVES, H.; BARROS, F. C.; BUFFARINI, R.; HORTA, B. L. *et al.*
Infant nutrition and growth: trends and inequalities in four population-
based birth cohorts in Pelotas, Brazil, 1982-2015. *Int J Epidemiol*, 48,
n. Suppl 1, p. i80-i88, Apr 1 2019.

HAFEZ, M.; EL-MASRY, S.; MUSA, N.; FATHY, M. *et al.* Relationship
between visceral obesity and plasma fibrinogen in obese children. *J*
Pediatr Endocrinol Metab, 29, n. 3, p. 289-296, Mar 2016.

KATO, H.; KASHIWAGI, H.; SHIRAGA, M.; TADOKORO, S. *et al.*
Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler*
Thromb Vasc Biol, 26, n. 1, p. 224-230, Jan 2006.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J*
Clin Endocrinol Metab, 89, n. 6, p. 2548-2556, Jun 2004.

KOENIG, W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update.
Thromb Haemost, 89, n. 4, p. 601-609, Apr 2003.

KONSTANTINIDES, S.; SCHÄFER, K.; KOSCHNICK, S.; LOSKUTOFF, D. J.
Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis
suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin*
Invest, 108, n. 10, p. 1533-1540, Nov 2001.

LIHN, A. S.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Adiponectin: action,
regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*, 6, n. 1, p.
13-21, Feb 2005.

MEI, Z.; GRUMMER-STRAWN, L. M.; PIETROBELLI, A.; GOULDING, A. *et al.*
Validity of body mass index compared with other body-composition
screening indexes for the assessment of body fatness in children and
adolescents. *Am J Clin Nutr*, 75, n. 6, p. 978-985, Jun 2002.

MROZINSKA, S.; CIESLIK, J.; BRONIATOWSKA, E.; UNDAS, A. Elevated leptin and decreased adiponectin independently predict the post-thrombotic syndrome in obese and non-obese patients. *Sci Rep*, 8, n. 1, p. 6938, May 2 2018.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 384, n. 9945, p. 766-781, Aug 30 2014.

NINIVAGGI, M.; APITZ-CASTRO, R.; DARGAUD, Y.; DE LAAT, B. *et al.* Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem*, 58, n. 8, p. 1252-1259, Aug 2012.

Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894, p. i-xii, 1-253, 2000.

ORKIN, S. H.; FISHER, D. E.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. *et al.* Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood. 2015.

ORLANDO, A.; NAVA, E.; GIUSSANI, M.; GENOVESI, S. Adiponectin and Cardiovascular Risk. From Pathophysiology to Clinic: Focus on Children and Adolescents. *Int J Mol Sci*, 20, n. 13, Jun 30 2019.

PERARAMELLI, S.; ROSING, J.; HACKENG, T. M. TFPI-dependent activities of protein S. *Thromb Res*, 129 Suppl 2, p. S23-26, May 2012.

PLOMGAARD, P.; KELLER, P.; KELLER, C.; PEDERSEN, B. K. TNF-alpha, but not IL-6, stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in human subcutaneous adipose tissue. *J Appl Physiol* (1985), 98, n. 6, p. 2019-2023, Jun 2005.

SAMAD, F.; RUF, W. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*, 122, n. 20, p. 3415-3422, Nov 14 2013.

SAMBOLA, A.; OSENDE, J.; HATHCOCK, J.; DEGEN, M. *et al.* Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation*, 107, n. 7, p. 973-977, Feb 25 2003.

SIKLAR, Z.; ÖÇAL, G.; BERBEROĞLU, M.; HACIHAMDIOĞLU, B. *et al.* Evaluation of hypercoagulability in obese children with thrombin generation test and microparticle release: effect of metabolic parameters. Clin Appl Thromb Hemost, 17, n. 6, p. 585-589, Nov-Dec 2011.

SIMPSON, A. J.; BOOTH, N. A.; MOORE, N. R.; BENNETT, B. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. J Clin Pathol, 44, n. 2, p. 139-143, Feb 1991.

STEIN, P. D.; BEEMATH, A.; OLSON, R. E. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. Am J Med, 118, n. 9, p. 978-980, Sep 2005.

TRIANAFYLLOU, G. A.; PASCHOU, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. Endocrinol Metab Clin North Am, 45, n. 3, p. 633-645, Sep 2016.

TRIPODI, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. Clin Chem, 62, n. 5, p. 699-707, May 2016.

TRIPODI, A. Detection of procoagulant imbalance. Modified endogenous thrombin potential with results expressed as ratio of values with-to-without thrombomodulin. Thromb Haemost, 117, n. 5, p. 830-836, May 3 2017.

TRIPODI, A.; PRIMIGNANI, M.; BADIALI, S.; DE RUBERTO, F. *et al.* Body mass index reduction improves the baseline procoagulant imbalance of obese subjects. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 48, n. 1, p. 52-60, 2019/07/01 2019.

TSCHONER, A.; STURM, W.; ENGL, J.; KASER, S. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1 and visceral obesity during pronounced weight loss after bariatric surgery. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 22, n. 4, p. 340-346, Apr 2012.

WALLACE, A. M.; MCMAHON, A. D.; PACKARD, C. J.; KELLY, A. *et al.* Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). Circulation, 104, n. 25, p. 3052-3056, Dec 18 2001.

WHINCUP, P. H.; GILG, J. A.; DONALD, A. E.; KATTERHORN, M. *et al.* Arterial distensibility in adolescents: the influence of adiposity, the metabolic syndrome, and classic risk factors. Circulation, 112, n. 12, p. 1789-1797, Sep 20 2005.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; BAUTISTA, L. *et al.* Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*, 366, n. 9497, p. 1640-1649, Nov 5 2005.