AUDREY KRÜSE ZEINAD-VALIM

**Análise da geração de trombina em uma
população de indivíduos com clone HPN
(Hemoglobinúria Paroxística Noturna)**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zeinad-Valim, Audrey Krüse

Análise da geração de trombina em uma população de indivíduos com clone HPN (Hemoglobinúria Paroxística Noturna) / Audrey Krüse Zeinad-Valim. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Elbio Antonio D'Amico.

Descritores: 1.Hemoglobinúria paroxística noturna 2.Trombose
3.Trombocitopenia 4.Hemorragia 5.Geração de trombina 6.Trombina/metabolismo
7.Testes de coagulação sanguínea

USP/FM/DBD-366/15

*“Nós podemos dizer, seguramente,
que a HPN é a trombofilia adquirida
mais cruel de toda a medicina.”*

Lucio Luzzatto, Itália, 2011

Ao Dr. Alli Kassim Zeinad (*in memoriam*), Homem Adão Borboleta.

À Cyrene Krüse Zeinad, meu exemplo de força e perseverança .

Aos meus irmãos, Mack (*in memoriam*), Alec e Mireille, pilares da minha vida.

Ao meu filho David, minha esperança para seguir em frente .

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr Elbio Antonio D'Amico, por seus ensinamentos, amizade e auxílio nesta tese.

À mestre Tânia Rúbia Flores da Rocha, pela amizade, incentivo e apoio incondicionais.

À minha amiga Valéria de Oliveira, pelo companheirismo e dedicação.

À Deise Moromizato, pela constante disponibilidade

A todos os amigos do Grupo de Hemostasia, pelo companheirismo e união.

À Professora Doutora Sandra Fátima Menosi Guallandro e ao mestre Guilherme Henrique Hencklain Fonseca, pela inspiração e exemplo de dedicação à Medicina.

À todos os que participaram desta pesquisa como pacientes ou controles, sem os quais este trabalho não seria possível.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para minha caminhada até aqui.

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 Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	29
3 MÉTODOS	31
3.1 Casuística.....	32
3.1.3 Seleção	32
3.1.1 Critérios de inclusão.....	33
3.1.2 Critérios de exclusão.....	33
3.1.4 Amostragem.....	34
3.1.5 Determinação dos Grupos	35
3.2 Métodos.....	35
3.2.1 Procedimento do estudo	35
3.2.2 Definições Diagnósticas	37
3.2.3 Geração de trombina.....	37
3.3.4 Parâmetros do trombograma	38
3.3.5 Procedimento do teste de geração de trombina.....	39
3.3.6 Medidas para redução de variabilidade intralaboratorial e interlaboratorial	41
3.3.7 Delineamento da Pesquisa	41
3.3.8 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Caracterização da Amostra	45
4.2 Relação entre os parâmetros de geração de trombina e terapia anticoagulante # em pacientes do grupo HPN.....	57
4.3 Avaliação da interferência da trombocitopenia na geração de trombina em pacientes do grupo HPN.....	59
4.4 Análise de correlação de variáveis laboratoriais e RETP no grupo HPN.....	61
4.5 Análise no subgrupo de pacientes com fatores de risco para TEV	64
5 DISCUSSÃO.....	69

6 CONCLUSÕES.....	77
7 ANEXOS.....	79
8 REFERÊNCIAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Anemia aplástica idiopática adquirida ou associada a clone HPN < 10%
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAT	- <i>Calibrated Automated Thrombogram</i>
CTI	- <i>Corn trypsin inhibitor</i>
DAF	- <i>Decay accelerating factor</i>
DMID	- Diabetes mellitus insulino dependente
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPCR	- Receptor endotelial da proteína C
ETP	- Potencial de trombina endógeno
<i>ETP</i>	- Endogenous thrombin potencial
FLAER	- Aerolisina fluorescente
FVa.	- Fator V da coagulação, ativado
FVIII:C	- Atividade coagulante do FVIII
FVIIIa	- Fator VIII da coagulação, ativado
FvW	- Fator von Willebrand
FvW:RCo	- Atividade do cofator de ristocetina
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HMG-CoA redutase	- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase, enzima da via do mevalonato
HPN	- Hemoglobinúria Paroxística Noturna
HPN-AA	- Hemoglobinúria Paroxística Noturna associada à aplasia medular
IL-6	- Interleucina 6
IMC	- Índice de massa corporal

ISTH	- Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose
MAC	- Complexo de ataque à membrana
MIRL	- <i>Membrane inhibitor of reactive lysis</i>
MP	- Micropartículas
PC	- Proteína C
PMP	- Micropartículas derivadas de plaquetas
PPP	- Plasma pobre em plaquetas
PRP	- Plasma rico em plaquetas
PTI	- Trombocitopenia imune
SMD	- Síndrome mielodisplásica
SNC	- Sistema nervoso central
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	- Evento tromboembólico
TEV	- Tromboembolismo venoso
TFPI	- Inibidor da via do fator tecidual
TM	- Trombomodulina
TP	- Tempo de protrombina
t-PA	- Ativador do plasminogênio tecidual
TRH	- Terapia de reposição hormonal
TTPA	- Tempo de tromboplastina parcial ativada
uPAR	- Receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VCAM-1	- Vascular cell adhesion molecule 1

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Teste de HAM ou do soro acidificado (teste de sensibilidade à lise pelo complemento), à esquerda da figura. Os tubos 1 e 5 contém hemácias do paciente, entretanto o tubo 1 contém soro acidificado de doador, e o tubo 5 soro acidificado do paciente. À direita teste do açúcar (baseia-se na ativação do complemento em meio de baixa força iônica, D = controle, P = paciente).....6
- Figura 2 - A geração de trombina resultante da depleção das plaquetas do plasma, em controles normais e pacientes com HPN15
- Figura 3 - Curva de geração de trombina, ou trombograma, mostrando seus quatro parâmetros: tempo de latência, tempo para o pico, concentração máxima de trombina (pico) e potencial de trombina endógeno (ETP).....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sócio demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes e voluntários saudáveis. Ambulatório de Hematologia do HC-FMUSP, 2010 a 2013.....	47
Tabela 2 - Testes laboratoriais empregados na avaliação de pacientes com HPN, AA e normais.....	49
Tabela 3 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX\ T}$), de tempo para a $C_{MAX\ T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX\ T}$ em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$, segundo terapia anticoagulante [#]	58
Tabela 4 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX\ T}$), de tempo para a $C_{MAX\ T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX\ T}$, segundo trombocitopenia, em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$	60
Tabela 5 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX\ T}$), de tempo para a $C_{MAX\ T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX\ T}$, segundo trombocitopenia, em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$, inclusive os indivíduos <i>com</i> fatores de risco para TEV	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Redução de 57% no ETP após a adição de TM em controle saudável.....	50
Gráfico 2 -	Redução de 72% no ETP após a adição de TM em paciente com aplasia	51
Gráfico 3 -	Redução de 12% no ETP após a adição de TM em paciente com clone HPN	51
Gráfico 4 -	Boxplot da relação ETP (RETP) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN. O ponto representa um valor aberrante (<i>outlier</i>).....	52
Gráfico 5 -	Boxplot do efeito da trombomodulina no pico para C_{MAX} de trombina (razão pico para $C_{MAX\ T}$) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	53
Gráfico 6 -	Boxplot dos valores de C_{MAX} de trombina com adição de trombomodulina (TM) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	54
Gráfico 7 -	Boxplot dos valores de tempo para a C_{MAX} de trombina com TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	55
Gráfico 8 -	Boxplot da dos valores de tempo para a C_{MAX} de trombina sem TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	55
Gráfico 9 -	Boxplot dos valores de tempo de latência para a o início da geração de trombina com TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	56
Gráfico 10 -	Boxplot dos valores de tempo de latência para a o início da geração de trombina sem TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN	57
Gráfico 11 -	Dispersão entre atividade de fator von Willebrand e RETP em pacientes HPN	61
Gráfico 12 -	Dispersão entre Proteína C e RETP	62

Gráfico 13 - Dispersão entre atividade coagulante do FVIII e atividade do fator von Willebrand.....	63
Gráfico 14 - Análise de correlação entre relação de ETP e proporção do clone HPN (população sem fatores de risco para TEV).....	64
Gráfico 15 - Dispersão entre clone HPN (%) e RETP em pacientes com HPN ou com AA (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)	65
Gráfico 16 - Dispersão entre clone HPN (%) e RETP em pacientes trombocitopênicos, com HPN e AA (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)	66
Gráfico 17 - Dispersão entre número de plaquetas e tempo de latência em pacientes trombocitopênicos, com clone HPN $\geq 10\%$ (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)	67

RESUMO

Zeinad-Valim AK. *Análise da geração de trombina em uma população de indivíduos com clone HPN (Hemoglobinúria Paroxística Noturna)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A HPN é uma patologia na qual a atividade do sistema complemento, sem oposição, leva a complicações sistêmicas. Ela é caracterizada por anemia hemolítica adquirida com hemoglobinúria intermitente, falência medular e fenômenos tromboembólicos (TE). A trombose venosa é a sua principal causa de mortalidade, entretanto o seu mecanismo fisiopatológico é apenas parcialmente elucidado. O grande número de pacientes com trombocitopenia dificulta o manejo da profilaxia antitrombótica secundária e primária. Optou-se por evidenciar o desequilíbrio hemostático associado ao clone HPN através de um teste de avaliação global da coagulação. **MÉTODOS:** Para a detecção do potencial hemostático de cada indivíduo foi utilizado um ensaio fluorogênico de geração de trombina, em amostra de plasma pobre em plaquetas na presença e na ausência de trombomodulina (TM). A eficiência na redução do potencial de trombina endógeno (ETP) e da concentração máxima de trombina (pico) pela TM foi utilizada para a identificação do estado de hipercoagulabilidade. O tempo para o início da geração de trombina (tempo de latência) e para a concentração máxima de trombina foram utilizados para a detecção do fenótipo hemorrágico. Os indivíduos foram categorizados em três grupos: HPN, se clone HPN $\geq 10\%$; anemia aplástica idiopática adquirida ou associada a clone $< 10\%$, e normais. Os pacientes e controles foram submetidos a avaliação laboratorial que incluiu pesquisa de trombofilia (TB) e do clone HPN, hemograma, testes habituais de avaliação da hemostasia, e no grupo de pacientes análise bioquímica. Os participantes foram avaliados para a identificação da presença de fatores de risco para TE através de questionário. A análise dos resultados foi realizada em duas fases: a primeira incluiu apenas indivíduos com pesquisa de TB negativa e sem fatores de risco para TE; a segunda, realizada apenas no grupo de pacientes, também incluiu indivíduos em uso de contraceptivo hormonal, diagnóstico de infecção assintomática, evento de TE associado a fator de risco temporário, em período superior a 1 ano da inclusão no estudo, e com pesquisa de TB positiva. Esta última fase da análise teve como objetivo incluir um maior número de pacientes com o diagnóstico destas patologias, de baixa prevalência populacional. **RESULTADOS:** A presença do clone $\geq 10\%$ foi associada à ineficiência da ação da TM em reduzir o ETP e o pico. O primeiro, de maior relevância científica e clínica, apresentou correlação positiva e negativa, respectivamente, com a atividade do fator von

Willebrand (FvW:RCo) e com níveis plasmáticos de proteína C (PC). O grupo HPN apresentou menor tempo para atingir o pico. Na segunda fase, o tempo de latência apresentou correlação negativa com o número de plaquetas no grupo HPN, e houve correlação positiva do clone com a ineficiência da ação da TM na redução do ETP. **CONCLUSÕES:** o teste de geração de trombina é eficaz na detecção do fenótipo protrombótico associado ao clone HPN. As correlações encontradas com o FvW:RCo e a PC sugerem que a ativação endotelial e o sistema da PC, respectivamente, podem estar comprometidos. A inflamação secundária à ativação do sistema complemento pode levar à redução de expressão endotelial da TM e do receptor da PC. Entretanto os nossos achados, associados à descrição recente da redução de expressão e de atividade da TM, secundária à depleção de óxido nítrico (em estudos com estatinas), podem justificar a característica agressiva da trombofilia na HPN, e o desenvolvimento de TE mesmo nos pacientes em anticoagulação oral. Os parâmetros que avaliam o 'tempo' no trombograma (tempo de latência e tempo para o pico) podem auxiliar na identificação do risco hemorrágico eventualmente associado à HPN

Descritores: Hemoglobinúria paroxística noturna. Trombose. Trombocitopenia. Sangramento. Geração de trombina. Teste de geração de trombina.

ABSTRACT

Zeinad-Valim AK. *Thrombin generation analysis in individuals with PNH clone (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria)* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUCTION: PNH is a pathology in which the uncontrolled activity of the complement system leads to systemic complications. The pathology is characterized by an acquired hemolytic anemia with intermittent hemoglobinuria, bone marrow failure and thromboembolic event (TE). Venous thrombosis is the main cause of death, however, its physiopathological mechanism is only partially understood. The large number of patients with thrombocytopenia affects the management of primary and secondary antithrombotic prophylaxis. We chose to demonstrate the hemostatic unbalance associated with PNH clone through a global evaluation of the coagulation test. **METHODS:** To detect the hemostatic potential, we used a fluorogenic thrombin-generation assay, in platelet-poor plasma, with and without thrombomodulin (TM). Analysis of the efficiency of TM in reducing the endogenous thrombin potential (ETP) and of the upper limit of thrombin concentration (peak) was done to identify the hypercoagulable state. Times to initiate thrombin generation (latency time-LT) and for reaching the peak were used to identify hemorrhagic phenotypes. Subjects were divided in three groups: PNH patients (if PNH clone $\geq 10\%$), patients with acquired idiopathic aplastic anemia or clone-associated (clone $< 10\%$), and controls. Patients and controls were investigated for thrombophilia (TB) and PNH clone, underwent blood test, and regular exams to evaluate hemostasis. Patients were evaluated for the presence of risk factors for TE through questionnaires. Results were analyzed in two steps: the first included only patients negative for TB and with no risk factors for TE; the second step, done only in patients, included individuals using hormonal contraceptive, diagnosis of any asymptomatic infection, TE associated to temporary risk factors, and which have occurred in a period longer than one year since inclusion in the study, and positive TB. The aim of the second step was to gather the largest possible number of patients in these low prevalence pathologies. **RESULTS:** The presence of the clone $\geq 10\%$ was associated with TM inefficiency in reducing the ETP (ETP+TM) and peak. In the first analysis, which had greater clinical relevance, we observed a positive correlation between ETP+TM and the activity of the von Willebrand factor (FvW:RCo), whereas a negative correlation was observed with the levels of protein C (PC). The PNH group presented the shortest time to reach the peak. In the second step of the analysis, the LT showed negative correlation with platelet counts in the PNH group, whereas a positive correlation

between the clone and ETP+TM was observed. **CONCLUSION:** The thrombin-generation assay effectively detects the prothrombotic phenotype associated to PNH. The correlation found with both FvW:RCo and PC suggests that endothelial activation, and the PC system as well, may be deficient in these patients. Secondary inflammation to activation of the complement system may lead to lower endothelial expression of TM and of the PC receptor. However, our findings, together with recent descriptions of a reduced expression of the TM activity secondary to nitric oxide depletion (observed in studies on statin) may explain the aggressive nature of thrombophilia in PNH and the development of TE in these patients, even in those taking oral anticoagulants. The parameters that measure the time of thrombin generation may help identify the hemorrhagic risk that might be associated with PNH.

Descriptors: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Thrombosis. Thrombocytopenia. Bleeding. Thrombin generation. Thrombin generation test.

1 INTRODUÇÃO

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna foi uma das primeiras patologias hematológicas descrita, certamente pelo seu principal sintoma, de característica repentina e claramente perceptível – a hemoglobinúria. A presença de urina de coloração marrom escura é facilmente notada pelo paciente, e induz um grande impacto no médico assistente¹.

Na Idade Média, por volta do século 17, a observação detalhada da urina era fundamental para a avaliação da condição clínica do paciente. A expertise do médico assistente era testada substituindo-se a urina do paciente por urina de cavalo. Embora houvesse descrição de urina negra ou escurecida, até então o padrão noturno da HPN não havia sido evidenciado¹.

O primeiro relato de caso possivelmente relacionado a um paciente com HPN foi o de Charles Stewart* *apud* Young e Moss¹, um médico escocês que estagiava em Arcangel, província de Arkhangelsk, localizada nas margens do Mar Branco, no extremo norte da Rússia. Em 1794 ele descreveu o caso de um paciente com ‘eliminação periódica de sangue pela uretra’, com interrupção abrupta. As crises de urina negra duravam cerca de três dias, e eram acompanhadas de dor abdominal e em dorso, torpor e sensação de plenitude cefálica, sintomas frequentemente observados nas crises de hemoglobinúria na HPN. Nenhuma menção foi feita quanto à exposição ao frio como causadora das crises, para a diferenciação da

* Stewart C. Account of a singular periodical discharge of blood from the urethra termination successfully. Duncan's Med. Commentaries. 1794; 1, 332.

hemoglobinúria paroxística ao frio, entretanto a localização geográfica possivelmente não permitiu esta distinção.

A primeira descrição inquestionável da HPN foi a de Sir William Gull[†] *apud* Young e Moss¹, em 1866. Ele descreveu, detalhadamente, o que chamou de ‘hematinúria intermitente’, pois reconheceu que a urina de um paciente, que trabalhava com tingimento em couro, tinha aspecto de sangue vivo, entretanto não continha elementos celulares, fazendo uma distinção clara de hematúria. Ele notou que os episódios ocorriam durante dois a três dias, e observou que a primeira urina da manhã era a mais acometida.

A descrição clássica da HPN foi aquela de Paul Strübing[‡] *apud* Young e Moss¹, um jovem médico da Alemanha Oriental. Ele descreveu o caso de um artesão de 29 anos que, durante atividades no exército, notou a presença de urina vermelho escuro especialmente de manhã, de maneira intermitente. Durante as crises apresentava fadiga, fraqueza, dor em hipocôndrio esquerdo, taquipneia, palpitação e tontura. Percebeu que grande parte dos sintomas ocorriam durante as crises.

Em 1953, Willian Holmes Crosby, através de sua perspicácia em uma revisão detalhada da literatura publicada até então, observou a grande influência que a trombose desempenha na história natural da HPN, demonstrando que as complicações tromboembólicas são a sua principal causa de mortalidade².

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna é uma condição na qual a atividade do sistema complemento, sem o controle adequado, leva a complicações sistêmicas³. Clinicamente se caracteriza por anemia hemolítica

[†] Gull WW. A case of intermittent haematuria, with remarks. Guy's Hospital Rep. 1866;12,381-92.

[‡] Strübing P. Paroxysmale hämoglobinurie. Dtsch. Med. Wochenschr. 1882;8,1-8.

adquirida intravascular, com hemoglobinúria intermitente, falência medular e fenômenos tromboembólicos. É uma patologia rara, resultante de mutações somáticas na célula tronco hematopoiética, no gene fosfatidilinositol glicano classe A (PIG-A). O produto do gene PIG-A participa da biossíntese da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), responsável pela ligação de várias proteínas à membrana celular. O defeito na biossíntese desta âncora resulta na deficiência de todas as proteínas que são ligadas através do GPI.

Foram catalogadas cerca de 200 mutações somáticas neste gene em pacientes com HPN⁴. Dois terços destas mutações, que ocorrem ao longo de toda a região de codificação, são constituídas por pequenas inserções ou deleções, levando a mutação tipo *frameshift* e subsequente interrupção prematura da região codificadora, resultando em produto proteico inativo. Os eritrócitos afetados não apresentam proteínas ligadas à GPI, sendo classificados como tipo III. A maior parte das outras mutações são *point mutations*, tipicamente *missense*, que produzem eritrócitos tipo II ou tipo III. As células do tipo II tem expressão intermediária das proteínas ancoradas pela GPI⁵, e aquelas do tipo I tem expressão normal.

A atividade das proteínas ancoradas à GPI é extremamente variada. Uma função crítica é a proteção da célula contra a ação do sistema complemento. A ação da cascata do complemento, sem oposição, resulta na hemólise intravascular e trombose venosa, que são as características clínicas mais marcantes da doença. A deficiência do CD55, e principalmente do CD59 são as principais causadoras das manifestações clínicas.

O CD55, *decay accelerating factor* ou DAF, é inibidor de C3 e C5 convertases do sistema complemento, e sua deficiência leva à deposição

crescente de C3b nas células do clone HPN. Entretanto, pacientes com ausência congênita de CD55 apresentam apenas pequeno aumento de sensibilidade ao complemento⁴. O CD59, *membrane inhibitor of reactive lysis* ou MIRL, é um inibidor do complexo de ataque à membrana (MAC). Ele se liga ao componente C8 do complemento, prevenindo a ligação e subsequente polimerização de C9. Na ausência do CD59, a polimerização de C9 propicia a formação de poros na membrana celular, levando à hemólise intravascular. O antagonismo do CD59 é evidenciado pela associação da deficiência congênita de CD59 com hemólise clínica, hemoglobinúria e trombose venosa^{4,6}. A deficiência destas duas proteínas de regulação do sistema complemento define a presença de clone HPN.

Por muitos anos o teste de HAM (Figura 1), no qual os eritrócitos do paciente são incubados em soro acidificado e posteriormente expostos ao complemento ativado, foi o padrão ouro para o diagnóstico⁵. Atualmente a citometria de fluxo de sangue periférico, para a detecção de deficiência grave ou ausência do CD55 e CD59 e de outras proteínas ligadas à âncora de GPI, em pelo menos duas linhagens celulares, é historicamente o método de escolha para o diagnóstico⁷. Os granulócitos refletem de maneira mais fidedigna a população de células tronco, já que não são suscetíveis à hemólise, mas a análise em eritrócitos é mais robusta e pode diferenciar as células do tipo II e tipo III⁵. A citometria de fluxo pode ser realizada para a detecção de proteínas ligadas à GPI, ou para a detecção da âncora de GPI, pela utilização de uma proteína derivada de toxinas bacterianas, que se liga diretamente à ela, como a aerolisina fluorescente, ou FLAER, importante para a detecção de pequenos clones HPN⁸.

Figura 1 - Teste de HAM ou do soro acidificado (teste de sensibilidade à lise pelo complemento), à esquerda da figura. Os tubos 1 e 5 contêm hemácias do paciente, entretanto o tubo 1 contém soro acidificado de doador, e o tubo 5 soro acidificado do paciente. À direita teste do açúcar (baseia-se na ativação do complemento em meio de baixa força iônica, D = controle, P = paciente) [Cortesia de Deise Moromizato]

A associação com aplasia de medula óssea não é incomum, descrita por Dacie e Lewis⁹, em 1944. Como a incidência de aplasia medular é de 1-2 casos/1.000.000/ano^{10,11}, e na HPN a incidência e prevalência estimadas são de 1,3 casos/1.000.000habitantes/ano e 15,9 casos/1.000.000 de habitantes, respectivamente¹², a coexistência das duas patologias corrobora mecanismo fisiopatológico comum. A doença pode ocorrer em qualquer idade (mediana ao redor de 35 anos), com distribuição similar entre os sexos⁵.

Nas hemácias a presença do clone HPN leva a anemia hemolítica intravascular, que pode ocorrer espontaneamente ou em associação à infecção, medicações e trauma (presumivelmente por situações ligadas à ativação do sistema complemento)⁵. A hemólise intravascular leva à liberação sistêmica de hemoglobina livre no plasma, superando a capacidade de sua remoção por mecanismos reguladores, com consequente adsorção e sequestro de óxido nítrico pela hemoglobina livre, além de liberação de mediadores inflamatórios. Em um terço dos casos a hemólise é o sintoma predominante, e

um quarto dos pacientes apresenta hemoglobinúria na primeira urina da manhã, episódica. Pode ocorrer espasmo esofágico e disfunção erétil, sintomas relacionados à disfunção da musculatura lisa, secundários ao sequestro de óxido nítrico⁵. Ocasionalmente a hemoglobinúria pode levar a falência renal, mais evidente na população oriental¹³.

Clinicamente a HPN pode apresentar espectro clínico variado. Ela ocorre como um *continuum* entre o tipo hemolítico em um extremo, e o tipo predominantemente associado à AA com clone subclínico, em outro⁵. Estas características podem variar durante o curso da doença, assim como a proporção de células do clone HPN. De maneira geral os pacientes com HPN clássica ou hemolítica apresentam maiores clones, enquanto que os pacientes hipoplásicos apresentam clones menores (< 20% neutrófilos e < 10% eritrócitos HPN)¹⁴.

Didaticamente ela é subdividida em três subgrupos¹⁵. A HPN clássica, com evidência clínica de hemólise intravascular, com níveis extremamente elevados de desidrogenase láctica e reticulocitose, sem critérios para doença definida de medula óssea; aquela que ocorre com outra patologia medular específica, com características definidas de hemólise, porém paralelamente (ou previamente) apresenta diagnóstico de aplasia medular, e menos frequentemente a síndrome mielodisplásica (SMD) e mielofibrose; e a HPN subclínica, sem evidência clínica ou laboratorial de hemólise, sendo característica a associação com síndromes de falência medular, como a anemia aplástica e a SMD.

A trombose na HPN, especialmente em território venoso como descrito por Crosby², em 1953, é a principal causa de mortalidade em séries

européias e americanas, responsável por 40 a 67% dos óbitos de causa conhecida, sendo relatada em cerca de 40% dos pacientes. A trombose arterial é rara, com incidência de até 15%¹⁶. Em 29 a 44% dos pacientes pelo menos um evento tromboembólico ocorre durante a evolução^{13,15,17-21}, elevando o risco relativo de óbito em 10,2 vezes em oito anos²¹⁻²³. A identificação de evento tromboembólico durante o diagnóstico eleva o risco de mortalidade em cinco a 15,4 vezes¹³, resultando em sobrevida global de apenas 40% em quatro anos²¹. Em 60% dos pacientes os eventos tromboembólicos podem ser evidenciados apenas através de ressonância magnética de alta sensibilidade²⁴.

A influência da etnia na evolução da HPN é bem estabelecida. Os caucasianos apresentam incidência de trombose ao redor de 40%, podendo ser superior nos latino-americanos e afrodescendentes¹⁹. Na população tailandesa e asiática, a prevalência é inferior a 10%^{13,25,26}. Vale ressaltar a menor incidência de fenômenos tromboembólicos na população geral asiática, de mecanismo incerto²⁷.

A trombose, em particular, parece estar relacionada a maiores clones. Um estudo conduzido no Reino Unido encontrou incidência cumulativa de 44% na taxa de trombose em pacientes com clone HPN $\geq 50\%$ (em granulócitos), e de apenas 5,8 % naqueles com clones inferiores, em um período de 10 anos ($p < 0,01$)²⁸. Moyo *et al.*²⁰ encontraram, através de modelo de regressão logística, uma relação de probabilidades para o risco de trombose de 1,64 para cada elevação de 10% na proporção do clone HPN. Entretanto a incidência de trombose naqueles indivíduos com menores clones (de até 10%) se mostrou superior à observada em indivíduos saudáveis^{28,29}.

A ocorrência de trombose de veia hepática é desastrosa para pacientes com o diagnóstico de HPN. Ela geralmente sinaliza o início de progressiva deterioração clínica, e prognóstico sombrio⁵. A trombose de veia hepática, levando à síndrome de Budd-Chiari, parece ser a complicação trombótica mais frequente, acometendo 15 a 40,7% dos pacientes^{5,30}. Em ordem decrescente, os outros sítios mais frequentemente acometidos são o território venoso do sistema nervoso central, trombose venosa profunda de membros inferiores, trombose de veia porta, de sistema venoso mesentérico, veia cava inferior e trombose *in situ* da vasculatura pulmonar, trombose de seio venoso, de veia esplênica, renal e da derme³⁰, como também trombose microvascular de veias esplâncnicas, possível causa de dor abdominal intermitente⁵. A síndrome de Budd-Chiari é a principal causa de mortalidade, seguida pela trombose de veias do sistema nervoso central, em especial de seio sagital superior, e de veias mesentéricas³⁰. O acometimento preferencial em sistema venoso esplâncnico e de sistema nervoso central ainda não está elucidado³.

Tamanho o impacto dos fenômenos tromboembólicos nesta população resultou na recomendação, pelo grupo Internacional de Interesse em HPN, de profilaxia primária com antagonistas de vitamina K nos indivíduos com clone HPN $\geq 50\%$ e plaquetometria superior a 100.000/mm³, exceto aqueles pacientes de ascendência asiática¹⁵. Tal orientação foi proveniente de um estudo retrospectivo que avaliou 163 pacientes com clone HPN, no qual foi sugerida anticoagulação com warfarin nos indivíduos com clone HPN $\geq 50\%$, com plaquetometria superior a 100.000/mm³, e que não apresentassem risco hemorrágico. Foi observada incidência acumulada

de trombose, em 10 anos, de 36,5% na população que não recebeu profilaxia antitrombótica, e nenhum evento na população com as mesmas características que usou o cumarínico ($p = 0,01$)²⁸.

A trombocitopenia na HPN tem sido associada, historicamente, a risco hemorrágico. A maior incidência de fenômenos hemorrágicos na população oriental é justificada pela maior prevalência de HPN associada à aplasia de medula óssea. Em uma análise comparativa, 63,2% dos pacientes orientais apresentaram trombocitopenia, e mortalidade por sangramento de 23,7%. A população ocidental, com maior prevalência de HPN clássica, apresentou mortalidade secundária a sangramento de 10,5% ($p = 0,03$). Entretanto, é interessante notar que 52,3% da população caucasiana também apresentou trombocitopenia¹³.

Em uma análise da história natural da doença conduzida no Hospital Hammersmith, em Londres, grande parte dos pacientes (80%) apresentavam trombocitopenia, definida como grave (inferior a $50.000/\text{mm}^3$) em 48% dos casos¹⁷. Porém, apenas em 18,3% dos casos a mortalidade, possivelmente associada à doença, foi secundária a sangramento. Esta população recebia anticoagulação oral de acordo com a indicação do médico assistente, e não foi estabelecido se a anticoagulação e/ou a trombocitopenia contribuíram para os eventos hemorrágicos.

De maneira geral, pelo menos metade dos pacientes com HPN apresentam trombocitopenia. Em um estudo que avaliou 220 pacientes²¹, a trombocitopenia esteve presente em 52% dos indivíduos, com mediana de $40.000/\text{mm}^3$ (intervalo de 1.000 - $135.000/\text{mm}^3$). Entretanto a mortalidade por hemorragia foi de apenas 15%. A presença de plaquetopenia ao diagnóstico

foi fator de risco independente de mau prognóstico [risco relativo de 2,2 (1,3-2,8; $p < 0,003$)], e a trombose foi a principal causa de mortalidade. Não foi esclarecido, neste estudo, se os eventos hemorrágicos estiveram associados ao uso de cumarínicos.

É importante salientar os achados de um estudo que comparou a evolução dos diferentes subtipos de HPN. Em uma população de 460 pacientes com HPN clássica ou associada à aplasia medular (HPN-AA), a incidência cumulativa de trombose em 10 anos foi similar nos dois grupos: 37% na HPN clássica, e de 30% no grupo HPN-AA¹⁷. A trombose foi a principal causa de mortalidade nos dois subgrupos. Em 224 pacientes incluídos no subgrupo HPN-AA, 27% apresentavam anemia e trombocitopenia (definida por contagem plaquetária inferior a 80000/mm³), e 68% pancitopenia¹⁸, evidenciando que, apesar de grande proporção de pacientes com trombocitopenia, com valores inferiores a 100.000/mm³, a evolução para fenômenos tromboembólicos foi similar àquela encontrada na população sem trombocitopenia.

A correlação entre manifestações hemorrágicas e trombocitopenia grave nem sempre é observada. Em 1975, Willian H. Crosby já constatou que pacientes poderiam apresentar manifestações clínicas diversas, entretanto com nível plaquetário tão reduzido quanto 5.000/mm³, e diferenciou a 'púrpura seca' (pacientes sem manifestações hemorrágicas) da 'púrpura molhada'³¹, em pacientes com trombocitopenia imune (PTI). Em 1991, Ahn YS *et al.* demonstraram que pacientes com PTI assintomática apresentavam maior número de micropartículas derivadas de plaquetas, quando comparados aos indivíduos com PTI e níveis plaquetários similares,

mas com sangramento. Assim, sugeriu que as micropartículas derivadas de plaquetas (PMP) podem ser ativas no processo hemostático, e proteger os indivíduos com trombocitopenia imune do risco de sangramento. Ao caracterizar a falta de correlação universal entre a plaquetometria e a ocorrência de fenômenos hemorrágicos, sugeriu que a quantificação e caracterização de PMP podem auxiliar na identificação do risco hemorrágico e no manejo das trombocitopenias imunes. Também indicou que níveis elevados de PMP em trombocitopenias não imunes podem reduzir o risco hemorrágico, como na HPN^{32,33}.

A ineficiência do controle da atividade do sistema complemento na superfície plaquetária é possivelmente um dos principais mecanismos responsáveis pela trombofilia na HPN. As plaquetas com fenótipo HPN, deficientes em CD59, apresentaram 10 vezes mais sítios de ligação de membrana para o fator Va, expressão de superfície catalítica para o complexo protrombinase (Va+Xa) e taxa de conversão de protrombina quando estimuladas pelo complexo de ataque à membrana (MAC), em comparação a controles normais³⁴. A lise plaquetária induzida pelo complemento é minimizada pela liberação na superfície plaquetária do excesso do MAC, através de seu englobamento, vesiculação da membrana celular e extrusão, com liberação de fragmentos celulares no plasma. A plaqueta se torna ativada, ao mesmo tempo em que estas 'partículas' derivadas de plaquetas apresentam superfície fosfolipídica catalítica circulante, importante para a formação do complexo tenase (VIIIa+IXa) e protrombinase³⁴. É importante ressaltar que a exposição de novos sítios de ligação para o fator Va ocorre tanto em plaquetas quanto em micropartículas³⁴.

As micropartículas (MP) são pequenas vesículas irregulares de tamanho heterogêneo (100-1,000 nm) liberadas da membrana plasmática após ativação celular, apoptose ou exposição a estresse de cisalhamento³⁵. Elas se correlacionam a efeitos procoagulantes e proinflamatórios. Tipicamente as MP armazenam componentes citoplasmáticos e de membrana que refletem a sua origem celular específica, e estão implicadas em vários processos biológicos, incluindo comunicação intercelular, imunidade, apoptose e hemostasia³⁶.

A distribuição dos fosfolípides nas duas superfícies da membrana bicamada é altamente organizada e assimétrica. Os aminofosfolípides (fosfatidilserina “PS” e fosfatidiletanolamina “PE”) são segregados na camada interna, enquanto que o fosfoglicerídeo fosfatidilcolina e a esfingomielina, um esfingofosfolípide, estão localizadas principalmente na camada externa. Esta distribuição fica sob o controle de algumas proteínas, como a *flippase* (responsável pela translocação lipídica interior), *floppase* (responsável pela translocação lipídica exterior), e a *scramblase*, dependente de cálcio, que facilita o movimento bidirecional entre as duas camadas^{37,38}. A estimulação celular desencadeia a elevação de cálcio, aumentando as atividades da *floppase* e *scramblase*, reduzindo a atividade da *flippase*. Consequentemente os aminofosfolípides são translocados rapidamente para a camada externa, a membrana perde sua assimetria e o cálcio intracelular ativa os mecanismos responsáveis pela reorganização do citoesqueleto necessário para a liberação das MP da membrana³⁹. Os estímulos responsáveis pela desorganização da assimetria fosfolipídica *in vivo* são o estresse oxidativo, a liberação de citocinas, a ativação do

complemento, hipóxia ou apoptose³⁶. Em condições fisiológicas, as micropartículas estão implicadas em funções biológicas distintas, como a hemostasia⁴⁰. A exposição de PE na superfície das MP propicia sítios de ligação para a formação dos complexos das enzimas da coagulação⁴¹, aumentam a adesão plaquetária ao endotélio⁴² e estimulam a expressão de fator tecidual funcionante⁴³ e geração de trombina⁴⁰. Além disto, as MP podem desempenhar papel importante na função vascular e inflamação através da modulação do óxido nítrico e geração de prostaciclina³⁶. Sugere-se que MP derivadas de plaquetas apresentam atividade procoagulante 50 a 100 vezes superior à das plaquetas ativadas⁴⁴.

A elevação de micropartículas derivadas de plaquetas, com atividade pró-coagulante, foi descrita tanto em pacientes com HPN clássica quanto naqueles indivíduos com HPN associada à aplasia medular, quando os dois grupos foram comparados à população de aplasia exclusiva e a controles normais ($p < 0,00007$ e $p < 0,003$, respectivamente). É interessante notar que os indivíduos com aplasia de medula óssea apresentaram PMP em valores inferiores ao grupo controle ($p < 0,004$)⁴⁵. Os autores sugeriram que em pacientes com diagnóstico de HPN e trombocitopenia, níveis elevados de PMP podem ser protetores contra sangramento⁴⁵.

É muito interessante notar que, já em 1956, Julius L. Mendel observou que a geração de trombina, no método descrito por Pitney e Dacie em 1953, em um paciente com HPN e trombocitopenia, não apresentou diferença nos resultados obtidos no plasma pobre em plaquetas e no plasma rico em plaquetas (Figura 2). Ele observou que, ao contrário de indivíduos normais, a remoção de plaquetas da amostra na HPN não resultou na diminuição da

geração de trombina, e sugeriu que ‘substâncias derivadas de plaquetas estão presentes, livremente, no plasma da HPN’, e afirmou que este poderia ser o motivo pelo qual, mesmo trombocitopênicos, os pacientes com HPN não apresentam sangramento, mas sim, trombose⁴⁶.

Figura 2 - A geração de trombina resultante da depleção das plaquetas do plasma, em controles normais e pacientes com HPN [Fonte: Pitney e Dacie, 1953⁴⁷]

O eculizumab, um anticorpo monoclonal humanizado, é utilizado para o tratamento da HPN. Ele inibe o componente C5 da cascata do complemento, bloqueando a produção de C5a e C5b-9, que leva à redução significativa de hemólise, necessidade transfusional e sintomas de fadiga nestes pacientes⁴⁸. Também foi observada, em uma análise *post hoc*, a diminuição de 87% da taxa global de fenômenos tromboembólicos¹⁶.

Duas análises das alterações do sistema hemostático na HPN, associadas ao uso deste inibidor do complemento, evidenciaram dados surpreendentes. No primeiro estudo, o uso do eculizumab reduziu de maneira significativa os marcadores de geração de trombina (DDímero,

complexo trombina-antitrombina), e da citocina inflamatória IL-6. Foi observado que houve uma correlação inversa entre os marcadores de geração de trombina e de inflamação com a contagem plaquetária, em todos os pacientes, e esta não foi secundária ao uso paralelo de terapia imunossupressora, sugerindo que, em alguns pacientes, o consumo plaquetário secundário à ativação do complemento e à geração de trombina pode contribuir para a trombocitopenia⁴⁹. Em outra análise avaliou-se a correlação da plaquetometria com o uso da terapia anticomplemento, em uma população composta de 49 pacientes com trombocitopenia de um total de 195 pacientes incluídos nos estudos SHEPHERD⁵⁰, TRIUMPH⁴⁸, de fase II e extensões⁵¹. A contagem plaquetária foi registrada no início do estudo, e em 26 e 52 semanas de tratamento com eculizumab. A mediana da plaquetometria nos 49 indivíduos foi de $68 \times 10^9/L$ (variação de 23 a $97 \times 10^9/L$). Os pacientes com trombocitopenia eram mais propensos a apresentar diagnóstico de evento tromboembólico quando comparados ao restante da população ($45\% \times 27\%$; $p < 0,022$), e a inibição do complemento elevou a plaquetometria para níveis superiores a $100 \times 10^9/L$ em 33% (95% CI: 20-48%) e 36% (95% CI: 22-51%) dos casos em 26 e 52 semanas, respectivamente. A mediana de contagem de plaquetas se elevou para $85 \times 10^9/L$ em 52 semanas de tratamento ($p < 0,001$), independentemente de história prévia de TE ($p < 0,05$), de história de insuficiência medular ($p < 0,05$), e de impacto na produção medular pelo tratamento, pois não houve mudança na contagem absoluta de neutrófilos. Estes autores também sugeriram que o mecanismo de elevação da plaquetometria poderia ter sido secundário à inibição do consumo plaquetário mediado pelo complemento,

além de afirmar que os eventos tromboembólicos foram mais frequentes em pacientes com trombocitopenia. Sugeriram que a atividade do complemento contribui para a ativação e consumo plaquetário, com trombocitopenia secundária e maior risco concomitante de eventos tromboembólicos⁵².

Outros mecanismos implicados na fisiopatologia da trombofilia da HPN são a lesão e ativação endotelial mediadas pela ação do complemento, pela liberação de hemoglobina livre, por geração de radicais livres e de citocinas inflamatórias, com aumento de expressão de fator von Willebrand^{53,54}. A depleção de óxido nítrico leva a vasoconstrição e a ativação plaquetária, que também é resultante do aumento na geração de trombina, da toxicidade direta da hemoglobina livre, pela elevação de radicais livres e pela disfunção endotelial⁵⁵. O receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPAR), e, indiretamente, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que dependem do GPI para exercer suas funções, parecem também contribuir para a fisiopatologia dos fenômenos tromboembólicos⁵. O TFPI é liberado, predominantemente, pelo endotélio, e é ligado a uma proteína, ancorada pela GPI, essencial para o seu transporte para a superfície celular. É uma proteína anticoagulante potente que inibe o complexo catalítico fator tecidual+fator VIIa e o fator Xa, sendo o único inibidor fisiológico do início da coagulação. A sua síntese também sofre redução mediada por citocinas inflamatórias⁵⁶. A função do uPAR é ligar a uroquinase à superfície de monócitos e granulócitos, convertendo o plasminogênio a plasmina, iniciando a fibrinólise⁵. A sua ausência é possivelmente relevante, já que a atividade do sistema fibrinolítico é inversamente proporcional ao tamanho do clone⁵⁷.

Atualmente, na prática clínica, os dois principais parâmetros utilizados para a avaliação do desequilíbrio hemostático na HPN são a proporção do clone, que estima o risco trombótico, e o grau de trombocitopenia, historicamente relacionado ao risco hemorrágico. Os pacientes com clone $\geq 50\%$ e plaquetometria superior a $100.000/\text{mm}^3$ recebem profilaxia primária com anticoagulantes, mas não aqueles com trombocitopenia¹⁵, pelo receio de maior incidência de fenômenos hemorrágicos e pela suposta 'proteção', pela trombocitopenia, para a ocorrência de fenômenos tromboembólicos. Por esta grande complexidade das alterações do sistema hemostático associadas ao clone HPN, optou-se por evidenciar este desequilíbrio com um teste de avaliação global da hemostasia, a geração de trombina.

A trombina é uma enzima central no processo hemostático. A avaliação do potencial de gerar trombina, em um indivíduo, pode se correlacionar de maneira mais fidedigna a um estado de hiper ou hipocoagulabilidade, quando comparado aos testes tradicionais.

A geração de trombina, através da conversão do fibrinogênio em fibrina e posterior formação do coágulo é o resultado final de um processo complexo de reações proteolíticas, iniciado pela formação do complexo FVIIa+FT após a lesão vascular. Esta fase inicial resulta na formação de pequenas concentrações de trombina, através da ativação do complexo protrombinase, que causa retroalimentação positiva na ativação do FV, FVIII e fator XI, levando à formação de trombina em concentrações muito elevadas, que culmina na conversão do fibrinogênio em fibrina⁵⁸. A geração de trombina pelo complexo FT+FVIIa é inibida pelo TFPI⁵⁹. Atualmente as superfícies celulares com PS funcionam não apenas como suporte para estas reações (modelo tradicional da

coagulação), mas também com uma função de coordenação ativa de todo o processo hemostático (modelo celular da coagulação)⁶⁰. A trombina acelera sua própria geração, por um sistema de retroalimentação positiva, e também a inibe, através de sua interação com a trombomodulina. Por se ligar a este receptor endotelial, a trombina perde sua função procoagulante e passa a ter propriedade anticoagulante, ativando a proteína C. Esta reação sofre amplificação pela trombomodulina em mais de 1000 vezes⁶¹. A proteína C ativada, com seu cofator proteína S, inibe o FVIIIa e o FVa⁶². A antitrombina é outro importante anticoagulante natural, que inibe a geração de trombina⁶³.

Os testes tradicionais da coagulação, como o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), não apresentam sensibilidade para avaliar todo o sistema hemostático. Estes testes terminam após a formação inicial do coágulo, quando apenas 5% de toda a trombina fisiologicamente relevante é formada. Também não apresentam sensibilidade para os estados de hipercoagulabilidade⁶⁴. A mensuração individual dos fatores de coagulação pode identificar deficiências específicas, entretanto ela nem sempre está associada ao fenótipo clínico.

A mensuração da capacidade de um indivíduo em gerar trombina captura o resultado final da interação entre as proteases e seus inibidores, e é potencialmente útil para a avaliação do fenótipo, protrombótico (alta capacidade em gerar trombina) ou hemorrágico (geração de trombina reduzida). A capacidade do plasma em gerar trombina ao longo do tempo, *in vitro*, é denominada potencial de trombina endógeno (ETP), que difere dos marcadores de geração de trombina *in vivo*, como o fragmento 1+2 da protrombina, os complexos trombina-antitrombina e o fibrinopeptídeo A⁶⁵.

A primeira descrição do método de geração de trombina ocorreu em 1953^{47,66}, entretanto o método era muito trabalhoso, difícil de ser realizado e sujeito a grande variabilidade⁶⁷. Recentemente, após a automatização e possibilidade de realização em múltiplas amostras simultaneamente, o teste ganhou popularidade na avaliação das alterações do sistema hemostático em diversas patologias^{65,67-69}.

Os métodos atuais iniciam a geração de trombina após a adição de um ativador ao plasma recalcificado, na presença de fosfolípidos, causando a clivagem da trombina por um substrato, cromogênico ou fluorogênico⁷⁰. O método fluorogênico é o mais estudado, e que apresenta variabilidade inferior⁶⁷.

Os parâmetros obtidos no método fluorogênico incluem o tempo de latência, momento aonde a formação de trombina se inicia, a concentração máxima de trombina (pico), o tempo para atingir a concentração máxima de trombina (tempo para o pico), e o ETP (Figura 3)⁶⁷.

Figura 3 - Curva de geração de trombina, ou trombograma, mostrando seus quatro parâmetros: tempo de latência, tempo para o pico, concentração máxima de trombina (pico) e potencial de trombina endógeno (ETP). [Adaptado de van Veen *et al.*, 2008⁶⁷]

Estudos atuais demonstram reprodutibilidade aceitável, com coeficiente de variação intra e interlaboratorial $< 10\%$ ^{69,71}. Entretanto, esta variabilidade depende, fundamentalmente, da padronização dos reagentes e dos métodos, principalmente se o laboratório utiliza reagentes produzidos localmente. A geração de trombina é particularmente susceptível à variabilidade, fruto de diferentes metodologias para a coleta da amostra, preparo do plasma, reagentes e estoque^{69,72-74}. Para os resultados serem reprodutíveis e comparáveis, a metodologia deve ser a mesma durante o estudo⁶⁷. A diminuição na concentração de fosfolípides (variando entre 0,0 e 1,5 $\mu\text{mol/L}$) e de fator tecidual (1 pmol/L) elevam esta variabilidade⁷². Ela pode ser reduzida se a ativação da via de contato for inibida com inibidor da tripsina derivado do milho (*corn trypsin inhibitor* ou *CTI*). Esta ativação,

entretanto, é importante com concentrações de fator tecidual inferiores a 2 pmol/L, e não interfere em concentrações de 5 pmol/L de FT^{71,75,76}. A maior parte dos laboratórios utiliza a concentração de fosfolípides de 4 µmol/L^{67,71}. Em relação à amostra de plasma, aquela realizada em plasma pobre em plaquetas (PPP) é a mais utilizada, e aonde existe padronização. Como o teste em PRP necessita ser realizado em plasma fresco, os estudos de variabilidade inter-laboratorial não são possíveis⁶⁷.

A presença de plaquetas na amostra teste eleva a variabilidade interindividual, já que elas exercem atividade procoagulante não padronizada⁷¹. O teste também sofre redução significativa em seus parâmetros com plaquetometria inferior a 50.000/mm³^{71-73,77}. Ao avaliar a influência da concentração plaquetária na geração de trombina realizada em PRP, Gerotziafas *et al.*⁷⁷ demonstraram que os parâmetros tempo de latência e tempo para o pico sofrem influência da plaquetometria. O parâmetro tempo de latência apresentou maior valor (tempo mais prolongado) em contagens plaquetárias inferiores a 100.000/mm³ ($p < 0,05$). Não foi observada diferença para plaquetometria entre 100.000 e 400.000/mm³. O tempo para o pico apresentou maior valor à partir de 50.000 plaquetas ($p < 0,05$), sendo similar até atingir o valor de 400.000/mm³. Idealmente, quando realizada em PRP, a geração de trombina deve ser realizada com plaquetometria de 150.000/mm³⁶⁹. Para eliminação destes fatores imprevisíveis foi proposto que a amostra seja testada em PPP, com a adição de fosfolípides pró-coagulantes sintéticos em concentração $\geq 4\mu\text{M}$ (descrita como a condição experimental ideal)⁷¹ na presença de FT em baixa concentração ($\leq 6 \text{ pM}$), gerando resultados similares aos observados em

plasma rico em plaquetas (PRP)⁷¹. Também é importante salientar que o uso do PRP congelado e descongelado afeta de maneira importante alguns parâmetros TGT⁷⁸, em especial o tempo de latência e o tempo para o pico⁷¹.

Os estudos que avaliaram a geração de trombina podem utilizar as mesmas concentrações dos reagentes. Porém, os resultados podem ser muito diferentes, especialmente se reagentes produzidos localmente foram utilizados. Os fabricantes de FT não apresentam a concentração de FT em seus produtos, e apesar de várias fontes disponíveis, e sensibilidade e especificidade são muito variáveis⁶⁷.

Outra fonte possível de resultados díspares está relacionada ao calibrador utilizado. A relação entre a geração de trombina e a atividade fluorescente não é linear, devido ao consumo do substrato durante a reação, e a falta de linearidade entre a atividade fluorescente com o aumento da concentração de moléculas fluorescentes (*inner filter effect*). Portanto, para cada nível de fluorescência é necessário um fator de calibração diferente para o cálculo da concentração de trombina. Como este sinal fluorescente também é influenciado pela coloração do plasma, aqueles com colorações diferentes com o mesmo potencial de geração de trombina podem levar a resultados potencialmente diversos⁶⁹. O CAT (*The Calibrated Automated Thrombogram*) utiliza um calibrador com atividade similar à trombina conhecida, comparando a geração de trombina na amostra em teste paralelamente à amostra que contém o calibrador, corrigindo as variáveis citadas automaticamente⁶⁷. Foi demonstrada reprodutibilidade entre diferentes centros através da padronização dos reagentes e da metodologia utilizada^{67,79,80}.

O uso de agentes sensibilizadores da via da proteína C não estão presentes nos reagentes utilizados. A ativação *in vivo* necessita da formação do complexo entre a trombomodulina e a trombina, ativando a proteína C. A trombomodulina não está presente nos reagentes, mas a sensibilidade da via da proteína C *ex vivo* pode ser avaliada através da adição de trombomodulina⁸¹, proteína C ativada⁷⁴ ou ao veneno Protac⁸² à amostra teste⁸³. O uso destes agentes sensibiliza o teste para deficiência de proteína C (exceto com APC), proteína S, mutação do FVLeiden e condições associadas a resistência adquirida à proteína C.

A mensuração da capacidade de geração de trombina no plasma é potencialmente útil e pode ser aplicada para o rastreamento, monitorização e/ou diagnóstico do desequilíbrio hemostático. Ela tem sido utilizada para a detecção de grande variedade de situações com hipo ou hipercoagulabilidade. Ela está reduzida em pacientes com hemofilia A e B, pode ser útil na monitorização do uso de agentes *bypass* em pessoas com hemofilia e inibidores^{83,84}, correlaciona-se com o fenótipo hemorrágico, que pode variar em indivíduos com o mesmo nível de atividade de fator coagulante, e também está reduzida em plaquetopatias e coagulopatias hemorrágicas hereditárias raras⁸⁵⁻⁸⁸. O método também foi eficaz em identificar o estado de hipercoagulabilidade associado a trombofilias hereditárias e adquiridas^{81,89,90}.

A eficácia na detecção do fenótipo protrombótico através da geração de trombina é demonstrada por vários estudos. Tripodi *et al.* avaliaram 254 pacientes que foram acompanhados após um primeiro evento de TEV idiopático, e relataram que os indivíduos com elevação da geração de

trombina na presença de trombomodulina apresentaram maior risco de TEV recorrente. Aqueles com ETP > 960 nM x min ou concentração máxima de trombina > 193 nM tiveram taxa de risco de TEV recorrente de 3,41 e 4,57, respectivamente, quando comparados aqueles com ETP < 563 nM x min ou $C_{\max} < 115 \text{ nM}^{91}$. O mesmo foi observado por Besser *et al.*, que avaliaram 188 pacientes com um primeiro evento de TEV, idiopático ou secundário a um evento não cirúrgico, relatando que ETP elevado é preditor significativo de recorrência idiopática (HR 2,6, 95% CI 1,2 - 6,0)⁹². Em estudo similar Hron *et al.*, com 861 pacientes, aqueles sem recorrência apresentaram menores valores de ETP quando comparados aos pacientes com TEV recorrente ($p < 0,001$) após primeiro evento idiopático. Entretanto, van Hylckama Vlieg *et al.*⁸¹ não encontraram valor preditivo para risco de recorrência de TEV, porém a geração de trombina foi importante para avaliação do risco de primeiro evento trombótico. Entretanto, este estudo apresentou um desenho experimental diferente, utilizando fator tecidual em concentração elevada (15pM) e diluição do plasma 1:4 em tampão antes da análise já que a amostra de plasma puro era insuficiente para a realização da geração de trombina⁹².

No método fluorogênico, a geração de trombina esteve aumentada na presença de FV R506Q, do F2 G20210A e deficiências hereditárias de proteína C, proteína S e antitrombina^{74,76,82,93,94}, e em pacientes com níveis elevados de FVIII:C, FIX:C, FXI:C^{75,94-96}, em mulheres que utilizam contraceptivos orais combinados ou terapia de reposição hormonal^{72,94,97,98}, em pacientes com anticoagulante lúpico^{74,99,100} e com deficiência adquirida de proteína S¹⁰¹. Estes estudos utilizaram uma variedade de métodos para

demonstrar o efeito de diversos estados protrombóticos no CAT, como o uso de PRP, PRP congelado e PPP, diversas concentrações de FT e de fosfolípidos e agentes para aumentar a sensibilidade do teste para a via da proteína C. Esta última parece apresentar uma importância fundamental na demonstração do fenótipo protrombótico. Vários estudos demonstraram que pacientes com F5 R506Q, deficiência de proteína C ou proteína S, em uso de ACO e TRH ou níveis elevados de FVIII apresentaram aumento na geração de trombina/resistência à proteína C quando comparados a indivíduos normais quando um ativador da via da proteína C foi utilizado no teste^{74,94,97-100}. A falência na utilização deste ativador é uma possível razão pela qual alguns estudos não demonstraram uma relação clara entre o fenótipo protrombotico e a elevação da geração de trombina^{93,102}. Em 2006, Dargaud *et al.*⁹⁴ demonstraram que o uso do CAT com a adição de trombomodulina é eficaz e mais sensível para a identificação do fenótipo protrombótico. Neste cenário, o ETP é o parâmetro mais frequentemente utilizado⁶⁷, e os resultados podem ser expressos como a razão entre ETP na presença do ativador e ETP sem ativador^{82,103}. Inúmeros estudos posteriores demonstraram que a ineficácia da redução na geração de trombina pela trombomodulina (RETP) é capaz de identificar o risco de TEV associado ao estado de hipercoagulabilidade de várias patologias¹⁰⁴⁻¹⁰⁸. Entretanto, como a TM é uma proteína de membrana celular endotelial, a concentração fisiológica é difícil de ser estabelecida. Dargaud *et al.* determinaram que a TM derivada de pulmão de coelho foi a mais eficaz na discriminação entre indivíduos normais e com fenótipo protrombótico⁸¹, ao utilizar uma concentração que foi capaz de reduzir em 50% a ETP em indivíduos normais^{83,94}.

As características da curva de geração de trombina com maior relevância para a avaliação do estado de hipercoagulabilidade são aquelas que incorporam os parâmetros potencial de trombina endógeno (ETP) e a concentração máxima de trombina (pico) em sua análise. O tempo de latência e o tempo para o pico podem sofrer influência variável. Zekavat *et al.* sugeriram que o teste de geração de trombina é uma ferramenta útil para a estimativa do risco hemorrágico em pacientes com coagulopatias hemorrágicas raras. Apesar de a correlação encontrada ter sido de pequena magnitude (ao redor de 0,3), ela foi significativa, e o fenótipo hemorrágico esteve associado ao prolongamento do tempo de latência e do tempo para o pico⁸⁵. Dielis *et al.* observaram que, com o estímulo de FT 1pM e 13,6pM, em amostra de PPP, o tempo de latência foi determinado pelos parâmetros FVII, FIX, proteína S livre, TFPI e níveis elevados de fibrinogênio. O FVII, de acordo com o conceito de que a cascata de coagulação é iniciada pela ligação do FT ao FVII(a); o FIX, provavelmente como resultado da ativação direta do FIX pelo complexo FT+FVIIa em baixo estímulo procoagulante; TFPI livre e proteína S, refletindo a inibição do complexo FVIIa+FT pelo sistema TFPI/PS, e fibrinogênio em concentrações elevadas, possivelmente relacionada à habilidade do fibrinogênio, particularmente do γ' -fibrinogênio, em se ligar ao exosite II e inibir a ativação do FVIII mediada pela trombina¹⁰⁹.

Já Dielis *et al.*¹⁰⁹ descreveram que, em amostra de PPP, com 5pM de FT, níveis elevados de FII e de fibrinogênio prolongaram o tempo de latência, e sugeriu que, em elevadas concentrações, a protrombina e o F1+2 podem inibir, de forma competitiva, a ligação de outras proteínas Gla à superfície lipídica, prolongando o tempo para a formação do complexo

protrombinase. Não houve diferença significativa para o fator IX. Não foram avaliados os anticoagulantes naturais. Também observou que os níveis de fator X encurtaram o tempo de latência. Já o tempo para o pico foi influenciado pelo FX (níveis elevados levaram à redução do tempo). Também observou o prolongamento deste parâmetro com concentrações elevadas de protrombina. Entretanto foram utilizadas concentrações de fatores 200% a 400% acima do valor normal.

Ollivier *et al.*¹¹⁰ demonstraram que o CAT em amostra de PPP pode ser utilizado para detectar atividade endógena de FT no plasma, e demonstrou que a principal fonte in vivo é proveniente de micropartículas. Encontrou que baixos níveis de FT endógeno contribuem para o início da coagulação, e a depleção de micropartículas derivadas de monócitos prolongou, de maneira significativa, o tempo de latência. Um estudo que avaliou a interferência de micropartículas, majoritariamente derivadas de plaquetas, em amostra de PPP demonstrou que a redução de micropartículas derivadas de plaquetas prolonga o tempo de latência e o tempo para o pico¹¹¹.

2 OBJETIVOS

a) Descrever as alterações do sistema hemostático associadas ao clone HPN através da avaliação global da coagulação.

b) Avaliar a possível interferência da plaquetopenia associada ao clone HPN neste contexto.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.3 Seleção

O recrutamento para a participação no estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram avaliados:

A) pacientes em seguimento ambulatorial;

B) indivíduos com clone HPN superior a 2%;

C) indivíduos selecionados através de levantamento de prontuário médico eletrônico com os termos Anemia Hemolítica Adquirida, subitem Hemoglobinúria Paroxística Noturna, Anemia Aplástica Idiopática e outras Anemias Aplásticas, Anemia Aplástica Grave, Anemia Aplástica Muito Grave, Anemia Aplástica Não Grave, Anemia Aplástica Não Grave com necessidade transfusional, leucopenia com medula hipocelular, pancitopenia;

D) doadores de sangue que não puderam doar por exceder o número máximo de doações realizadas no último ano, trazer criança como acompanhante, por apresentarem situações com maior risco de aquisição de doenças sexualmente transmissíveis, e por terem realizado endoscopia em período inferior a seis meses. Não foram incluídos doadores com diagnóstico conhecido de doenças sexualmente transmissíveis ou com doenças de trato gastrointestinal;

E) pessoas saudáveis voluntárias.

3.1.1 Critérios de inclusão

Indivíduos com idade entre 18 e 75 anos, com diagnóstico de Hemoglobinúria Paroxística Noturna, Aplasia Medular Idiopática Adquirida ou associada ao clone HPN (AA), acompanhados no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HC-FMUSP no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2013, e voluntários saudáveis.

3.1.2 Critérios de exclusão

(A) para análise entre o grupo HPN, AA e normais: diagnóstico de câncer, grande cirurgia nos últimos três meses (ortopédica, gastrointestinal, urológica, torácica, ginecológica), hospitalização no último mês, gravidez ou puerpério, imobilização recente (nos últimos três dias), infecção aguda, insuficiência cardíaca congestiva classe funcional III ou IV, doença reumática ou respiratória aguda, uso de anticoagulante oral como profilaxia secundária para TEV, anticoagulante parenteral nas últimas 24 horas, antiagregante plaquetário, anti-inflamatório não hormonal ou antifibrinolítico na última semana, diagnóstico conhecido de trombofilia hereditária, tabagismo, síndrome pós trombótica, história prévia de tromboembolismo venoso ou arterial, uso de contraceptivo ou terapia de reposição hormonal (TRH), uso de eculizumab ou de outras drogas que possam interferir na hemostasia.

(B) para a análise realizada apenas no subgrupo dos pacientes: os mesmos, exceto pacientes em uso de contraceptivo, com infecção aguda assintomática, diabetes mellitus insulínica dependente (DMID), uso de andrógeno sintético, com diagnóstico de tromboembolismo venoso ou arterial superior a um ano. Tais indivíduos foram analisados separadamente,

e considerados com fator de risco presente para TEV, para avaliar as possíveis alterações encontradas em maior número de pacientes, pela baixa incidência e prevalência da HPN e de AA na população.

O formulário preenchido para registro das características demográficas, clínicas e para identificação de fatores de risco para TEV está presente no Anexo A.

3.1.4 Amostragem

A população do estudo foi definida de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, constituída por indivíduos selecionados sucessivamente através do dia de agendamento de sua consulta ambulatorial. Os doadores de sangue foram selecionados em dias aleatórios. Os outros indivíduos normais foram voluntários, membros do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HC-FMUSP.

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos, sugeridos pela Declaração de Helsinque, após a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP, projeto número 1143/09, registro número 4920 (Anexo B). Todos os participantes foram voluntários e incluídos somente após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). O estudo foi realizado com recursos fornecidos pela FAPESP, projeto 2010/19431-3.

3.1.5 Determinação dos Grupos

Grupo HPN: clone HPN maior ou igual a 10%, associado ou não ao diagnóstico de aplasia medular.

Grupo AA: diagnóstico de aplasia medular e/ou clone HPN inferior a 10%.

Normais: grupo de indivíduos normais, saudáveis.

3.2 Métodos

3.2.1 Procedimento do estudo

A inclusão no estudo foi realizada após a leitura, compreensão, assinatura do TCLE e explanação do procedimento e objetivo da pesquisa. Posteriormente o participante era submetido a entrevista de acordo com o Anexo A, e em caso de dúvida diagnóstica, submetido a exame físico pelo pesquisador. Os pacientes anticoagulados eram orientados a suspender o marevan e iniciar o clexane na dose profilática de 40 mg 1 x ao dia por via subcutânea, por um período mínimo de sete dias antes da coleta da amostra, colhida apenas após 24 horas da última dose de clexane, com reinício da anticoagulação oral associada à terapia parenteral até atingir INR alvo. Todos os indivíduos tiveram suas características demográficas e clínicas coletadas antes da realização dos testes.

A amostra era coletada e encaminhada para a realização de:

Pesquisa de trombofilia: nível plasmático de proteína S livre (imunoturbidimétrico, HemosIL[®] Free Protein S), nível plasmático de proteína C (cromogênico automatizado, HemosIL[®] Protein C), nível plasmático de antitrombina (cromogênico, Liquid Antithrombin), de fibrinogênio (Clauss

modificado), de plasminogênio (cromogênico automatizado), anticoagulante lúpico (coagulométrico funcional), pesquisa do anticorpo anticardiolipina IGG e IGM (Elisa, QuantaLite ACA Inova IGIII), pesquisa do anticorpo antibeta2glicoproteína IGG e IGM (Elisa, QuantaLite β 2GPI IGG e IGM, Inova), mensuração de homocisteína plasmática (imunoturbidimétrico, HemosIL TM, Homocysteine), pesquisa do F2 G20210A, FV R506Q (reação de polimerização em cadeia - PCR).

Testes habituais para a avaliação da hemostasia: tempo de protrombina (Quick modificado, ISI ~ 1,2), tempo de tromboplastina parcial ativada (Proctos & Rapaport modificado), atividade coagulante do FVIII (coagulométrico funcional) e do fator V (coagulométrico funcional), atividade do fator de von Willebrand (imunoturbidimétrico), determinação do dímero D (imunoturbidimétrico), teste de Owren modificado, contagem de plaquetas no citrato (Brecher e Cronkite, câmara de Neubauer) e EDTA (automatizado).

Todos os testes para a pesquisa de trombofilia e de avaliação da hemostasia foram realizados com reagentes IL, Instrumentation Laboratory, Bedford, USA, exceto se especificado.

Pesquisa do clone HPN por citometria de fluxo para pesquisa de CD55 e CD59 em granulócitos e eritrócitos, CD14 e CD64 em monócitos (CD55, CD59 e CD14 PE, CD64 FITC, BD Pharmingen TM, USA).

Hemograma e análise bioquímica: hemograma (automatizado, microscopia coloração panóptica), desidrogenase láctica (cinético automatizado), proteína C reativa (imunoturbidimétrico), proteínas totais e frações e bilirrubinas totais e frações (colorimétrico automatizado).

Geração de trombina: análise realizada por meio de método fluorogênico - CAT (*The Calibrated Automated Thrombogram*, ThrombinoscopeTM, SinapseBV, Maastrich, Holanda).

3.2.2 Definições Diagnósticas

Anemia aplástica idiopática adquirida: pancitopenia (pelo menos duas citopenias: Hb < 10g/dL; neutrófilos < 1.500/mm³ ou plaquetas < 50.000/mm³), no contexto de medula óssea hipocelular com ausência de infiltrado anormal e sem aumento de reticulina.

Plaquetopenia: clone HPN presente, maior ou igual a 10%, e plaquetas < 100.000/mm³.

Hemoglobinúria Paroxística Noturna com hemólise: clone HPN ≥ 10% e DHL ≥ 1,5 vezes o limite superior da normalidade.

3.2.3 Geração de trombina

Composição dos reagentes utilizados: (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda):

PPP reagent 5pM: é uma mistura de fosfolípides e fator tecidual. Após a reconstituição com 20 µL do reagente, 80 µL de plasma e 20 µL de FluCa, a mistura final contém 5pM de fator tecidual e 4µM de fosfolípides.

FluCa-Kit: mistura de substrato fluorogênico e tampão (que contém cloreto de cálcio). O substrato fluorogênico sofre a ação da trombina gerada na amostra, e emite um sinal fluorogênico que é diretamente relacionado à

concentração de trombina gerada ao longo do tempo. Ele é adicionado pelo distribuidor do aparelho, que determina o tempo zero da reação.

Thrombin Calibrator: possui atividade similar à trombina. Age no substrato fluorogênico e funciona como um padrão de concentração conhecida de trombina, que é comparada à trombina gerada na amostra teste. Não sofre a ação de substratos ou inibidores plasmáticos.

Trombomodulina (American Diagnostica Inc., Stamford CT, EUA): derivada de pulmão de coelho,. A concentração utilizada foi aquela que reduziu em 50% a geração de trombina (ETP) de indivíduos normais.

3.3.4 Parâmetros do trombograma

Como já foi observado na Figura 3, podemos considerar os seguintes parâmetros:

Tempo de latência (*lagtime*): momento aonde a formação de trombina se inicia (o momento aonde a concentração de trombina atinge 1/6 do pico da concentração máxima de trombina). Unidade: minutos.

Potencial de trombina endógeno (*ETP*): área sob a curva de geração de trombina, expressa em concentração de trombina. Unidade: nanomolar x minuto, nM x minuto.

Pico (*peak*): concentração máxima de trombina. Unidade: nM de trombina.

Tempo para o pico (*time to peak, tpeak*): tempo para atingir a concentração máxima de trombina, em minutos.

3.3.5 Procedimento do teste de geração de trombina

As amostras de sangue para a análise foram coletadas em dois tubos vacutainer com citrato de sódio 3.2%, na proporção de 1:9 partes de anticoagulante/sangue.

Preparo do PPP: As amostras foram submetidos a centrifugação 1800 g por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante do plasma do tubo 1 foi armazenado em tubos eppendorf (três amostras de 0,5 mL) para estoque. O plasma sobrenadante do tubo 2 foi aspirado e centrifugado novamente a 10.000 g por mais 10 minutos a temperatura ambiente, em tubos plásticos. Logo após a segunda centrifugação, o plasma foi separado em três alíquotas, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o teste. Todo o procedimento, até o seu congelamento, foi realizado em até duas horas da coleta das amostras. O período máximo de estoque das amostras congeladas foi de seis meses.

A análise da geração de trombina foi realizada de acordo com a descrição de Hemker *et al.*⁶⁹. Os experimentos foram realizados em uma placa de microtitulação de polipropileno, com poços arredondados (Immulon 2HB, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia). A geração de trombina foi desencadeada utilizando-se FT 5pM e 4μM de fosfolípides sintéticos (PPP reagent 5pM) sem e com a adição de trombomodulina (PPP reagent 5pM + TM).

Inicialmente o PPP reagent 5pM, o calibrador e a trombomodulina eram preparados e pipetados na placa (pipetagem reversa). No momento da análise, as amostras eram descongeladas em banho maria, a 37° C, no período de cinco minutos. Para cada placa utilizada eram descongeladas 8 amostras, e cada amostra ocupava nove poços da placa.

Antes do início de cada procedimento, toda a placa era inspecionada para verificar a eventual presença de bolhas, e eventualmente descartada. A placa era mantida aquecida a 37°C, dentro do fluorímetro paralelamente à preparação do *FluCa*. As amostras do *CAT* foram mensuradas em triplicata, ou seja, três poços preenchidos com plasma e reagente [80 µL de PPP, 20 µL de *PPP-Reagent 5pM*], em três poços adicionais, além do plasma e reagente era adicionada trombomodulina, na concentração de 6nM (volume 3 µL), e para controle três poços preenchidos com o mesmo plasma e o calibrador de trombina (total de nove poços por paciente). Após 15 minutos de incubação a 37°C, 20 µL de substrato fluorogênico diluído em tampão mais cálcio (*FluCa*) são dispensados automaticamente em cada poço. A reação é monitorizada utilizando-se um fluorímetro (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia), com um filtro de excitação de 390 nM e de emissão de 460 nM, a 37°C. O sinal fluorescente é convertido em concentração de trombina, através de comparação contínua ao sinal gerado pelo calibrador de trombina. Um trombograma (curva de geração de trombina) com os seus parâmetros são gerados automaticamente pelo software (Thrombinoscope TM, Sinapse BV, Maastricht, Holanda). O ETP foi derivado do cálculo da área sob a curva de geração de trombina, ajustada para a atividade trombina- α 2macroglobulina. Quatro parâmetros foram avaliados: o ETP, pico máximo de concentração de trombina, tempo para o pico e tempo de latência. A redução do ETP na presença de trombomodulina foi avaliada em cada amostra.

Todos os testes foram realizados pelo mesmo operador, acompanhados por farmacêutica-bioquímica com experiência em laboratório de hemostasia. Todos os experimentos foram interrompidos após 30 minutos do seu início, período suficiente para o término da reação.

3.3.6 Medidas para redução de variabilidade intralaboratorial e interlaboratorial

Vários fatores podem levar à variação intra e interlaboratorial do método. Uma importante questão relacionada às curvas de geração de trombina é a interpretação dos dados. Para a redução da variabilidade pré analítica, a coleta das amostras foi realizada com atenção especial para a redução do tempo de garroteamento e de lesão tecidual, com agulha de 21 gauge, preferencialmente realizada pelo mesmo profissional. Todas as amostras foram processadas no mesmo laboratório, pela mesma equipe, até o seu congelamento, que não foi superior a seis meses.

Após a realização dos experimentos, as curvas de geração de trombina, em triplicata para cada indivíduo, foram avaliadas pelo operador e, de maneira cega, pelo supervisor. As curvas (trombogramas) aonde se observou grande variabilidade de desvio padrão entre os parâmetros avaliados, na falta de um traçado típico e homogêneo, foram excluídas da análise. Os resultados incluídos foram aqueles aonde se observou reprodutibilidade do traçado ao menos em duplicata.

3.3.7 Delineamento da Pesquisa

Os indivíduos foram categorizados de acordo com a proporção de clone HPN nos três grupos: HPN, AA e/ou HPN sc e normais.

Os grupos, definidos, foram comparados de acordo com as características demográficas, clínicas e laboratoriais. Os parâmetros ETP, ETP + TM e a relação $ETP+TM / ETP$ (RETP), pico, tempo de latência e tempo para o pico, com e sem TM, foram comparados entre os três grupos.

Em uma segunda fase, os parâmetros ETP, ETP+TM e RETP, pico, tempo de latência e tempo para o pico, com e sem TM, foram comparados dentro do grupo HPN de acordo com o uso de terapia anticoagulante e de plaquetopenia.

Foi avaliada a presença de correlação entre RETP e a proporção de clone HPN, isoladamente e associada à plaquetopenia, e RETP e os parâmetros FVIII:C, FvW:RCo, PC, PSlivre, AT, DHL, DDímero, concentração de hemoglobina, número de plaquetas e de neutrófilos.

Por fim, todos os indivíduos do grupo HPN (incluídos aqueles com fatores de risco para TEV) foram avaliados, e foi estabelecida a interferência de terapia anticoagulante e da plaquetopenia nos parâmetros do trombograma, assim como a presença de correlação entre clone HPN e RETP.

3.3.8 Análise Estatística

Inicialmente efetuou-se a análise descritiva das características de todos os participantes da pesquisa. Foram apresentadas tabelas com frequências para as variáveis qualitativas e estimativas das medidas de tendência central e de dispersão para as variáveis quantitativas.

Para verificar associação entre as variáveis qualitativas e os três grupos do estudo (pacientes com clone HPN $\geq 10\%$ (HPN), pacientes com aplasia medular idiopática ou associada ao clone HPN subclínico (AA) e voluntários saudáveis (normais) empregaram-se testes da razão de verossimilhanças.

Em relação às variáveis quantitativas, foram conduzidos testes de normalidade de distribuição de probabilidades avaliadas com uso do teste de Kolmogorov-Smirnov. Nas situações em que os três grupos apresentaram distribuição normal, a comparação foi realizada com o teste ANOVA seguido por comparações múltiplas de Tukey quando verificada diferença com significância estatística entre os grupos. No caso de não normalidade em pelo menos um dos grupos, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Em seguida, apenas os pacientes do HPN tiveram seus parâmetros de geração de trombina avaliados segundo ocorrência de anticoagulação e de plaquetopenia. Para essas comparações foi utilizado o teste t-Student, quando os grupos apresentavam distribuição normal, ou, caso contrário, o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Por último, utilizou-se o teste de correlação de Pearson ou o teste não paramétrico de correlação de Spearman para verificar a relação entre a relação de ETP e alguns marcadores laboratoriais.

Neste estudo adotou-se nível de significância $\leq 5\%$.

Os dados foram inseridos no programa Excel e analisados no programa estatístico STATA versão 13.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Amostra

Foram avaliados inicialmente 23 pacientes com clone HPN $\geq 10\%$ e 25 com AA acompanhados no Ambulatório de Hematologia do HC-FMUSP entre 2010 e 2013. Também foram avaliados 39 voluntários saudáveis.

Para a análise entre os três grupos (HPN, AA e normais), foram incluídos apenas os pacientes sem fatores de risco para TEV (no grupo HPN, 17 indivíduos, e no grupo AA, 15 pacientes).

Posteriormente, após a realização dos testes laboratoriais, foram excluídos, pelo diagnóstico laboratorial de trombofilia, sem diagnóstico de TEV, três pacientes do grupo HPN (com deficiência de Proteína S, laboratorial, em uma única dosagem, com tempo de protrombina e teste de Owren normais, sem diagnóstico de TEV), três do grupo AA (uma mutação do FVLeiden, uma mutação da protrombina, um anticorpo antifosfolípide triplo positivo) e seis do grupo de normais (dois indivíduos com mutação do FVLeiden e um com mutação do gene da protrombina e três indivíduos com deficiência de Proteína S, laboratorial, em uma única dosagem, com tempo de protrombina e teste de Owren normais). Não houve diferença na distribuição de trombofilia entre os grupos ($p = 0,991$).

A população analisada está representada na Tabela 1. A distribuição foi homogênea para sexo, etnia, idade e índice de massa corporal (IMC). O grupo AA apresentou plaquetometria inferior aos outros dois grupos ($p <$

0,001). O grupo HPN apresentou menor valor de hemoglobina, e hemólise laboratorial evidente. Apenas neste último havia pacientes que estavam em regime de anticoagulação crônica, para profilaxia primária de TEV.

Para a análise realizada apenas no subgrupo de pacientes, foram incluídos os indivíduos de acordo com os critérios de exclusão B e aqueles que apresentaram diagnóstico laboratorial de trombofilia[§].

[§] Os motivos para a exclusão de nove pacientes HPN e 13 pacientes AA da análise entre os três grupos de pacientes, sem fatores de risco para trombose foram:

A) HPN: 1- trombose de veia jugular associada a cateter durante internação há mais de um ano e uso atual de acetato de medroxiprogesterona; 2 - trombose de veia retiniana há mais de um ano; 3 - uso de antibiótico por infecção de trato urinário, assintomática, associada a uso de norgestrel e etinilestradiol; 4 - deficiência de proteína S, laboratorial, em uma única dosagem, com tempo de protrombina e teste de Owren normais, sem diagnóstico de TEV; 5 - uso de anticoncepcional intramuscular há três meses; 6 - uso de antibiótico para possível BCP, assintomática; 7- uso de acetato de medroxiprogesterona; 8 e 9 - deficiência de proteína S, laboratorial, em uma única dosagem, com tempo de protrombina e teste de Owren normais, sem diagnóstico de TEV.

B) AA: 1- anticorpo antifosfolípide triplo positivo; 2 - mutação do gene da protrombina; 3 - mutação do FVLeiden; 4 - uso de esteroide sintético; 5 - uso de acetato de noretisterona e diagnóstico prévio de trombose (há dois anos da coleta), por cirurgia ortopédica; 6 - DMID e uso de esteroide sintético; 7 - uso de esteroide sintético; 8 - DMID; 9 - esteroide sintético; 10- uso de contraceptivo, não identificado; 11 - /uso de esteroide sintético; 12 - uso de desogestrel; 13 - uso de gestodeno+etinilestradiol.

Tabela 1 - Características sócio demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes e voluntários saudáveis. Ambulatório de Hematologia do HC-FMUSP, 2010 a 2013

VARIÁVEIS	HPN (n=14)	AA (n=12)	normais (n=33)	p
Sexo feminino				
Etnia		n° (%)		
	7 (50,0)	4 (33,3)	14 (42,4)	0,692
Branco	7 (50,0)	6 (50,0)	18 (54,6)	0,300
Afrodescendente	7 (50,0)	4 (33,3)	10 (30,3)	
Amarelo ou índio	0 (0,0)	2 (16,7)	5 (15,1)	
Anticoagulação	9 (39,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	< 0,001 ^a
Idade (anos)		mediana (min-máx)		
	38,5 (20-68)	44,5 (22-64)	32 (18-60)	0,396
Plaquetas x10⁹/L	110 (34-335)	41 (5-275)	221 (144-350)	< 0,001 ^b
IMC	26,6 (20,6-31,1)	29,2 (24,4-36,4)	26,3 (19,6-34,7)	0,075
Concentração de hemoglobina (g/dL)	10,2 (7,6-14,6)	12,2 (6,7-16,5)	14,5 (12,2-17,3)	< 0,001 ^c
Neutrófilos (mil/mm³)	2265 (600-4130)	1250 (430-4630)	3000 (1400-7400)	< 0,001 ^d
DHL (U/L)	2412 (719-5884)	427 (246-505)		< 0,001

NP: não foi possível calcular

^a apenas o HPN apresentou anticoagulação

^b HPN x normais ($p < 0,001$), AA x normais ($p < 0,001$)

^c HPN x AA ($p = 0,032$), HPN x normais ($p < 0,001$), AA x normais ($p < 0,001$)

^d HPN x normais ($p = 0,007$), AA x normais ($p < 0,001$)

A avaliação dos parâmetros hemostáticos evidenciou níveis elevados de FVIII:C e de atividade de fator Von Willebrand no grupo de pacientes. O grupo AA apresentou TTPA inferior ao grupo de normais. Não houve diferença nos níveis do Dímero-D, na atividade dos anticoagulantes naturais e na atividade de protrombina. O grupo de normais apresentou valor inferior de fator V, entretanto os resultados apresentaram variação dentro do intervalo de normalidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Testes laboratoriais empregados na avaliação de pacientes com HPN, AA e normais

VARIÁVEIS	HPN (n=14)	AA (n=12) mediana (mín-máx)	Normais (n=33)	p
Tempo de tromboplastina parcial ativada (R)	0,91 (0,85-1,13)	0,90 (0,77-1,21)	1,00 (0,79-1,33)	0,014^c
Atividade de protrombina (%)	101 (75-117)	107 (91-156)	100 (70-133)	0,155
FVIII:C (U)*	161,5 (106-338)	183 (83-330)	100 (49-230)	<0,001^a
FvW:RCo (U)*	163 (60-248)	221 (143-372)	106 (51-290)	<0,001^b
Antitrombina (U)	115,5 (89-149)	123,5 (88-151)	113,0 (95-145)	0,275
Dímero	188,5 (69-597)	124,0 (60-624)	123,0 (31-4779)	0,127
Fator V (U)	119,5 (73-164)	136,0 (90-194)	99,0 (63-184)	0,001^d
Proteína C (U)	101,0 (69-141)	117,5 (92-177)	105,0 (75-169)	0,064
Proteína S (U)	86,0 (64-131)	109,5 (70-141)	93,0 (69-150)	0,120

FVIII:C atividade
coagulante do fator
VIII

* ignorados: 2 em HPN e 2
em normais

FvW:RCo: atividade do fator von Willebrand

^a HPN x normais (p<0,001), AA x normais (p<0,001)
^b HPN x AA (p=0,029), HPN x normais (p=0,049), AA x normais (p<0,001)
^c AA x normais (p=0,006)
^d HPN x normais (p=0,013), AA x normais (p<0,001)
^e AA x normais (p=0,010)

Os Gráficos 1, 2 e 3 exemplificam, respectivamente, os padrões característicos da eficiência da ação da trombomodulina na redução do potencial de trombina endógeno (RETP) em controles, em pacientes com diagnóstico de aplasia medular idiopática ou associada a clone HPN < 10%, e em pacientes com clone HPN $\geq$ 10%.

Gráfico 1 - Redução de 57% no ETP após a adição de TM em controle saudável

TM= trombomodulina

Gráfico 2 - Redução de 72% no ETP após a adição de TM em paciente com aplasia

TM = trombomodulina; TL = tempo de latência; TP = tempo para o pico

Gráfico 3 - Redução de 12% no ETP após a adição de TM em paciente com clone HPN

TM= trombomodulina

Pode-se observar que o paciente do Gráfico 2 apresentou maior tempo para o início da geração de trombina (tempo de latência) e maior tempo para a concentração máxima de trombina (tempo para o pico).

A adição de trombomodulina ao plasma dos pacientes com clone HPN não foi eficaz na redução dos valores de ETP e do pico para C_{MAX} de trombina quando comparado os resultados obtidos àqueles encontrados nos pacientes com AA e normais (Gráficos 4 e 5).

Gráfico 4 - Boxplot da relação ETP (RETP) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN. O ponto representa um valor aberrante (outlier)

Gráfico 5 - Boxplot do efeito da trombomodulina no pico para C_{MAX} de trombina (razão pico para $C_{MAX T}$) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

Os pacientes com clone HPN apresentaram maior de concentração máxima de trombina na presença de trombomodulina em relação ao grupo de normais (Gráfico 6). Não houve diferença nos valores sem TM.

Gráfico 6 - Boxplot dos valores de C_{MAX} de trombina com adição de trombomodulina (TM) em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

Os pontos representam valores aberrantes (*outliers*)

Os pacientes com HPN atingiram a concentração máxima de trombina em tempo inferior ao observado em pacientes com AA, quando o teste foi realizado na presença e na ausência de TM (Gráficos 7 e 8). Os indivíduos com AA apresentaram maior tempo para atingir a C_{MAX} de trombina em relação aos normais, quando o teste foi realizado na presença de TM (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Boxplot dos valores de tempo para a C_{MAX} de trombina com TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

Os pontos representam valores aberrantes (*outliers*)

Gráfico 8 - Boxplot dos valores de tempo para a C_{MAX} de trombina sem TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

O ponto representa valor aberrante (*outlier*)

Os pacientes com AA apresentaram maior tempo de latência para o início da geração de trombina em relação aos indivíduos normais (com e sem TM), o que não foi observado nos pacientes com HPN (Gráficos 9 e 10)

Gráfico 9 - Boxplot dos valores de tempo de latência para a o início da geração de trombina com TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

O ponto representa valor aberrante (*outlier*)

Gráfico 10 -Boxplot dos valores de tempo de latência para a o início da geração de trombina sem TM em pacientes e controles, segundo valores de clone HPN

Os pontos representam valores aberrantes (*outliers*)

4.2 Relação entre os parâmetros de geração de trombina e terapia anticoagulante # em pacientes do grupo HPN

O uso de terapia anticoagulante não reduziu os valores de ETP, de RETP, do pico para a concentração máxima de trombina, do tempo para atingir a concentração máxima de trombina e do tempo de latência para o início da geração de trombina ($p > 0,05$, Tabela 3). Não houve diferença no número de plaquetas entre os grupos com e sem anticoagulação ($p = 0,156$).

Tabela 3 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX\ T}$), de tempo para a $C_{MAX\ T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX\ T}$ em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$, segundo terapia anticoagulante[#]

VARIÁVEIS	SEM ANTICOAGULAÇÃO (n=9)		COM ANTICOAGULAÇÃO (n=5)		p
	média (dp)	mediana (mín-máx)	média (dp)	mediana (mín-máx)	
clone HPN (%)	64,4 (28,0)	64,0 (22-98)	77,0 (16,9)	80,0 (51-98)	0,383
ETP	1377,9 (204,8)	1391,7 (1102,0-1672,0)	1407,7 (285,1)	1307,3 (1123,3-1770,5)	0,824
ETP + TM	1020,1 (265,0)	1044,0 (603,7-1557,0)	807,2 (245,4)	813,7 (424,5-1032,5)	0,166
RETP	0,74 (0,13)	0,74 (0,55-0,93)	0,58 (0,15)	0,61 (0,32-0,72)	0,056
C _{MAX T}	301,0 (43,0)	295,5 (231,1-370,7)	269,1 (55,2)	254,3 (196,2-343,2)	0,252
C _{MAX T} + TM	261,9 (68,2)	256,5 (157,5-383,2)	199,5 (64,1)	231,3 (90,4-242,0)	0,162
razão C _{MAX T}	0,86 (0,12)	0,87 (0,68-1,03)	0,73 (0,17)	0,76 (0,46-0,91)	0,115
tempo para C _{MAX T}	6,0 (0,5)	5,8 (5,3-6,8)	6,4 (0,5)	6,3 (6,0-7,3)	0,127
tempo para C _{MAX T} + TM	6,6 (0,6)	6,5 (5,7-7,3)	7,1 (0,7)	6,8 (6,5-8,3)	0,155
tempo de latência	3,5 (0,4)	3,7 (3,00-4,17)	3,8 (0,5)	3,7 (3,2-4,4)	0,316
tempo de latência +TM	4,4 (0,5)	4,5 (3,67-5,00)	4,8 (0,9)	4,5 (3,8-6,0)	0,312

TM: trombomodulina

RETP = ETP + TM / ETP

[#] todos os indivíduos em anticoagulação foram submetidos a procedimento de "ponte" com heparina de baixo peso molecular (descrita em material e métodos) para que não houvesse interferência do efeito da medicação no teste no momento da coleta.

4.3 Avaliação da interferência da trombocitopenia na geração de trombina em pacientes do grupo HPN

A presença de trombocitopenia nos pacientes com clone HPN $\geq 10\%$ não reduziu os valores de ETP, de RETP, do pico para a concentração máxima de trombina, do tempo para atingir a concentração máxima de trombina e do tempo de latência para o início da geração de trombina ($p > 0,05$, Tabela 4). Os grupos foram homogêneos em relação à proporção do clone HPN.

Tabela 4 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX T}$), de tempo para a $C_{MAX T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX T}$, segundo trombocitopenia, em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$

VARIÁVEIS	PLAQUETAS						p
	≥100.000/mm ³ (n=9)			<100.000/mm ³ (n=5)			
	média (dp)	mediana (mín-máx)	média (dp)	mediana (mín-máx)	média (dp)	mediana (mín-máx)	
clone HPN (%)	77,2 (17,4)	80 (50-98)	54,0 (30,7)	51 (22-98)			0,092
ETP	1368,7 (217,4)	1307,3 (1102,0-1770,5)	1424,1 (262,5)	1507,0 (1123,3-1672,0)			0,678
ETP + TM	890,7 (253,0)	1009,5 (424,5-1223,0)	1040,1 (301,7)	899,7 (813,7-1557,0)			0,341
RETP	0,65 (0,16)	0,63 (0,32-0,88)	0,73 (0,13)	0,72 (0,60-0,93)			0,381
C _{MAX T}	286,0 (51,5)	295,5 (196,2-353,4)	296,1 (46,7)	291,6 (253,1-370,7)			0,723
C _{MAX T} + TM	229,8 (73,7)	242,0 (90,4-340,5)	257,3 (71,2)	231,3 (207,8-383,2)			0,842
razão C _{MAX T}	0,79 (0,16)	0,81 (0,46-0,96)	0,86 (0,13)	0,87 (0,68-1,03)			0,364
tempo para C _{MAX T}	6,1 (0,6)	6,0 (5,6-7,3)	6,2 (0,6)	6,3 (5,3-6,8)			0,829
tempo para C _{MAX T} + TM	6,7 (0,7)	6,7 (5,9-8,3)	6,8 (0,7)	7,3 (5,7-7,3)			0,817
tempo de latência	3,6 (0,4)	3,5 (3,0-4,4)	3,8 (0,5)	3,8 (3,0-4,2)			0,434
tempo de latência +TM	4,5 (0,7)	4,3 (3,7-6,0)	4,6 (0,6)	4,7 (3,7-5,3)			0,793

TM: trombomodulina

RETP = ETP + TM / ETP

4.4 Análise de correlação de variáveis laboratoriais e RETP no grupo HPN

Pode-se observar correlação positiva entre RETP e atividade de fator von Willebrand (Gráfico 11) e correlação negativa entre RETP e PC (Gráfico 12), ambas moderadas e com significância estatística.

Gráfico 11 -Dispersão entre atividade de fator von Willebrand e RETP em pacientes HPN

ρ = correlação de Spearman; RETP = ETP+TM/ETP; FvW:RCo = atividade do fator von Willebrand

Gráfico 12 - Dispersão entre Proteína C e RETP

ρ de Pearson=correlação de Pearson; RETP = ETP+TM/ETP; PC: atividade de proteína C

Entretanto, não houve correlação entre RETP e FVIII (correlação de Pearson $r = 0,543$, $p = 0,068$), apesar de constataremos forte correlação positiva entre FvW:RCO e FVIII:C (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Dispersão entre atividade coagulante do FVIII e atividade do fator von Willebrand

ρ de Pearson=correlação de Pearson; FVIII:C=atividade coagulante do FVIII; FvW:RCO = atividade do fator von Willebrand

Não foi observada correlação entre RETP e PS livre ($p = 0,447$), DDímero ($p = 0,737$), número de plaquetas ($p = 0,455$), concentração de hemoglobina ($p = 0,610$), DHL ($p = 0,308$), antitrombina ($p = 0,794$) e número de neutrófilos ($p = 0,613$).

Não houve correlação entre RETP e proporção do clone HPN ao avaliarmos os pacientes da Tabela 1, aonde foram excluídos todos os indivíduos com fatores de risco para TEV (critérios de exclusão A) (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Análise de correlação entre relação de ETP e proporção do clone HPN (população sem fatores de risco para TEV)

ρ = correlação de Spearman; RETP = ETP+TM/ETP

4.5 Análise no subgrupo de pacientes com fatores de risco para TEV

Devido ao pequeno número de pacientes incluídos na primeira análise, optou-se por avaliar a existência da correlação entre RETP e proporção do clone HPN no grupo total de pacientes ($n = 48$), incluindo os pacientes com HPN e AA com presença de fatores de risco para trombose (critérios de exclusão B). Foi observada uma correlação positiva entre RETP e proporção do clone HPN, moderada e com significância estatística (Gráfico 15).

Gráfico 15 -Dispersão entre clone HPN (%) e RETP em pacientes com HPN ou com AA (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)

ρ = correlação de Spearman; RETP = ETP+TM/ETP

Ao se considerar, dentre estes pacientes, aqueles com menos de 100.000 plaquetas/mm³ (n = 25), também foi observada correlação positiva entre RETP e proporção do clone HPN, moderada e com significância estatística (Gráfico 16).

Gráfico 16 -Dispersão entre clone HPN (%) e RETP em pacientes trombocitopênicos, com HPN e AA (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)

ρ = correlação de Spearman; RETP = ETP+TM/ETP

Ao avaliar toda a população com clone HPN $\geq$ 10%, incluindo os indivíduos com fatores de risco para TEV, e comparar os parâmetros de geração de trombina no grupo com e sem trombocitopenia, o tempo de latência para o início da geração de trombina apresentou correlação negativa com o número de plaquetas, moderada, com significância estatística (Gráfico 17). Não houve diferença nos outros parâmetros (Tabela 5).

Gráfico 17 -Dispersão entre número de plaquetas e tempo de latência em pacientes trombocitopênicos, com clone HPN $\geq 10\%$ (toda a população, inclusive os pacientes com fatores de risco para TEV)

ρ = correlação de Spearman

Tabela 5 - Mediana de ETP, de concentração máxima de trombina ($C_{MAX\ T}$), de tempo para a $C_{MAX\ T}$ e de tempo de latência com e sem TM, além de relação de ETP (RETP) e razão para a $C_{MAX\ T}$, segundo trombocitopenia, em pacientes com clone HPN $\geq 10\%$, inclusive os indivíduos com fatores de risco para TEV

VARIÁVEIS	PLAQUETAS				p
	≥100.000/mm ³ (n=13)		<100.000/mm ³ (n=10)		
	média (dp)	mediana (mín-máx)	média (dp)	mediana (mín-máx)	
clone HPN (%)	75,5 (21,6)	80 (32-98)	60,1 (31,3)	60 (22-98)	0,177
ETP	1343,6 (223,0)	1307,3 (995,0-1770,5)	1408,6 (270,6)	1456,5 (995,5-1669,7)	0,534
ETP + TM	911,6 (245,6)	1009,5 (424,5-1249,0)	983,1 (240,3)	956,8 (709,0-1557,0)	0,493
RETP	0,68 (0,14)	0,68 (0,32-0,88)	0,71 (0,17)	0,69 (0,42-1,02)	0,603
C _{MAX T}	290,4 (48,8)	295,5 (196,2-353,4)	299,6 (35,3)	295,9 (253,1-370,7)	0,621
C _{MAX T} + TM	236,8 (67,2)	242,0 (90,4-340,5)	252,0 (61,5)	233,7 (159,2-383,2)	0,584
razão C _{MAX T}	0,80 (0,13)	0,81 (0,46-0,96)	0,84 (0,15)	0,88 (0,53-1,03)	0,528
tempo para C _{MAX T}	5,9 (0,6)	5,8 (4,8-7,3)	6,3 (0,6)	6,3 (5,3-7,5)	0,145
tempo para C _{MAX T} + TM	6,4 (0,8)	6,3 (5,1-8,3)	7,0 (1,0)	7,3 (5,7-9,1)	0,120
tempo de latência	3,4 (0,5)	3,5 (2,5-4,4)	3,8 (0,5)	3,7 (3,0-5,0)	0,048
tempo de latência +TM	4,3 (0,7)	4,3 (3,0-6,0)	4,8 (1,0)	4,7 (3,3-7,1)	0,188

TM: trombomodulina

RETP = ETP + TM / ETP

5 DISCUSSÃO

O teste de geração de trombina é uma ferramenta útil, que vem sendo utilizada para a caracterização do desequilíbrio hemostático associado a inúmeras patologias. Neste estudo, a nossa suposição foi a de que a avaliação global da hemostasia realizada por meio deste ensaio pudesse identificar a instabilidade do sistema hemostático associado ao clone HPN. Até o momento este desequilíbrio foi demonstrado por estudos retrospectivos e prospectivos, de evolução clínica e história natural da doença^{3,13,15,17,18,20,21,28,30,112,113}, e através de marcadores de ativação da coagulação, como o F1+2, TAT e D-Dímero^{49,54}. Entretanto, com a utilização de um teste que incorpora em sua análise alguns fatores procoagulantes e anticoagulantes, o estado de hipercoagulabilidade inerente à HPN pode ser evidenciado de uma maneira mais próxima daquela que ocorre *in vivo*. Até o presente momento, a análise da geração de trombina pelo método CAT foi descrita em três pacientes que utilizaram terapia inibidora do complemento, durante curso estável da doença. Os resultados foram inconclusivos, e o teste não discriminou os pacientes de indivíduos normais. Infelizmente os dados referentes à metodologia não foram explicitados¹¹⁴.

Os trabalhos iniciais utilizando o método CAT demonstraram grande variabilidade nos valores normais. Os estudos diferiram quanto à concentração de fosfolípidos, de fator tecidual e quanto à adição de ativadores da via da proteína C e de inibidores da via de contato^{94,109}. Não

havia uma padronização do teste, tampouco de suas variáveis pré-analíticas, como o manejo das amostras e preparo do PPP. Isto poderia levar a variações interlaboratoriais, dificultando a comparação dos resultados obtidos nos estudos^{79,107,115}. Um grupo de trabalho da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH) vem realizando esforço conjunto para a padronização do teste^{79,80}. Demonstrou-se, por meio de estudo multicêntrico, que um protocolo padronizado da metodologia reduz de maneira eficaz a variabilidade dos resultados em limites aceitáveis, incrementando a possibilidade de sua utilização em estudos clínicos⁸⁰.

No presente estudo optou-se por incorporar alguns procedimentos para tornar os resultados reprodutíveis e comparáveis, como a utilização de trombomodulina para a detecção do fenótipo protrombótico, além do uso de baixa concentração de fator tecidual e de concentração fisiológica de fosfolípides. A análise foi realizada em PPP, e a fonte de fosfolípides, de fator tecidual e do substrato fluorogênico foi padronizada^{67,69,72-74}. Como medidas adicionais, o tempo total de leitura dos resultados foi homogêneo, a avaliação dos resultados foi feita de maneira 'cega', a concentração do calibrador de trombina foi constante, e a análise foi realizada com utilização parcial da placa de microtitulação⁷⁹. A variabilidade dos valores de ETP obtidos em nossos controles normais é similar ao publicado por Hemker e Luddington *et al.*^{69,76}. Os resultados encontrados em nossos controles são similares àqueles observados em experimento realizado nas mesmas condições e reagentes¹⁰⁸.

Em nosso estudo, a ineficiência da ação da trombomodulina em reduzir a geração de trombina, avaliada através do ETP e da concentração

máxima de trombina, são consistentes com o risco de TEV observado na HPN. Estes parâmetros são aqueles de maior relevância clínica para avaliação do estado de hipercoagulabilidade^{91,107,116,117}. Pudemos demonstrar também que este risco apresenta correlação positiva com o FvW:RCo, correlação negativa com a PC, não foi associado ao FVIII:C, pode sofrer pouca influência da trombocitopenia, e é proporcional ao tamanho do clone (à partir de 10%). Até então o melhor valor preditivo do clone HPN para o desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos não foi estabelecido^{18,20,28}.

A correlação positiva do risco trombótico com a atividade do fator von Willebrand pode estar associada à ativação endotelial, e a correlação negativa dos níveis plasmáticos de proteína C consequente ao estado inflamatório, ambos característicos da HPN. A redução dos marcadores de ativação endotelial FvW, t-PA e sVCAM-1⁵⁴ e de IL-6 (uma importante citocina inflamatória), associada à redução do Dímero-D após tratamento com eculizumab^{49,54} justificam nossa hipótese. Na HPN a atividade da PC pode estar diminuída. Em estados inflamatórios agudos, os leucócitos ativados liberam interleucina 1-beta e fator de necrose tumoral alfa, inibindo a expressão endotelial da trombomodulina e do receptor da proteína C, gerando redução na ativação deste anticoagulante natural¹¹⁸. Este mecanismo de trombofilia na HPN já havia sido sugerido³.

A avaliação global do sistema hemostático de um paciente com grande proporção de clone HPN (superior a 50%), que vinha em uso de estatina, diferiu do padrão observado. Estudos recentes demonstraram que os inibidores de HMG-CoA redutase inibem a expressão de RNA mensageiro de IL-6, e

aumentam a expressão de RNA de trombomodulina em células endoteliais humanas, o que resulta em aumento expressivo da ativação da proteína C¹¹⁹. O efeito das estatinas na atividade da trombomodulina foi mimetizado por doadores de óxido nítrico (NO), e bloqueado por seus sequestradores. Os autores sugeriram que a sua disponibilidade exerce efeito importante na regulação da TM, direta ou indiretamente¹¹⁹.

Na HPN a depleção do NO desempenha papel fundamental em sua fisiopatologia⁵⁵. A natureza crônica da hemólise é tanta que, mesmo entre os paroxismos ou em indivíduos assintomáticos, ocorre liberação de hemoglobina livre suficiente para saturar os sistemas bioquímicos responsáveis pela sua remoção. A depleção de óxido nítrico resultante pode ser mais intensa pela redução de seu substrato, secundária ao consumo pela arginase eritrocitária^{3,55}.

A análise destes estudos associada aos nossos resultados sugere que a diminuição da ativação da via da proteína C pode representar um mecanismo fisiopatológico importante na trombofilia característica da HPN.

Entretanto em nosso estudo a ação da TM foi avaliada em amostra de plasma, e a TM é uma proteína de membrana celular endotelial. Desta maneira, é possível que o complexo trombina + TM exógena não seja capaz de ativar a PC na amostra de plasma teste, ou que o sistema PC ativada/PS não consiga inativar o FVIIIa e o FVa. Entretanto, em nossa análise não foi encontrada correlação do risco trombótico com os níveis de FVIII:C, apesar de sua forte correlação positiva (FVIII:C) com a atividade do fator von Willebrand. Também foram descartados, nesta fase da análise, todos os casos de trombofilia, inclusive os indivíduos com mutação do FV Leiden.

In vivo, a PC é ativada pelo complexo TM+trombina e o receptor endotelial da proteína C (EPCR). A sua associação (EPCR) com a TM é evidenciada pela redução concomitante de suas atividades após estímulo pelo TNF alfa (*in vitro*). Ele pode aumentar a ativação da PC, porém apenas quando os dois receptores (EPCR+TM) estão próximos, na superfície da célula endotelial^{118,120}. Em indivíduos saudáveis a PC ativada é encontrada no plasma¹²¹. Teoricamente, o mecanismo de ativação da PC está intacto no grupo de pacientes com aplasia de medula óssea e normais, e com comprometimento significativo, provável, na HPN, induzido por citocinas inflamatórias, e pelo sequestro de oxido nítrico. A redução nos níveis de PC ativada no plasma dos pacientes com HPN poderia justificar a ineficiência da atividade de TM exógena adicionada à amostra teste.

Estudos em modelos animais de leitos vasculares, específicos para a ocorrência de eventos tromboembólicos, exploraram os efeitos de deficiência parcial de TFPI, combinada a deficiência funcional de TM. Foi observada deposição de fibrina nos leitos vasculares hepático e cerebral, justificando o acometimento preferencial, ainda não elucidado, de trombose em território esplâncnico e em SNC na HPN, o que demonstra, através de modelo *in vivo*, que o comprometimento da atividade da trombomodulina associado à deficiência de proteínas ancoradas pela GPI podem desempenhar papel fundamental no mecanismo de trombofilia na HPN.

Os pacientes que estavam em anticoagulação oral antes da análise não apresentaram redução significativa no risco trombótico ($p = 0,056$), observação clínica descrita na HPN^{3,28}. Isto poderia se justificar pela ação dos antagonistas de vitamina K apenas em fatores plasmáticos.

Os parâmetros do teste de geração de trombina relacionados ao tempo podem ser úteis para a avaliação do fenótipo hemorrágico associado a coagulopatias hemorrágicas raras⁸⁵ e para a identificação do potencial hemostático de micropartículas derivadas de plaquetas (PMP) em plasma refrigerado, utilizado para o tratamento da coagulopatia do trauma¹¹¹.

Nossos resultados demonstraram que a presença do clone HPN esteve associada a maior rapidez para atingir a concentração máxima de trombina, que foi independente dos valores do tempo de protrombina. A demonstração de que a presença de PMP reduz este parâmetro, quando comparada a amostra com depleção de micropartículas, em estudo que utilizou metodologia similar à nossa¹¹¹ sugere que os nossos resultados podem ter sido secundários à maior atividade catalítica das PMP na HPN, quando foram comparados aos resultados encontrados nos pacientes aplásicos, como evidenciado por Hugel *et al.*⁴⁵.

A presença do clone HPN não interferiu no tempo de latência na comparação entre o grupo de normais e com aplasia medular (possivelmente pela ausência de fator tecidual em PMP). Este último grupo apresentou os maiores tempos. Entretanto, a análise em toda a população com clone HPN $\geq 10\%$ evidenciou correlação negativa do tempo de latência com o número de plaquetas, apesar do experimento ter sido realizado em amostra de plasma pobre em plaquetas, o que pode sugerir que este parâmetro, associado ao tempo para o pico, podem ser ferramentas úteis para a identificação do risco hemorrágico eventualmente relacionado à trombocitopenia na HPN.

Não foi encontrada correlação entre RETP e DHL, possivelmente porque a trombofilia induzida pela hemólise intravascular pode ser um fenômeno tardio. A falta de associação de RETP com o D-Dímero pode ser secundária aos diferentes aspectos do sistema hemostático avaliados pela geração de trombina e o DDímero. O último pode ser um marcador da ativação da coagulação que ocorre in vivo, e o primeiro reflete o resultado global final do potencial individual de coagulação¹²².

Neste estudo apresentou várias limitações, como o pequeno número de pacientes, grande número de indivíduos excluídos da análise por apresentarem presença de fatores de risco para tromboembolismo venoso, e a falta de avaliação do papel das PMP e da proteína C ativada em nossa população.

A geração de trombina, avaliada pelo CAT, através da análise da relação ETP+TM/ETP é eficaz na detecção do fenótipo protrombótico associado ao clone HPN. A ineficiência da via da PC pode ser mais um mecanismo da trombofilia desta patologia, e a atividade plasmática do fator von Willebrand pode ser uma ferramenta útil para a avaliação deste risco. Como a trombocitopenia é uma preocupação constante no manejo destes pacientes, os parâmetros relacionados ao tempo no teste de geração de trombina podem auxiliar na avaliação do risco hemorrágico eventualmente relacionado à trombocitopenia na HPN.

6 CONCLUSÕES

a) A geração de trombina é capaz de detectar o fenótipo protrombótico associado ao clone HPN.

a1) A ineficiência da ação da trombomodulina pode ser um mecanismo fisiopatológico importante para a trombofilia observada nestes pacientes.

a2) A atividade do fator von Willebrand pode ser um marcador laboratorial para a avaliação deste estado de hipercoagulabilidade.

b) Os parâmetros que avaliam o 'tempo' no trombograma podem auxiliar na identificação do risco hemorrágico eventualmente associado à HPN.

7 ANEXOS

Anexo A - Questionário

Questionário

☐ Paciente n° ____

☐ Controle n° ____

Idade

☐ > 40a

Sexo

☐ Homem

☐ Mulher

Peso ____

Altura ____

IMC ____

☐ Grande cirurgia nos últimos 3 meses (ortopédica, trauma em MMII, gastrointestinal, urológica, torácica, ginecológica)

☐ Hospitalização até 1 mês atrás

☐ Uso de TRH/ACO

☐ Gravidez/puerpério

☐ Imobilização > 3d recente

☐ Câncer ativo

☐ Viagem prolongada > 4 hrs nas últimas 8 semanas

☐ Infecção aguda

☐ AVC recente

☐ ICC classe funcional III ou IV

☐ Doença reumática aguda

☐ Doença respiratória aguda

☐ História prévia de TEV

☐ Síndrome pós-trombótica

☐ Trombofilia hereditária

☐ História familiar de TEV

☐ História pessoal de trombose arterial

☐ História familiar de trombose arterial

☐ Varizes

☐ Tabagismo

☐ Uso de anticoagulante

☐ Uso de antiinflamatório/antiagregante plaquetário

☐ ?Afro-americano

☐ ?Asiático/Ilhas do Pacífico/Hispanicos

Uso de alguma outra medicação

Alguma outra patologia?

Anexo B - Aprovação CAPPesq **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1143/09**, intitulado: "**GERAÇÃO DE TROMBINA EM UMA POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM CLONE HPN (HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA)**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr Elbio Antonio D'Amico**

Pesquisador (a) Executante: **Audrey Krüse Zeinad Valim**

CAPPesq, 05 de Novembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(instruções para preenchimento anexas)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise da Geração de Trombina em uma população de indivíduos com clone HPN (Hemoglobinúria Paroxística Noturna)**

PESQUISADOR : Audrey Krüse Zeinad Valim

CARGO/FUNÇÃO: Médica assistente do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 100658

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Hematologia do HCFMUSP – Grupo de Hemostasia

PESQUISADOR : Elbio Antonio D'Amico

CARGO/FUNÇÃO: Chefe do Grupo de Hemostasia do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 28360

UNIDADE DO HC-FMUSP: Serviço de Hematologia do HCFMUSP – Grupo de Hemostasia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HC-FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : O período de coleta será de um dia, com necessidade de novas coletas se houver algum problema na amostra de sangue coletada ou se for necessária a reavaliação do caso.

III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

- 1 Justificativa e objetivos da pesquisa :** Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O objetivo deste é avaliar o risco de desenvolvimento de trombose (entupimento dos vasos – veias ou artérias) nos indivíduos com clone HPN (Hemoglobinúria Paroxística Noturna) com ou sem aplasia de medula óssea, e se este risco depende da quantidade de células do clone HPN ou da quantidade de plaquetas em seu sangue (responsáveis pela primeira parte da coagulação). Este risco irá ser comparado com indivíduos com aplasia de medula óssea sem clone HPN.

A Hemoglobinúria Paroxística Noturna é uma doença rara da célula tronco, responsável pela produção do sangue normal. Esta doença pode cursar com 1) Trombose (entupimento dos vasos); 2) Anemia por destruição dos glóbulos vermelhos; 3) Urina escurecida secundária a eliminação da hemoglobina (por destruição dos glóbulos vermelhos), 4) redução dos glóbulos brancos (responsáveis pela defesa), e das plaquetas (responsáveis pela primeira parte da coagulação) ou 5) pode cursar sem nenhuma manifestação clínica, e ser detectada apenas após a realização de exames de sangue.

- 2. Procedimento que será realizado e o propósito:** você será contatado(a) através de uma ligação telefônica ou durante um dia de consulta no ambulatório. Neste contato perguntaremos o dia de sua próxima consulta no Hospital das Clínicas da FMUSP e se você concordar, um membro da pesquisa, que explicará o estudo, irá encontrá-lo(a) no dia de sua consulta, e você irá ler este Termo de Consentimento. Se você aceitar fazer parte do estudo, você será encaminhado ao centro de coleta do exame de sangue e você então será submetido(a) a uma coleta de sangue como é feito rotineiramente em suas visitas agendadas ao hospital. Como você já sabe, a sua veia será visualizada pelo(a) profissional que irá coletar seu sangue, um algodão com álcool ou outro agente para a limpeza será passado em sua pele para limpeza do local da punção venosa, e então uma agulha será inserida em sua veia e uma amostra de sangue será extraída para a análise. Solicitaremos também a coleta de um exame de urina.. Se você nunca tiver apresentado trombose, mas já estiver em uso de anticoagulantes orais, iremos sugerir a troca desta medicação por uma medicação injetável (clexane, fragmin ou liquemine) por aproximadamente 7 dias para retirar o efeito do anticoagulante oral, como você já deve ter usado previamente a este estudo, e após a coleta o anticoagulante oral será reintroduzido e posteriormente agendaremos uma consulta para checar se a dose do anticoagulante oral está adequada.

O objetivo da realização destes exames é a comparação do risco de desenvolvimento de trombose nos pacientes com clone HPN com ou sem aplasia de medula óssea quando comparado ao risco nos pacientes com aplasia de medula óssea sem clone HPN.

3. **Desconfortos e riscos esperados:** Após a coleta do exame de sangue você poderá evoluir com uma mancha rocha no local da punção (equimose/hematoma), que geralmente melhora espontaneamente. Você também poderá apresentar um pouco de dor no local da punção da veia, como acontece rotineiramente nas coletas de exame de sangue.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** Somente no final deste estudo poderemos concluir quais são as características dos indivíduos com clone HPN que estão associadas com risco do desenvolvimento de trombose (cerca de 40% dos indivíduos com esta doença podem desenvolver trombose, porém ainda não sabemos quais são os fatores que aumentam ou diminuem este risco). Talvez com estes resultados poderemos avaliar quais pessoas que se beneficiariam da introdução de medidas preventivas antes da ocorrência da trombose, já que em alguns casos a trombose pode levar à morte.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. **Garantia de acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O(A) principal investigador(a) é a Dra Audrey Krüse Zeinad Valim que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios, 1º andar do PAMB, centro de Hemofilia, Telefone(s) 30615544, ramal 330. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069- 6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
2. **Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento** – É garantida a liberdade da retirada e consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
3. **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
4. **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados** parciais das pesquisas que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

5.Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. **6.Compromisso do pesquisador** de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

Confirmando que li a folha de informações ao paciente para o estudo acima, ou que a folha de informações foi lida para mim; o estudo foi explicado e tive a oportunidade de fazer perguntas. Eu discuti com a Dra. Audrey Krüse Zeinad Valim sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Indivíduo:

Nome completo (em letra de forma): _____

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente

ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

8 REFERÊNCIAS

1. Young NS, Moss J. *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidylinositol-linked proteins*. The United States of America: Academic Press; 2000.
2. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: relation of the clinical manifestations to underlying pathogenic mechanisms. *Blood*. 1953; 8(9):769-812.
3. Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2013; 121(25):4985-96.
4. Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*. 2007; 35(4):523-33.
5. Hall C, Richards SJ, Hillmen P. The glycosylphosphatidylinositol anchor and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria/aplasia model. *Acta Haematol*. 2002; 108(4):219-30.
6. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1990; 323(17):1184-9.

7. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014; 124(18):2804-11.
8. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78(4):211-30.
9. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease. *Ser Haematol*. 1972; 5(3):3-23.
10. Young NS, Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2008; 93(4):489-92.
11. Maluf E, Hamerschlak N, Cavalcanti AB, Junior AA, Eluf-Neto J, Falcao RP, et al. Incidence and risk factors of aplastic anemia in Latin American countries: the LATIN case-control study. *Haematologica*. 2009; 94(9):1220-6.
12. Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(11):1256-64.
13. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004; 83(3):193-207.

14. Hillmen P, Richards SJ. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2000; 108(3):470-9.
15. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; 106(12):3699-709.
16. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2007; 110(12):4123-8.
17. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1995; 333(19):1253-8.
18. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood.* 2008; 112(8):3099-106.
19. Araten DJ, Thaler HT, Luzzatto L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria. *Thromb Haemost.* 2005; 93(1):88-91.
20. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol.* 2004; 126(1):133-8.

21. Socie G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet*. 1996; 348(9027):573-7.
22. Gralnick HR, Vail M, McKeown LP, Merryman P, Wilson O, Chu I, et al. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 1995;91(3):697-702.
23. Ray JG, Burows RF, Ginsberg JS, Burrows EA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis: review and recommendations for management of the pregnant and nonpregnant patient. *Haemostasis*. 2000; 30(3):103-17.
24. Hill A, Sapsford RJ, Scally A, Kelly R, Richards SJ, Khurisgara G, et al. Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *Br J Haematol*. 2012; 158(3):409-14.
25. Fujioka S, Asai T. Prognostic features of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*. 1989; 52(8):1386-94.
26. Kruatrachue M, Wasi P, Na-Nakorn S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in Thailand with special reference to as association with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1978; 39(2):267-76.
27. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol*. 2007; 44(2):62-9.

28. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003; 102(10):3587-91.
29. Hoekstra J, Leebeek FW, Plessier A, Raffa S, Darwish Murad S, Heller J, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. *J Hepatol*. 2009; 51(4):696-706.
30. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. *J Thromb Haemost*. 2007; 5(3):642-5.
31. Crosby WH. Editorial: Wet purpura, dry purpura. *JAMA*. 1975; 232(7):744-5.
32. Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med*. 1992; 119(4):334-45.
33. Horstman LL, Jy W, Schultz DR, Mao WW, Ahn YS. Complement-mediated fragmentation and lysis of opsonized platelets: ender differences in sensitivity. *J Lab Clin Med*. 1994; 123(4):515-25.
34. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1993; 82(4):1192-6.

35. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(1):15-26.
36. Niccolai E, Emmi G, Squatrito D, Silvestri E, Emmi L, Amedei A, et al. Microparticles: Bridging the Gap between Autoimmunity and Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2015; 41(4):413-22.
37. Smeets EF, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RF. Calcium-induced transbilayer scrambling of fluorescent phospholipid analogs in platelets and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1195(2):281-6.
38. Williamson P, Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, Schlegel RA, Zwaal RF. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry.* 1995; 34(33):10448-55.
39. Comfurius P, Williamson P, Smeets EF, Schlegel RA, Bevers EM, Zwaal RF. Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry.* 1996;35(24):7631-4.
40. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(12):2594-604.
41. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001; 85(4):639-46.

42. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*. 2006; 46(1):143-52.
43. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005; 106(5):1604-11.
44. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007; 97(3):425-34.
45. Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*. 1999; 93(10):3451-6.
46. Mendel JL, Williams MJ, Clapp MP. Thrombin-generation studies on a case of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 1956; 2(2):194-6.
47. Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol*. 1953; 6(1): 9-14.
48. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355(12):1233-43.

-
49. Weitz IC, Razavi P, Rochanda L, Zwicker J, Furie B, Manly D, et al. Eculizumab therapy results in rapid and sustained decreases in markers of thrombin generation and inflammation in patients with PNH independent of its effects on hemolysis and microparticle formation. *Thromb Res.* 2012; 130(3):361-8.
 50. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2008; 111(4):1840-7.
 51. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2004; 350(6):552-9.
 52. Socie G MP, Schrezenmeier H, Höchsmann B, Maciejewski JP, Weitz IC, Hill A. *Terminal complement inhibitor Eculizumab improves complement-mediated platelet consumption and thrombocytopenia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).* 51st ASH Annual Meeting and Exposition; Monday, December 7; New Orleans, LA. *Blood* 2009; 114 [Abst 4030].
 53. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2004; 125(6):804-13.

-
54. Helley D, de Latour RP, Porcher R, Rodrigues CA, Galy-Fauroux I, Matheron J, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica*. 2010; 95(4):574-81.
 55. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13):1653-62.
 56. Maroney SA, Mast AE. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfus Apher Sci*. 2008; 38(1):9-14.
 57. Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, Schmid A, Kokschi M, Schopflin C, et al. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14(7):685-95.
 58. Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science (New York, NY)*. 1991; 253(5022):909-12.
 59. Rapaport SI. The extrinsic pathway inhibitor: a regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thromb Haemost*. 1991; 66(1):6-15.
 60. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001; 85(6):958-65.
 61. Maruyama I. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant; its structure, function and expression. *Jpn Circ J*. 1992; 56(2):187-91.

-
62. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem.* 1989; 264(9):4743-6.
 63. Lawson JH, Butenas S, Ribarik N, Mann KG. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J Biol Chem.* 1993; 268(2):767-70.
 64. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1995; 74(1):134-8.
 65. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost.* 1986; 56(1):9-17.
 66. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6(1):3-8.
 67. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol.* 2008; 142(6):889-903.
 68. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1993; 70(4):617-24.
 69. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33(1):4-15.

70. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2000; 83(4):589-91.
71. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J.* 2005; 3:16.
72. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica.* 2003; 88(5):547-54.
73. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Tripodi A. Standardization of the endogenous thrombin potential measurement: how to minimize the effect of residual platelets in stored plasma. *Br J Haematol.* 2004; 124(3):355-7.
74. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004; 114(5-6):539-45.
75. van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC, Kitchen S, Bowyer AE, Makris M. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008; 19(3):183-9.

-
76. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(11):1954-9.
 77. Gerotziafas GT, Chakroun T, Depasse F, Arzoglou P, Samama MM, Elalamy I. The role of platelets and recombinant factor VIIa on thrombin generation, platelet activation and clot formation. *Thromb Haemost.* 2004; 91(5):977-85.
 78. Chaireti R, Jennersjo C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)--a 7-year follow-up. *Thromb Res.* 2013; 131(2):135-9.
 79. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, et al. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol.* 2007; 139(2):303-9.
 80. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res.* 2012; 130(6):929-34.
 81. van Hylckama Vlieg A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Baglin TP. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol.* 2007; 138(6):769-74.

-
82. Gatt A, van Veen JJ, Cooper P, Kitchen S, Makris M. Protein C deficiency screening using a thrombin generation assay - an upgrade. *Thromb Haemost.* 2007; 98(3):691-2.
 83. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol.* 2005; 130(5):653-61.
 84. Dargaud Y, Sorensen B, Shima M, Hayward C, Srivastava A, Negrier C. Global haemostasis and point of care testing. *Haemophilia.* 2012; 18 Suppl 4:81-8.
 85. Zekavat OR, Haghpanah S, Dehghani J, Afrasiabi A, Peyvandi F, Karimi M. Comparison of thrombin generation assay with conventional coagulation tests in evaluation of bleeding risk in patients with rare bleeding disorders. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2014; 20(6):637-44.
 86. Adams M. Assessment of thrombin generation: useful or hype? *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35(1):104-10.
 87. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34(7):670-82.
 88. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* 2011;127 Suppl 3:S21-5.
 89. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Thomassen MC, Spiezia L, Gavasso S, et al. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(5):971-9.

-
90. Castoldi E, Maurissen LF, Tormene D, Spiezia L, Gavasso S, Radu C, et al. Similar hypercoagulable state and thrombosis risk in type I and type III protein S-deficient individuals from families with mixed type I/III protein S deficiency. *Haematologica*. 2010; 95(9):1563-71.
 91. Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(8):1327-33.
 92. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(10):1720-5.
 93. Andresen MS, Abildgaard U, Liestol S, Sandset PM, Mowinckel MC, Odegaard OR, et al. The ability of three global plasma assays to recognize thrombophilia. *Thromb Res*. 2004; 113(6):411-7.
 94. Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognise the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost*. 2006; 96(5):562-7.
 95. Regnault V, Beguin S, Lecompte T. Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33(1):23-9.

96. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann L. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004; 15(3):241-4.
97. Eilertsen AL, Liestol S, Mowinckel MC, Hemker HC, Sandset PM. Differential impact of conventional and low-dose oral hormone therapy (HT), tibolone and raloxifene on functionality of the activated protein C system. *Thromb Haemost*. 2007; 97(6):938-43.
98. Tchaikovski SN, van Vliet HA, Thomassen MC, Bertina RM, Rosendaal FR, Sandset PM, et al. Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost*. 2007; 98(6):1350-6.
99. Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*. 2003; 89(2):208-12.
100. Lecompte T, Wahl D, Perret-Guillaume C, Hemker HC, Lacolley P, Regnault V. Hypercoagulability resulting from opposite effects of lupus anticoagulants is associated strongly with thrombotic risk. *Haematologica*. 2007; 92(5):714-5.

101. Regnault V, Boehlen F, Ozsahin H, Wahl D, de Groot PG, Lecompte T, et al. Anti-protein S antibodies following a varicella infection: detection, characterization and influence on thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(6):1243-9.
102. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA.* 2006; 296(4):397-402.
103. Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Florent B, Nguyen P. Protein C deficiency screening using a thrombin-generation assay. *Thromb Haemost.* 2007; 97(1):165-6.
104. Tripodi A, Chantarangkul V, Gianniello F, Clerici M, Lemma L, Padovan L, et al. Global coagulation in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 2013; 92(12):1633-9.
105. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2009; 137(6):2105-11.
106. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* 2011; 365(2):147-56.
107. Noubouossie DF, Le PQ, Corazza F, Debaugnies F, Rozen L, Ferster A, et al. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *Am J Hematol.* 2012; 87(2):145-9.

108. Kim HK, Kim JE, Park SH, Kim YI, Nam-Goong IS, Kim ES. High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *J Diabetes Complications*. 2014; 28(3):365-9.
109. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyak K, Ten Cate H, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost*. 2008; 6(1):125-31.
110. Ollivier V, Wang J, Manly D, Machlus KR, Wolberg AS, Jandrot-Perrus M, et al. Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay. *Thromb Res*. 2010; 125(1):90-6.
111. Matijevic N, Wang YW, Kostousov V, Wade CE, Vijayan KV, Holcomb JB. Decline in platelet microparticles contributes to reduced hemostatic potential of stored plasma. *Thromb Res*. 2011; 128(1):35-41.
112. Weitz IC. Thrombosis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria - insights into the role of complement in thrombosis. *Thromb Res*. 2010; 125 Suppl 2:S106-7.
113. Weitz IC. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(3):315-21.

-
114. Seregina EA, Tsvetaeva NV, Nikulina OF, Zapariy AP, Erasov AV, Gribkova IV, et al. Eculizumab effect on the hemostatic state in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Cells Mol Dis*. 2015; 54(2):144-50.
115. Lipets EN, Ataullakhanov FI. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thromb J*. 2015; 13(1):4.
116. Eichinger S, Heinze G, Jandek LM, Kyrle PA. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation*. 2010; 121(14):1630-6.
117. Eichinger S, Hron G, Kollars M, Kyrle PA. Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin Chem*. 2008; 54(12):2042-8.
118. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007; 109(8):3161-72.
119. Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, et al. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14(6):575-85.

120. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT.
The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by
the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* .
1996; 93(19):10212-6.
121. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated protein C in blood
from human subjects. *Blood.* 1992; 79(9):2340-8.
122. Dargaud Y, Hierso S, Rugeri L, Battie C, Gaucherand P, Negrier C, et
al. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment 1+2 and D-
dimers during pregnancy. *Thromb Haemost.* 2010; 103(2):469-71.