

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DANYELLE ROMANA ALVES RIOS**

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE TROMBOSE DO  
ACESSO VASCULAR EM PACIENTES SOB  
HEMODIÁLISE**

**Belo Horizonte - MG**

**2009**

**DANYELLE ROMANA ALVES RIOS**

**ESTUDO DE BIOMARCADORES DE TROMBOSE DO  
ACESSO VASCULAR EM PACIENTES SOB  
HEMODIÁLISE**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Karina Braga Gomes Borges

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ana Cristina Simões e Silva

Colaboradora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria das Graças Carvalho

**Belo Horizonte - MG**

**2009**

*Dedico este trabalho*

*A Deus por me iluminar a cada amanhecer.*

*À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Luci Dusse, pela confiança, incentivo,  
dedicação, carinho e amizade.*

*Aos meus amores, Antonio Luiz e Ângela que me deram a vida,  
minha irmã Dayane e ao meu marido*

*Danny pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Luci Maria Sant'Ana Dusse, que não apenas dedico esse trabalho, mas agradeço simplesmente por ser minha orientadora e amiga.

À Prof<sup>a</sup> Maria das Graças Carvalho pela colaboração, carinho, amizade e por tudo que você me ensinou de bom, pois que convive ao lado de uma pessoa tão iluminada se transforma em uma pessoa melhor. Muito obrigada.

À minha co-orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Karina Braga Gomes Borges pela colaboração, carinho e amizade. A sua competência e humildade fazem com que você se transforme em um exemplo para todos que convivem ao seu redor, fazendo com queiramos crescer e melhorar a cada dia. Muito obrigada.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Ana Cristina Simões e Silva pela colaboração, a disponibilidade sempre imediata e dedicação. Muito obrigada.

À Prof<sup>a</sup> Ana Paula Sales Moura Fernandes pela disponibilidade do laboratório de biologia molecular, pela colaboração e amizade.

Aos nefrologistas Dr. Valério Rodrigues, Dr<sup>a</sup> Eleonora Lima e Dr<sup>a</sup> Mônica Maria Moreira Delgado Maciel pela confiança, disponibilidade e colaboração.

Aos enfermeiros Adailto Vieira dos Santos e Regina Souza pela disponibilidade, compreensão, apoio e por possibilitarem a realização deste trabalho. Muito obrigada.

Ao amigo farmacêutico-bioquímico Jarbas Cardoso, pela amizade e colaboração no laboratório de Biologia Molecular.

À amiga Geralda de Fátima Guerra Lages, pela amizade, apoio e colaboração no laboratório de Hematologia.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, pela convivência e apoio, especialmente à amiga Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem que tanto me ajudou quando mais precisei.

Aos amigos do laboratório de Hematologia, pela convivência e apoio, especialmente à Cláudia Natália Ferreira pela colaboração e amizade.

À Prof<sup>ª</sup> Ângela Maria Quintão Lana da Escola de Veterinária da UFMG, pela orientação na análise estatística.

Aos professores, colegas e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG que acompanharam o desenvolver deste projeto.

À minha querida amiga Roberta Carvalho de Figueiredo, minha irmã e fiel companheira, que esteve presente em todos os momentos, para rir, para chorar, para aconselhar e, além disso, para me ajudar a concluir este trabalho com seus conhecimentos estatísticos. Essa vitória também é sua, muito obrigada.

Ao meu pai, que mesmo não estando presente, sei que de onde ele estiver, está me iluminando, me dando forças e coragem para continuar e não desistir nunca, pois foi isso que ele me ensinou em vida. Saudades eternas.

À minha mãe que me apóia em todos os momentos, que fica na torcida, que está sempre pronta para ajudar. Só tenho que dizer: obrigada por ser minha mãe. Essa vitória também é sua.

À minha irmã Dayane que não mede esforços para me ajudar sempre que preciso, que está sempre ao meu lado torcendo por mim. Muito obrigada.

Ao meu marido Danny, meu grande amor, amigo e companheiro para todas as horas. Obrigada pela compreensão, pelos conselhos, pelas tantas vezes que me acalmou na hora do desespero e simplesmente por está ao meu lado. Te amo!

Aos meus avós, tios e a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para a realização desta etapa e torceram por mim. Em especial ao tio Zé e à tia Maria que me receberam em sua casa com tanto carinho, meus sinceros agradecimentos.

A todos os pacientes que contribuíram voluntariamente com este estudo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos auxiliares de enfermagem do Instituto Mineiro de Nefrologia e do Hospital das Clínicas/UFMG pela coleta das amostras de sangue.

A todos os professores e mestres que passaram pela minha vida, pelos ensinamentos e dedicação. Em especial ao professor Geraldo Alves da Silva, que foi o grande incentivador e quem me orientou a seguir a área acadêmica.

A Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

*“A longa jornada até o fim de um capítulo começa com um pequeno passo para adentrar o primeiro parágrafo”.*

Autor desconhecido

## RESUMO

A hemodiálise é um processo de filtração do sangue onde ocorre a retirada de toxinas e água acumuladas no organismo. Este tratamento é indicado para os portadores de doença renal crônica em estágio terminal. As complicações relacionadas ao acesso vascular, necessário para a realização da hemodiálise, são responsáveis por 20 a 25% das hospitalizações dos pacientes em diálise crônica. A ocorrência de trombose no acesso vascular constitui um problema grave, pois dificulta enormemente ou até inviabiliza, a realização de um tratamento que é vital para o paciente. O objetivo deste estudo foi investigar alterações moleculares, dos sistemas hemostático e inflamatório e a frequência do grupo sanguíneo ABO em pacientes submetidos à hemodiálise, bem como a associação dessas com a ocorrência de complicações trombóticas do acesso vascular. Foram avaliados 195 pacientes submetidos à hemodiálise, dos quais 149 não apresentaram trombose do acesso vascular (grupo I) e 46 apresentaram essa complicação (grupo II), além de 80 indivíduos hígidos (Grupo III). Foram investigadas as mutações no gene da protrombina (G20210A) e do F V (G1691A), os níveis plasmáticos de D-Di, PAI-1, FvW, F VIII, ADAMTS-13, PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1 e o grupo sanguíneo ABO. A análise estatística dos resultados revelou que os níveis plasmáticos de D-Di, FvW e a atividade do F VIII estavam elevados e de PAI-1 e ADAMTS-13 reduzidos nos pacientes dos grupos I e II quando comparados aos do grupo III. Não houve diferença entre os grupos I e II em relação aos parâmetros hemostáticos e inflamatórios. O grupo sanguíneo ABO foi semelhante nos três grupos. Os níveis plasmáticos de FvW e a atividade do FVIII estavam elevados nos indivíduos do grupo sanguíneo “não O” comparados aos do grupo “O” nos grupos I, II e III. A presença da mutação no gene da protrombina (G20210A) mostrou uma associação significativa e independente com a trombose do acesso vascular, enquanto a presença da mutação no F V, os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios e o grupo sanguíneo ABO não mostraram associação com esta complicação. Houve correlação significativa entre os níveis dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios nos dois grupos submetidos à hemodiálise. Embora os marcadores hemostáticos e inflamatórios avaliados não se mostraram úteis para prever a ocorrência de complicações trombóticas do acesso vascular, os resultados deste estudo revelaram que os pacientes submetidos à hemodiálise apresentam um quadro de hipercoagulabilidade. Além disso, sugeriram que a presença da mutação no gene da protrombina (G20210A) está associada à ocorrência de trombose do acesso vascular.

**PALAVRAS-CHAVE:** Hemodiálise; acesso vascular; hemostasia; trombofilia; hipercoagulabilidade; grupo sanguíneo ABO; inflamação.

## ABSTRACT

Hemodialysis is a kind of blood filtration in which accumulated toxins and water are removed from the body. This treatment is indicated for patients in the end stage renal disease. Vascular access complications constitute about 20-25% of all hospitalizations in dialysed patients. The occurrence of thrombosis in the vascular access is a serious problem that might severely compromise or even make impossible the hemodialysis, which is vital for the patient. The aim of this study was to investigate molecular, hemostatic and inflammatory alterations and of the ABO blood group frequency in patients undergoing hemodialysis as well as the association between these alterations and the occurrence of vascular access thrombosis. A total of 195 patients undergoing hemodialysis have been evaluated, of which 149 patients had not experienced vascular access thrombosis (Group I) and 46 patients had this complication (Group II), beyond 80 healthy individuals (Group III). Mutations of prothrombin (G20210A) and factor V (G1691A) genes, D-Di, PAI-1, FvW, F VIII, ADAMTS-13, PCRus, IL-8 and TGF-b1 plasma levels, and ABO blood group have been investigated. Statistical analysis showed that D-Di, FvW and F VIII were increased, whereas PAI-1 and ADAMTS-13 were reduced in groups I and II if compared to group III. There was no difference between groups I and II in relation to the hemostatic and inflammatory parameters. ABO blood group frequency was similar in the three groups. The FvW plasma levels and F VIII activity was elevated in "non O" blood group individuals if compared to "O" blood group in all three studied groups. Prothrombin mutation (G20210A) had a significant and independent association with vascular access thrombosis. Factor V mutation (F V Leiden), hemostatic and plasma levels of inflammatory markers as well as the ABO blood group were not associated with this complication. There was a significant correlation between hemostatic and inflammatory markers in both groups of patients undergoing hemodialysis. Although the hemostatic and inflammatory markers evaluated have not shown to be useful in predicting the occurrence of vascular access thrombotic complications, the results of this study revealed that the patients undergoing hemodialysis present a hypercoagulability status. Furthermore, the results suggested the presence of prothrombin mutation (G20210A) is associated with the occurrence of vascular access thrombosis.

**KEY-WORDS:** Hemodialysis; vascular access; hemostasis; thrombophilia; hipercoagulability; ABO blood group; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Iniciação da coagulação.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>2 Amplificação da coagulação.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>3 Propagação da coagulação.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4 Mecanismo de ação da AT.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>5 Mecanismo de ação da proteína C/ proteína S.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>6 Mecanismo de ação do TFPI.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>7 Mecanismos de ativação e inibição do sistema fibrinolítico.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>8 Fator V Leiden. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição.....</b>                 | <b>73</b> |
| <b>9 Mutação no gene da protrombina. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição.....</b> | <b>73</b> |
| <b>10 Distribuição dos valores plasmáticos de ALT (U/L) nos grupos I e II.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>11 Distribuição dos valores plasmáticos de F VIII (% atividade) nos grupos I, II e III.....</b>                                | <b>87</b> |
| <b>12 Distribuição dos valores plasmáticos de FvW (mU/mL) nos grupos I, II e III.....</b>   | <b>87</b> |
| <b>13 Distribuição dos valores plasmáticos de ADAMTS-13 (ng/mL) nos grupos I, II e III.....</b>                                   | <b>88</b> |
| <b>14 Distribuição dos valores plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos grupos I, II e III.....</b>  | <b>88</b> |
| <b>15 Distribuição dos valores plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nos grupos I, II e III.....</b>                                       | <b>89</b> |
| <b>16 Distribuição dos grupos sanguíneos nos grupos I, II e III.....</b>  | <b>90</b> |
| <b>17 Distribuição dos valores plasmáticos de PCRus (mg/L) nos grupos I e II.....</b>   | <b>92</b> |
| <b>18 Distribuição dos valores plasmáticos de IL-8 (pg/mL) nos grupos I e II.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>19 Distribuição dos valores plasmáticos de TGF-<math>\beta</math>1 (pg/mL) nos grupos I e II.....</b>                          | <b>93</b> |

## LISTA DE TABELAS

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Relação dos motivos de exclusão de participantes do estudo.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>2</b>  | <b>Características clínicas dos integrantes do estudo.....</b>   | <b>82</b> |
| <b>3</b>  | <b>Dados laboratoriais dos pacientes integrantes dos grupos I e II.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>4</b>  | <b>Frequência das mutações nos genes da protrombina (G20210A) e do F V (G1691A) entre os integrantes dos grupos I e II.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>5</b>  | <b>Parâmetros hemostáticos avaliados nos integrantes do estudo.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>6</b>  | <b>Frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO nos integrantes do estudo.....</b>  | <b>89</b> |
| <b>7</b>  | <b>Parâmetros hemostáticos dos integrantes dos grupos I, II e III, segundo o grupo sanguíneo “O” e “não O”.....</b>  | <b>91</b> |
| <b>8</b>  | <b>Parâmetros inflamatórios avaliados nos integrantes dos grupos I e II.....</b>   | <b>92</b> |
| <b>9</b>  | <b><i>Odds ratio</i>, intervalos de confiança (IC) e valor de p do modelo de regressão logística múltiplo considerando como variável dependente a presença de trombose do acesso vascular.....</b> | <b>94</b> |
| <b>10</b> | <b>Coefficiente de correlação (r) de Spearman e valor de p para os parâmetros hemostáticos e inflamatórios avaliados nos grupos I e II.....</b>  | <b>95</b> |
| <b>11</b> | <b>Parâmetros hemostáticos, inflamatórios e frequência do grupo sanguíneo ABO entre os integrantes do grupo I e do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico.....</b>                | <b>96</b> |
| <b>12</b> | <b>Parâmetros hemostáticos e inflamatórios nos dois subgrupos do grupo I (Ia e Ib).....</b>  | <b>97</b> |

## LISTA DE QUADROS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Distribuição dos grupos sanguíneos numa amostragem de doadores da Fundação Hemominas/MG (estimativa para população geral de Minas Gerais).....</b>  | <b>43</b> |
| <b>2 Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs, para amplificação dos segmentos genômicos específicos.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>3 Concentrações dos reagentes utilizados nas PCRs.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>4 Programas de PCR utilizados para amplificação das regiões gênicas de interesse.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>5 Condições padronizadas de digestão enzimática para detecção das mutações F V Leiden (G1691A) e no gene da protrombina (G20210A), pela análise do polimorfismo de tamanho de restrição (RFLP).....</b> | <b>72</b> |
| <b>6 Tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO.....</b>  | <b>77</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| $\alpha$ 2-AP | $\alpha$ 2-antiplasmina   |
| A             | Adenina   |
| ADAMTS-13     | <i>A disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains</i> |
| ADP           | Adenosina difostato   |
| ALT           | Alanina amino transferase   |
| AMPc          | Adenosina monofosfato cíclica   |
| ARA           | Antagonistas dos receptores de angiotensina                                       |
| Arg           | Arginina  |
| AS-HRP        | Estreptavidina-horseradish  |
| AT            | Antitrombina  |
| ATP           | Adenosina trifosfato  |
| CBS           | Cistationina $\beta$ -sintase   |
| CDL           | Cateter duplo lúmen   |
| CDLs          | Cateteres duplo lúmen   |
| CHCM          | Concentração de hemoglobina   |
| CT            | Colesterol total  |
| CTLF          | Capacidade total de ligação do ferro  |
| D-Di          | Dímero D  |
| DNA           | Ácido desoxirribonucléico   |
| cDNA          | Ácido desoxirribonucléico complementar  |
| DPAC          | Diálise peritoneal ambulatorial contínua  |
| DRA           | Doença renal aguda  |
| DRC           | Doença renal crônica  |
| EDTA          | Ácido etilenodiaminotetracético   |
| ELISA         | <i>Enzyme linked immune assay</i>   |
| EPCR          | Receptor endotelial de proteína C   |
| F IX          | Fator IX  |
| F IXa         | Fator IX ativado  |
| F V           | Fator V   |
| F Va          | Fator V ativado   |

|         |   |
|---------|---|
| F VII   | Fator VII                                       |
| F VIIa  | Fator VII ativado                               |
| F VIII  | Fator VIII                                      |
| F VIIIa | Fator VIII ativado                              |
| F X     | Fator X   |
| F Xa    | Fator X ativado                                 |
| F XI    | Fator XI  |
| F XIa   | Fator XI ativado                                |
| F XII   | Fator XII                                       |
| F XIIa  | Fator XII ativado                               |
| F XIII  | Fator XIII                                      |
| F1+2    | Fragmento 1+2 da protrombina                    |
| FAL     | Fosfatase alcalina                              |
| FAV     | Fístula arteriovenosa                           |
| FbDP    | Produtos de degradação da fibrina               |
| FgDP    | Produtos de degradação do fibrinogênio          |
| FPA     | Fibrinopeptídeo A                               |
| FPB     | Fibrinopeptídeo B                               |
| FT      | Fator tissular                                  |
| FVL     | Fator V Leiden                                  |
| FvW     | Fator von Willebrand                            |
| FXIIIa  | Fator XIII ativado                              |
| G       | Guanina   |
| GID     | Ganho interdialítico                            |
| Glu     | Glutamina                                       |
| HCM     | Hemoglobina corpuscular média                   |
| HD      | Hemodiálise                                     |
| HDLc    | Lipoproteína de alta densidade                  |
| HRP     | <i>Horseradish</i> peroxidase                   |
| IC 95%  | Intervalo de confiança de 95%                   |
| ICAM-1  | Molécula de adesão intercelular-1               |
| IECA    | Inibidores da enzima conversora de angiotensina |
| IL-1    | Interleucina-1                                  |

|         |  |
|---------|--|
| IL-6    | Interleucina-6   |
| IL-8    | Interleucina-8   |
| IMC     | Índice de massa corpórea   |
| IST     | Índice de saturação de transferrina  |
| Kt/V    | Cinética da uréia  |
| LDLc    | Lipoproteína de baixa densidade  |
| LES     | Lúpus eritematoso sistêmico  |
| Lp(a)   | Lipoproteína a   |
| MCP-1   | Proteína quimiotática de monócitos   |
| MMP-9   | Metaproteinase da matriz-9   |
| MTHFR   | Metilenoetetraidrofolato redutase  |
| NFKDOQI | <i>The National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative</i> |
| nPCR    | <i>Normalized protein catabolism rate</i>                                  |
| OPD     | Orto-fenilendiamina  |
| OR      | <i>Odds ratio</i>  |
| PS      | Proteína S   |
| PAI-1   | Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1                               |
| PAP     | Complexo plasmina-antiplasmina   |
| PB      | Pares de base  |
| PC      | Proteína C   |
| PCa     | Proteína C ativada   |
| PCR     | Reação em Cadeia da Polimerase   |
| PCR     | Proteína C reativa   |
| PCRus   | Proteína C reativa ultrasensível   |
| PDF     | Produtos de degradação da fibrina  |
| PTFE    | Politetrafluoretileno  |
| PTH     | Paratormônio   |
| q.s.p.  | Quantidade suficiente para   |
| RFLP    | Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição                          |
| RPM     | Rotações por minuto  |
| TAFI    | Inibidor da fibrinólise ativado por trombina                               |
| TAT     | Complexo trombina-antitrombina   |
| TFPI    | Inibidor da via do fator tissular  |

|                |   |
|----------------|---|
| TG             | Triglicérides   |
| TGF- $\beta$ 1 | <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i> |
| TM             | Trombomodulina  |
| TMB            | Perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina          |
| TNF- $\alpha$  | Fator de necrose tumoral- $\alpha$                    |
| TP             | Tempo de protrombina                                  |
| t-PA           | Ativador tecidual do plasminogênio                    |
| TpP            | Proteína precursora de trombo                         |
| TTPa           | Tempo de tromboplastina parcial ativada               |
| u-PA           | Ativador do plasminogênio tipo uroquinase             |
| URR            | Relação de redução de uréia                           |
| VCAM-1         | Molécula de adesão vascular-1                         |
| VCM            | Volume corpuscular médio                              |
| VLDLc          | Lipoproteína de densidade muito baixa                 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....</b>                                       | <b>19</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.1 Hemodiálise.....</b>   | <b>24</b> |
| <b><u>2.1.1 Aspectos fisiológicos da hemodiálise.....</u></b>               | <b>24</b> |
| <b><u>2.1.2 Acesso vascular para hemodiálise.....</u></b>                   | <b>27</b> |
| <b>2.2 Hemostasia.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.3 Coagulação sanguínea.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>2.4 Inibidores endógenos da coagulação sanguínea.....</b>                | <b>34</b> |
| <b>2.5 Fibrinólise.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>2.6 Mutações que predis põem a trombofilia.....</b>                      | <b>39</b> |
| <b>2.7 Sistema ABO e predisposição à trombose venosa.....</b>               | <b>42</b> |
| <b><u>2.7.1 Grupo sanguíneo ABO.....</u></b>                                | <b>42</b> |
| <b><u>2.7.2 Sistema ABO, F VIII, FvW e trombose venosa.....</u></b>         | <b>43</b> |
| <b>2.8 Hemodiálise e alterações hemostáticas.....</b>                       | <b>46</b> |
| <b><u>2.8.1 Alterações plaquetárias.....</u></b>                            | <b>47</b> |
| <b><u>2.8.2 Alterações dos fatores da coagulação e fibrinólise.....</u></b> | <b>49</b> |
| <b>2.9 Hemodiálise e marcadores inflamatórios.....</b>                      | <b>57</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                                       | <b>62</b> |
| <b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>4.1 Casuística.....</b>  | <b>64</b> |
| <b><u>4.1.1 Aspectos éticos.....</u></b>                                    | <b>64</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b><u>4.1.2 Seleção dos participantes do estudo</u></b> .....                 | 64 |
| <b><u>4.1.2.1 Critérios de inclusão</u></b> .....                             | 64 |
| <b><u>4.1.2.2 Critérios de exclusão</u></b> .....                             | 65 |
| <b><u>4.1.3 Seleção dos indivíduos hígidos</u></b> .....                      | 66 |
| <b><u>4.1.3.1 Critérios de exclusão</u></b> .....                             | 66 |
| <b><u>4.1.4 Grupos avaliados</u></b> .....                                    | 66 |
| <b><u>4.1.5 Caracterização da população de pacientes estudada</u></b> .....   | 66 |
| <b><u>4.1.6 Detalhamento da hemodiálise</u></b> .....                         | 67 |
| <b>4.2 Amostra biológica</b> .....  | 67 |
| <b>4.3 Métodos</b> .....  | 68 |
| <b><u>4.3.1 Avaliação das mutações que predispõem a trombofilia</u></b> ..... | 68 |
| <b><u>4.3.1.1 Extração de DNA</u></b> .....                                   | 68 |
| <b><u>4.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u></b> .....              | 69 |
| <b><u>4.3.1.3 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)</u></b>          | 71 |
| <b><u>4.3.2 Avaliação da coagulação e fibrinólise</u></b> .....               | 74 |
| <b><u>4.3.2.1 Determinação do F VIII</u></b> .....                            | 74 |
| <b><u>4.3.2.2 Determinação do FvW</u></b> .....                               | 74 |
| <b><u>4.3.2.3 Determinação da ADAMTS-13</u></b> .....                         | 75 |
| <b><u>4.3.2.4 Determinação dos D-Di</u></b> .....                             | 76 |
| <b><u>4.3.2.5 Determinação do PAI-1</u></b> .....                             | 76 |
| <b><u>4.3.3 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO</u></b> .....                  | 77 |
| <b><u>4.3.4 Avaliação dos marcadores inflamatórios</u></b> .....              | 77 |
| <b><u>4.3.4.1 Determinação da PCRus</u></b> .....                             | 77 |
| <b><u>4.3.4.2 Determinação da IL-8</u></b> .....                              | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| <b><u>4.3.4.3 Determinação do TGF-<math>\beta</math>1</u></b> .....  | 78  |
| <b>4.4 Análise estatística</b> .....   | 79  |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | 81  |
| <b>5.1 Avaliação das características clínicas</b> .....  | 82  |
| <b>5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais</b> .....  | 83  |
| <b>5.3 Avaliação das mutações que predisõem a trombofilia</b> .....  | 85  |
| <b>5.4 Avaliação da coagulação e fibrinólise</b> .....   | 86  |
| <b>5.5 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO</b> .....  | 89  |
| <b>5.6 Avaliação da relação do grupo sanguíneo ABO e níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos</b> .....                                  | 90  |
| <b>5.7 Avaliação dos marcadores inflamatórios</b> .....  | 92  |
| <b>5.8 Associação dos parâmetros avaliados com a trombose do acesso vascular</b> .....   | 93  |
| <b>5.9 Correlação entre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios</b> .....  | 95  |
| <b>5.10 Avaliação dos marcadores hemostáticos, inflamatórios e frequência do grupo sanguíneo ABO na recorrência do evento trombótico</b> ..... | 96  |
| <b>5.11 Avaliação dos marcadores hemostáticos e inflamatórios nos integrantes do grupo I, após reavaliação dos prontuários</b> .....           | 97  |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....   | 98  |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....  | 118 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 121 |
| <b>ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética</b> .....  | 144 |
| <b>ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....  | 145 |
| <b>ANEXO 3 - Ficha Clínica</b> .....   | 146 |
| <b>ANEXO 4 – Artigo publicado</b> .....  | 148 |

# *1 Introdução e Relevância*

---

---

A hemodiálise é um processo de filtração do sangue onde ocorre a retirada de toxinas e água acumuladas no organismo. Este tratamento é indicado para os portadores de doença renal crônica (DRC) em estágio terminal. As causas principais da DRC são as enfermidades glomerulares primárias ou secundárias, em especial a nefropatia diabética, hipertensão arterial e as glomerulopatias. Além dessas, destacam-se também as uropatias obstrutivas, as infecções urinárias de repetição, os cálculos renais e a nefropatia de refluxo.

A incidência e a prevalência da DRC e, conseqüentemente, a necessidade de submeter à hemodiálise tem aumentado progressivamente a cada ano no Brasil e em todo o mundo. Estima-se que cerca de um a quatro milhões de brasileiros são portadores de DRC.

O custo elevado para manter os pacientes em tratamento hemodialítico tem preocupado os órgãos governamentais que subsidiam 95% desse tratamento. Além disso, pacientes sob hemodiálise têm a produtividade comprometida, o que afeta o sistema de previdência pública e seguridade social.

Tanto a DRC, como o processo de hemodiálise podem alterar a função das plaquetas e dos sistemas da coagulação e da fibrinólise, contribuindo para complicações hemorrágicas ou trombóticas.

Para a realização da hemodiálise é necessário dispor de um acesso vascular que pode ser temporário (algumas horas a meses) ou permanente, mediante a utilização de uma fístula. As complicações relacionadas ao acesso vascular são responsáveis por 20 a 25% das hospitalizações dos pacientes em diálise crônica. Tais complicações incluem a trombose precoce (decorrente de problemas técnicos na confecção da fístula), trombose tardia, infecções, hemorragia e formação de hematoma.

A formação de trombos no acesso vascular resulta principalmente de estenose causada por hiperplasia progressiva das camadas íntima ou fibromuscular no sistema do fluxo venoso. A estenose, por sua vez, leva a redução da velocidade do fluxo sanguíneo, o que favorece a hipercoagulabilidade. No entanto, algumas vezes a trombose ocorre espontaneamente sem causa anatômica, sugerindo que outras condições possam desencadear o processo trombótico. A ocorrência de trombose no acesso vascular constitui um problema grave, pois dificulta enormemente ou até inviabiliza, a realização de um tratamento que é vital para o paciente.

A literatura revela que o processo da coagulação e da fibrinólise têm um papel importante nas complicações relacionadas ao acesso vascular. Sabe-se que o processo de hemodiálise predispõe aos eventos trombóticos, por resultar em ativação das plaquetas e dos fatores da coagulação. A superfície artificial da fístula arteriovenosa (FAV) ou do enxerto de politetrafluoretileno (PTFE) promove a adesão de plaquetas e do fibrinogênio, o fluxo sanguíneo turbulento no circuito extracorpóreo resulta na agregação das plaquetas e na ativação de monócitos com consequente expressão de fator tissular. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento, que contribuem para o aumento da hiperplasia no acesso vascular, reduzindo o fluxo sanguíneo e facilitando a agregação de outras plaquetas ativadas e não ativadas. No entanto, os dados da literatura em relação aos fatores desencadeadores do evento trombótico, são controversos.

A principal motivação para a realização deste estudo foi elucidar as possíveis causas que levam ao desenvolvimento de trombos no acesso vascular em pacientes submetidos ao desafio hemostático representado pela hemodiálise, visando elucidar suas causas, bem como definir marcadores hemostáticos e/ou inflamatórios capazes de prever a ocorrência desse evento.

Uma extensa revisão da literatura revelou que apenas cinco estudos, conduzidos na Itália, Kuwait, Canadá, Japão e Turquia avaliaram a associação entre marcadores hemostáticos e as complicações do acesso vascular. O presente estudo é inédito na população brasileira. Considerando as características da nossa população, de modo particular, a composição étnica, este estudo assume grande relevância, pois poderia possibilitar a implementação de regimes adequados de anticoagulação, contribuindo para a prevenção da formação de trombos nessa área.

Está bem consolidada na literatura a relação do sistema ABO e trombose venosa, indicando que indivíduos dos grupos sanguíneos “não O” (A, B e AB) apresentam maior risco de desenvolver eventos trombóticos que aqueles do grupo “O”. Indivíduos portadores dos grupos sanguíneos “não O” apresentam níveis plasmáticos elevados de fator VIII (F VIII) e de fator von Willebrand (FvW) que aqueles do grupo “O”. Sabe-se que o FvW é uma das poucas proteínas não eritrocitárias que se liga aos antígenos do sistema ABO. No entanto, o mecanismo pelo qual os determinantes do sistema ABO influenciam os níveis plasmáticos do FvW ainda não foram elucidados. Considerando que o FvW constitui o carreador do

F VIII na circulação, um aumento de FvW compromete o *clearance* de F VIII, resultando na elevação dos níveis plasmáticos desse.

Um mecanismo envolvido na regulação FvW no plasma envolve a enzima ADAMTS-13 (*a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains*), que promove a clivagem dos grandes mútímeros desse fator. Em doenças como a púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica, nas quais ocorre ausência ou redução da atividade da ADAMTS-13, há o comprometimento da clivagem dos mútímeros do FvW e, conseqüentemente, elevação desses no plasma, concorrendo para a agregação plaquetária.

Nenhum estudo foi encontrado na literatura, relacionando o grupo sanguíneo ABO e o risco de desenvolver trombose em pacientes sob hemodiálise, bem como avaliando a enzima ADAMTS-13 nesses pacientes.

Considerando que a trombose é uma doença de caráter multifatorial e que os fatores genéticos e adquiridos associados a essa podem variar em diferentes populações e, considerando ainda, que a hemodiálise constitui uma condição particular, seria importante conduzir estudos objetivando o maior entendimento do sistema hemostático, bem como sua relação com a inflamação em pacientes sob hemodiálise da população brasileira. Tais estudos poderão estabelecer o potencial de marcadores laboratoriais para monitorar a condição hemostática de pacientes sob hemodiálise, o que poderá contribuir para a adoção de medidas importantes na profilaxia da formação de trombos e na melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

Sabendo da complexidade da DRC e do processo dialítico, bem como as lacunas existentes na literatura, este estudo se justifica plenamente podendo gerar conhecimentos adequados à nossa realidade.

## *2 Revisão da literatura*

---

---

## 2.1 Hemodiálise

O processo de transição demográfica pelo qual o Brasil passa atualmente revela um crescimento das doenças crônico-degenerativas na população. O aumento da população idosa devido ao aumento da expectativa de vida leva a uma maior demanda por determinados procedimentos terapêuticos a cada ano, entre eles, as terapias renais substitutivas, incluindo a hemodiálise (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A hemodiálise é um processo de filtração do sangue onde ocorre a retirada de toxinas e água acumuladas no organismo (SBN, s.d.).

As Diretrizes Européias de Boas Práticas em Hemodiálise (2002) recomendam o início do tratamento dialítico quando a taxa de filtração glomerular for inferior a 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e surgirem sinais clínicos de desnutrição, sobrecarga de volume sem resposta a diuréticos ou outros sintomas e sinais atribuídos à uremia.

Apesar da primeira hemodiálise realizada no Brasil ter ocorrido em 1949, foi apenas na década de 70 que o programa de substituição renal foi introduzido como rotina para os pacientes portadores de doença renal crônica (DRC) (ROMÃO *et al.*, 2003). O passo fundamental para a sua utilização foi o desenvolvimento, em 1960, do *shunt* arteriovenoso, que permitiu o acesso direto à circulação e a realização da hemodiálise em pacientes ambulatoriais (QUINTON *et al.*, 1960; ROSENTHAL, 1981; WILSON *et al.*, 1982). Um passo seguinte foi a introdução da fístula arteriovenosa (FAV), em 1962. Esse tipo de acesso vascular, que evitava os problemas de trombose e infecção do *shunt*, além de ser mais duradouro e cômodo para o paciente, permitiu a difusão por todo o mundo da hemodiálise como tratamento para pacientes portadores de DRC (CASTRO *et al.*, 1985; ROCHA, 1993). Segundo Sesso *et al.* (2008), o número estimado de pacientes em diálise no Brasil é de 87.044, sendo 89,4% em hemodiálise.

### 2.1.1 Aspectos fisiológicos da hemodiálise

A hemodiálise promove a depuração das substâncias tóxicas, água e sais minerais do organismo através da passagem do sangue por delgados canais limitados por uma fina membrana. O movimento dos resíduos metabólicos ocorre a

favor de um gradiente de concentração da circulação para o dialisado. As moléculas de água e os solutos de baixo peso molecular podem passar através dos poros da membrana, porém, solutos maiores, como as proteínas, não conseguem atravessá-la (DAUGIRDAS & STONE, 2003).

Dois tipos de dialisadores são utilizados: o dialisador de fibra oca e o dialisador de placas paralelas. No dialisador de fibra oca, o sangue flui através de milhares de pequenos capilares firmemente agrupados em um feixe e a solução de diálise flui ao redor e fora das fibras. Uma vez tendo passado pelos capilares, o sangue é coletado em uma câmara e é então devolvido ao paciente. Em dialisadores de placas paralelas, o sangue e a solução dialítica passam através de espaços alternados formados pela superposição de camadas de membranas colocadas umas sobre as outras. As membranas sintéticas são as mais comumente utilizadas nos dialisadores, podendo ser constituídas por poliácridonitrila, polissulfona, policarbonato, poliamida e polimetilmetacrilato (DAUGIRDAS & STONE, 2003).

O processo de troca entre os dois lados na membrana é determinado por duas forças básicas: difusão e ultrafiltração.

A difusão refere-se ao movimento de solutos obedecendo à diferença de concentração entre os dois lados da membrana, cuja passagem é limitada pelo peso molecular do soluto. Desse modo, os resíduos do metabolismo protéico passam do sangue para o líquido de diálise, enquanto o bicarbonato segue o caminho inverso. Assim, a troca de massa resulta do gradiente de concentração, da área de superfície e permeabilidade da membrana, assim como da velocidade de fluxo do sangue e do líquido de diálise. Algumas membranas de diálise mais modernas são especialmente finas e têm poros grandes e, deste modo, apresentam baixa resistência ao transporte de solutos, sendo denominadas membranas de alto fluxo (CARVALHO & CARVALHO, 1996; DAUGIRDAS & STONE, 2003).

Já a ultrafiltração ocorre quando a água, impulsionada por uma força hidrostática ou osmótica, é empurrada através da membrana. Aqueles solutos que conseguem passar facilmente através dos poros da membrana são carregados juntamente com a água, em função do gradiente de pressão hidrostática criado entre os dois compartimentos. A ultrafiltração é realizada durante a diálise com o propósito de remover a água acumulada pela ingestão de líquidos ou pelo metabolismo dos alimentos durante o período interdialítico (CARVALHO & CARVALHO, 1996; GUYTON & HALL, 1997; DAUGIRDAS & STONE, 2003).

O líquido de diálise circula em contracorrente ao sangue para maximizar a diferença da concentração dos produtos catabólicos entre o sangue e o dialisado em todas as partes do dialisador. A composição básica da solução de diálise é água altamente purificada, acrescida de sódio, potássio, cloreto, cálcio, glicose e bicarbonato. O fluxo do líquido de diálise é mantido em 500 mL/min, já o fluxo sanguíneo no circuito extracorpóreo é mantido entre 350 e 500 mL/min desde a saída do acesso vascular, passando pelo ramo arterial (onde se acopla a bomba de sangue) e pelo compartimento sanguíneo do dialisador, até retornar pelo ramo venoso (DAUGIRDAS & STONE, 2003).

Em geral, a hemodiálise é realizada três vezes por semana, em sessões com duração média de três a quatro horas e em clínicas especializadas. Uma máquina de diálise e um acesso vascular (cateter ou fístula) são necessários para conectar o sistema vascular do paciente (SBN, s.d.).

A diálise peritoneal utiliza para filtração do sangue o peritônio. Por meio da fixação de um cateter flexível no abdômen, é feita a infusão de um líquido semelhante ao soro na cavidade abdominal. Este líquido, chamado de banho de diálise, entra em contato com o peritônio, e através dele é feita a retirada das substâncias tóxicas do sangue. Após um período de permanência do banho de diálise na cavidade abdominal, esse fica saturado de substâncias tóxicas, necessitando ser retirado para, em seguida, fazer a infusão de novo banho de diálise. Esse processo é realizado de uma forma contínua, e é conhecido por diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC) (SBN, s.d.).

Em comparação com a diálise peritoneal, a hemodiálise proporciona uma alteração mais rápida na composição de solutos do plasma e a possibilidade de uma remoção mais eficaz do excesso de água corporal. Além de seu papel importante no tratamento da doença renal aguda (DRA), a hemodiálise representa, quer isoladamente, como terapêutica de manutenção permanente, quer como preparação para o transplante renal, a possibilidade de sobrevivência para milhares de portadores de DRC terminal (CARVALHO & CARVALHO, 1996; ZAWADA, 2003).

Uma interação, bastante complexa, ocorre entre o paciente e os vários elementos do processo dialítico. Essa inclui a qualidade da água utilizada, a composição do líquido de diálise, as características da membrana e do dialisador, os equipamentos de diversos tipos, os fluxos de sangue e do dialisado e o processo de anticoagulação do paciente (CARVALHO & CARVALHO, 1996).

### **2.1.2 Acesso vascular para hemodiálise**

Atualmente, existem três tipos principais de acesso vascular que permitem a realização da hemodiálise: a fístula arteriovenosa (FAV), o enxerto de politetrafluoretileno (PTFE) e o cateter venoso central (COSTA *et al.*, 2008). O acesso vascular adequado define não só um melhor resultado terapêutico, mas uma melhor sobrevida dos pacientes portadores de DRC. No entanto, não têm sido observados, nos últimos 30 anos, avanços importantes no que diz respeito ao acesso vascular à hemodiálise. As complicações associadas ao acesso vascular representam a maior causa de morbidade nos pacientes sob hemodiálise, sendo responsáveis por cerca de 25% das internações hospitalares (NASCIMENTO & RIELLA, 1999; SANTORO, 2000).

A inserção percutânea de um cateter em veias de grande calibre (jugular interna, subclávia ou femoral) permite que se estabeleça um acesso vascular temporário que pode durar de horas a semanas (DOQI, 1997). Os métodos permanentes mais utilizados em nosso meio consistem na confecção cirúrgica de anastomoses subcutâneas entre uma extremidade arterial e uma veia próxima, a FAV, ou a interposição subcutânea de um tubo de material sintético de uma extremidade arterial a uma venosa, conhecido como enxerto arteriovenoso. A duração desses acessos vasculares varia de meses a anos (PALDER *et al.*, 1985).

Os cateteres duplo lúmen (CDLs) permitem o acesso vascular imediato, fornecendo fluxo sanguíneo adequado para a realização de hemodiálise em situações emergenciais como a DRA. Estes também podem ser utilizados como acesso vascular temporário em pacientes com doença renal crônica que aguardam a confecção ou maturação do acesso vascular permanente, ou como alternativa a uma FAV nativa ou enxerto, nos casos em que não é possível efetuar um procedimento de acesso permanente por motivos anatômicos. No entanto, tanto o procedimento de inserção de CDL quanto o seu uso prolongado estão associados à ocorrência de uma série de complicações.

As complicações imediatas decorrem, em sua maioria, do procedimento da punção venosa central, sendo as mais frequentes a ocorrência de punção arterial, hemorragia local e formação de hematomas. Tardamente, o uso de CDL está associado à ocorrência de infecções locais e bacteremias, além de estenose e

trombose venosa (FELDMAN *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 2008). Uma análise prospectiva recente da ocorrência de infecção no acesso vascular de pacientes em hemodiálise apresentou uma taxa de 10,4 episódios de septicemia e bacteremia por 100 pacientes por ano e um risco relativo de 1,95 para pacientes com cateter venoso central comparado àqueles com fístula nativa (ISHAMI *et al.*, 2005).

A confecção da FAV promove a dilatação das veias envolvidas, permitindo que essas fiquem mais calibrosas, o que facilita seu uso subsequente na introdução de agulhas de calibre grosso fornecendo um fluxo sanguíneo adequado para ser filtrado. A FAV pode ser de três tipos: (1) radial cefálica (artéria radial e veia cefálica); (2) braquial cefálica (artéria braquial e veia cefálica); e (3) braquial basílica (artéria braquial e veia basílica). É necessária uma adequada maturação, de três a seis meses, para que a FAV possa ser utilizada. Sabendo desse período, é prudente que se indique a confecção da fístula tão logo se tenha a certeza de que o paciente é portador de DRC e que entrará em programa de hemodiálise (SCHWAB, 1999).

Os enxertos arteriovenosos podem ser inseridos em diferentes localizações, como no braço (artéria braquial para veia basílica), na parede torácica (artéria para veias axilares) ou na perna (artéria para veias femorais). A porção sintética do enxerto é usualmente PTFE. As vantagens de usar os enxertos de PTFE incluem o menor tempo de maturação (três a quatro semanas) e os múltiplos locais de acesso. A desvantagem é a tendência à estenose devido à hiperplasia endotelial e fibromuscular na anastomose venosa (SCHWAB, 1999).

Culp *et al.* (1995) estimaram uma taxa de 55,8% de perda do enxerto dentro de 12 meses após a confecção do mesmo. Outros pesquisadores observaram 33% de perda em 12 meses e 64,7% em 24 meses (MUNDA *et al.*, 1983). Churchill *et al.* (1992) relataram que a incidência de falhas no acesso vascular de enxertos de PTFE é cerca de duas vezes maior que na fístula nativa durante 12 meses de observação após a confecção da fístula arteriovenosa. Além disso, Besarab *et al.* (1990) relataram que o maior número de trombooses ocorreu em enxertos usando PTFE.

A recomendação do *The National Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative* (NFKDOQI) no que diz respeito à localização dos acessos vasculares definitivos, é a confecção de fístulas distais (radial-cefálica) e fístulas proximais (braquial-cefálica). Na impossibilidade de realização desses acessos, procede-se ao uso de enxertos arteriovenosos, priorizando o de PTFE, e como

última opção, a transposição de veia basílica com anastomose na artéria braquial (DOQI).

No Brasil, a forma predominante de acesso vascular é a FAV utilizando vasos nativos, ao contrário do que acontece nos EUA, onde há uma predominância do enxerto de PTFE, que representa 70% do total de acessos vasculares permanentes. As justificativas para a grande utilização de enxertos nos EUA incluem: o encaminhamento tardio dos pacientes aos cirurgiões para realizar o acesso vascular; a elevada prevalência de pacientes com diabetes mellitus e doença microvascular associada e o elevado número de pacientes com idade avançada, o que limitaria os locais disponíveis para confecção da FAV (SCHWAB, 1999).

As complicações que podem ocorrer com as fístulas são: trombose precoce (decorrente de problemas técnicos), trombose tardia (frequentemente causada por punções repetidas), infecções, hemorragia e hematoma (CARVALHO & CARVALHO, 1996). Em um estudo multicêntrico realizado por Nascimento & Riella (1999), ao se analisarem as principais complicações referentes às fístulas, a mais relatada foi a trombose (80% dos casos), que é a causa mais comum de perda de acesso vascular. Aproximadamente 75% a 85% dos casos de trombose estão relacionados à estenose no sistema venoso. A hipotensão arterial no estudo em questão foi a situação clínica mais relacionada à trombose da FAV, refletindo uma consequência da redução da perfusão (hipotensão) numa fístula já estenótica. Porém, alguns relatos têm observado tromboses espontâneas sem causa anatômica, sugerindo outros fatores como responsáveis pela trombose (PALDER *et al.*, 1985). A infecção no acesso vascular foi a segunda causa mais comum de perda da fístula, contabilizando 20% de todas as complicações referentes aos acessos vasculares.

As lesões estenóticas das FAV e dos enxertos arteriovenosos diferem das lesões ateroscleróticas do sistema arterial pela ausência de placas de lipídios. Ao contrário, há proliferação e migração de células musculares lisas e fibroblastos e acúmulo de matriz extracelular (GIRNDT *et al.*, 2007).

## 2.2 Hemostasia

A hemostasia constitui um conjunto de etapas responsáveis pela fluidez do sangue no leito vascular. Quando ocorre lesão de um vaso sanguíneo, uma sequência de eventos é iniciada visando interromper o sangramento. Estes eventos incluem a alteração do fluxo sanguíneo (vasoconstrição reflexa e localizada), ativação das plaquetas (com formação do tampão plaquetário) e dos fatores da coagulação (com formação do coágulo de fibrina), reparação da parede vascular lesada, lise do coágulo e restabelecimento do fluxo no vaso. Os componentes do sistema hemostático incluem o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico (GUYTON, 1992; COLVIN, 2004, FRANCO, 2001).

## 2.3 Coagulação sanguínea

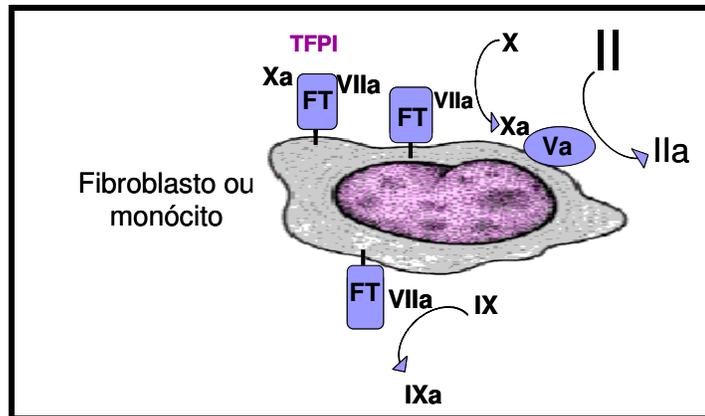
As plaquetas circulam margeando a parede vascular e, em circunstâncias normais, não aderem ao endotélio (COLVIN, 2004, LORENZI, 2006). Quando ocorre qualquer alteração da parede vascular, as plaquetas aderem ao local, por meio da glicoproteína GPIb/IX e do fator von Willebrand (FvW), tornam-se ativadas, alteram sua conformação, expõem fosfatidilserina e outros receptores na membrana, liberam do conteúdo de seus grânulos, promovendo o recrutamento de mais plaquetas para o local lesado. Por meio da GPIIb/IIIa, íons cálcio e do fibrinogênio, ocorre a agregação entre as plaquetas e a formação do tampão plaquetário (COLVIN, 2004; LORENZI, 2006).

O FvW é uma proteína multimérica composta por subunidades idênticas sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos e é composto por multímeros grandes (ultra-large FvW). Normalmente, estes multímeros são detectados no plasma normal apenas transitoriamente e estão armazenados nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e nas plaquetas. Uma vez liberados, os multímeros de FvW são clivados e removidos da circulação pela metaloproteinase ADAMTS-13 (*a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains*). A desmopressina (DDAVP) pode induzir a secreção do estoque FvW das células

endoteliais. Níveis plasmáticos elevados de multímeros do FvW estão associados à adesão e subsequente agregação das plaquetas circulantes (MOAKE *et al.*, 1982).

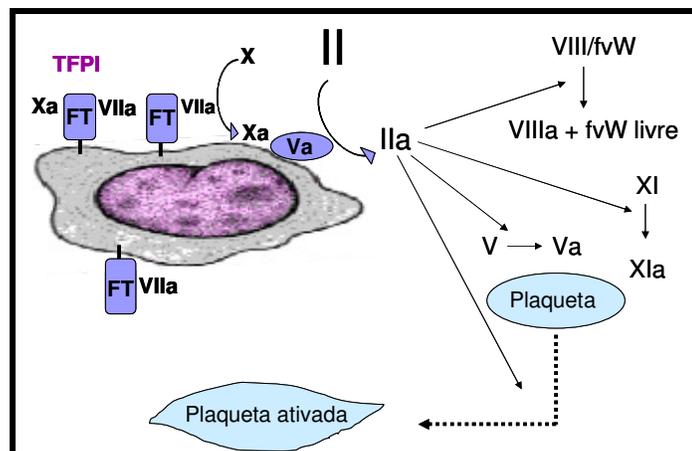
Na década de 60, foi proposto que simultaneamente à ativação das plaquetas, os fatores da coagulação tornavam-se ativados num modelo em cascata, no qual a ativação de um fator implicava na ativação de outro e, assim, sucessivamente, culminando com a formação do coágulo de fibrina. Este modelo admitia duas vias distintas, a intrínseca e extrínseca, iniciadas pelos fatores XII (F XII) e VII (F VII), respectivamente, que convergiam para uma via comum (MACFARLANE, 1964; DAVIE & RATNOFF, 1964). Embora ocorressem questionamentos acerca deste modelo *in vivo*, o mesmo foi aceito por mais de quatro décadas.

Recentemente, Hoffman & Monroe (2007) propuseram um modelo no qual a hemostasia *in vivo* ocorre por etapas reguladas por componentes celulares. Dessa forma, propuseram que o processo hemostático inicia-se quando células expressando FT são expostas à circulação sanguínea no local da lesão vascular (fase de iniciação). O FT não é expresso em células em contato direto com o sangue, mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular. As células endoteliais e monócitos, que normalmente não expressam o FT, podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1) (BUTENAS & MANN, 2002; HOFFMAN, 2003). O FT age como receptor e cofator para F VII. Uma vez ligado ao FT, o FVII é rapidamente convertido em F VIIa. O complexo resultante FVIIa/FT, catalisa a ativação dos fatores IX (F IX) e X. O F Xa formado sobre as células que expressam FT interage com seu cofator Va para formar o complexo protrombinase e gerar pequenas quantidades de trombina. Ao contrário, o F IXa não age sobre as células que expõem FT, não tendo um papel importante nessa fase de iniciação da coagulação (**Figura 1**) (HOFFMAN *et al.*, 1995).



**Figura 1 – Iniciação da coagulação (Adaptado de Hoffman & Monroe, 2007).**

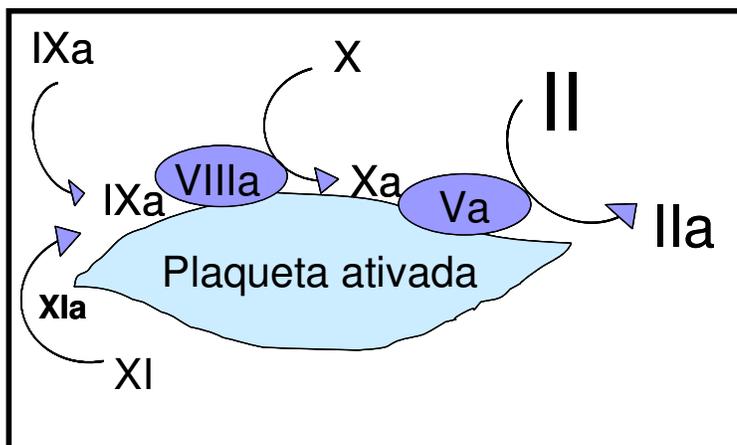
A pequena quantidade de trombina gerada sobre as células que expressam FT amplia o processo de sua própria geração, pois é responsável por ativar plaquetas, fator V (F V), fator XI (F XI), fator VIII (F VIII) e dissociar F VIII do FvW. Assim, o processo de coagulação é efetivamente iniciado, amplificando a resposta procoagulante (fase de amplificação) (**Figura 2**).



**Figura 2 – Amplificação da coagulação (Adaptado de Hoffman & Monroe, 2007).**

A atividade do F Xa formado a partir do complexo F VIIa/FT é restrita à células que expressa FT, porque o F Xa que se dissocia da superfície celular é rapidamente inibido pelo TFPI (*tissue factor pathway inhibition*) ou pela antitrombina (AT) na fase fluida. Ao contrário, o F IXa pode se difundir para a superfície plaquetária adjacente, por não sofrer ação desses inibidores e então se ligar ao receptor da superfície plaquetária, interagindo com seu cofator, F VIIIa, e ativar o F X (RAWALA-SHEIKH *et al.*, 1992; MONROE *et al.*, 1996; OLIVER *et al.*, 1999).

As plaquetas têm o papel de direcionar as reações da coagulação para o local lesado e de fornecer a superfície primária para a geração de grandes quantidades de trombina, necessária para efetiva hemostasia (fase de propagação). Uma vez que as plaquetas são ativadas, os cofatores Va e VIIIa rapidamente posicionam sobre a superfície plaquetária (MONROE *et al.*, 1994). O F XI também se liga à superfície plaquetária e é ativado pela trombina formada primariamente, não sendo necessária a presença de F XIIa. O F XIa ligado à plaqueta pode ativar mais F IX a F IXa. Após o complexo tenase (F IX/F VIIIa) ter sido formado sobre a plaqueta, o F X plasmático é ativado a F Xa na superfície plaquetária. O FXa associa ao F Va auxiliando na geração de trombina em quantidade suficiente para produzir um coágulo de fibrina estável (**Figura 3**) (BAGLIA & WALSH, 1998; OLIVER *et al.*, 1999).



**Figura 3** – Propagação da coagulação (Adaptado de Hoffman & Monroe, 2007).

A protrombina sofre uma primeira clivagem e a liberação de um fragmento inativo (fragmento 1+2 da protrombina/F1+2). A seguir ocorre uma segunda clivagem que resulta na formação da trombina. Os níveis de F1+2 refletem a atividade enzimática do fator Xa sobre a protrombina e constitui um marcador de geração de trombina (COLVIN, 2004).

O último estágio da coagulação envolve a clivagem do fibrinogênio (fator I) pela trombina (fator II), resultando na formação de fibrina. O fibrinogênio é um dímero onde cada monômero está constituído de três cadeias distintas,  $\alpha$ A,  $\beta$ B e  $\delta$ . A trombina atua sobre a molécula do fibrinogênio liberando o peptídeo A da cadeia  $\alpha$  e, posteriormente, o peptídeo B da cadeia  $\beta$ , dando origem aos fibrinopeptídeos A e B (FPA e FPB). Os monômeros de fibrina, assim formados, polimerizam-se

espontaneamente, dando origem ao polímero de fibrina (SCAZZIOTA & ALTMAN, 1995).

A trombina gerada na superfície plaquetária estabiliza o coágulo por ativar fator XIII (F XIII) (LORAND, 2001), TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) (BAJZAR *et al.*, 1995) e por clivar o receptor PAR-4 plaquetário (OFOSU, 2003). O FXIIIa age na formação de ligações covalentes entre os monômeros de fibrina adjacentes, gerando as ligações cruzadas do coágulo, importantes por aumentar a rigidez e resistência à fibrinólise induzida pela plasmina (DAVIE *et al.*, 1991; COLVIN, 2004; STEGNAR *et al.*, 2004).

Embora cada etapa do modelo baseado em células seja representada como reações isoladas, incluindo iniciação, amplificação e propagação, elas devem ser vistas como eventos contínuos sobrepostos (HOFFMAN & MONROE, 2007).

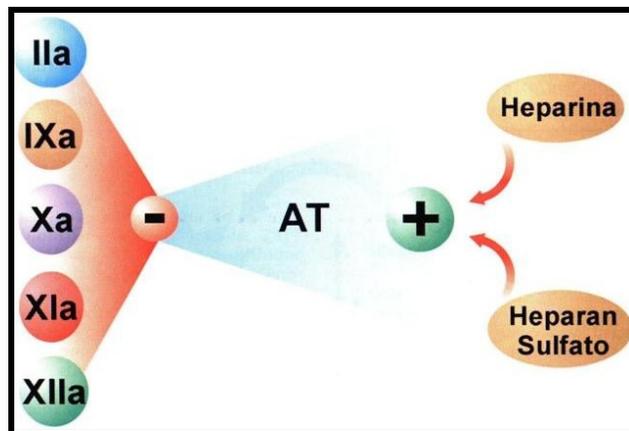
## 2.4 Inibidores endógenos da coagulação sanguínea

Uma vez formado o coágulo de fibrina sobre a área da lesão, o processo de coagulação deve ser limitado para evitar oclusões trombóticas em áreas adjacentes normais. Os processos procoagulantes são atenuados por uma variedade de inibidores, que são serino proteases inativas ou cofatores.

Os quatro principais inibidores fisiológicos da coagulação são a antitrombina (AT), as proteínas C e S (PC e PS) e o TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*).

A AT é uma glicoproteína produzida pelo fígado, que forma com a trombina e outras serino proteases ativas, incluindo os fatores IXa, Xa e XIa, um complexo estequiométrico, inativando essas enzimas. A AT também acelera a dissociação do complexo F VIIa/FT. A AT age como um inibidor direto da trombina, limitando a geração descontrolada da mesma e a consequente propagação de trombo. Este processo é acelerado em 1000 vezes pela heparina ou substâncias endógenas semelhantes à heparina. Os níveis do complexo trombina-antitrombina (TAT) expressam a quantidade de trombina presente na circulação e esse complexo é considerado um indicador de hipercoagulabilidade (CROWTHER & KELTON, 2003; HOFFMAN, 2003; COLVIN, 2004; STEGNAR *et al.*, 2004).

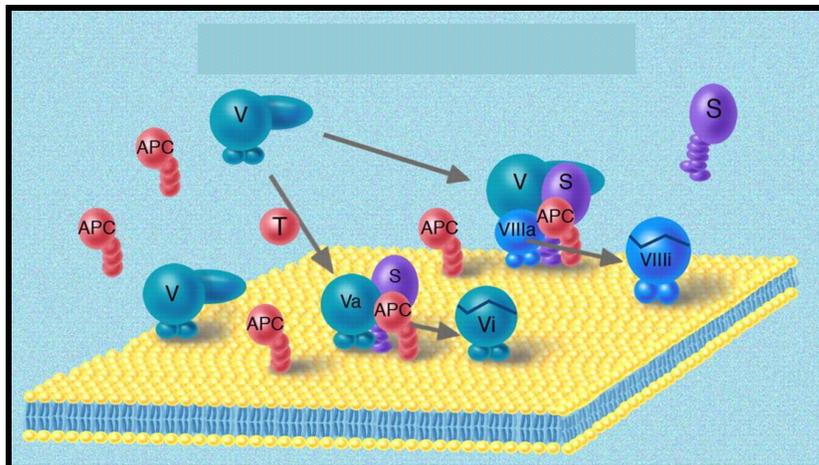
O mecanismo de ação da AT descrito anteriormente se encontra esquematizado na **Figura 4**.



**Figura 4 – Mecanismo de ação da AT (FRANCO, 2001).**  
AT: antitrombina

As proteínas S e C são sintetizadas no fígado na presença de vitamina K. Quando a trombina alcança uma célula endotelial intacta, ela se liga a uma glicoproteína na superfície dessa célula, a trombomodulina (TM) o que resulta na ativação da PC. A proteína C ativada (PCa) atenua a reação de coagulação pela quebra proteolítica e, conseqüentemente, por inativação dos fatores Va e VIIIa. A PS atua como um cofator não enzimático. Em condições normais, cerca de 40% da PS circula na forma livre, enquanto 60% está complexada com o C4b, uma proteína plasmática do sistema complemento. Apenas a PS livre é funcionalmente ativa e capaz de se ligar à PCa. Embora a trombina tenha função procoagulante, quando gerada em excesso passa a atuar como um anticoagulante potente, tendo em vista que sua ligação à TM endotelial representa o evento chave para ativação da via inibitória da PC (WALKER, 1984; BROZE, 1992; FRANCO, 2001; HOFFMAN, 2003, NORRIS, 2003).

A seqüência de eventos descrita anteriormente se encontra esquematizada na **Figura 5**.

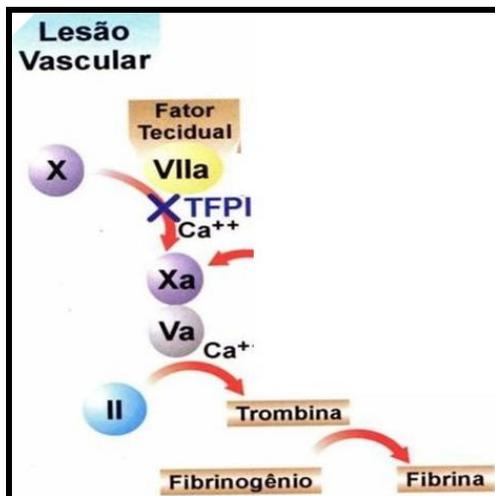


**Figura 5 - Mecanismo de ação da proteína C/ proteína S (Adaptada de Dahlback, 2008). APC: activated protein C**

O TFPI é uma proteína produzida pelas células endoteliais e apresenta três domínios do tipo “kunitz”. O primeiro domínio liga-se ao complexo F VIIa/FT, inibindo-o, e o segundo domínio liga-se e inibe o F Xa. Assim, a ativação direta do F X é regulada negativamente de modo rápido na presença do TFPI, que limita, dessa forma, a produção de F Xa e F IXa. A ligação do F Xa é necessária para que o TFPI exerça seu papel inibitório sobre o complexo F VIIa/FT (BROZE, 1992).

Dessa forma, o papel primário dos anticoagulantes naturais é prevenir a geração de trombina sobre células endoteliais saudáveis e, por conseguinte, limitar a formação de trombina à área imediata da lesão. Em condições fisiológicas (ausência de lesão vascular), há predomínio dos mecanismos anticoagulantes sobre os procoagulantes, o que garante a fluidez do sangue e mantém os vasos desobstruídos (HOFFMAN, 2003).

A seqüência de eventos descrita anteriormente se encontra esquematizada na **Figura 6**.



**Figura 6 – Mecanismo de ação do TFPI (FRANCO, 2001).**  
 TFPI: *tissue factor pathway inhibitor*

## 2.5 Fibrinólise

Após a reconstituição da parede vascular, o coágulo formado no vaso sanguíneo é efetivamente degradado e removido pelo sistema fibrinolítico (HOFFMAN & MONROE, 2007).

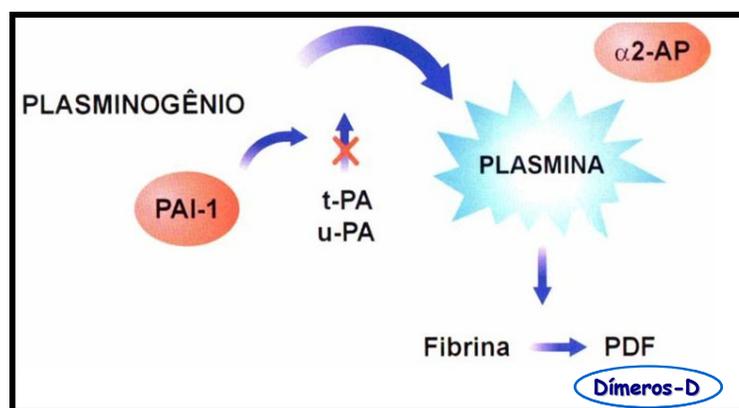
A enzima responsável por este processo é a plasmina, uma serino protease que cliva a fibrina em produtos de degradação solúveis. A plasmina é formada a partir da sua pró-enzima inativa, o plasminogênio, por ação de dois ativadores fisiológicos: o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA, *tissue plasminogen activator*), que é sintetizado pelas células endoteliais e representa o principal responsável pela lise do coágulo; e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA, *uroquinase plasminogen activator*). O u-PA é produzido em vários órgãos, principalmente próstata, útero e coração (VERSTRAETE & VERMYLEN, 1989). O plasminogênio é encontrado no plasma em concentrações muito maiores que seus ativadores; portanto, a disponibilidade dos dois ativadores de plasminogênio no plasma geralmente determina a extensão da formação de plasmina (HOFFMAN & MONROE, 2007). Trombina e oclusão venosa estimulam a liberação do t-PA pelas células endoteliais (SZYMANSKI *et al.*, 1994). O plasminogênio e o t-PA se ligam ao polímero de fibrina. Uma vez que o plasminogênio é ativado em plasmina, essa cliva

a fibrina em resíduos específicos de lisina e arginina, resultando na dissolução do coágulo (HOFFMAN & MONROE, 2007).

A plasmina age sobre o fibrinogênio resultando na formação dos fragmentos X, D, Y e E, também chamados de produtos de degradação do fibrinogênio (FgDP, *fibrinogen degradation products*) e sobre o polímero de fibrina, resultando nos produtos de degradação da fibrina (FbDP, *fibrin degradation products*), entre eles os dímeros-D (D-Di), que resultam da degradação das ligações cruzadas da fibrina. Os níveis de D-Di encontram-se elevados em indivíduos com trombose e aterosclerose, e têm sido utilizados como indicadores de hipercoagulabilidade e subsequentes eventos cardiovasculares (RIJKEN & SAKHAROV, 2001; NARAYANAN & HAMASAKI, 1998).

A inibição do sistema fibrinolítico ocorre ao nível dos ativadores do plasminogênio mediante ação de inibidores específicos. O principal inibidor do t-PA é o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1), que é sintetizado pelas células endoteliais. A plasmina livre circulante é rapidamente inativada pelo seu inibidor específico, a  $\alpha$ 2-antiplasmina, com a qual forma o complexo plasmina-antiplasmina (PAP). A ligação da trombina com a TM e a plasmina ativam a proteína denominada inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI- *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*), que promove a quebra de resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo, resultando na perda dos sítios de ligação para o t-PA e plasminogênio na fibrina e retardo da fibrinólise (BAJZAR *et al.*, 1995; COLVIN, 2004; FRANCO, 2001).

A sequência de eventos descrita anteriormente se encontra esquematizada na **Figura 7**.



**Figura 7** - Mecanismos de ativação e inibição do sistema fibrinolítico (Adaptado de FRANCO, 2001).  $\alpha$ 2-AP:  $\alpha$ 2-antiplasmina; PDF: produtos de degradação da fibrina.

## 2.6 Mutações que predisõem a trombofilia

A trombofilia hereditária consiste em uma tendência genética para a ocorrência de eventos tromboembólicos. A maioria dos fatores genéticos que predisõem à trombose compromete o balanço natural entre os componentes procoagulantes e anticoagulantes do sangue (DAHLBACK, 2000).

A ocorrência de trombose venosa esporádica, associada a uma alteração genética isolada, é relativamente baixa. No entanto, a presença de mutações em vários genes ou a associação a outros fatores de risco aumenta significativamente as chances de ocorrência da doença. Apesar da patogênese da trombose venosa ainda não estar completamente elucidada, evidências fortes indicam que a interação entre os fatores genéticos e ambientais tem grande influência na ocorrência da mesma. Pacientes com trombofilia hereditária exibem, em situações de risco para trombose tais como gravidez, uso de contraceptivo oral ou cirurgia ortopédica, maior risco de desenvolverem trombose venosa. Além disso, apresentam predisposição aumentada à trombose venosa recorrente e o evento trombótico ocorre em geral antes dos 45 anos de idade (VANDENBROUCKE *et al.*, 1994; McCOLL *et al.*, 1999; LOWE *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2001).

Os principais fatores genéticos associados à trombofilia incluem as mutações nos genes responsáveis pela síntese dos fatores V e II da coagulação, as deficiências dos anticoagulantes naturais (AT, PC e PS), a disfibrinogenemia e a hiperhomocisteinemia, que pode ser resultante da mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (POORT *et al.*, 1996; ROSENDAAL *et al.*, 1998; FRANCO, 2001b; BAUER, 2003).

Mais recentemente, estudos caso controle encontraram outros marcadores que estão associados ao aumento do risco de trombose venosa: mutações nos genes de inibidores da coagulação, como t-PA e TFPI, e outros como PAI-1 e receptor endotelial de PC (EPCR) (LANE & GRANT, 2000; BERTINA, 2001).

Dahlback e Hildebrand (1994) observaram que o plasma proveniente de vários pacientes que sofreram trombose venosa foi resistente à ação da PCa, ou seja, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) destes pacientes não se prolongava após adição de PCa quando comparado ao plasma de pacientes sem história de trombose venosa. Subsequentemente, alguns estudos demonstraram que cerca de 90% dos pacientes com resistência à PCa têm um alelo do F V que é

resistente ao efeito proteolítico da PCa. Esse alelo, o fator V Leiden (FVL), resulta da transição de uma guanina (G) para uma adenina (A) no nucleotídeo 1691 (G1691A), no exon 10 do gene do F V. Isso acarreta a troca de uma arginina (Arg) por uma glutamina (Glu) na posição 506, local onde o F V é reconhecido, clivado e inativado pela PCa. Dessa forma, o F V resultante do alelo mutante é ativado pelo F Xa, mas não é inativado corretamente pela PCa, resultando num quadro de hipercoagulabilidade (BERTINA *et al.*, 1994).

O FVL está presente em aproximadamente 5% das pessoas saudáveis do norte da Europa, em 10% dos pacientes apresentando trombose venosa e em 30 a 50% dos pacientes investigados para algum evento trombofílico (LEE *et al.*, 1996; RIDKER *et al.*, 1995; SALOMON *et al.*, 1999; RIDKER *et al.*, 1997). A frequência do FVL varia com a etnia, sendo comum em descendentes caucasianos, mas raro em descendentes africanos ou asiáticos do extremo oriente (RIDKER *et al.*, 1997).

Os pacientes heterozigotos portadores do FVL têm um risco relativamente baixo de sofrer trombose. Um estudo transversal feito na Itália demonstrou que apenas 6% dos portadores do FVL, próximos aos 65 anos de idade, apresentaram tromboembolismo venoso e a maioria dos eventos trombóticos ocorreu na vigência de outro fator de risco, tais como cirurgia (RODEGJIEO *et al.*, 1999). Já a presença desta condição em homozigose está associada a um risco de 50 a 100 vezes maior de desenvolver trombose venosa (ROSENDAAL *et al.*, 1995; LANE & GRANT, 2000; FRANCO, 2001b).

Arruda *et al.* (1995) encontraram 20% de heterozigotos para o FVL entre pacientes brasileiros que sofreram trombose venosa e/ou embolismo pulmonar sem outros fatores de risco associados e, na população controle com 100 indivíduos, essa mutação foi encontrada em 2%.

A mutação no gene da protrombina (G20210A) foi descrita pela primeira vez em 1996 por Poort e colaboradores. Estes pesquisadores observaram que 18% dos pacientes selecionados com trombose venosa e cerca de 1% dos indivíduos hígidos do grupo controle eram portadores dessa mutação. A mutação pontual no gene do fator II, que consiste na transição de uma guanina (G) para uma adenina (A) na posição 20210, está localizada no último nucleotídeo da região 3' não traduzida do cDNA, justamente antes do sítio de fixação da cauda de poli A. Essa alteração aumenta a estabilidade do RNA mensageiro, resultando em alta concentração plasmática de protrombina que leva à formação aumentada de trombina e,

consequente, aumento da taxa de conversão de fibrinogênio em fibrina (POORT *et al.*, 1996). Esta mutação é prevalente em 5 a 10% dos pacientes que já sofreram trombose e em aproximadamente 15% dos pacientes investigados para trombofilia (ROSENDAAL *et al.*, 1998; SALOMON *et al.*, 1999).

Da mesma forma que o FVL, a mutação G20210A no gene da protrombina é extremamente rara em populações africanas e asiáticas (ROSENDAAL *et al.*, 1998). Ainda não está claro o mecanismo pelo qual a transição de G → A no nucleotídeo 20210 causa a elevação dos níveis de protrombina no plasma. Várias hipóteses foram feitas, incluindo o aumento da transcrição do gene ou uma tradução mais eficiente (POORT *et al.*, 1996; LANE & GRANT, 2000; BERTINA, 2001). A mutação G20210A no gene da protrombina é considerada a segunda alteração genética mais frequentemente associada às trombofilias (FRANCO, 2001b).

O risco relativo de desenvolver trombose em portadores da mutação G20210A no gene da protrombina é de duas a quatro vezes maior se comparado com não portadores (POORT *et al.*, 1996). Arruda *et al.* (1997) encontraram em um grupo controle hígido composto por 295 indivíduos brasileiros, 0,7% de heterozigotos e no grupo de 116 indivíduos que sofreu trombose venosa, 4,3%. Entre aqueles que sofreram trombose sem outro fator de risco, os heterozigotos passaram a ser 3,5%. Em brasileiros descendentes de africanos, a prevalência de heterozigotos foi 2%.

Os mecanismos pela qual a hiperhomocisteinemia predispõe à trombose incluem ativação endotelial, proliferação de células musculares lisas, diminuição da produção de óxido nítrico e prostaciclina, maior depósito de LDL na parede arterial e ativação de monócitos (CATTANEO, 1999). A hiperhomocisteinemia pode ser congênita ou adquirida. As formas adquiridas estão associadas à deficiência de folato, vitaminas B<sub>12</sub> ou B<sub>6</sub>. Já a forma congênita resulta principalmente das mutações nos genes das enzimas MTHFR ou da cistationina β-sintase (CBS) (GOYETTE *et al.*, 1995; MUDD *et al.*, 1985). Numerosas alterações genéticas envolvendo estas enzimas foram descritas, mas a maior parte dessas é rara e de importância clínica somente quando presentes em homozigose.

Em estudos realizados no Estado de Minas Gerais (DE PAULA SABINO *et al.*, 2006; DE PAULA SABINO *et al.*, 2007), onde foi avaliada a presença de trombofilias em pacientes jovens, foi observado que o FVL e a mutação no gene da protrombina foram detectados em heterozigose em 1,2% e 3,1% dos indivíduos hígidos e em

6,9% e 5,1% dos pacientes que desenvolveram trombose venosa, respectivamente. Já a mutação no gene da MTHFR foi detectada nos indivíduos hígidos e nos pacientes com trombose venosa na frequência de 35,2% e 42,5% em heterozigose e 8,9 % e 6,5% em homozigose, respectivamente. Apenas a presença do FVL mostrou-se um fator de risco importante para o desenvolvimento de trombose venosa e de trombose arterial, tanto em pacientes que não apresentavam fatores de risco adquiridos concomitantes, como naqueles em que estes fatores estavam presentes.

A deficiência de AT está presente em cerca de 0,2% da população geral e em 0,5 a 7,5% dos pacientes com tromboembolismo venoso. As deficiências de PC e PS estão presentes em 0,2% da população em geral e os indivíduos que sofreram trombose apresentam a frequência de 2,5 a 6% e 1,3 a 5%, respectivamente. A maioria dos pacientes com trombose e deficiência das proteínas C ou S têm níveis de PC e PS livre cerca de 50% e 50-75% do normal, respectivamente (CROWTHER & KELTON, 2003). Embora as deficiências de AT, PC e PS sejam fatores de risco independentes para trombose venosa, em conjunto, estas anormalidades são responsáveis por apenas 5% a 10% do total de casos da doença em diferentes populações. Além disso, a grande heterogeneidade de alterações moleculares relacionadas às deficiências de AT, PC e PS dificulta a utilização de métodos moleculares para investigação rotineira destes estados trombofílicos. Dessa forma, o diagnóstico dessas deficiências tem sido estabelecido pela dosagem das respectivas proteínas no plasma utilizando métodos funcionais ou imunológicos (FRANCO, 2001b).

## **2.7 Sistema ABO e predisposição à trombose venosa**

### **2.7.1 Grupo Sanguíneo ABO**

O sistema de grupo sanguíneo ABO foi proposto por Karl Landsteiner no início do século XX. Embora grande conhecimento tenha sido obtido acerca dos antígenos de superfície das hemácias, o grupo sanguíneo ABO é considerado até hoje o mais importante dos grupos sanguíneos. Os antígenos do sistema ABO são resíduos terminais encontrados nos hidratos de carbonos presentes na superfície

das células e secreções. São sintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no gene ABO, que incorporam moléculas de açúcar sobre um tetrassacarídeo cujo resíduo terminal é uma galactose. A adição de uma fucose à galactose terminal produz o antígeno H (WATKINS, 1966).

Os alelos A e B codificam diferentes glicosiltransferases (A e B) que adicionam N-acetilgalactosamina e D-galactose à substância H, transformando-a em antígeno A e antígeno B, respectivamente. Os indivíduos do grupo sanguíneo O possuem o alelo O, que não codifica uma enzima funcional e, conseqüentemente, continuam a expressar apenas o antígeno H (LOWE, 1993).

Numa amostragem de doadores da Fundação Hemominas/MG, foi obtida a distribuição dos grupos sanguíneos, que é representativa do Estado de Minas Gerais, como mostra o **Quadro 1**.

**Quadro 1 - Distribuição dos grupos sanguíneos numa amostragem de doadores da Fundação Hemominas/MG (estimativa para população geral de Minas Gerais).**

| Grupo sanguíneo | Total  | Rh Positivo | Rh Negativo |
|-----------------|--------|-------------|-------------|
| <b>O</b>        | 47,3%  | 42,0%       | 5,3%        |
| <b>A</b>        | 36,3%  | 32,2%       | 4,1%        |
| <b>B</b>        | 12,5%  | 11,1%       | 1,4%        |
| <b>AB</b>       | 3,9%   | 3,5%        | 0,4%        |
| <b>Total</b>    | 100,0% | 88,8%       | 11,2%       |

Fundação Hemominas/MG, 2006

### **2.7.2 Sistema ABO, F VIII, FvW e trombose venosa**

Os grupos sanguíneos “não O” estão associados a níveis plasmáticos mais elevados de F VIII e FvW que o grupo sanguíneo “O” (KAMPHUISEN *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007). A elevação dos níveis plasmáticos de FVIII está associada ao aumento do risco de trombose venosa, doenças coronarianas, isquêmicas e cerebrovasculares (SOUTO *et al.*, 2000).

Vários fatores têm sido correlacionados ao aumento dos níveis plasmáticos de F VIII, como diabetes mellitus, concentrações plasmáticas elevadas de insulina, fibrinogênio, triglicérides, uso de contraceptivos orais, dentre outros. Variações no

gene do F VIII aumentam sua expressão, enquanto variações no gene do FvW aumentam sua afinidade pelo F VIII. A diminuição (genética ou adquirida) no clearance do F VIII e FvW e variações em outros genes envolvidos na biossíntese de FvW também constituem possíveis determinantes de níveis plasmáticos elevados de F VIII (CONLAN *et al.*, 1993; CUSHMAN, *et al.*, 1996; FOLSOM, *et al.*, 1997). Grande parte dos efeitos do grupo sanguíneo sobre os níveis plasmáticos de F VIII é mediada pelo FvW.

Orstavik *et al.* (1985) observaram que 66% das variações nos níveis plasmáticos do FvW foram resultantes de alterações genéticas e que 30% dessas alterações estavam relacionadas ao efeito dos grupos sanguíneos ABO. Outros estudos têm relatado que indivíduos do grupo "O" têm níveis plasmáticos de FvW menores que os indivíduos "não O". Em um grande estudo envolvendo 1.117 indivíduos hígidos conduzido por Gill *et al.* (1987), os níveis plasmáticos do FvW foram menores nos indivíduos do grupo "O" e maiores nos indivíduos do grupo AB. Além dos estudos sobre o fenótipo ABO, outros pesquisadores avaliaram a relação entre o genótipo ABO e os níveis plasmáticos do FvW e encontram níveis menores desse parâmetro no genótipo OO. No entanto, todos os estudos observaram também que os indivíduos heterozigotos para o alelo O (genótipos AO e BO) apresentavam níveis plasmáticos de FvW significativamente menores que os não carreadores do alelo O (genótipos AA, AB e BB) (SHIMA *et al.*, 1995; SOUTO *et al.*, 2000; SOUSA *et al.*, 2007).

O FvW é uma das poucas proteínas não eritrocitárias que se liga aos antígenos ABO. As estruturas oligossacarídicas ABH têm sido identificadas sobre as cadeias oligossacarídicas do FvW localizadas no domínio A1, o qual contém sítios de ligação para a glicoproteína plaquetária GPIb (MATSUI *et al.*, 1992). O'Donnell *et al.*, (2002) observaram uma relação direta entre o genótipo ABO, a expressão da transferase A e a quantidade de antígeno A expresso sobre o FvW circulante. O mecanismo pelo qual os determinantes ABH influenciam os níveis plasmáticos do FvW ainda não está esclarecido e algumas hipóteses têm sido propostas para explicar esse fenômeno (JENKINS & O'DONNELL, 2006). Primeiramente, existe a hipótese que os antígenos ABO influenciam a taxa de síntese ou secreção do FvW pelas células endoteliais (MOELLER *et al.*, 2001). Segundo, há evidências de que os determinantes do grupo sanguíneo O estão associados ao aumento do *clearance* hepático do FvW (VLOT *et al.*, 2000). Este grupo observou que o F VIII infundido em

pacientes com hemofilia A desaparece mais rapidamente nos pacientes do grupo “O” comparados aos do grupo “não O”. Finalmente, estudos recentes sugeriram que os determinantes do grupo sanguíneo ABO podem influenciar a suscetibilidade do FvW plasmático à proteólise pela ADAMTS-13 (JENKINS & O’DONNELL, 2006).

Bowen (2003) purificou FvW de indivíduos de diferentes grupos sanguíneos ABO, incubou com ADAMTS-13 derivada de plasma humano e observou que a proteólise do FvW foi significativamente mais rápida no grupo “O” comparada aos grupos “não O”. Adicionalmente, o fenótipo Bombay mostrou-se associado ao aumento da suscetibilidade à proteólise pela ADAMTS-13 (O’DONNELL *et al.*, 2005). Estes dados permitiram sugerir que a composição das cadeias oligossacarídicas pode estar envolvida na estabilidade da conformação da região de clivagem do FvW pela ADAMTS-13, de modo que a remoção de um açúcar terminal permite que o domínio A2 adote uma conformação mais permissiva à clivagem por esta enzima (FRANCHINI *et al.*, 2007).

Morelli *et al.* (2005) estudaram o efeito do genótipo do sistema ABO e o risco de trombose venosa profunda numa população de 471 pacientes que tiveram trombose venosa e 471 indivíduos sem histórico de eventos trombóticos (controles). No grupo dos pacientes, todos os genótipos “não O” (70,9%), exceto homozigotos  $A^2A^2$  ou heterozigotos  $A^2O^1$  /  $A^2O^2$  (7,2%), apresentaram maior risco de ocorrência de trombose quando comparados àqueles com genótipo OO (29,1%). Além disso, entre os 471 pacientes estudados, 92 (19,5%) apresentavam FVL, enquanto apenas 14 (3,0%) dos 471 indivíduos do grupo controle tinham essa mutação. Estes pesquisadores concluíram que a combinação dos genótipos dos grupos sanguíneos “não O” e o FVL, comparados com genótipos do grupo “O” sem o FVL, aumenta o risco de trombose venosa em 23 vezes.

Para elucidar o papel do grupo ABO, do FvW e do F VIII no processo de trombose venosa profunda, um estudo realizado com 301 pacientes e 301 indivíduos hígidos mostrou, pela análise univariada, que o risco de trombose aumentou com o aumento dos níveis de FvW e F VIII e foi maior em indivíduos “não O” que no grupo “O”. No entanto, na análise multivariada apenas o F VIII permaneceu como um fator de risco, sugerindo uma relação íntima entre grupo sanguíneo e concentração de FvW (KOSTER *et al.*, 1995).

Tirado *et al.* (2005) analisaram 250 pacientes com trombose venosa e 250 indivíduos hígidos e encontraram níveis de FvW mais elevados no grupo “não O”, o

qual foi mais frequente nos pacientes. No entanto, o risco atribuído ao FvW foi fortemente dependente do grupo sanguíneo, pois desaparecia após o ajuste para os grupos ABO. Resultados semelhantes foram encontrados por Ohira *et al.* (2007) no estudo LITE (*Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology*).

Recentemente, foi observado que os alelos  $A^1$ ,  $A^2$  e  $B$  do sistema ABO constituem fatores de risco independentes para a ocorrência de trombose venosa em indivíduos jovens da grande Belo Horizonte/MG (PAIVA *et al.*, 2009).

## 2.8 Hemodiálise e alterações hemostáticas

Admite-se que tanto a doença renal crônica, como o processo de hemodiálise podem alterar a função das plaquetas e dos sistemas da coagulação e da fibrinólise, contribuindo para complicações hemorrágicas ou trombóticas.

A hemorragia resulta de alterações consequentes à uremia, que incluem alterações da morfologia das paredes dos vasos, do fluxo sanguíneo na FAV e da função plaquetária (ERDEM *et al.*, 1996; SMITS *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2003).

Os eventos trombóticos são frequentes entre pacientes em estágio terminal da doença renal e contribuem para a alta morbidade e mortalidade cardiovascular nessa população. O aumento da tendência trombótica nos pacientes sob hemodiálise crônica resulta não apenas em doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral, tromboembolismo venoso, mas também na formação de trombos no acesso vascular para a diálise, especialmente em enxertos de PTFE. Tais complicações no acesso vascular, principalmente os eventos trombóticos, são responsáveis por cerca de 25% das hospitalizações dos pacientes em diálise (SMITS *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2003; BRONISZ *et al.*, 2004; KNOLL *et al.*, 2005).

Usualmente a trombose resulta de estenose causada por hiperplasia progressiva das camadas íntima ou fibromuscular no sistema do fluxo venoso. A estenose, por sua vez, resulta na redução da velocidade do fluxo sanguíneo, o que favorece a hipercoagulabilidade, a hipotensão e a hipovolemia. Estes fatores associados contribuem para a formação de trombos (WINDUS *et al.*, 1992).

As causas que resultam em trombose nos pacientes que fazem hemodiálise não estão completamente esclarecidas. Alguns dos fatores de risco descritos incluem diabetes mellitus, hipoalbuminemia, presença de anticorpos anticardiolipina,

aumento dos níveis séricos de lipoproteína (a) e de fibronectina, e idade avançada (PORILE & RICHTER, 1993; GOLDWASSER *et al.*, 1994; GOLDWASSER *et al.*, 1993). Ainda assim, uma porcentagem significativa de casos de trombose do acesso vascular continua sem explicação, sugerindo que há fatores predisponentes adicionais a serem descobertos.

### **2.8.1 Alterações plaquetárias**

As alterações observadas nas plaquetas de pacientes com uremia crônica incluem a diminuição da sensibilidade a agonistas plaquetários (CASTALDI *et al.*, 1966), aderência anormal dessas às superfícies estranhas (LARSSON, 1971; SALZMAN & NERI, 1966), atividade procoagulante reduzida (HOROWITZ *et al.*, 1970), diminuição da produção de tromboxano A<sub>2</sub> (REMUZZI *et al.*, 1983), aumento da adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (MATHIAS & PALINSKI, 1977), diminuição da retração do coágulo (LEWIS *et al.*, 1956) e diminuição da glicoproteína de membrana GPIb (SLOAND *et al.*, 1991).

O acúmulo de várias toxinas, tais como a uréia e outros componentes nitrogenados, ácido guanidinosuccínico, fenóis e um grupo de substâncias chamadas de “moléculas intermediárias urêmicas” é, pelo menos em parte, responsável pela disfunção plaquetária (BAZILINSKI *et al.*, 1985; DAVIS *et al.*, 1972; EKNOYAN *et al.*, 1969; RABINER & MOLINAS, 1970; ZWAGINGA *et al.*, 1991). Na maioria destes pacientes, o tempo de sangramento é prolongado e a agregação plaquetária é anormal. A hemodiálise ou a diálise peritoneal corrigem parcialmente essas anormalidades, por removerem parte das toxinas (SLOAND & SLOAND, 1997).

Um outro fator plasmático sugerido como importante na redução da agregação plaquetária são os fragmentos de fibrinogênio, que podem ocupar algumas das glicoproteínas GPIIb/IIIa da membrana plaquetária, impedindo assim, a ligação do fibrinogênio intacto e, conseqüentemente, a ligação cruzada entre plaquetas adjacentes para formar o tampão plaquetário (SREEDHARA *et al.*, 1996). Kozek-Langenecker *et al.* (1999) demonstraram que os fragmentos de fibrinogênio diminuem a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) normal, assim como em plaquetas normais isoladas. Relataram, ainda, diminuição da

disponibilidade dos receptores plaquetários do fibrinogênio determinada pela redução da ligação dos anticorpos anti-GPIIIa (anti-CD61) e diminuição da ligação do fibrinogênio marcado com  $I^{125}$  às plaquetas ativadas por adenosina difosfato (ADP) na presença desses fragmentos.

Sloand *et al.* (1997) observaram que a hemodiálise pode estar associada à disfunção plaquetária transitória, determinada pelo prolongamento do tempo de sangramento imediatamente após a hemodiálise comparado àquele obtido imediatamente antes do procedimento. No dia seguinte à hemodiálise, o tempo de sangramento volta ao normal. Na maioria dos pacientes, o prolongamento do tempo de sangramento foi associado à diminuição da sensibilidade das plaquetas à trombina, bem como a diminuição da aglutinação dessas em resposta à ristocetina. A ligação de anticorpos monoclonais às glicoproteínas da membrana plaquetária também foi significativamente afetada pela hemodiálise. Nos dez pacientes examinados por estes pesquisadores, a ligação dos anticorpos anti-GPIIb (anti-CD42b) mostrou-se diminuída imediatamente após a hemodiálise e aumentou no dia seguinte, correlacionando com as alterações do tempo de sangramento e da sensibilidade diminuída à trombina.

Outros trabalhos mostraram uma diminuição da expressão de GPIIb, que está associada à gravidade da doença renal. A expressão de GPIIb nas plaquetas estimuladas foi maior nos pacientes sob hemodiálise que nos pacientes com doença renal crônica e no grupo controle. Já a expressão de GPIIb/IIIa foi semelhante nos três grupos (LIANI *et al.*, 1996a; MOAL *et al.*, 2003; SALVATI & LIANI, 2001). Malyszko *et al.* (1996) observaram, ainda, uma menor agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, ácido araquidônico e ristocetina em pacientes com uremia crônica comparados a voluntários hígidos.

As anormalidades plaquetárias, a princípio, favorecem uma tendência ao sangramento. No entanto, em algumas circunstâncias, podem levar a um aumento das complicações trombóticas. Apesar dos estudos citados anteriormente sugerirem uma diminuição da expressão ou uma ativação anormal dos receptores das plaquetas (GPIIb e GPIIb/IIIa), um aumento no número de receptores plaquetários pode estar relacionado à obstrução do acesso vascular à hemodiálise (LIANI *et al.*, 1996b). Além disso, a hemodiálise pode ativar plaquetas, devido ao atrito destas com o circuito extracorpóreo (*shear stress* ou força de cisalhamento) e à turbulência

no acesso vascular (CASES *et al.*, 1993; HAKIM & SCHAFER, 1985; TURITO & HALL, 1998; VIENER *et al.*, 1986).

A superfície artificial do enxerto de PTFE, e em menor extensão da FAV nativa, promove a adesão de fibrinogênio, favorecendo a formação do coágulo no local de acesso vascular (SALZMAN *et al.*, 1987; SAVAGE & RUGGERI, 1991). O fibrinogênio plasmático, que está aumentado nos pacientes submetidos à hemodiálise, adere à glicoproteína GPIIb/IIIa da superfície plaquetária e, em seguida, liga-se a outras plaquetas não ativadas, tornando-as ativadas e favorecendo a agregação (SAVAGE & RUGGERI, 1991). Confirmando estes dados, Windus *et al.* (1995) demonstraram a deposição de plaquetas ao longo da superfície do acesso vascular.

Outro fator que pode contribuir para a ativação plaquetária é a ativação do fator de contato, F XII, levando à formação de trombina local, ativação e aumento da deposição das plaquetas (COLMAN *et al.*, 1987). As plaquetas ativadas liberaram fatores (*PDGF*, *platelet-derived growth factor*, por exemplo) que contribuem para o aumento da hiperplasia no acesso vascular, reduzindo o fluxo sanguíneo e facilitando a agregação de outras plaquetas ativadas e não-ativadas (SMITS *et al.*, 2000).

Chuang *et al.* (2003) investigaram a relação entre ativação plaquetária e sobrevida do acesso vascular em pacientes sob hemodiálise e demonstraram que a maioria dos pacientes com falha recorrente do acesso vascular tem maior quantidade de plaquetas ativadas circulantes. As plaquetas ativadas predispõem à hipercoagulabilidade, o que justificaria a frequente ocorrência de trombose no acesso vascular.

### **2.8.2 Alterações dos fatores da coagulação e fibrinólise**

O processo de hemodiálise pode influenciar o sistema hemostático de duas formas distintas. Primeiro, pelo efeito do procedimento em si, como o contato dos constituintes do sangue com superfícies de membranas de diálise carregadas negativamente (tais como as de poliacrilonitrila), a composição do circuito extracorpóreo e as condições do fluxo dentro do circuito. Segundo, pelo efeito de

anticoagulantes adicionados ao líquido de diálise (BARTELS *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2003; SABOVIC *et al.*, 2005).

A hemodiálise provoca um fluxo sanguíneo turbulento, que resulta na agregação das plaquetas e na ativação dos leucócitos. Os granulócitos aderidos à membrana de diálise liberam o conteúdo de seus grânulos e os monócitos expressam FT, um potente ativador de cascata de coagulação (FISCHER, 2007).

O controle do mecanismo hemostático em pacientes submetidos à hemodiálise é de extrema importância, visando garantir a qualidade do acesso vascular e prevenir a formação de trombos nesta área. Dessa forma, torna-se importante investigar a hemostasia em pacientes sob hemodiálise, bem como monitorar as alterações que ocorrem durante a diálise, objetivando a implementação de regimes adequados de anticoagulação (AMBUHL *et al.*, 1997).

A lesão endotelial é frequente em pacientes com DRC, provavelmente em consequência da retenção de toxinas urêmicas, dislipidemia, hipertensão, hiperparatireoidismo, bem como dos níveis elevados de IL-1 e TNF- $\alpha$  (MALYSZKO *et al.*, 2001). Uma elevação das concentrações plasmáticas de algumas proteínas sintetizadas pelo endotélio vascular tem sido descrita em pacientes com doença renal crônica. O FvW, cuja liberação na circulação é induzida principalmente por ativação e secreção endotelial, está normalmente elevado na uremia (GORDGE & NEILD, 1991). A TM solúvel, considerada um marcador de lesão endotelial e que circula em pequenas quantidades em indivíduos hígidos, está elevada durante o estágio inicial da doença renal (ISHII *et al.*, 1991; GRIS *et al.*, 1994; HERGESELL *et al.*, 1993; TAKAGI *et al.*, 1994). O FT circulante solúvel, também considerado um marcador de lesão endotelial, mostrou-se aumentado em pacientes submetidos à hemodiálise (KARIO *et al.*, 1995; KOYAMA *et al.*, 1994). Com relação ao inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), que também é secretado pelas células endoteliais, tanto níveis plasmáticos normais (HONG & YANG, 1994; NAKAMURA *et al.*, 1992) como elevados (GRIS *et al.*, 1994; TAKAGI *et al.*, 1994) têm sido relatados em pacientes sob hemodiálise.

Mezzano *et al.* (1997) propuseram que a cadeia de eventos que leva ao prolongamento do tempo de sangramento nos pacientes com uremia crônica inclui a ativação e secreção endotelial, aumento da produção de trombina e plasmina, depleção do ADP e adenosina trifosfato (ATP) plaquetários e defeito na agregação e secreção plaquetária. Esses achados sugerem que um mecanismo comum, iniciado

pela ativação endotelial, poderia explicar ambos os riscos hemorrágicos e trombóticos nos pacientes com uremia crônica. Esses pesquisadores obtiveram um aumento dos marcadores de disfunção endotelial [FvW, TM solúvel e molécula de adesão intercelular-1 solúvel (ICAM-1)] e de ativação hemostática (TAT, F1+2, PAP, produtos de degradação do fibrinogênio e fibrina) em pacientes com uremia crônica antes de iniciar a diálise. Esses marcadores apresentaram associações positivas entre eles e foram correlacionados com a creatinina plasmática, indicando serem dependentes da gravidade da doença renal crônica. Além disso, o aumento da geração de trombina e de plasmina foram relacionados a defeitos plaquetários, determinados principalmente pelo tempo de sangramento anormal na uremia (MEZZANO *et al.*, 1996; Mezzano *et al.* 2001).

Rabelink *et al.* (1994) verificaram uma alteração dos fatores da coagulação em pacientes com doença renal, confirmando o estado da hipercoagulabilidade nesta condição. Corroborando com esta premissa, concentrações plasmáticas elevadas de fibrinogênio, D-Di, TAT, F VII e níveis reduzidos de PC, indicativos de estado trombofílico, foram descritos em pacientes portadores de doença renal terminal (LAI *et al.*, 1991; SAGRIPANTI *et al.*, 1993; VAZIRI *et al.*, 1994).

De Marchi *et al.* (1996) exploraram o impacto dos níveis plasmáticos de vários fatores de risco para trombose e para hiperplasia das camadas íntima ou muscular dos vasos, em pacientes sob hemodiálise com FAV acompanhados por dois anos. Dos 30 pacientes envolvidos no estudo, 11 desenvolveram estenose venosa progressiva, e em três desses ocorreu estenose recorrente que resultou em trombose. Foram encontrados níveis elevados de F1+2 e D-Di, indicando que a coagulação e a fibrinólise estavam ativadas nos pacientes submetidos à hemodiálise comparando com indivíduos hígidos (controle). Apesar destas anormalidades, os níveis de t-PA e PAI-1 não diferiram do grupo controle. Além disso, observaram concentrações plasmáticas reduzidas de PC e elevadas de fibrinogênio e F VII. Desses marcadores hemostáticos, apenas PAI-1 e F VII foram preditores independentes de disfunção da FAV.

Erdem *et al.* (1996) avaliaram os marcadores de ativação e/ou inibição da coagulação e fibrinólise (F1+2, TAT, t-PA, u-PA, plasminogênio, PAP,  $\alpha_2$ -antiplasmina e  $\alpha_2$ -macroglobulina) em 26 pacientes em estágio terminal da doença renal sob hemodiálise, e a possível contribuição da FAV nestes parâmetros. Concluíram que tanto a coagulação como a fibrinólise estão ativadas, e que a FAV

pode ser um fator independente para essa ativação. Este possível efeito sugere que as alterações do endotélio vascular e o aumento do fluxo sanguíneo podem contribuir para ativação local dos sistemas da coagulação e da fibrinólise, resultando em desequilíbrio entre esses sistemas que pode acarretar a formação de trombos na FAV.

Ambuhl *et al.* (1997) determinaram a condição hemostática de 39 pacientes antes e durante a hemodiálise, pela avaliação plasmática de F1+2, TAT e D-Di. Concluíram que o procedimento da hemodiálise resulta na ativação da coagulação e sugeriram que os níveis de TAT e F1+2, deveriam ser empregados individualmente para prescrição da terapia anticoagulante, especialmente em pacientes com risco elevado de ocorrência de trombose.

Song *et al.* (1999) avaliaram, em um estudo de coorte, a associação do fibrinogênio plasmático e a perda do acesso vascular por trombose em 102 pacientes submetidos à hemodiálise. Verificaram que tanto os níveis elevados de fibrinogênio, como a idade avançada, enxerto de PTFE e uso de eritropoetina são fatores de risco independentes para complicações do acesso vascular.

Bartels *et al.* (2003), em um estudo longitudinal envolvendo dez pacientes, avaliaram e quantificaram os efeitos da aplicação de membranas alternativas na hemodiálise (polimetilmetacrilato e polissulfona) sobre a ativação da coagulação. Estes pesquisadores concluíram que o procedimento de diálise com ambas as membranas estimulou o F XII e fibrinogênio e elevou os níveis de TAT, F1+2 e proteína precursora de trombo – (TpP).

Yu *et al.* (2003) avaliaram os níveis plasmáticos de D-Di, FT e F1+2 em 82 pacientes antes e após a hemodiálise. Os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de acesso vascular (FAV, enxerto protético ou cateter venoso central) e o dialisador (membranas de polissulfona ou acetato de celulose). Esses pesquisadores verificaram que as concentrações dos marcadores avaliados foram maiores antes da hemodiálise comparados com valores normais, e tenderam a aumentar durante o procedimento. Constataram, também, que os níveis plasmáticos dos parâmetros da coagulação foram menores nos pacientes com FAV nativa, porém nenhuma diferença foi encontrada considerando as duas membranas avaliadas.

Kushiya *et al.* (2003) analisaram a relação dos marcadores hemostáticos com a aterosclerose e a duração da hemodiálise. Não observaram diferença significativa nos valores de TTPa, tempo de protrombina (TP), FvW, TAT, TM, dentre outros em

relação à duração da hemodiálise. No entanto, concluíram que ocorrem alterações da hemostasia (aumento significativo do TTPa e dos níveis de fibrinogênio, D-Di, TM e PAI-1 e redução dos níveis de PC e AT) nos pacientes sob hemodiálise comparados a indivíduos hígidos, e essas podem constituir um fator de risco para doenças isquêmicas nestes pacientes.

Nampoory *et al.* (2003) em um estudo prospectivo, propuseram identificar os fatores de risco que poderiam estar associados com o desenvolvimento de hipercoagulabilidade em pacientes submetidos à hemodiálise e relacionar esses achados com episódios de trombose do acesso vascular. Fizeram também um estudo longitudinal acompanhando 20 pacientes que receberam transplante renal para verificar o efeito biológico do transplante sobre o estado de hipercoagulabilidade e detectar os marcadores hemostáticos relevantes. Concluíram que há um estado de hipercoagulabilidade nos pacientes submetidos à hemodiálise comparados aos indivíduos hígidos, e que a presença de anticorpo lúpico e deficiências de PC e PS tiveram uma associação significativa com trombose do acesso vascular. Concluíram, também, que as deficiências de PC, PS e antitrombina foram completamente corrigidas alguns meses após o transplante renal, o que permitiu inferir que a hipercoagulabilidade nesses pacientes representou essencialmente uma condição adquirida e reversível.

Com relação aos níveis de TFPI, resultados controversos têm sido encontrados na literatura. Um aumento de TFPI em pacientes submetidos à hemodiálise comparados com indivíduos hígidos foi relatado em diversos estudos (INOUE *et al.*, 2000; YORIOKA *et al.*, 1998; KARIO *et al.*, 1994). No entanto, Cella *et al.* (1996) relataram níveis normais de TFPI nestes pacientes. Kario *et al.* (1994) mostraram que o uso de heparina durante a sessão de hemodiálise aumenta os níveis da atividade do TFPI, enquanto que o uso de outros anticoagulantes não afeta esses níveis. Ao contrário, Cella *et al.* (1996) demonstraram que, na hemodiálise sem heparina, houve um aumento progressivo da atividade do TFPI. Yorioka *et al.* (1998) obtiveram níveis elevados de TFPI em pacientes sob hemodiálise com trombose do acesso vascular.

O sistema fibrinolítico foi avaliado por Bronisz *et al.* (2004) em 43 pacientes submetidos à hemodiálise, por meio da determinação dos níveis plasmáticos de u-PA antígeno, PAP, produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina (FDP) e atividades da pré-caliceína e do C1-inibidor, antes e após a hemodiálise. Esses

pesquisadores concluíram que os pacientes submetidos à hemodiálise apresentaram ativação do sistema fibrinolítico comparados com indivíduos hígidos, no entanto, não verificaram diferenças nesses parâmetros antes e após a hemodiálise.

Sabovic *et al* (2005) avaliaram a agregação plaquetária e os marcadores da coagulação (TAT, F1+2, D-Di e fibrinogênio) e da fibrinólise (plasminogênio, t-PA, PAI-1) antes e imediatamente após a sessão regular de hemodiálise. Os resultados mostraram que, durante o procedimento de hemodiálise, não houve ativação significativa da agregação plaquetária e da coagulação. Ao contrário, a fibrinólise estaria ativada, considerando o aumento significativo da atividade de t-PA, o que contribuiria para tendência ao sangramento em alguns pacientes. Já Salobir *et al.* (2008) avaliaram os mesmos parâmetros do estudo anterior em 15 pacientes submetidos à hemodiálise e observaram níveis elevados de fibrinogênio, D-Di, TAT e F1+2 e níveis reduzidos de plasminogênio comparados ao grupo controle. Observaram ainda, uma diminuição da agregação plaquetária nos pacientes sob hemodiálise que se correlacionou positivamente com os níveis de plasminogênio. Sugeriram que os fatores que contribuem para a redução dos níveis de plasminogênio, tais como os fragmentos de fibrinogênio ou a plasmina, influenciam a agregação plaquetária.

Costa *et al.* (2008) observaram níveis elevados de D-Di e níveis reduzidos de PAI-1, além da elevada relação t-PA/PAI-1 em 50 pacientes submetidos à hemodiálise comparados a indivíduos hígidos. Observaram ainda, que os níveis de D-Di e t-PA estavam mais elevados nos pacientes com cateter venoso central comparados àqueles com FAV.

O'Shea *et al.* (2003), avaliaram um grupo específico de 31 pacientes submetidos à hemodiálise que apresentavam história de trombose do acesso vascular recorrente (em média 3,7 eventos/paciente em um ano). Esses pesquisadores observaram uma alta prevalência de anticorpos antifosfolípidos (58%), anticorpos anti-fator 4 plaquetário-heparina (18%), bem como níveis elevados de F VIII (93,5%), fibrinogênio (63%), proteína C reativa (PCR) (41,9%) e homocisteína (80,6%).

O papel de alguns polimorfismos ou mutações pontuais das proteínas envolvidas na coagulação sanguínea quanto à ocorrência de trombose no acesso vascular tem sido investigado. O fator V Leiden tem sido a alteração hereditária mais comumente encontrada (GIRNDT *et al.*, 2007).

O'Shea *et al.* (2003) pesquisaram as mutações que predisõem à trombofilia e encontraram apenas um paciente heterozigoto para a mutação G20210A no gene da protrombina, nenhum portador da mutação FVL e três pacientes portadores do polimorfismo no gene da MTHFR (um homozigoto e dois heterozigotos). Dessa forma, concluíram que todos os pacientes apresentavam pelo menos um fator de risco para trombose e 25 dos 31 pacientes apresentavam dois ou mais fatores de risco.

Fodinger *et al.* (1996) avaliaram 152 pacientes submetidos à hemodiálise e encontraram sete (4,6%) heterozigotos para o FVL. Esses pacientes não apresentaram complicações trombóticas, sem uma explicação plausível, no cateter venoso central ou na fístula. Atac *et al.* (2002) compararam 46 pacientes que sofreram trombose do acesso vascular com 44 pacientes sem essa complicação (grupo controle) e encontraram uma prevalência significativamente maior da mutação FVL no primeiro grupo (13% vs. 4%). O mesmo estudo também mostrou uma maior prevalência da mutação no gene da protrombina (G20210A) no grupo que teve trombose do acesso vascular comparado ao grupo controle (9% vs. 0%).

Knoll *et al.* (2005), em um estudo caso controle envolvendo 419 pacientes (107 que desenvolveram trombose do acesso vascular – grupo “caso” e 312 que não tiveram essa complicação – grupo controle), visando elucidar o papel da trombofilia na trombose do acesso vascular à hemodiálise, avaliaram polimorfismos dos genes dos fatores II, V, XIII e da MTHFR. Nesse estudo, foram controlados outros fatores de risco para trombose do acesso vascular, como o F VIII, homocisteína total, anticoagulante lúpico, fibrinogênio, anticorpo anticardiolipina, lipoproteína a - Lp(a), albumina, folato e vitamina B<sub>12</sub>. Estes pesquisadores concluíram que a presença de fatores trombofílicos (FVL, níveis elevados de F VIII, Lp(a) e homocisteína) está associada à trombose do acesso vascular para a hemodiálise. No entanto, sugeriram a necessidade de estudos adicionais para confirmar essa associação.

Akman *et al.* (2006) investigaram os fatores preditores do estado protrombótico, que aumentam o risco de trombose do acesso vascular. Acompanharam por três anos 109 pacientes que aguardavam o transplante renal, 36 sob DPAC e 73 sob hemodiálise, e observaram que a mutação FVL ou os níveis elevados de D-Di constituem os marcadores de risco mais importantes para trombose. Dessa forma, recomendaram a monitoração destes testes, antes e após o transplante renal, e o uso de anticoagulante durante o período de espera. Além

desses achados, os autores não detectaram diferenças nos parâmetros bioquímicos e genéticos entre as duas modalidades de diálise, sugerindo que a doença renal é a principal causa da atividade procoagulante.

Resultados controversos têm sido encontrados na literatura com relação aos níveis plasmáticos de homocisteína e a ocorrência de trombose do acesso vascular. Shemin *et al.* (1999) relataram que em 84 pacientes sob hemodiálise, 41 com FAV e 43 com enxerto sintético, a trombose ocorreu em 56% dos pacientes dentro de um período de 18 meses. O risco relativo para trombose da fístula aumentou em 4% a cada 1,0  $\mu\text{M}$  de aumento nos níveis plasmáticos de homocisteína total. Um outro estudo avaliando pacientes com fístulas nativas exclusivamente também demonstrou que o nível plasmático de homocisteína é capaz de prever a ocorrência de trombose do acesso vascular (MALLAMACI *et al.*, 2005). No entanto, outros estudos não confirmaram essa associação. Manns *et al.* (1999), avaliaram retrospectivamente 118 pacientes acompanhados por três anos e demonstraram níveis similares de homocisteína entre os pacientes que desenvolveram trombose e os que não desenvolveram.

O papel do polimorfismo C677T da MTHFR na ocorrência de trombose do acesso vascular em pacientes em hemodiálise tem sido avaliado. Um estudo retrospectivo com 337 pacientes sob diálise com FAV de 13 centros de hemodiálise do Japão, demonstrou que o genótipo homozigótico foi encontrado em 20% dos pacientes e foi o fator de maior risco para trombose do acesso vascular comparado aos genótipos normal e heterozigótico (FUKASAWA *et al.*, 2003). Já Mallamaci *et al.* (2005) confirmaram a relação entre níveis plasmáticos de homocisteína e o risco de ocorrência de trombose, mas não detectaram um risco adicional dado pela mutação no gene da MTHFR (C677T).

Uma análise crítica da literatura referente às alterações hemostáticas observadas nos pacientes submetidos à hemodiálise revela inúmeras conclusões conflitantes. Isto mostra, indubitavelmente, a necessidade da observação rigorosa de vários critérios, uma vez que os marcadores laboratoriais estão sujeitos a uma série de alterações induzidas no ato da coleta da amostra de sangue, no processo de separação e armazenamento do plasma e nos procedimentos adotados para as análises laboratoriais. Além disso, deve ser cuidadosamente estabelecidos os critérios de exclusão para a seleção dos pacientes para o estudo, visando a não interferência de outras condições associadas à DRC, ao procedimento da

hemodiálise, ao uso de antiinflamatórios, que poderiam resultar em alterações hemostáticas e confundir a interpretação dos resultados.

## 2.9 Hemodiálise e marcadores inflamatórios

Diversos estudos têm sugerido que a doença renal crônica (DRC) terminal está associada a um estado inflamatório leve, também chamado de microinflamação, o qual é caracterizado pela elevação das citocinas próinflamatórias circulantes, ocasionando a síndrome da má nutrição, inflamação e aterosclerose. Os pacientes com DRC, em geral, apresentam comprometimento da função imunológica relacionada a alterações da reatividade celular e da expressão modificada de receptores. Tais alterações resultam do comprometimento da função excretora dos rins e do acúmulo de componentes próinflamatórios, toxinas urêmicas e estresse oxidativo. Este último leva ao aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) por monócitos e, indiretamente, de proteína C reativa (PCR) pelo fígado (LIU *et al.*, 2008; DESCAMPS-LATSCHA *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 1994; IKIZLER, 2008).

A microinflamação constitui um fator importante na morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos à hemodiálise, especialmente pelo aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV). A taxa de mortalidade por DCV após ajuste por idade, sexo e diabetes é cerca de 9%, sendo 10-20 vezes maior que na população em geral. A diálise tem sido associada a alterações agudas na ativação do sistema do complemento, na função dos macrófagos, nos marcadores granulocíticos, na ativação da célula T e na liberação de várias citocinas próinflamatórias (LIBBY *et al.*, 2002; SEZER *et al.*, 2002; TSIRPANLIS *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2004; ZIMMERMANN *et al.*, 1999; TARAKÇIOGLU *et al.*, 2003).

A inflamação nos pacientes em diálise pode variar ao longo do tempo; e a presença de eventos clínicos pode estar relacionada a elevações persistentes nos níveis de PCR. A PCR é considerada um marcador fidedigno de inflamação e pode contribuir diretamente para a lesão endotelial e a patogênese da aterosclerose (KAYSEN *et al.*, 1997; GIRNDT *et al.*, 2002). Níveis séricos elevados de PCR e níveis reduzidos de albumina são preditores bem estabelecidos de mortalidade em pacientes com e sem doença renal. Estudos transversais baseados em uma única determinação dos níveis de PCR mostraram que 30-50% dos pacientes em pré-

diálise e dos submetidos à hemodiálise apresentaram ativação da resposta inflamatória com níveis elevados de PCR (STENVINKEL, 2002).

Nascimento *et al.* (2004), em um estudo longitudinal envolvendo 180 pacientes submetidos à hemodiálise, avaliaram os níveis séricos de PCR de dois em dois meses durante seis meses e acompanharam esses pacientes por 21 meses subsequentes para avaliar a taxa de mortalidade. Constataram que havia dois grupos característicos de pacientes com níveis elevados de PCR: um com níveis flutuantes ( $n = 65$ ) e o outro com atividade inflamatória persistente ( $n = 41$ ). Esse último apresentou taxa de mortalidade maior que o primeiro. Estes pesquisadores concluíram ainda que a idade mais avançada, os níveis séricos reduzidos de albumina, a elevação da PCR e a desnutrição foram preditores independentes de mortalidade.

Tsai *et al.* (2007) também mostraram que idade avançada, níveis aumentados de PCR ultra-sensível (PCR-us), redução da albumina e presença de diabetes são preditores independentes para mortalidade em pacientes submetidos à hemodiálise, acompanhados por 36 meses.

Rysz *et al.* (2006) em um estudo envolvendo 15 pacientes submetidos à hemodiálise, avaliaram se a sessão de hemodiálise leva a alterações agudas nos níveis plasmáticos de citocinas proinflamatórias IL-2, IL-6, interleucina-8 (IL-8), IL-1b e TNF- $\alpha$ . Concluíram que os níveis dessas citocinas, com exceção da IL-2, aumentaram significativamente durante uma única sessão de hemodiálise. De modo similar, Caglar *et al.* (2002) também observaram aumento dos níveis de fibrinogênio e IL-6 durante uma única sessão de hemodiálise em nove pacientes. Tal aumento foi mais relevante duas horas após o término da sessão.

Razeghi *et al.* (2008), em um estudo transversal envolvendo 114 pacientes submetidos à hemodiálise, observaram que 41% destes apresentaram níveis elevados de PCR, os quais mostraram uma correlação negativa com os níveis de albumina, hemoglobina e transferrina, sugerindo uma relação entre a PCR e outros fatores inflamatórios e nutricionais. Gad *et al.* (2008) observaram que os marcadores de inflamação (PCR-us e ICAM-1) e de hipofibrinólise (TAFI) estão elevados em 62 pacientes com DRC (15 em tratamento conservador e 47 em hemodiálise).

Mezzano *et al.* (2001) observaram níveis elevados de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-8) e de proteínas de fase aguda (PCR, fibrinogênio e  $\alpha$ 1-antitripsina) em 64 pacientes com DRC antes de iniciar o tratamento dialítico. Houve correlação

significativa entre as proteínas inflamatórias e os níveis de FvW, TM, ICAM-1 solúvel, PAP, FbDP e FgDP, sugerindo que a DRC pode ser vista como um modelo clínico de inflamação sistêmica leve que está intrinsecamente associada ao estresse oxidativo, lesão endotelial e ativação hemostática, os quais são importantes mediadores de aterosclerose e dos eventos trombóticos. Costa *et al.* (2008) observaram leucocitose, neutrofilia, níveis elevados de IL-6, do receptor solúvel de IL-2 e da PCR em pacientes submetidos à hemodiálise (n = 50) comparados a indivíduos saudáveis (n = 25), confirmando a presença de um estado inflamatório nesses pacientes. Houve correlação significativa entre os níveis dos marcadores inflamatórios e de D-Di, sugerindo uma inter-relação da inflamação e hemostasia.

Considerando que eventos trombóticos em artérias coronarianas e veias profundas de membros estão associados à inflamação dos vasos afetados, pode-se inferir que, na FAV, a inflamação esteja envolvida no processo de trombose (LIBBY, 1995; LEE & LIBBY, 1997; WAKEFIELD *et al.*, 1995; ROUMEN-KLAPPE *et al.*, 2002). No entanto, a relação entre presença de inflamação e complicações do acesso vascular ainda não está bem estabelecida.

Liu *et al.* (2008) observaram que os níveis de PCR-us, TNF- $\alpha$  e IL-6 foram significativamente maiores em pacientes submetidos à hemodiálise que desenvolveram trombose do acesso vascular (n = 14) comparado ao grupo de pacientes sob hemodiálise crônica que não tiveram essas alterações (n = 18) e ao grupo de pacientes que estava iniciando o tratamento hemodialítico (n = 15). Observaram ainda que os pacientes com trombose do acesso vascular apresentaram hiperplasia significativa da camada íntima da parede vascular da FAV e aumento da expressão de MCP-1 comparado ao grupo que estava iniciando o tratamento e essas alterações estavam correlacionadas positivamente ao aumento dos níveis de PCR-us. Sugeriram que a microinflamação pode estar envolvida no desenvolvimento de hiperplasia da camada íntima, levando à estenose e, conseqüentemente, à trombose do acesso vascular.

Chang *et al.* (2005) observaram infiltração abundante de macrófagos e moderada de linfócitos na parede vascular de FAVs que desenvolveram trombose (n=23) acompanhada por aumento na expressão de molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), citocinas proinflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) comparado à parede vascular de FAVs que não desenvolveram trombose (n = 13). Sugeriram que IL-6 e VCAM-1 teriam um papel no aumento da proliferação

das células musculares lisas vasculares e o MMP-9 causaria instabilidade na camada neoíntima e subsequente lesão do endotélio, levando à trombose. Sugeriram, ainda, que o tratamento com antiinflamatórios poderia ser útil para melhorar a longevidade da FAV.

Cai *et al.* (2006) também observaram que os níveis de PCR e do marcador de disfunção endotelial (VCAM-1) estavam mais elevados nos pacientes sob hemodiálise que apresentaram pelo menos um evento trombótico no enxerto arteriovenoso comparado àqueles que nunca tiveram essa complicação. No entanto, esses resultados não diferiram daqueles de indivíduos saudáveis.

A literatura mostra que os pacientes com DRC ou submetidos à hemodiálise apresentam um estado inflamatório crônico e que este está correlacionado com eventos cardiovasculares. No entanto, o papel da inflamação na trombose do acesso vascular ainda é conflitante.

## *3 Objetivos*

---

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações moleculares, hemostáticas e inflamatórias em pacientes submetidos à hemodiálise e a associação dessas com complicações trombóticas do acesso vascular.

### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença do fator V Leiden e da mutação no gene do fator II em pacientes submetidos à hemodiálise e avaliar a associação desses com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular.
- Determinar e comparar os níveis plasmáticos dos marcadores da coagulação e fibrinólise, F VIII, FvW, ADAMTS-13, D-Di e PAI-1 em pacientes submetidos à hemodiálise e indivíduos hígidos e investigar a associação desses marcadores com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular.
- Realizar a fenotipagem dos grupos sanguíneos do sistema ABO e relacioná-los aos níveis plasmáticos dos marcadores da coagulação e fibrinólise em pacientes submetidos à hemodiálise e indivíduos hígidos e investigar a associação dos grupos sanguíneos com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular.
- Determinar os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios, PCRus, IL-8 e fator de crescimento e transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) em pacientes submetidos à hemodiálise e investigar a associação desses com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular.
- Correlacionar os parâmetros hemostáticos e inflamatórios.
- Determinar os parâmetros laboratoriais com potencial para a detecção precoce de complicações trombóticas do acesso vascular em pacientes submetidos à hemodiálise.

## *4 Casuística e Métodos*

---

---

## **4.1 Casuística**

### **4.1.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi previamente analisado, sob o ponto de vista ético e formal, e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 099/07) (ANEXO 1). Foi também analisado e aprovado pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e pela Diretoria do Instituto Mineiro de Nefrologia/Belo Horizonte – MG.

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa foi feito pelos pesquisadores utilizando-se linguagem clara, a todos os integrantes do estudo, explicitando o direito de interromperem a participação a qualquer momento, sem danos ou represálias. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

O estudo incluiu a análise detalhada dos prontuários de todos os pacientes atendidos no Instituto Mineiro de Nefrologia e no Serviço de Hemodiálise do Hospital das Clínicas – UFMG. Dos pacientes selecionados para o estudo, foi feita a coleta manual, em ficha individual padronizada, dos dados clínicos e laboratoriais de interesse a partir de prontuários médicos (ANEXO 3), bem como a coleta de uma amostra de sangue.

### **4.1.2 Seleção dos pacientes do estudo**

Primeiramente foi feita a análise detalhada de 344 prontuários dos pacientes submetidos à hemodiálise no Instituto Mineiro de Nefrologia e no Hospital das Clínicas – UFMG para a seleção dos participantes do estudo, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

#### **4.1.2.1 Critérios de inclusão**

- Idade: 18 a 70 anos
- Tempo mínimo de hemodiálise: seis meses
- Tipo de acesso vascular: FAV ou enxerto de PTFE

#### **4.1.2.2 Critérios de exclusão**

- Uso de anticoagulantes orais
- História pregressa de trombose arterial ou venosa, com exceção de trombose do acesso vascular
- Presença de doenças hepáticas, neoplasias, lúpus eritematoso sistêmico (LES), coagulopatias e vasculite
- Presença de doença aguda
- História de transplante renal
- Soro positivo para HIV
- Gravidez

Dos 344 pacientes, 195 foram selecionados para o estudo e 149 foram excluídos. Os motivos da exclusão estão relacionados na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Relação dos motivos de exclusão de participantes do estudo.**

| <b>Razões de exclusão</b>      | <b>N° de pacientes</b> |
|--------------------------------|------------------------|
| < 18 anos                      | 16                     |
| > 70 anos                      | 36                     |
| < 6 meses de HD                | 1                      |
| Acesso vascular CDL            | 9                      |
| Uso de anticoagulante oral     | 1                      |
| Doenças hepáticas              | 14                     |
| Neoplasias                     | 3                      |
| LES                            | 3                      |
| Vasculopatias                  | 3                      |
| Transplante renal              | 49                     |
| Soro positivo para HIV         | 4                      |
| Coagulopatias                  | 2                      |
| Recusa em participar do estudo | 2                      |
| Outros (óbito, internações)    | 6                      |
| <b>Total</b>                   | <b>149</b>             |

HD: hemodiálise; CDL: cateter duplo lúmen

### **4.1.3 – Seleção dos indivíduos hígidos**

Os indivíduos do grupo controle, com características epidemiológicas, como sexo, idade e classe social, similares aos pacientes submetidos à hemodiálise, foram selecionados segundo os critérios exclusão descritos a seguir.

#### **4.1.3.1 - Critérios de exclusão**

- Gravidez
- História pregressa de trombose arterial ou venosa
- Presença de doenças hepáticas, autoimune, câncer, *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, síndrome nefrótica e doença renal crônica
- Presença de doença aguda

### **4.1.4 Grupos avaliados**

Os 195 pacientes selecionados e os 80 indivíduos hígidos foram distribuídos em três grupos:

Grupo I: 149 pacientes submetidos à hemodiálise que não apresentaram complicações trombóticas do acesso vascular.

Grupo II: 46 pacientes submetidos à hemodiálise que apresentaram complicações trombóticas do acesso vascular.

Grupo III: 80 indivíduos hígidos.

### **4.1.5 Caracterização da população de pacientes estudada**

Os 195 pacientes elegíveis para participar do estudo eram portadores de doença renal crônica, submetidos à hemodiálise por mais de seis meses e com acesso vascular permanente funcionante (FAV ou enxerto).

O acesso vascular funcionante foi definido como fluxo sanguíneo adequado durante a canulação com duas agulhas por pelo menos uma sessão de hemodiálise completa.

Os pacientes foram classificados como grupo II quando o acesso vascular funcionante apresentou oclusão trombótica (n= 46). A oclusão trombótica foi definida

pela ausência de fluxo sanguíneo detectada ao exame clínico e/ou ao *doppler* ultrassom acarretando incapacidade de usar o acesso vascular para a diálise. O grupo I foi composto por indivíduos que nunca tiveram oclusão trombotica no acesso vascular permanente (n = 149).

As características clínicas dos pacientes integrantes dos grupos estudados foram coletadas dos prontuários médicos e incluíram: idade, sexo, pressão arterial, índice de massa corpórea (IMC), tempo de hemodiálise, cinética da uréia (Kt/v), relação de redução de uréia (URR), taxa de catabolismo protéico (nPCR), ganho interdialítico (GID), causa primária da doença renal crônica, tipo de acesso vascular, medicamentos utilizados e presença de diabetes (**Tabela 2**).

Os parâmetros laboratoriais coletados dos prontuários médicos incluíram o eritrograma; número de plaquetas e as determinações de ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (CTLF), índice de saturação de transferrina (IST), ferritina, colesterol total, LDLc, HDLc, triglicérides, alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), proteínas totais, albumina, creatinina, uréia pré-diálise, uréia pós-diálise, cálcio total, potássio, fosfato e paratormônio (PTH), como mostra a **Tabela 3**.

#### **4.1.6 Detalhamento da hemodiálise**

A sessão de hemodiálise foi realizada três vezes por semana com duração de três a quatro horas, dependendo da eficácia do tratamento. O fluxo sanguíneo foi em média de 300 a 450 mL/minuto, de acordo com a necessidade individual do paciente. O fluxo do dialisante foi constante de 500 mL/minuto, usando tampão de bicarbonato. Foram utilizados dialisadores de alto fluxo (n=163) como o HF80 e de baixo fluxo (n=32) como F6, F7 e F8 HPS, todos com membrana de polissulfona. Todos os pacientes receberam heparina convencional, em dose única, antes do início da circulação extracorpórea. A dose administrada variava de 100 a 150UI/Kg.

#### **4.2 Amostra biológica**

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue utilizando seringas de polietileno conectadas ao acesso de diálise, na primeira sessão de hemodiálise da semana, antes de iniciar a circulação extracorpórea e antes da administração de

heparina. Posteriormente, 9 mL desta amostra foram transferidos delicadamente para tubos de polietileno contendo anticoagulante citrato de sódio 0,129 mol/L, na proporção 9:1. Dos indivíduos hígidos foram coletadas amostras de 10 mL de sangue venoso diretamente em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio 0,129 mol/L do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson).

As amostras foram centrifugadas a 3800 rpm sob refrigeração (4°C) por 20 minutos, em centrífuga JOUAN® modelo BR4i (França), para a obtenção do plasma. O plasma foi aliquoteado em tubos *Eppendorf*® e armazenado a -70°C até o momento da realização dos testes laboratoriais (determinação de F VIII, FvW, ADAMTS-13, D-Di, PAI-1, ABO, PCRus, IL-8 e TGF-β1). Imediatamente antes de iniciar os testes laboratoriais as amostras foram descongeladas em banho-maria à 37°C.

Cerca de 1 mL do sangue coletado dos pacientes foi transferido para tubos de polietileno contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o qual foi utilizado para a extração do DNA dos leucócitos para a pesquisa das mutações que predisõem à trombofilia (fator V Leiden e mutação no gene da protrombina).

## **4.3 Métodos**

### **4.3.1 Avaliação das mutações que predisõem a trombofilia**

#### **4.3.1.1 Extração de DNA**

As amostras de sangue (1 mL) foram coletadas em frasco estéril com EDTA, e o DNA genômico foi extraído das células sanguíneas (leucócitos), utilizando-se o conjunto de reagentes “*Wizard Genomic DNA Purification*” (Promega®), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 300 µL da amostra de sangue total foi transferida para um tubo *tipo Eppendorf*® de 1,5 mL estéril e incubada com 900 µL de solução de lise de hemácias (Tris-base 17 mM/ cloreto de amônio 144 mM) durante 10 minutos, à temperatura ambiente, invertendo o tubo durante a incubação. Após a lise das hemácias, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 2 minutos em centrífuga SIGMA® modelo 2K15 (Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de

leucócitos ressuspendido com 300 µL da solução de lise celular (NaOH 0,2 M/ sulfato de sódio dodecil – SDS 1%). Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução de precipitação de proteínas (acetato de amônio 7,5 M), a amostra foi agitada em vórtex durante 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo novo contendo 300 µL de isopropanol. A amostra foi misturada por inversão cerca de 20 vezes para que ocorresse a precipitação do DNA, e posteriormente centrifugada a 14.000 rpm durante 3 minutos. Após o descarte do isopropanol, foram adicionados 300 µL de etanol a 70% para lavar o sedimento de DNA. Em seguida foi realizada outra centrifugação, a 14.000 rpm durante 3 minutos, descartado o etanol e adicionados 50 µL de solução de hidratação (Tris-base 10 mM/ EDTA 0,1 mM). A amostra foi armazenada em temperatura aproximada de 2° a 8°C.

#### **4.3.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

O DNA extraído das amostras de sangue de todos os participantes do estudo foi submetido à investigação da presença das mutações no gene da protrombina (G20210A) e Fator V Leiden (G1691A). A técnica descrita a seguir já se encontrava padronizada em nosso laboratório (GODOI, 2002). Para tal, foram empregados oligonucleotídeos iniciadores e condições de reação previamente descritas (POORT *et al.*, 1996; HUBER *et al.*, 2000).

Na reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®), desoxirribonucleotídeos (GIBCO BRL®), tampão (15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de TritonX-100) (Phoneutria®) e Taq polimerase (Phoneutria®). As reações foram realizadas para um volume final de 20 µL em máquina de PCR *MJ Research* modelo PT 100 (USA). As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada uma das mutações investigadas se encontram listadas no **Quadro 2**.

**Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs, para amplificação dos segmentos genômicos específicos.**

| Mutação                                    | Óligo senso                | Óligo antisenso                        |
|--|----------------------------|--|
| Gene da protrombina (G20210A) <sup>1</sup> | 5' TCTAGAAACAGTTGCCTGGC 3' | 5' ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC 3'           |
| Fator V Leiden (G1691A) <sup>2</sup>       | 5' TCAGGCAGGAACAACACCAT 3' | 5' GGTTACTTCAAGGACAAAATACCTGTAAAGCT 3' |

POORT *et al.*, 1996<sup>1</sup>; HUBER *et al.*, 2000<sup>2</sup>.

O número de ciclos, concentração dos reagentes e temperatura de anelamento foram padronizados para cada segmento genômico a ser amplificado com o objetivo de se obter um bom sinal de amplificação, com o mínimo de inespecificidade (GODOI, 2002). As condições padronizadas se encontram nos **Quadros 3 e 4** (GODOI, 2002).

**Quadro 3 - Concentrações dos reagentes utilizados nas PCRs.**

| Reagentes       | Fragmento do gene a ser amplificado |                                   |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                 | Concentrações de uso                |                                   |
|                 | G20210A                             | G1691A                            |
| Tampão          | 1X<br>(1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )   | 1X<br>(1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ) |
| dNTP            | 0,2 mM                              | 0,2 mM                            |
| Óligo senso     | 1,0 µM                              | 1,0 µM                            |
| Óligo antisenso | 1,0 µM                              | 1,0 µM                            |
| Taq polimerase  | 1u                                  | 1u                                |
| DNA             | 75 µg                               | 75 µg                             |
| Água q.s.p.     | 20 µL                               | 20 µL                             |

q.s.p.: quantidade suficiente para

**Quadro 4 - Programas de PCR utilizados para amplificação das regiões gênicas de interesse.**

| Etapas              | Fragmento do gene a ser amplificado |              |
|---------------------|-------------------------------------|--------------|
|                     | G20210A                             | G1691A       |
| Desnaturação prévia | 95° - 10 min                        | 95° - 10 min |
| Desnaturação        | 94° - 1 min                         | 94° - 1 min  |
| Anelamento          | 57° - 1 min                         | 55° - 1 min  |
| Extensão            | 72° - 1 min                         | 72° - 1 min  |
| N ° de ciclos       | 40 ciclos                           | 40 ciclos    |
| Extensão final      | 72° - 5 min                         | 72° - 5 min  |

Em todos os conjuntos de reações de amplificação foram utilizados controles positivos, DNAs de indivíduos heterozigoto ou homozigoto para as mutações em estudo e um tubo sem DNA (branco), que funciona como controle dos reagentes.

#### **4.3.1.3 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)**

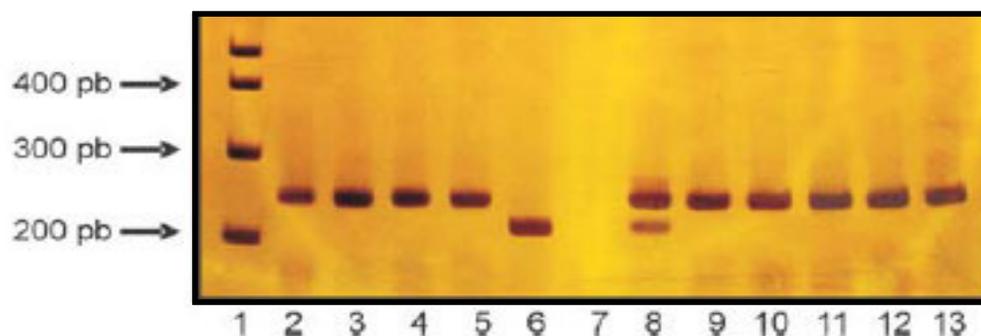
Após amplificação do segmento específico, uma alíquota de 10 µL da reação de amplificação foi digerida com endonuclease de restrição específica, sendo incubada com 10 µL da mistura de digestão enzimática à 37°C durante o mínimo de 12 horas. As condições foram padronizadas (GODOI, 2002) de acordo com protocolos já descritos e se encontram no **Quadro 5** (POORT *et al.*, 1996; HUBER *et al.*, 2000).

**Quadro 5 - Condições padronizadas de digestão enzimática para detecção das mutações F V Leiden (G1691A) e no gene da protrombina (G20210A), pela análise do polimorfismo de tamanho de restrição (RFLP).**

| Reagentes           | Concentrações de uso           |                     |                     |
|---------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
|                     | Estoque                        | G20210A             | G1691A              |
| Tampão da enzima    | 10X                            | 1X                  | 1X                  |
| Enzima de restrição | <i>Hind</i> III: 10 u/ $\mu$ L | <i>Hind</i> III: 7u | <i>Hind</i> III: 7u |
| Água q.s.p.         |                                | 10 $\mu$ L          | 10 $\mu$ L          |

q.s.p.: quantidade suficiente para

O resultado da digestão foi analisado através da presença dos polimorfismos de tamanho de restrição (RFLP) em gel de poliacrilamida a 8% (mutações no gene da protrombina) e a 6% (Fator V Leiden) corado pela prata. O polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição obtido após a digestão dos produtos de PCR permite verificar se o indivíduo analisado é heterozigoto, homozigoto ou não portador da mutação pesquisada, conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9. Para os dois genes em estudo, a presença da mutação cria um sítio para a enzima de restrição no fragmento amplificado. Por isso, os indivíduos que não possuem a mutação apresentam apenas uma banda na mesma altura do produto amplificado, pois não é digerido. O perfil de indivíduos homozigotos mutantes é, em geral, evidenciado através da presença de apenas uma banda, menor que o produto amplificado. Indivíduos heterozigotos apresentam duas bandas resultantes da digestão, uma correspondendo ao alelo normal e outra ao mutante.



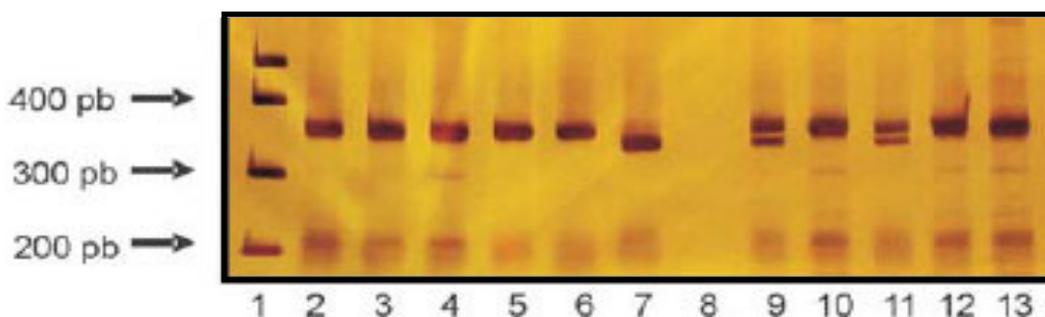
**Figura 8 – Fator V Leiden. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição.**

1 - Padrão de peso molecular.

2 a 5, 9 a 13 - Perfil de bandas de indivíduo não portador do Fator V Leiden (241pb).

6 - Perfil de bandas de um indivíduo homozigoto para Fator V Leiden (209 e 32 pb). O fragmento na região de 32 pb não é visualizado no gel.

8 - Perfil de bandas de um indivíduo heterozigoto para Fator V Leiden (241, 209 e 32 pb). O fragmento de 32 pb não é visualizado no gel.



**Figura 9 – Mutação no gene da protrombina. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição.**

1 - Padrão de peso molecular.

2 a 6, 10, 12 e 13- Perfil de bandas de indivíduo não portador da mutação no gene da protrombina (345 pb).

7 - Perfil de bandas de um indivíduo homozigoto para mutação no gene da protrombina (322 e 23 pb). O fragmento de 23 pb não é visualizado no gel.

9 e 11 - Perfil de bandas de um indivíduo heterozigoto para mutação no gene da protrombina (345, 322 e 23 pb). O fragmento de 23pb não é visualizada no gel.

## **4.3.2 Avaliação da coagulação e fibrinólise**

### **4.3.2.1 Determinação do F VIII**

A determinação do fator VIII foi feita por método coagulométrico, utilizando plasma deficiente em F VIII (Dade Behring, *Marburg*, Alemanha), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na determinação do TTPa de uma mistura do plasma deficiente com o plasma do paciente. O F VIII presente no plasma do paciente pode compensar a ausência desse fator no plasma deficiente. A atividade do F VIII é expressa em porcentagem (%) do valor normal e é determinada através de uma curva de calibração, confeccionada com a diluição de um *pool* de plasma normal em tampão imidazol, conforme sugerido pelo fabricante.

Para o plasma controle, cujo valor esperado era 25% (19-31%), foram obtidos os valores de 21,6% e 26,3% para o primeiro e segundo *kit*, respectivamente.

A faixa dos valores de referência do F VIII plasmático, fornecido pelo fabricante, é de 70 a 150% do valor normal. No entanto, o mesmo recomenda que cada laboratório determine a sua faixa de normalidade.

O ensaio foi realizado utilizando-se o equipamento BFT\* II Analyzer – Dade Behring® (Alemanha).

### **4.3.2.2 Determinação do FvW**

A determinação do FvW foi feita por ELISA (*enzyme linked immune assay*) de captura, utilizando-se o *Kit* IMUBIND® FvW (American Diagnostica® Inc., *Stamford, USA*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na captura dos antígenos FvW presentes nos plasmas testados, por anticorpos policlonais (anti-FvW), fixados na superfície de uma placa. Os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionam-se anticorpos policlonais (conjugados com peroxidase), que vão se ligar a determinantes antigênicos do FvW (capturados na etapa anterior), distintos daqueles ligados aos primeiros anticorpos. Os anticorpos conjugados com

peroxidase (*horseradish* peroxidase – HRP) que não se ligaram ao FvW são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase (HRP) ligada ao segundo anticorpo, com o substrato TMB (perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de FvW na amostra plasmática.

O fabricante não fornece valores de referência para os níveis plasmáticos do FvW.

A leitura das reações foi feita utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax *Microplate Reader* - MOLECULAR DEVICES (USA). A concentração dos parâmetros analisados de cada plasma testado foi obtida interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão.

#### **4.3.2.3 Determinação da ADAMTS-13**

A determinação da ADAMTS-13 plasmática foi feita por ELISA de captura, utilizando-se o *Kit* IMUBIND® ADAMTS-13 (American Diagnostica® Inc., *Stamford, USA*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, cujo princípio é semelhante ao descrito para o FvW. Porém, a captura dos antígenos ADAMTS-13 presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos monoclonais (anti- ADAMTS-13) e, após lavagens sucessivas, adicionam-se anticorpos policlonais biotinizados que vão se ligar a determinantes antigênicos da ADAMTS-13 (capturados na etapa anterior). Em seguida, adiciona-se peroxidase conjugada com estreptavidina-horseradish (SA – HRP) para completar a formação do complexo de detecção anticorpo-enzima.

Para o plasma de referência fornecido pelo fabricante, cujo valor era  $26,2 \pm 2,6$  ng/mL, foram obtidos os valores 23,5 e 22,0 ng/mL para o primeiro e segundo *kit*, respectivamente.

A faixa dos valores de referência da ADAMTS-13 plasmático, fornecido pelo fabricante, é de 630 a 850 ng/mL. No entanto, o mesmo recomenda que cada laboratório determine a sua faixa de normalidade.

#### **4.3.2.4 Determinação dos D-Di**

A determinação dos dímeros-D plasmáticos foi feita por ELISA de captura, utilizando-se o *Kit* IMUCLONE<sup>®</sup> D - Dimer (American Diagnostica<sup>®</sup> Inc., *Stamford, USA*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, cujo princípio é o mesmo descrito para o FvW, com a diferença que a captura dos antígenos D-Di presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos monoclonais (anti- D-Di).

Para os plasmas de referência fornecidos pelo fabricante, cujo valor era *high control*: 1940 a 2375ng/mL; *low control*: < 400ng/mL, foram obtidos os valores *high control*: 1917; 1907 e 1917ng/mL e *low control*: 181, 147 e 100 ng/mL para o primeiro, segundo e terceiro *kit*, respectivamente.

O valor de referência do D-Di plasmático, fornecido pelo fabricante, é de <400 ng/mL.

#### **4.3.2.5 Determinação do PAI-1**

A determinação dos níveis plasmáticos de PAI-1 foi realizada por ELISA de captura, utilizando-se o *Kit* IMUBIND<sup>®</sup> PLASMA PAI-1 (American Diagnostica<sup>®</sup> Inc., *Stamford, USA*), seguindo-se, rigorosamente as instruções do fabricante, cujo princípio é o mesmo descrito para o FvW. Porém, a captura dos antígenos PAI-1 presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos monoclonais (anti- PAI-1) e a revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita através da determinação da reação da enzima peroxidase (ligada ao segundo anticorpo) com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), na presença de peróxido de hidrogênio, gerando um produto de coloração amarela. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se laranja.

A faixa dos valores de referência do PAI-1 plasmático, fornecido pelo fabricante, é de 2 a 47 ng/mL. No entanto, o mesmo recomenda que cada laboratório determine a sua faixa de normalidade.

### **4.3.3 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO**

A fenotipagem foi realizada pela técnica indireta. Três tubos foram identificados como A, B e O, nos quais foram colocadas duas gotas de suspensão à 5% de hemácias previamente classificadas como A, B e O, respectivamente, e duas gotas de plasma do paciente a ser classificado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 1500 rpm por dois minutos. A leitura foi feita agitando suavemente os tubos e observando se houve ou não aglutinação (CARVALHO & SILVA, 1990).

A interpretação da tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO encontra-se resumida no **Quadro 6**.

**Quadro 6 - Tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO.**

| <b>Grupo Sanguíneo</b> | <b>Hemácia A</b> | <b>Hemácia B</b> | <b>Hemácia O</b> |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| AB                     | -                | -                | -                |
| A                      | -                | +                | -                |
| B                      | +                | -                | -                |
| O                      | +                | +                | -                |

### **4.3.4 Avaliação dos marcadores inflamatórios**

#### **4.3.4.1 Determinação da PCR ultra-sensível**

A determinação dos níveis plasmáticos de PCRus foi realizada por imunonefelometria, utilizando-se o *kit* CardioPhase\* hsCRP (Dade Behring®, Alemanha), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na ligação de partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal anti-PCR humana com a PCR das amostras testadas, formando aglutinados que dispersam a luz irradiada. A intensidade da luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A avaliação é feita por comparação com um padrão de uma concentração conhecida.

O valor de referência da PCRus plasmática, fornecido pelo fabricante, é de < 5,0 mg/L.

O ensaio foi realizado utilizando-se o equipamento BN II – Dade Behring® (Alemanha).

#### **4.3.4.2 Determinação da IL-8**

A determinação dos níveis plasmáticos de IL-8 foi realizada por ELISA de captura, utilizando-se o *kit* Quantikine Human CXCL8/IL-8 Immunoassay® (R & D Systems, *Minneapolis*, USA), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, cujo princípio é o mesmo descrito para o FvW, com a diferença que a captura dos antígenos IL-8 presentes nos plasmas testados é feita por anticorpos monoclonais (anti-IL-8).

O valor de referência da IL-8 plasmática, fornecido pelo fabricante, é de < 31,2 pg/mL.

#### **4.3.4.3 Determinação do TGF-β1**

A determinação dos níveis plasmáticos de TGF-β1 foi realizada por ELISA de captura, utilizando-se o *kit* Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay® (R & D Systems, *Minneapolis*, USA), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, cujo princípio é o mesmo descrito para o FvW, com a diferença que a captura dos antígenos TGF-β1 presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos monoclonais (anti-TGF-β1 humano). Além disso, é necessária uma ativação prévia da amostra, com uma solução de ativação ácida (HCl 1N), para que o TGF-β1 latente se transforme na sua forma imunorreativa detectável pelo imunoenensaio Quantikine TGF-β1. Após, a amostra é neutralizada (NaOH 1,2N/HEPES 0,5M) e o pH deve ficar entre 7,2 a 7,6.

A faixa dos valores de referência do TGF-β1 plasmático, fornecido pelo fabricante, é de 903 a 1654 pg/mL.

#### 4.4 Análise estatística

O cálculo amostral foi feito utilizando a fórmula abaixo e o número de pacientes necessários para este estudo foi 209.

$$n = \frac{Nz^2 pq}{d^2(N-1) + z^2 pq}$$

N = número de pacientes submetidos à hemodiálise na grande BH em 2007 (1402)

z = variável padrão reduzida (1,96)

p = frequência de trombose nos pacientes submetidos à hemodiálise (20%)

q = 1 – p

d = diferença mínima esperada entre números observados (0,05)

A comparação entre dois grupos foi feita utilizando o teste t de *Student* para as variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal e o método não paramétrico de *Mann-Whitney* para as variáveis com distribuição não normal. O teste de *Kruskal-Wallis* seguido de teste de *Dunn* foi utilizado para identificação da diferença entre as médias dos três grupos para a determinação da possível interação entre os fatores estudados. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de *Fisher*. A correlação entre alguns parâmetros estudados foi investigada pelo teste de *Spearman*. A normalidade foi testada pelo método de *Kolmogorov-Smirnov*. Foram consideradas como diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .

Inicialmente, foi investigada por meio de regressão logística, a associação entre a presença de trombose do acesso vascular e a variável explicativa (alterações hemostáticas e inflamatórias) descrita a seguir.

A variável explicativa foi criada a partir da presença das seguintes alterações:

- Mutação G20210A no gene da protrombina (sim/não)
- Mutação G1691A no gene do F V (sim/não)
- Níveis elevados de F VIII (sim/não)
- Níveis elevados de FvW (sim/não)
- Níveis reduzidos de ADAMTS-13 (sim/não).
- Níveis elevados de D-Di (sim/não);

- Níveis elevados de PAI-1 (sim/não).
- Níveis elevados de PCRus (sim/não).
- Níveis elevados de IL-8 (sim/não).
- Níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 (sim/não).

Os níveis de F VIII, FvW, D-Di, PAI-1, PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1 foram considerados elevados quando estavam acima de 150% de atividade, 1012 mU/mL, 400 ng/mL, 47 ng/mL, 5 mg/L, 31,2 pg/mL e 1654 pg/mL, respectivamente, de acordo com os valores de referência fornecidos pelo fabricante. Os níveis de ADAMTS-13 foram considerados reduzidos quando estavam abaixo de 486 ng/mL. Os fabricantes de conjuntos diagnósticos para determinação de FvW e ADAMTS-13 não fornecem os valores de referência. Portanto, foi feita a determinação dos níveis plasmáticos desses dois marcadores em um grupo de indivíduos hígidos, visando determinar o intervalo de referência.

Os pacientes foram categorizados do seguinte modo:

0. Pacientes que apresentaram somente uma das alterações descritas anteriormente
1. Pacientes que apresentaram de duas a três alterações
2. Pacientes que apresentaram quatro ou mais alterações

Todos os pacientes apresentaram pelo menos uma das alterações. A análise estatística considerou como categoria de referência aqueles que apresentaram somente uma das alterações. A magnitude da associação foi determinada pelo *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Posteriormente, foi investigada por meio de regressão logística, a associação entre a presença de trombose do acesso vascular e algumas variáveis explicativas de interesse. As variáveis associadas à variável resposta na análise univariada, com valor de  $p < 0,20$  e aquelas consideradas fatores de confusão, foram inseridas no modelo de regressão logística múltiplo para identificar as que mantinham associação de maneira independente, ao nível de significância de  $p < 0,05$ . A magnitude da associação foi determinada pelo OR e IC 95%.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas SIGMA STAT (versão 2.03) e STATA (versão 10.0).

## *5 Resultados*

---

## 5.1 Avaliação das características clínicas

Os dados clínicos dos integrantes dos três grupos avaliados neste estudo estão apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2 – Características clínicas dos integrantes do estudo.**

| Parâmetros                              | Grupo I<br>(n = 149) | Grupo II<br>(n = 46) | Grupo III<br>(n = 80) | p       |
|---|----------------------|----------------------|-----------------------|---------|
| Idade (anos)                            | 52 (39-60)           | 50 (41-59)           | 48 (46-52)            | 0,380   |
| Sexo                                    |                      |                      |                       | 0,193   |
| Masculino [n(%)]                        | 86 (58%)             | 20 (43%)             | 40 (50%)              |         |
| Feminino [n(%)]                         | 63 (42%)             | 26 (57%)             | 40 (50%)              |         |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )                | 23,6 (21,1-26,5)     | 22,6 (20,1-28,5)     | 24,8 (22,9-26,1)      | 0,112   |
| Causa primária da DRC [n(%)]            |                      |                      |                       |         |
| Nefrosclerose hipertensiva              | 51 (34%)             | 14 (30%)             |                       | 0,633   |
| Glomerulopatias                         | 39 (26%)             | 7 (15%)              |                       | 0,126   |
| Nefropatia diabética                    | 21 (14%)             | 12 (26%)             |                       | 0,060   |
| Rins policísticos                       | 7 (5%)               | 3 (7%)               |                       | 0,624   |
| Outras causas ou etiologia desconhecida | 31 (21%)             | 10 (22%)             |                       | 0,892   |
| Pressão arterial pré-diálise            |                      |                      |                       |         |
| Pressão sistólica (mmHg)                | 130 (120-143)        | 140 (130-150)        |                       | 0,060   |
| Pressão diastólica (mmHg)               | 80 (80-90)           | 80 (80-90)           |                       | 0,968   |
| Tempo de HD (meses)                     | 34,0 (17,0-90,3)     | 39,5 (19,0-92,0)     |                       | 0,226   |
| Tipo de acesso vascular [n(%)]          |                      |                      |                       |         |
| FAV radial-cefálica                     | 111 (74,5%)          | 21 (45,7%)           |                       | <0,001* |
| FAV braquial-cefálica                   | 34 (22,8%)           | 20 (43,5%)           |                       | 0,006*  |
| FAV de alça de safena                   | 0                    | 1 (2,2%)             |                       | 0,070   |
| PTFE radial-cefálica                    | 1 (0,7%)             | 1 (2,2%)             |                       | 0,377   |
| PTFE braquial-cefálica                  | 4 (2,0%)             | 3 (6,4%)             |                       | 0,221   |
| Kt/v                                    | 1,4 (1,3-1,6)        | 1,5 (1,3-1,6)        |                       | 0,513   |
| URR                                     | 73,6 ± 5,9           | 74,0 ± 6,4           |                       | 0,716   |
| nPCR (g/Kg/dia)                         | 1,1 (1,0-1,4)        | 1,2 (1,0-1,6)        |                       | 0,451   |
| GID (Kg)                                | 3,2 ± 1,1            | 2,9 ± 1,4            |                       | 0,165   |
| Medicamentos [n(%)]                     |                      |                      |                       |         |
| Hipotensores                            |                      |                      |                       |         |
| IECA                                    | 69 (46%)             | 19 (41%)             |                       | 0,551   |
| β-bloqueador                            | 64(43%)              | 21 (46%)             |                       | 0,747   |
| Antagonista de canal de cálcio          | 65 (44%)             | 17 (37%)             |                       | 0,423   |
| ARA                                     | 17 (11%)             | 2 (4%)               |                       | 0,158   |
| Ácido acetilsalicílico                  | 38 (26%)             | 8 (17%)              |                       | 0,257   |
| Estatinas                               | 31 (21%)             | 5 (11%)              |                       | 0,129   |
| Suplementos vitamínicos                 | 149 (100%)           | 46 (100%)            |                       |         |
| Ansiolíticos/Antidepressivos            | 41 (28%)             | 12 (26%)             |                       | 0,848   |
| Insulina                                | 29 (19%)             | 10 (22%)             |                       | 0,736   |
| Eritropoetina                           | 129 (87%)            | 41 (89%)             |                       | 0,651   |
| Diabetes [n(%)]                         | 40 (27%)             | 15 (33%)             |                       | 0,448   |

\*p< 0,05. Os dados paramétricos são apresentados como média ± desvio padrão (teste t de *Student*). Os não-paramétricos como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney/Kruskal-Wallis*). Dados de frequência (%) foram analisados por teste  $\chi^2$ . IMC: índice de massa corpórea; HD: hemodiálise; FAV: fístula arteriovenosa; PTFE: politetrafluoretileno; Kt/v: cinética da uréia; URR: relação de redução de uréia; nPCR: taxa de catabolismo protéico normalizada; GID: ganho interdialítico; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARA: antagonistas dos receptores de angiotensina.

As características clínicas dos integrantes dos grupos I e II foram obtidas nos prontuários médicos e os dados dos indivíduos do grupo III foram obtidos durante a entrevista.

Foram comparados os valores médios e frequências das variáveis obtidas entre os grupos I e II e não foi observada diferença significativa, com exceção do tipo de acesso vascular que teve maior frequência de FAV radial-cefálica (distal) nos pacientes do grupo I (74,5% versus 45,7% no grupo II,  $p < 0,001$ ) e de FAV braquial-cefálica (proximal) nos pacientes do grupo II (43,5% versus 22,8% no grupo I,  $p = 0,006$ ).

## **5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais**

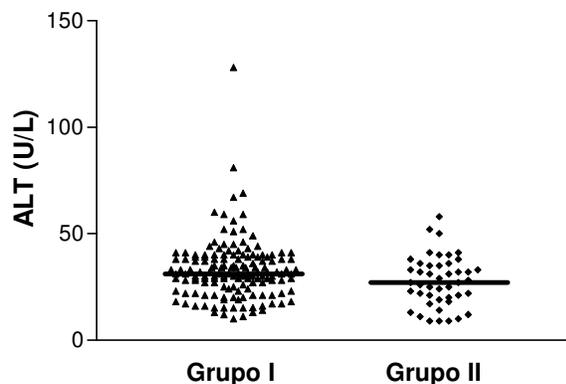
Os dados laboratoriais coletados dos prontuários médicos dos pacientes integrantes dos grupos I e II estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3 – Dados laboratoriais dos pacientes integrantes dos grupos I e II.**

| Parâmetros                             | Grupo I (n = 149)   | Grupo II (n = 46)   | p      |
|--|---------------------|---------------------|--------|
| Nº de hemácias x 10 <sup>6</sup> /mL   | 4,1 (3,6-4,5)       | 3,9 (3,6-4,2)       | 0,143  |
| Hemoglobina (g/dL)                     | 12,4 (11,1-13,8)    | 11,9 (10,7-13,1)    | 0,107  |
| Hematócrito (%)                        | 36,7 ± 5,7          | 35,7 ± 5,1          | 0,288  |
| VCM                                    | 91,3 ± 5,6          | 91,3 ± 5,0          | 0,956  |
| HCM                                    | 30,3 ± 2,2          | 30,0 ± 2,1          | 0,405  |
| CHCM                                   | 33,3 (32,8-33,6)    | 33,2 (32,4-33,7)    | 0,440  |
| Nº de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mL  | 210,0 (175,0-264,0) | 224,5 (176,0-254,0) | 0,693  |
| Nº de leucócitos x 10 <sup>3</sup> /mL | 7,0 (5,0-8,0)       | 6,2 (5,7-7,5)       | 0,685  |
| Ferro sérico (µg/dL)                   | 58,0 (45,8-74,0)    | 54,0 (42,8-70,8)    | 0,443  |
| CTLF (µg/dL)                           | 229,0 ± 48,0        | 226,0 ± 45,0        | 0,774  |
| IST (%)                                | 25,3 (19,0-34,0)    | 24,1 (20,0-31,0)    | 0,587  |
| Ferritina (ng/mL)                      | 340,0 (208,7-610,3) | 319,5 (154,0-556,0) | 0,198  |
| CT (mg/dL)                             | 164,3 ± 38,7        | 166,3 ± 34,5        | 0,747  |
| LDLc (mg/dL)                           | 93,2 ± 30,0         | 97,1 ± 25,0         | 0,440  |
| HDLc (mg/dL)                           | 34,0 (29,0-44,0)    | 33,0 (27,0-43,0)    | 0,304  |
| TG (mg/dL)                             | 150,0 (90,5-229,5)  | 126,0 (100,0-234,0) | 0,983  |
| ALT (U/L)                              | 31,0 (24,5-39,0)    | 27,0 (19,8-35,3)    | 0,027* |
| FAL (U/L)                              | 132,0 (103,0-191,5) | 132,0 (110,3-213,8) | 0,488  |
| Proteínas totais (g/dL)                | 7,5 ± 0,7           | 7,3 ± 0,8           | 0,095  |
| Albumina (g/dL)                        | 3,5 (3,3-3,8)       | 3,6 (3,4-3,8)       | 0,290  |
| Creatinina (mg/dL)                     | 12,0 ± 3,4          | 11,4 ± 3,0          | 0,322  |
| Uréia pré-diálise (mg/dL)              | 140,7 ± 34,9        | 142,8 ± 31,2        | 0,704  |
| Uréia pós-diálise (mg/dL)              | 36,8 ± 12,9         | 37,5 ± 13,7         | 0,779  |
| Cálcio total (mg/dL)                   | 8,8 (8,4-9,3)       | 8,4 (8,4-9,4)       | 0,603  |
| Potássio (mmol/L)                      | 5,0 (4,6-5,6)       | 5,2 (4,6-5,7)       | 0,478  |
| Fosfato (mg/dL)                        | 5,4 ± 1,5           | 5,4 ± 1,7           | 0,837  |
| PTH (pg/mL)                            | 322,0 (150,0-688,8) | 284,0 (128,0-525,0) | 0,437  |

\*p < 0,05. Os dados paramétricos são apresentados como média ± desvio padrão (teste t de *Student*). Os não-paramétricos como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney*). VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina; CTF: capacidade total de ligação do ferro; IST: índice de saturação de transferrina; CT: colesterol total; TG: triglicérides; ALT: alanina amino transferase; FAL: fosfatase alcalina; PTH: paratormônio.

Os valores médios das variáveis laboratoriais dos pacientes do grupo I não diferiram significativamente daqueles do grupo II, com exceção dos níveis de ALT, que foram significativamente maiores no grupo I, 31,0 U/L (24,5-39,0 U/L) quando comparadas ao grupo II, 27,0 U/L (19,8-35,3 U/L,  $p=0,027$ ). A **Figura 10** apresenta a distribuição dos valores obtidos para os níveis plasmáticos de ALT nos grupos I e II.



**Figura 10** – Distribuição dos valores plasmáticos de ALT (U/L) nos grupos I e II. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas.

### 5.3 Avaliação das mutações que predisõem à trombofilia

A fim de avaliar a frequência das mutações nos genes da protrombina (G20210A) e do F V (G1691A) em pacientes submetidos à hemodiálise e investigar a associação dessas com trombose do acesso vascular, foram comparadas as frequência destas mutações entre os grupos I e II (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Frequência das mutações nos genes da protrombina (G20210A) e do F V (G1691A) entre os integrantes dos grupos I e II.

| Mutação | Genótipo     | Grupo I (n = 149) | Grupo II (n = 46) |
|---------|--------------|-------------------|-------------------|
| G20210A | Heterozigoto | 2 (1,3%)          | 4 (8,7%)*         |
|         | Negativo     | 147 (98,7%)       | 42 (91,3%)        |
| G1691A  | Heterozigoto | 2 (1,3%)          | 0 (0%)            |
|         | Negativo     | 147 (98,7%)       | 46 (100%)         |

Um número significativamente maior de heterozigotos para a frequência da mutação no gene da protrombina (G20210A), foi obtido no grupo II comparando-se ao grupo I (OR: 7,0; IC 95%: 1,1 a 57,3;  $p=0,01$ ). Não foi observada diferença significativa ( $p=0,430$ ) na frequência da mutação no gene do F V (G1691A) entre os grupos estudados. Em nenhum dos grupos foram encontrados indivíduos homozigotos para as mutações investigadas.

#### 5.4 Avaliação da coagulação e fibrinólise

Visando investigar as alterações hemostáticas em pacientes submetidos à hemodiálise e a associação dessas variáveis com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular, foi feita a avaliação da hemostasia dos integrantes dos três grupos, por meio da determinação plasmática dos seguintes marcadores: D-Di, PAI-1, FvW, ADAMTS-13 e FVIII. A **Tabela 5** apresenta os resultados dos parâmetros hemostáticos obtidos para os grupos I, II e III.

Na **Tabela 5** estão apresentados os resultados dos parâmetros hemostáticos para os grupos I, II e III.

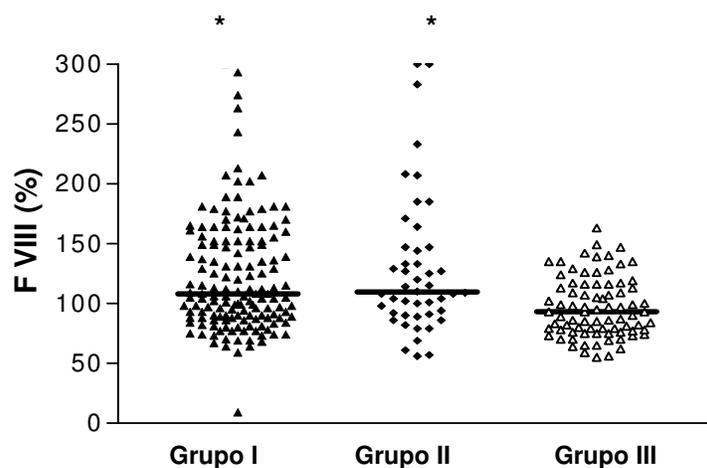
**Tabela 5 – Parâmetros hemostáticos avaliados nos integrantes do estudo.**

| Parâmetros           | Grupo I (n = 149) | Grupo II (n = 46) | Grupo III (n = 80) |
|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| F VIII (% atividade) | 108 (88-152)*     | 110 (91-147)*     | 93 (78-116)        |
| FvW (mU/mL)          | 1047 (722-1351)*  | 1134 (760-1381)*  | 805 (683-1012)     |
| ADAMTS-13 (ng/mL)    | 276 (238-330)*    | 299 (244-330)*    | 578 (486-690)      |
| D-Di (ng/mL)         | 444 (241-836)*    | 464 (311-899)*    | 241 (166-319)      |
| PAI-1 (ng/mL)        | 10,1 (4,5-20,9)*  | 8,4 (5,0-17,2)*   | 54,6 (36,7-73,6)   |

\* $p<0,05$  comparado com o grupo III.

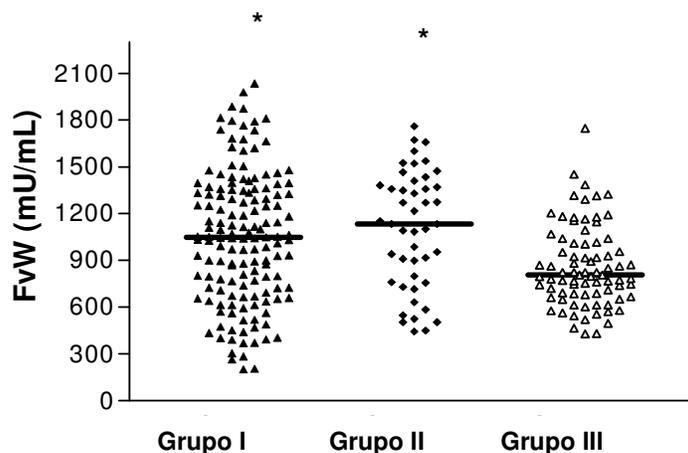
Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (Kruskal-Wallis e teste de Dunn). F VIII: fator VIII; FvW: fator von Willebrand;; ADAMTS-13: *a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains-13*; D-Di: dímeros-D; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.

A comparação da atividade do F VIII entre os três grupos mostrou valores aumentados nos grupos I e II em relação ao grupo III ( $p < 0,05$ ), conforme ilustrado na **Figura 15**. Não houve diferença comparando-se os resultados obtidos para esse parâmetro entre os grupos I e II.



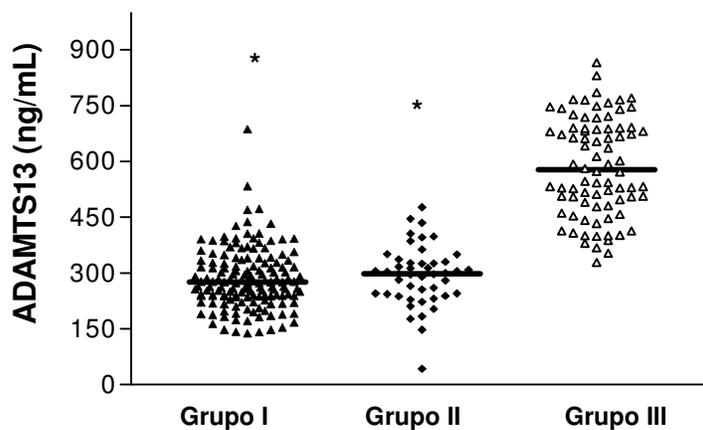
**Figura 11** - Distribuição dos valores plasmáticos de F VIII (% atividade) nos grupos I, II e III. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo III.

Quando comparado os níveis de FvW nos grupos I e II ao grupo III, foi observado também um aumento nos dois primeiros grupos, conforme representado na **Figura 14** ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença comparando-se os resultados obtidos para esse parâmetro entre os grupos I e II.



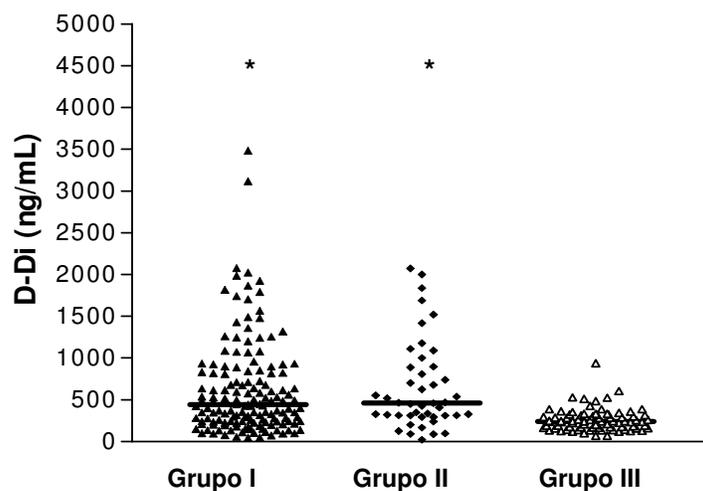
**Figura 12** - Distribuição dos valores plasmáticos de FvW (mU/mL) nos grupos I, II e III. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo III.

Em contrapartida, observou-se que os níveis de ADAMTS-13 foram significativamente reduzidos nos pacientes dos grupos I e II quando comparados aos indivíduos do grupo III ( $p < 0,05$ ) (**Figura 12**). Não houve diferença comparando-se os resultados obtidos para esse parâmetro entre os grupos I e II.



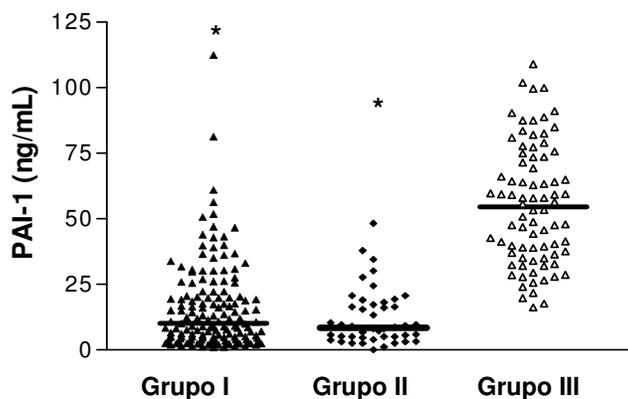
**Figura 13** - Distribuição dos valores plasmáticos de ADAMTS-13 (ng/mL) nos grupos I, II e III. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo III.

Os níveis de D-Di mostraram-se mais elevados nos pacientes dos grupos I e II quando comparados aos obtidos no grupo III ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13**). Não houve diferença comparando-se os resultados obtidos para esse parâmetro entre os grupos I e II.



**Figura 14** – Distribuição dos valores plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos grupos I, II e III. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo III.

A comparação dos resultados dos marcadores hemostáticos, obtidos nos três grupos, mostrou que os níveis plasmáticos de PAI-1 estavam reduzidos nos pacientes dos grupos I e II em relação aos indivíduos do grupo III (**Figura 11**). Não houve diferença comparando-se os resultados obtidos para esse parâmetro entre os grupos I e II.



**Figura 15** - Distribuição dos valores plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nos grupos I, II e III. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo III.

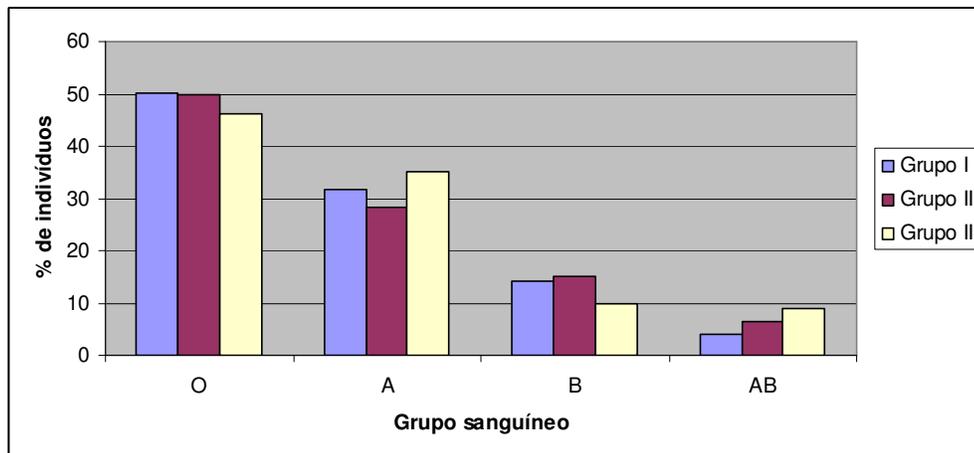
### 5.5 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO

Visando avaliar a associação dos grupos sanguíneos com a presença de complicações trombóticas do acesso vascular, foi investigada a frequência dos grupos sanguíneos ABO nos integrantes do estudo.

Na **Tabela 6** e na **Figura 15** estão apresentadas as frequências dos grupos sanguíneos do sistema ABO para os grupos I, II e III.

**Tabela 6** – Frequência dos grupos sanguíneos do sistema ABO nos integrantes do estudo.

| Grupo sanguíneo | Grupo I (n = 149) | Grupo II (n = 46) | Grupo III (n = 80) | p     |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------|
| O               | 75 (50,3%)        | 23 (50,0%)        | 37 (46,2%)         | 0,833 |
| A               | 47 (31,6%)        | 13 (28,3%)        | 28 (35,0%)         | 0,726 |
| B               | 21 (14,1%)        | 7 (15,2%)         | 8 (10,0%)          | 0,611 |
| AB              | 6 (4,0%)          | 3 (6,5%)          | 7 (8,8%)           | 0,381 |
| “não O”         | 74 (49,7%)        | 23 (50%)          | 43 (53,8%)         | 0,833 |



**Figura 16 - Distribuição dos grupos sanguíneos nos grupos I, II e III.**

Foi observada uma maior frequência do grupo sanguíneo “O” nos três grupos, seguido de forma decrescente, pela frequência dos grupos A, B e AB. Quando agrupados os tipos A, B e AB (grupo “não O”) não foi observada diferença significativa em relação à frequência dos grupos sanguíneos ABO entre os grupos I, II e III. A distribuição dos grupos sanguíneos nos integrantes deste estudo foi similar à distribuição obtida em 2006 entre os doadores cadastrados na Fundação Hemominas/MG (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2006).

### **5.6 Avaliação da relação do grupo sanguíneo ABO e níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos**

Os integrantes do estudo foram distribuídos de acordo com o grupo sanguíneo em duas categorias “O” e “não O” (que incluiu os indivíduos A, B e AB). Visando avaliar a associação entre os parâmetros hemostáticos e as categorias “O” e “não O”, os níveis plasmáticos desses parâmetros para cada um dos grupos (I, II ou III) foram comparados, considerando a categoria a qual seus integrantes pertencem, “O” e “não O”, como mostra a **Tabela 7**.

**Tabela 7 – Parâmetros hemostáticos dos integrantes dos grupos I, II e III, segundo o grupo sanguíneo “O” e “não O”.**

| Parâmetros/Grupos    |           | Grupos sanguíneos |                 | p        |
|----------------------|-----------|-------------------|-----------------|----------|
|                      |           | “O”               | “Não O”         |          |
| F VIII (%)           | Grupo I   | 98 (80-139)       | 118 (97-164)    | 0,001*   |
|                      | Grupo II  | 104 (87-129)      | 125 (99-160)    | 0,195    |
|                      | Grupo III | 87 ± 21           | 105 ± 25        | 0,001*   |
| FvW<br>(Um/mL)       | Grupo I   | 916 ± 413         | 1175 ± 388      | < 0,001* |
|                      | Grupo II  | 998 ± 373         | 1196 ± 357      | 0,073    |
|                      | Grupo III | 761 ± 222         | 940 ± 262       | 0,002*   |
| ADAMTS-13<br>(ng/mL) | Grupo I   | 274 (239-333)     | 276 (222-319)   | 0,786    |
|                      | Grupo II  | 302 ± 73          | 286 ± 89        | 0,502    |
|                      | Grupo III | 540 ± 113         | 623 ± 136       | 0,005*   |
| D-Di<br>(ng/mL)      | Grupo I   | 372 (234-886)     | 491 (244-823)   | 0,403    |
|                      | Grupo II  | 466 (324-790)     | 461 (254-1068)  | 0,792    |
|                      | Grupo III | 263 ± 148         | 257 ± 123       | 0,837    |
| PAI-1<br>(ng/mL)     | Grupo I   | 8,8 (4,6-19,2)    | 13,3 (3,9-26,9) | 0,445    |
|                      | Grupo II  | 14,2 ± 12,5       | 10,1 ± 7,9      | 0,191    |
|                      | Grupo III | 58,0 ± 23,3       | 53,0 ± 22,4     | 0,336    |

\*p < 0,05. Os dados paramétricos são apresentados como média ± desvio padrão (teste t de *Student*). Os não-paramétricos como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney*). F VIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand; ADAMTS-13: *a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains-13*; D-Di: dímeros-D; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.

Um aumento significativo nos níveis plasmáticos de F VIII e FvW entre os integrantes dos grupos I (0,001 e <0,001, respectivamente) e III (0,001 e 0,002, respectivamente) e de ADAMTS-13 naqueles do grupo III (p=0,005) foi verificado dentre os indivíduos “não O”, comparando-se àqueles do grupo “O”. Os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 não variaram entre os participantes dos três grupos, de acordo com o grupo sanguíneo.

## 5.7 Avaliação dos marcadores inflamatórios

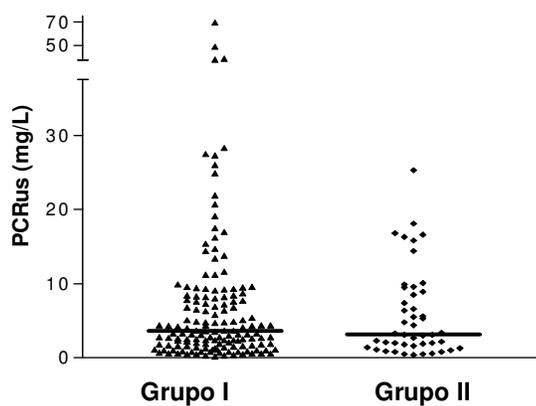
Objetivando investigar a associação dos marcadores inflamatórios e a presença de complicações trombóticas do acesso vascular em pacientes submetidos à hemodiálise foi determinada a concentração plasmática de PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1. A **Tabela 8** apresenta os resultados obtidos para os grupos I e II.

**Tabela 8 – Parâmetros inflamatórios avaliados nos integrantes dos grupos I e II.**

| Parâmetros             | Grupo I (n = 149) | Grupo II (n = 46) | p     |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------|
| PCRus (mg/L)           | 3,7 (1,7-8,4)     | 3,2 (1,6-8,9)     | 0,811 |
| IL-8 (pg/mL)           | 5,0 (3,0-9,0)     | 6,0 (4,0-9,0)     | 0,574 |
| TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) | 2665 (2149-3064)  | 2461 (1997-3228)  | 0,540 |

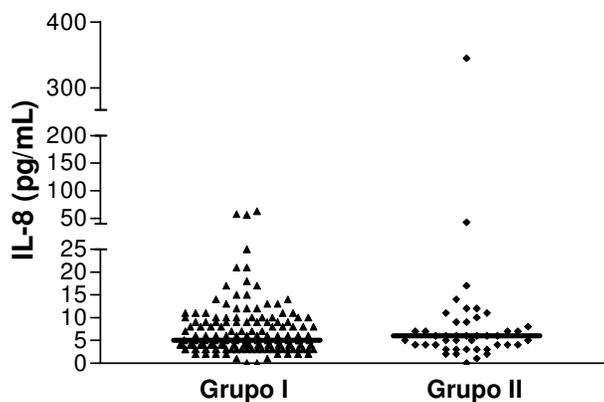
Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney*). PCRus: proteína C reativa ultrasensível; IL-8: interleucina-8; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformador-beta 1.

Não houve diferença significativa entre os valores de PCRus no grupo I quando comparados ao grupo II, conforme ilustrado na **Figura 17**.



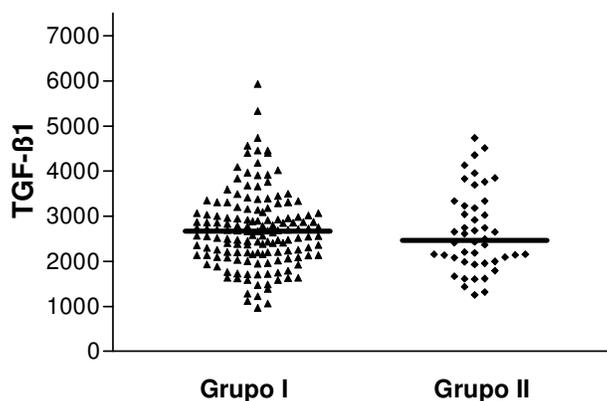
**Figura 17 - Distribuição dos valores plasmáticos de PCRus (mg/L) nos grupos I e II. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas.**

Os níveis de IL-8 também não apresentaram diferença significativa entre os grupos I e II (**Figura 18**).



**Figura 18** - Distribuição dos valores plasmáticos de IL-8 (pg/mL) nos grupos I e II. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas.

Avaliando os valores obtidos para TGF- $\beta$ 1, não foi observada diferença significativa entre os grupos I e II (**Figura 19**).



**Figura 19** - Distribuição dos valores plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) nos grupos I e II. As linhas horizontais indicam as medianas obtidas.

## 5.8 Associação dos parâmetros avaliados com a trombose do acesso vascular

Na análise inicial não foi observada associação entre a presença de trombose do acesso vascular e a variável explicativa, ou seja, presença de pelo menos uma alteração hemostática e inflamatória, duas ou três alterações (OR: 1,71; IC 95%:

0,38 a 7,67,  $p=0,483$ ) ou mais de quatro destas alterações (OR: 1,71; IC 95%: 0,35 a 8,31,  $p=0,505$ ).

Dos participantes do estudo, 22 (11,3%) apresentaram pelo menos uma das alterações hemostáticas e inflamatórias (variável explicativa), 87 (44,6%) apresentaram duas ou três alterações e 86 (44,1%) apresentaram quatro ou mais alterações.

Na análise posterior, por regressão logística univariada, foi investigada a associação entre a presença de trombose do acesso vascular e algumas variáveis explicativas de interesse, como idade, sexo, tempo de hemodiálise, IMC, ganho interdialítico, concentração de hemoglobina, número de plaquetas, níveis plasmáticos de ferritina, CT, HDLc, ALT, albumina, creatinina e cálcio, Kt/v; URR, nPCR, pressão arterial sistólica e diastólica, níveis plasmáticos de PAI-1, D-Di, FvW, ADAMTS-13, F VIII, PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1, grupos sanguíneos “O” e “não O”, presença das mutações FVL (G1691A) e no gene da protrombina (G20210A) e presença de diabetes.

Os resultados da análise de regressão logística univariada mostraram associação significativa ( $p<0,20$ ) entre a presença de trombose do acesso vascular e o ganho interdialítico, concentração de hemoglobina, níveis plasmáticos de ALT e IL-8, PA sistólica e a presença da mutação no gene da protrombina (G20210A).

No entanto, quando analisadas sob o modelo de regressão logística múltipla, apenas a variável mutação no gene da protrombina (G20210A) ( $p=0,012$ ) e a ALT ( $p=0,034$ ) permaneceram associadas independentemente à variável resposta, ou seja, presença de trombose do acesso vascular (**Tabela 9**).

**Tabela 9 – Odds ratio, intervalos de confiança (IC) e valor de p do modelo de regressão logística múltiplo considerando como variável dependente a presença de trombose do acesso vascular.**

| Variáveis           | Odds ratio | IC 95%     | p valor |
|---------------------|------------|------------|---------|
| GID (Kg)            | 1,0        | 0,20; 1,10 | 0,082   |
| Hemoglobina (g/dL)  | 1,0        | 0,84; 1,18 | 0,990   |
| ALT (U/L)           | 0,96       | 0,92; 0,99 | 0,034*  |
| PA sistólica (mmHg) | 1,02       | 0,99; 1,04 | 0,080   |
| IL-8                | 1,01       | 0,99; 1,03 | 0,238   |
| Mutação G20210A     | 12,0       | 1,72; 83,5 | 0,012*  |

\* $p<0,05$ . GID: ganho interdialítico; ALT: alanina amino transferase; PA: pressão arterial.

## 5.9 Correlação entre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios

Visando investigar a correlação entre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios foi utilizada a correlação de *Spearman* como apresentado na **Tabela 10**.

**Tabela 10 - Coeficiente de correlação (r) de *Spearman* e valor de p para os parâmetros hemostáticos e inflamatórios avaliados nos grupos I e II.**

| Marcadores      | Grupo I (n = 149) |          | Grupo II (n = 46) |       |
|-----------------|-------------------|----------|-------------------|-------|
|                 | r                 | p        | r                 | p     |
| PAI-1 e PCRus   | 0,31              | < 0,001* | 0,31              | 0,04* |
| PAI-1 e TGF-β1  | 0,37              | < 0,001* | 0,30              | 0,04* |
| D-Di e PCRus    | 0,27              | < 0,001* | 0,31              | 0,04* |
| D-Di e TGF-β1   | 0,23              | < 0,005* | -0,19             | 0,195 |
| FvW e PCRus     | 0,26              | 0,001*   | 0,16              | 0,275 |
| FvW e TGF-β1    | 0,31              | < 0,001* | 0,31              | 0,04* |
| F VIII e PCRus  | 0,19              | 0,02*    | - 0,17            | 0,266 |
| F VIII e TGF-β1 | 0,18              | 0,03*    | - 0,14            | 0,355 |

\*p< 0,05; r: coeficiente de correlação. PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; D-Di: dímeros-D; FvW: Fator von Willebrand; F VIII: Fator VIII; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; TGF-β1: fator de crescimento transformador-beta 1

Foi observada correlação positiva entre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos PAI-1, D-Di, FvW e F VIII e os marcadores inflamatórios PCRus e TGF-β1 no grupo I. No grupo II foi observada correlação positiva apenas entre os níveis de PAI-1 e PCRus, PAI-1 e TGF-β1, D-Di e PCRus e FvW e TGF-β1 .

### 5.10 Avaliação dos marcadores hemostáticos, inflamatórios e frequência do grupo sanguíneo ABO na recorrência do evento trombótico

Uma comparação foi feita entre parâmetros hemostáticos, inflamatórios e frequência do grupo sanguíneo ABO nos integrantes do grupo I e do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, constituído de dez pacientes (grupo IIa) e os resultados estão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11 – Parâmetros hemostáticos, inflamatórios e frequência do grupo sanguíneo ABO entre os integrantes do grupo I e do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico.**

| Parâmetros           | Grupo I (n = 149) | Grupo IIa (n = 10)<br>> 1 evento trombótico | p       |
|----------------------|-------------------|---|---------|
| D-Di (ng/mL)         | 444 (241-836)     | 427 (168-1001)                              | 0,840   |
| PAI-1 (ng/mL)        | 10,1 (4,5-20,9)   | 11,9 (5,9-19,3)                             | 0,763   |
| FvW (um/mL)          | 1046 ± 419        | 1029 ± 362                                  | 0,902   |
| F VIII (% atividade) | 108 (88-152)      | 124 (104-147)                               | 0,427   |
| ADAMTS-13 (ng/mL)    | 284 ± 82          | 298 ± 118                                   | 0,632   |
| PCRus (mg/L)         | 3,6 (1,6-8,3)     | 3,8 (2,0-6,4)                               | 0,843   |
| IL-8 (pg/mL)         | 5,0 (3,0-9,0)     | 6,5 (5,0-14,0)                              | 0,193   |
| TGF-β1 (pg/mL)       | 2664 (2140-3064)  | 3280 (2183-3828)                            | 0,193   |
| Grupo sanguíneo      | Grupo "O"         | 75 (50,3%)                                  | 6 (60%) |
|                      | Grupo "não O"     | 74 (49,7%)                                  | 4 (40%) |

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann Whitney*). Comparação de frequência foi feita por teste  $\chi^2$ . D-Di: dímeros-D; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; FvW: fator von Willebrand; F VIII: fator VIII; ADAMTS-13; *a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains-13*; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; IL-8: interleucina-8; TGF-β1: fator de crescimento transformador-beta 1.

Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros hemostáticos, inflamatórios e a frequência do grupo sanguíneo ABO entre os integrantes do grupo I e dos dez pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico (grupo IIa).

### 5.11 Avaliação dos marcadores hemostáticos e inflamatórios nos integrantes do grupo I, após reavaliação dos prontuários

A reavaliação dos prontuários médicos dos pacientes submetidos à hemodiálise, um ano após a coleta de sangue para este estudo, revelou que 15 pacientes do grupo I tiveram trombose neste período. Dessa forma, os integrantes do grupo I foram reclassificados em dois subgrupos: Ia (incluiu os pacientes que apresentaram trombose) e Ib (os que permaneceram sem esta complicação). Foram comparadas as mesmas variáveis hemostáticas e inflamatórias, visando identificar um marcador de predição para o evento trombótico. A **Tabela 12** apresenta os resultados dos parâmetros avaliados neste estudo para os dois subgrupos do grupo I (Ia e Ib).

**Tabela 12 - Parâmetros hemostáticos e inflamatórios nos dois subgrupos do grupo I (Ia e Ib).**

| Parâmetros           | Grupo Ia (n = 15) | Grupo Ib (n = 134) | p     |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------|
| D-Di (ng/mL)         | 428 (242 – 1085)  | 445 (242-818)      | 0,670 |
| PAI-1 (ng/mL)        | 19,2 (5,0-31,0)   | 9,4 (4,3-20,2)     | 0,319 |
| FvW (mU/mL)          | 1191 ± 408        | 1029 ± 419         | 0,159 |
| F VIII (% atividade) | 149 (103-169)     | 106 (88-152)       | 0,082 |
| ADAMTS-13 (ng/mL)    | 250 (220-310)     | 276 (239-334)      | 0,344 |
| PCRus (mg/L)         | 4,8 (1,9 – 23,0)  | 3,4 (1,6-8,2)      | 0,270 |
| IL-8 (pg/mL)         | 4,0 (3,0-8,8)     | 5,0 (3,0-9,0)      | 0,451 |
| TGF-β1 (pg/mL)       | 3027 ± 913        | 2648 ± 817         | 0,095 |

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann Whitney*). Comparação de frequência foi feita por teste  $\chi^2$ . D-Di: dímeros-D; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; FvW: fator von Willebrand; F VIII: fator VIII; ADAMTS-13; *a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains-13*; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; IL-8: interleucina-8; TGF-β1: fator de crescimento transformador-beta 1.

Não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros hemostáticos e inflamatórios entre os integrantes dos grupos Ia e Ib.

## *6 Discussão*

---

A doença renal crônica, bem como o processo de hemodiálise, são eventos que predisõem à trombose. O aumento da tendência trombótica nos pacientes sob hemodiálise resulta da ativação de plaquetas e dos fatores da coagulação. A superfície artificial do enxerto de PTFE, e em menor extensão da FAV nativa, promove a adesão de plaquetas e do fibrinogênio, favorecendo a formação do coágulo no local de acesso vascular (SALZMAN *et al.*, 1987; SAVAGE & RUGGERI, 1991). O fluxo sanguíneo turbulento no circuito extracorpóreo resulta na agregação das plaquetas e na ativação de monócitos com consequente expressão de FT (FISCHER, 2007). As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento como o PDGF (*platelet-derived growth factor*), que contribuem para o aumento da hiperplasia no acesso vascular, reduzindo o fluxo sanguíneo e facilitando a agregação de outras plaquetas ativadas e não ativadas (SMITS *et al.*, 2000).

Além destes processos, a retenção de toxinas urêmicas, dislipidemia, hipertensão e hiperparatireoidismo associados à DRC contribuem para a lesão endotelial (MALYSZKO *et al.*, 2001).

A quase totalidade dos casos de trombose em pacientes que fazem hemodiálise está associada ao fluxo sanguíneo reduzido no acesso vascular, devido, principalmente, à proliferação das células musculares lisas e à hiperplasia da íntima na anastomose venosa da FAV ou na região do enxerto arteriovenoso, que eventualmente progride para estenose. No entanto, outras causas de redução do fluxo sanguíneo levando à trombose do acesso vascular têm sido propostas. Dessa forma, a estase devido à hipotensão, hipovolemia ou a compressão externa da região da fístula, a lesão endotelial, o estado de hipercoagulabilidade, o uso de eritropoetina, a presença de diabetes e o tabagismo podem estar envolvidos nos eventos trombóticos. A redução do fluxo sanguíneo causa estagnação do sangue dentro do acesso vascular, gerando um ambiente protrombótico (SMITS *et al.*, 2000; BROPHY *et al.*, 2009; LIN & YANG, 2009).

Estudos relatam que cerca de 20 a 25% das hospitalizações de pacientes submetidos à hemodiálise resultam de complicações no acesso vascular, sendo que 80% dessas são decorrentes de trombose (NASCIMENTO & RIELLA, 1999; SMITS *et al.*, 2000).

Visando elucidar as possíveis causas que levaram ao desenvolvimento de trombos no acesso vascular em pacientes submetidos ao desafio hemostático representado pela hemodiálise, no presente estudo foram investigados marcadores

hemostáticos e inflamatórios, a frequência do grupo sanguíneo do sistema ABO e fatores genéticos que predispõem à trombose, com o propósito de definir aqueles capazes de prever o evento trombótico. Isso possibilitaria a adoção de medidas terapêuticas para prevenir a ocorrência da formação de trombos.

Um total de 195 pacientes atendidos no Instituto Mineiro de Hemodiálise e no Serviço de Hemodiálise do Hospital das Clínicas/UFMG, selecionados de acordo com os critérios de exclusão que visavam eliminar outros fatores capazes de predispor à trombose, foram avaliados neste estudo. Destes pacientes, 149 (76%) não tiveram trombose do acesso vascular (Grupo I) e 46 (24%) tiveram essa complicação (Grupo II). Além destes, foram incluídos 80 indivíduos hígidos (Grupo III).

A pesquisa de todos os marcadores úteis para a identificação do risco aumentado de trombose poderia representar o delineamento ideal para responder aos objetivos propostos neste estudo. No entanto, mesmo que fossem investigados todos os fatores trombofílicos conhecidos, incluindo as deficiências de AT, PC, antígenos PS livre ou PS total; resistência à PCa; anticorpo lúpico e anticorpos anticardiolipina; homocisteína plasmática e F VIII (antígeno e/ou atividade), além da análise do DNA para pesquisa do FVL e da mutação no gene da protrombina (G20210A), o estudo não estaria completo, pois é possível que haja outros fatores que ainda não foram descritos.

A literatura revela que nem sempre os marcadores trombofílicos citados são úteis e eficazes para o diagnóstico de um evento trombótico. Além disso, sabe-se que os testes laboratoriais deveriam ser solicitados somente quando os resultados desses fossem capazes de influenciar as decisões terapêuticas ou as medidas de prevenção de uma determinada doença. Nas condições trombofílicas, os resultados dos testes laboratoriais normalmente não influenciam o tratamento dos eventos agudos, pois a conduta terapêutica não depende dos resultados desses testes. Por outro lado, tais resultados podem ser importantes para a prevenção de um evento trombótico ou a sua recidiva, pois irão auxiliar na decisão quanto ao tempo e intensidade do tratamento a ser instituído (TRIPODI & MANNUCCI, 2001).

Sabe-se que o acesso vascular para hemodiálise envolve componentes dos sistemas arterial e venoso e, dessa forma, os fatores de risco para ambos os sistemas podem afetar a função da fístula.

A análise das características clínicas dos integrantes dos grupos avaliados revelou que não houve diferença significativa para a maioria dessas. No entanto, a frequência dos tipos de acesso vascular foi diferente entre os grupos I e II, sendo que a FAV radial-cefálica (distal) foi mais frequente nos pacientes do grupo I e a FAV braquial-cefálica (proximal) nos pacientes do grupo II. Este resultado seria o esperado, considerando que o local de primeira escolha para confecção da FAV é distal e que os pacientes do grupo II desenvolveram trombose do acesso vascular, tornando necessário confeccionar outra FAV, agora proximal.

O levantamento da causa primária da DRC mostrou que houve uma tendência ( $p=0,06$ ) de maior frequência da nefropatia diabética no grupo II (26%) quando comparado ao grupo I (14%). No entanto, na análise por regressão logística, a presença de diabetes não mostrou associação significativa com a trombose do acesso vascular (OR: 1,36; IC: 0,66 a 2,79;  $p=0,398$ ).

A pressão sistólica tendeu a ser mais elevada ( $p=0,06$ ) nos pacientes do grupo II, 140 mmHg (130-150 mmHg), comparando-se ao grupo I, 130 mmHg (120-143 mmHg), no entanto, essa variável não se mostrou associada à trombose do acesso vascular (OR: 1,02; IC: 0,99 a 1,04;  $p=0,08$ ).

Com relação ao uso de medicamentos pelos pacientes sob hemodiálise, embora não tenha sido observada diferença significativa na frequência do uso de ácido acetilsalicílico e estatinas nos pacientes dos grupos I e II (26% e 21%; 17% e 11%, respectivamente), pode-se inferir que a utilização desses medicamentos em um número maior de pacientes do grupo I pode ter contribuído para prevenir o desenvolvimento de eventos trombóticos nesse grupo.

Quanto aos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, cujos resultados foram coletados dos prontuários médicos, não foram observadas diferenças significativas entre aqueles obtidos para os grupos I e II, com exceção dos níveis de ALT que foram significativamente maiores ( $p=0,027$ ) no grupo I, 31 U/L (24,5-39,0 U/L) quando comparados ao grupo II, 27 U/L (19,8-35,3 U/L). Pela análise de regressão logística múltipla, essa enzima foi considerada um fator de risco independente para trombose do acesso vascular (OR: 0,96; IC: 0,92 a 0,99;  $p=0,034$ ). No entanto, a observação da distribuição dos valores obtidos para esta enzima (**Figura 10**) revelou que esses estavam dentro do limite de referência (<68 U/L), exceto dois valores no grupo I (81 e 128 U/L), que ultrapassaram esse limite, o que poderia justificar a elevação da mediana dos valores nesse grupo, resultando

em diferença significativa quando comparada ao grupo II. Embora a presença de doenças hepáticas fizesse parte dos critérios de exclusão, inadvertidamente, dois pacientes (dentre os 149 selecionados para compor o grupo I), apresentavam formas subclínicas de hepatopatias e foram incluídos neste estudo.

Com relação aos fatores de risco genéticos para o desenvolvimento de trombose, a mutação no gene da protrombina (G20210A) tem se destacado como uma das alterações mais importantes, especialmente para a trombose venosa profunda. Neste estudo foram identificados dois (1,3%) pacientes heterozigotos para mutação no gene da protrombina (G20210A) pertencentes ao grupo I e quatro (8,7%) pacientes heterozigotos do grupo II, dentre eles um apresentou mais de um evento trombótico.

Um estudo conduzido por Paiva *et al.* (2009), onde a presença da mutação G20210A foi investigada em 233 indivíduos hígidos da mesma região e *background* genético dos pacientes envolvidos no presente estudo (Belo Horizonte e cidades vizinhas) revelou apenas três portadores dessa mutação em heterozigose, o que resultou em uma frequência de 1,3%, idêntica à obtida no presente estudo. O número reduzido de portadores da mutação G20210A neste estudo reflete sua frequência na nossa população regional.

Embora a análise estatística tenha mostrado que a mutação G20210A constitui um fator de risco para o desenvolvimento de trombose do acesso vascular nos pacientes sob hemodiálise (OR: 12,0; IC 95%: 1,72 a 83,5;  $p=0,012$ ), estudos envolvendo um grupo amostral maior tornam-se necessários para confirmar esta associação, uma vez que o número de indivíduos que apresentaram a mutação nos dois grupos avaliados foi pequeno, 2 (1,3%) e 4 (8,7%) nos grupos I e II, respectivamente.

Em concordância com o presente estudo, Atac *et al.* (2002) observaram quatro (9%) pacientes heterozigotos para mutação G20210A no grupo de pacientes sob hemodiálise que apresentaram trombose do acesso vascular ( $n=46$ ) e nenhum paciente portador dessa mutação no grupo que não teve essa complicação ( $n=44$ ), sugerindo que essa alteração pode contribuir para a trombose do acesso vascular.

No entanto, outros estudos não observaram associação entre a mutação no gene da protrombina e as complicações trombóticas do acesso vascular. O'Shea *et al.* (2003) observaram apenas um paciente heterozigoto para a mutação G20210A entre 31 pacientes submetidos à hemodiálise que apresentavam história de

trombose do acesso vascular recorrente. Eleftheriadis *et al.* (2008) não detectaram essa mutação em um caso relatado de trombose do acesso vascular. Estudos realizados por Akman *et al.* (2006), Knoll *et al.* (2005) e Danis *et al.* (2009) também não encontraram associação significativa entre a presença da mutação G20210A e a trombose da FAV.

A inclusão da pesquisa do F V Leiden neste estudo resultou do fato desta mutação constituir a alteração genética mais frequentemente associada à trombose venosa em populações com descendência caucasiana, aumentando o risco de ocorrência do evento em 6,6 vezes (SIMIONI *et al.*, 2002). No entanto, sabe-se que a associação do FVL e trombose arterial ainda é controversa (ROSENDAAL *et al.*, 1997; VOETSCH *et al.*, 2000, SABINO *et al.*, 2006).

No presente estudo foram encontrados dois (1,3%) pacientes heterozigotos para FVL no grupo I e nenhum paciente do grupo II apresentou essa mutação, sugerindo que essa alteração não está associada às complicações trombóticas do acesso vascular. Este resultado está de acordo com alguns relatos da literatura. Födinger *et al.* (1996), não demonstraram associação entre o FVL e trombose do acesso vascular. Esses pesquisadores investigaram a presença do FVL em 152 pacientes submetidos à hemodiálise (idade média: 56 anos, intervalo: 21-84 anos) e identificaram sete pacientes heterozigotos (4,6%). No entanto, esses pacientes não apresentaram trombose do acesso vascular. Outro estudo no qual foram avaliados 31 pacientes sob hemodiálise com história de trombose do acesso vascular recorrente (idade média: 44 anos, intervalo: 21-79 anos), o FVL não foi detectado em nenhum dos pacientes (O'SHEA *et al.*, 2003).

Recentemente, Brophy *et al.* (2009), em um estudo caso controle, pesquisaram o FVL em 101 pacientes submetidos à hemodiálise por pelo menos três anos. Encontraram três pacientes (5,0%) heterozigotos para a mutação estudada entre os 60 pacientes que haviam sofrido dois ou mais episódios de trombose do acesso vascular dentro de 12 meses (idade:  $54 \pm 14$  anos) e dois pacientes (4,9%) heterozigotos entre os 41 pacientes que não haviam apresentado essa complicação (idade:  $55 \pm 10$  anos), concluindo que o FVL não é um fator de risco para trombose do acesso vascular. Danis *et al.* (2009) encontraram oito (6,9%) pacientes heterozigotos para essa mutação em 116 pacientes submetidos à hemodiálise, no entanto, também não observaram associação com trombose do acesso vascular.

Por outro lado, Akman *et al.* (2006) observaram associação significativa entre a presença do FVL e a trombose da FAV em 73 pacientes sob hemodiálise (idade:  $47 \pm 13$  anos) que aguardavam o transplante renal. Atac *et al.* (2002) observaram seis (13%) pacientes heterozigotos para FVL em um total de 46 que sofreram mais de três episódios trombóticos do acesso vascular (idade média: 47 anos) e dois (4%) pacientes heterozigotos em 44 sem essa complicação (idade média: 42 anos), sendo que a prevalência do FVL foi significativamente maior no primeiro grupo. Um estudo caso controle envolvendo 419 pacientes sob hemodiálise (idade:  $62 \pm 16$  anos), mostrou uma associação significativa entre FVL e trombose do acesso vascular após ajuste com outros fatores de risco (KNOLL *et al.*, 2005).

Em dois relatos de caso, foi observada a presença do FVL em heterozigose. No primeiro, Bremer & Shaefer (1997) relataram a presença dessa mutação em um paciente de 54 anos que sofreu trombose do acesso vascular após três meses de hemodiálise. Porém, esse paciente já havia desenvolvido trombose em inúmeras veias (mesentérica, ilíaca, femoral, subclávia e jugular) e artérias (axilar, poplítea, subclávia e renal). No segundo relato de caso, Eleftheriadis *et al.* (2008) observaram o FVL em um paciente de 31 anos submetido à hemodiálise por dois anos e que desenvolveu dois episódios de trombose do acesso vascular. No entanto, outros fatores de risco para trombose também estavam presentes.

A controvérsia entre os resultados dos diferentes estudos em relação à associação da presença da mutação no gene da protrombina e do FVL e a trombose do acesso vascular pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas variações étnicas das populações estudadas, o controle inadequado de outros fatores de risco para trombose, bem como pelo tamanho limitado das amostras nos diferentes estudos. O critério etnia não foi considerado neste estudo, uma vez que a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, o que implica numa grande dificuldade em definir a origem étnica dos indivíduos, baseando-se apenas em parâmetros fenotípicos (PARRA *et al.*, 2003).

Considerando os vários fatores de risco para trombose e a baixa frequência das mutações que predispõem à trombofilia, estudos longitudinais com critérios de exclusão bem estabelecidos e envolvendo um número maior de pacientes tornam-se essenciais para responder com maior clareza se a presença dessas mutações realmente predispõe à trombose do acesso vascular. Elucidar esta questão é de

extrema relevância, pois resultará em subsídios para a decisão sobre o uso de anticoagulantes em pacientes que fazem hemodiálise.

Com relação aos marcadores hemostáticos, no presente estudo foram avaliados os níveis plasmáticos de D-Di, PAI-1, FvW, ADAMTS-13 e F VIII.

O D-Di constitui o produto da quebra de ligação cruzada da fibrina e é dependente da geração de fibrina e da fibrinólise, sendo considerado o melhor marcador de *turnover* de fibrina. A elevação dos níveis plasmáticos de D-Di indica tanto a exarcebação na formação de fibrina, como a atuação do sistema fibrinolítico, caracterizando um quadro de hipercoagulabilidade (MATSUO *et al.*, 2000).

O valor preditivo negativo dos níveis plasmáticos de D-Di e presença de trombose venosa profunda está bem estabelecido. Entretanto, a associação deste marcador e outras condições trombóticas, como coagulação intravascular disseminada, tromboembolismo arterial, embolismo pulmonar, hemorragia, pós-operatório e neoplasias tem sido amplamente estudada, mas ainda não está consolidada. Com base nestas considerações, neste estudo, utilizou-se este marcador de geração de fibrina para avaliar o risco de desenvolver um quadro de hipercoagulabilidade entre os pacientes submetidos à hemodiálise e investigar se esse marcador estava associado à trombose do acesso vascular.

As medianas dos valores de D-Di obtidas para o grupo I, 444 (241-836 ng/mL) e grupo II, 464 (311-899 ng/mL) foram significativamente maiores comparadas as do grupo III, 241 (166-319 ng/mL). Entre os grupos I e II, não houve diferença significativa para este parâmetro (**Figura 13**). O percentual de indivíduos que apresentou níveis plasmáticos de D-Di acima do limite de referência (> 400 ng/mL) foi 54% para o grupo I e 59% para o II, sugerindo que não há uma associação entre os níveis de D-Di e a ocorrência de trombose do acesso vascular. A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

O PAI-1 é sintetizado por várias fontes como células endoteliais, tecido adiposo e hepático e uma grande quantidade desse é armazenada nas plaquetas. Várias citocinas inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) estimulam a síntese endotelial de PAI-1, bem como fatores de crescimento e hormônios (estrogênio, trombina e insulina) (VAUGHAN, 2005). Níveis aumentados de PAI-1 favorecem a permanência do coágulo de fibrina e, conseqüentemente, o

desenvolvimento de trombos, resultando em doenças cardíacas aguda e crônica, bem como em outras doenças tromboembólicas arteriais e venosas. Os níveis do PAI-1 dependem tanto da regulação gênica, como de outros fatores de risco para aterosclerose, incluindo a resistência à insulina, diabetes e hipertrigliceridemia. Idade, sexo, variação circadiana, níveis plasmáticos de fibrinogênio e estrogênio, hipertensão, consumo de álcool, tabagismo, dieta e sedentarismo podem interferir nos níveis de PAI-1 (HUBER, 2001; LUX *et al.*, 2003).

Neste estudo foram avaliados os níveis plasmáticos de PAI-1 e as medianas dos valores obtidos para os grupos I, 10,1 ng/mL (4,5-20,9 ng/mL) e II, 8,4 ng/mL (5,0-17,2 ng/mL) foram significativamente menores comparadas ao grupo III, 54,6ng/mL (36,7-73,6 ng/mL). A comparação dos resultados dos grupos I e II não mostrou diferença significativa (**Figura 11**). A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

O FvW é uma glicoproteína multimérica sintetizada nas células endoteliais e megacariócitos. Os dímeros de FvW são secretados para o plasma e para o subendotélio, enquanto que os multímeros são armazenados dentro dos corpos de *Weibel-Palade* nas células endoteliais. Dessa forma, quando há lesão endotelial, ocorre um aumento expressivo dos níveis de FvW no plasma, determinando um estado de hipercoagulabilidade (OUVINA *et al.*, 2001; SUMPIO *et al.*, 2002). Admite-se que o FvW contribui diretamente para a formação do trombo, considerando que constitui o mediador da adesão das plaquetas aos componentes do subendotélio e indiretamente, por ser o carreador do F VIII, prevenindo o *clearance* desse do plasma e favorecendo a geração de trombina (RUGGERI, 2003).

O F VIII desempenha um papel crucial na fase de propagação da ativação da coagulação. Uma vez formado o complexo F IXa/F VIIIa ocorre a ativação do F X em F Xa, que por sua vez ativará outros fatores, culminando com a formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2007).

Diversas condições clínicas promovem um aumento da secreção de FvW pelo endotélio resultando, assim, em maior adesão e agregação plaquetária e consequente formação de trombos. Isto pode explicar a associação de níveis elevados de F VIII e FvW com o tromboembolismo e a aterosclerose (RUGGERI, 1993; JAGER *et al.*, 1999).

Um mecanismo envolvido na regulação dos níveis plasmáticos de FvW é a ação da enzima ADAMTS-13, que promove a clivagem desse fator. A deficiência de ADAMTS-13, bem como a presença de anticorpos contra essa enzima, resulta no aumento plasmático de FvW e, conseqüentemente, favorece a ocorrência de trombose em vasos de pequeno calibre (RUGGERI, 2003; RIEGER *et al.*, 2005).

Diversos estudos mostraram que em doenças como púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urêmica, nas quais ocorre ausência ou redução da atividade da ADAMTS-13, há o comprometimento da clivagem dos multímeros do FvW e, conseqüentemente, elevação desses no plasma (RUGGERI *et al.*, 1982; LOWE & WERNER, 2005). Um levantamento da literatura revelou que não há estudos avaliando os níveis de ADAMTS-13 em pacientes submetidos à hemodiálise.

No presente estudo, foram avaliados os níveis plasmáticos de FvW, ADAMTS-13 e F VIII. Os níveis do FvW foram significativamente maiores nos pacientes dos grupos I e II, 1047 mU/mL (722-1351 mU/mL) e 1134 mU/mL (760-1381 mU/mL), respectivamente, comparados aos indivíduos hígidos do grupo III, 805 mU/mL (683-1012 mU/mL). Entre os grupos I e II, não houve diferença significativa entre as medianas obtidas (**Figura 14**). O percentual de indivíduos que apresentou níveis plasmáticos de FvW acima do limite de referência (>1012 mU/mL) foi 54% para o grupo I e 59% para o II, sugerindo que não há uma associação entre os níveis de FvW e a ocorrência de trombose do acesso vascular. A comparação da média obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

Para a ADAMTS-13, foi observada uma redução significativa nos níveis dessa enzima nos pacientes dos grupos I e II, 276 ng/mL (238-330 ng/mL) e 299 ng/mL (244-330 ng/mL), respectivamente, comparados aos do grupo III, 578 ng/mL (486-690 ng/mL). A comparação entre as medianas dos grupos I e II não revelou diferença (**Figura 12**). O percentual de indivíduos que apresentou níveis plasmáticos de ADAMTS-13 abaixo do limite de referência (< 486 ng/mL) foi 97% para o grupo I e 100% para o II, sugerindo que não há uma associação entre os níveis de ADAMTS-13 e a ocorrência de trombose do acesso vascular. A comparação da média obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que

desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

A atividade do F VIII foi significativamente maior nos pacientes dos grupos I e II, 108% (88-152%) e 110% (91-147%), respectivamente, comparada ao grupo III, 93% (78-116%). Considerando que o F VIII constitui uma proteína de fase aguda e que os pacientes sob hemodiálise apresentam um quadro de inflamação, a elevação dessa proteína nesses pacientes é justificável. Entre os grupos I e II, não houve diferença significativa entre as medianas obtidas (**Figura 15**). O percentual de indivíduos que apresentou atividade do F VIII acima do limite de referência (> 150 %) foi 27% para o grupo I e 22% para o II, sugerindo que não há uma associação entre a atividade do F VIII e a ocorrência de trombose do acesso vascular. A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

Vários estudos têm demonstrado a relação entre os níveis de FvW e de F VIII e os grupos sanguíneos do sistema ABO. Indivíduos dos grupos sanguíneos “não O” (A, B e AB) apresentam níveis elevados de FvW e de F VIII e, conseqüentemente, maior risco de desenvolver eventos trombóticos, quando comparados aos indivíduos do grupo “O”. O aumento destes fatores parece estar associado à presença de oligossacarídeos correspondentes aos antígenos do grupo A e B na molécula do FvW. Como o FvW constitui o carreador plasmático do F VIII, a presença destes oligossacarídeos comprometeria o *clearance* do FvW e do complexo FvW/FVIII, resultando em aumento da concentração desses fatores no plasma (SCHLEEF *et al.*, 2004; LARSEN *et al.*, 2005; MORELLI *et al.*, 2005).

No presente estudo foi comparada a frequência dos grupos sanguíneos nos integrantes dos três grupos, visando esclarecer uma possível associação do grupo “não O” e ocorrência de trombose do acesso vascular em pacientes submetidos à hemodiálise. Foi avaliada também a influência do grupo sanguíneo nos níveis plasmáticos dos marcadores hemostáticos.

A distribuição dos grupos sanguíneos dos integrantes dos grupos I, II e III foi similar e está de acordo com a frequência obtida pela Fundação Hemominas em 2006, para os doadores de sangue de Minas Gerais. A comparação da frequência dos grupos sanguíneos dos pacientes sob hemodiálise que não tiveram trombose

(Grupo I) com aquela dos pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

O grupo sanguíneo mostrou-se significativamente relacionado aos níveis plasmáticos de FvW e F VIII nos integrantes dos grupos I ( $p < 0,001$  e  $p = 0,001$ , respectivamente) e III ( $p = 0,002$  e  $p = 0,001$ , respectivamente) (**Tabela 7**). Indivíduos do grupo “O” apresentaram níveis significativamente menores destes fatores em comparação aos indivíduos “não O”. No grupo II, os níveis de FvW e F VIII também foram menores nos indivíduos do grupo “O” comparados aos do grupo “não O”, no entanto, essa diferença não foi significativa ( $p = 0,195$  e  $p = 0,07$ , respectivamente), provavelmente pelo número reduzido de pacientes nesse grupo.

Os níveis plasmáticos de ADAMTS-13 no grupo III foram maiores nos indivíduos “não O” quando comparados aos do grupo “O”. Uma possível explicação para este fato seria que o aumento dos níveis plasmáticos de FvW nesses indivíduos resultaria em um mecanismo compensatório que promoveria o aumento da ADAMTS-13, já que seu papel é clivar os multímeros de FvW que passam para a corrente sanguínea prevenindo, assim, um estado de hipercoagulabilidade. Nos pacientes sob hemodiálise, não foi observado aumento da ADAMTS-13 nos indivíduos classificados como “não O”, o que contribuiria para o estado de hipercoagulabilidade, detectado pelos níveis elevados de FvW e de F VIII nesses pacientes em relação aos do grupo “O”.

Em concordância com estes dados, diversos estudos da literatura revelaram níveis aumentados de FVIII e FvW em indivíduos dos grupos sanguíneos A, B e AB (KAMPHUISEN *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007). Em um levantamento da literatura não foram encontrados estudos avaliando a relação do grupo sanguíneo ABO e níveis de ADAMTS-13, bem como a associação dessa enzima com a ocorrência de trombose do acesso vascular em pacientes sob hemodiálise.

Os dados obtidos neste estudo mostraram claramente uma ativação da coagulação nos pacientes submetidos à hemodiálise (grupos I e II) revelada pelos níveis elevados de D-Di, FvW, F VIII e níveis reduzidos de ADAMTS-13, quando comparados aos de indivíduos hígidos (grupo III) (**Tabela 5**). Por outro lado, foram obtidos níveis reduzidos de PAI-1, o que favorece a atuação do sistema fibrinolítico, resultando em maior degradação da fibrina, o que justificaria os níveis elevados de D-Di nestes pacientes em relação aos indivíduos hígidos.

A literatura revela que a DRC, nos pacientes que ainda não estão fazendo hemodiálise, está associada às alterações da coagulação e da fibrinólise. Concentrações plasmáticas elevadas de fibrinogênio, D-Di, F1+2, TAT, F VII, FvW, TM e PAI-1 e reduzidas de AT e PC têm sido descritas nestes pacientes, sendo indicativos de lesão endotelial e estado trombofílico (LAI *et al.*, 1991; HERGESELL *et al.*, 1993; SAGRIPANTI *et al.*, 1993; GRIS *et al.*, 1994; TAKAGI *et al.*, 1994; RABELINK *et al.*, 1994; VAZIRI *et al.*, 1994; KARIO *et al.*, 1997; MEZZANO *et al.*, 1997; MALYSZKO *et al.*, 2006). Estes estudos sugerem que a progressão da DRC induz ou é acompanhada de lesão endotelial que está associada à disfunção plaquetária e ao aumento da produção de trombina, resultando no desenvolvimento de aterosclerose e no aumento do risco trombótico em pacientes com uremia. No entanto, o mecanismo exato pelo qual o estado trombótico se desenvolve não está claro.

A hemodiálise promove a correção parcial das alterações metabólicas da uremia e poderia, assim, reduzir a progressão da lesão endotelial e seus efeitos sobre a hemostasia primária. No entanto, o processo de hemodiálise, por si só, altera o sistema hemostático, contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade.

Tomura *et al.* (1990), observaram aumento significativo dos níveis de FvW e TM durante uma única sessão de hemodiálise, sugerindo que esse procedimento poderia induzir a lesão e estímulo das células endoteliais e que o tratamento, a longo prazo, poderia predispor a desordens vasculares.

Vários pesquisadores investigaram o efeito do processo da hemodiálise e do tipo de membrana do dialisador utilizado sobre os marcadores da coagulação e da fibrinólise. A maioria dos estudos revelou ativação da coagulação (níveis plasmáticos elevados de F1+2, D-Di, TAT, fibrinogênio, F VII, F XII, FT, FvW, TM, PDF, FPA, TpP e/ou níveis reduzidos de PC e AT) e da fibrinólise, evidenciado pelos níveis plasmáticos normais ou elevados de plasminogênio, t-PA, u-PA, PAI-1, PAP (SULTAN *et al.*, 1990; NAKAMURA *et al.*, 1991; AMBUHL *et al.*, 1997; YORIOKA *et al.*, 1998; BARTELS *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2003; KUSHIYA *et al.*, 2003; BRONISZ *et al.*, 2004; SABOVIC *et al.*, 2005; SALOBIR *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008).

Adams *et al.* (2008) observaram disfunção endotelial (níveis plasmáticos elevados de TM e selectina-E) e ativação da coagulação (níveis plasmáticos elevados de FT, F VII, F1+2 e reduzidos de AT e PS) em pacientes com DRC submetidos ou não à hemodiálise e diálise peritoneal quando comparados a

indivíduos hígidos. As alterações da coagulação sanguínea estavam associadas ao grau da disfunção renal e à inflamação (níveis plasmáticos de IL-6), no entanto, não estava associada à lesão endotelial.

Erdem *et al.* (1996) avaliaram o efeito da FAV sobre a hemostasia e propuseram que esse resultava de alterações na morfologia do endotélio vascular e do aumento do fluxo sanguíneo, que contribuiriam para a ativação local da coagulação e da fibrinólise. Estes pesquisadores compararam os níveis de F1+2, TAT, t-PA, u-PA, plasminogênio, PAP,  $\alpha_2$ -antiplasmina e  $\alpha_2$ -macroglobulina em amostras colhidas do retorno venoso da FAV, com amostras colhidas de veias periféricas do membro superior oposto em 26 pacientes sob hemodiálise. Além disso, compararam estes valores com os encontrados em indivíduos hígidos. Concluíram que a coagulação e a fibrinólise estão ativadas em pacientes sob hemodiálise e que a FAV parece ter um papel crucial na patogênese do estado trombótico nestes pacientes. Sugeriram, ainda, que com o aumento da produção de trombina na FAV, a fibrinólise também é ativada localmente. A ativação da coagulação e da fibrinólise estabelece um equilíbrio dinâmico e a FAV se mantém funcionando. Uma maior ativação da coagulação e/ou redução da atividade fibrinolítica poderia levar à trombose da FAV. No entanto, o motivo pelo qual ocorre este desequilíbrio ainda não está claro.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que não houve associação entre os níveis dos marcadores hemostáticos, a frequência do grupo sanguíneo ABO e a trombose no acesso vascular nos pacientes sob hemodiálise, sugerindo que esses parâmetros laboratoriais não são adequados para prever o risco de ocorrência desse evento.

Uma extensa revisão da literatura revelou que apenas cinco estudos avaliaram a associação de marcadores da coagulação, fibrinólise e as complicações do acesso vascular. O presente estudo constituiu a primeira investigação conduzida na população brasileira visando elucidar as causas do desenvolvimento de trombose do acesso vascular em pacientes sob hemodiálise, bem como definir marcadores hemostáticos capazes de prever a ocorrência desse evento.

Um estudo conduzido na Itália visando avaliar a complicação da FAV resultante da estenose em 30 pacientes sob hemodiálise (média de idade = 61 anos), demonstrou a influência das citocinas (IL-6 e MCP-1); dos marcadores hemostáticos (F VII, F XII e PAI-1); da hiperinsulinemia e das alterações dos lipídios

e apolipoproteínas na patogênese da estenose progressiva e subsequente trombose na fístula. Estes dados sugeriram que a avaliação destes marcadores poderia ser útil na prevenção da estenose venosa com intuito de reduzir o risco de desenvolver trombose da FAV (De MARCHI *et al.*, 1996).

Song *et al.* (1999) avaliaram 102 pacientes coreanos submetidos à hemodiálise (idade média: 52 anos, intervalo: 19-78 anos) acompanhados por 18 meses. Concluíram que, a idade, o enxerto de PTFE, o uso de eritropoetina recombinante e níveis elevados de fibrinogênio ( $\geq 460$  mg/dL) são fatores de risco independentes para complicações do acesso vascular. Tais complicações estão relacionadas a situações que necessitaram de angioplastia transluminal, terapia trombolítica ou reparo cirúrgico.

Nampoory *et al.* (2003), em um estudo prospectivo conduzido no Kuwait, avaliaram os níveis plasmáticos de PC, PS e AT, a resistência à PCa e a presença do anticorpo lúpico em 82 pacientes submetidos à hemodiálise (idade média: 44 anos, intervalo: 9-75 anos) por mais de seis meses. Concluíram que havia um estado de hipercoagulabilidade nos pacientes submetidos à hemodiálise comparados aos indivíduos hígidos e observaram associação significativa entre trombose do acesso vascular e deficiência de PC, deficiência de PS, anticorpo lúpico positivo e resistência à PCa. Foram excluídos do estudo eventos trombóticos relacionados a episódios de hipotensão, trauma ou causas técnicas.

Knoll *et al.* (2005) mostraram também uma associação significativa entre níveis elevados de F VIII, níveis elevados de Lp(a) e níveis elevados de homocisteína e trombose do acesso vascular em pacientes canadenses, após ajustar outros fatores de risco.

Danis *et al.* (2009) em um estudo transversal conduzido na Turquia, no qual foram avaliados 116 pacientes sob hemodiálise não observaram associação entre trombose do acesso vascular e fatores trombofílicos (níveis plasmáticos de PC, PS, AT, homocisteína, atividade de F VIII e anticorpos anticardiolipina), níveis de folatos, vitamina B12 e de proteínas de fase aguda (PCR e fibrinogênio)

A literatura revela outras causas que podem contribuir para a trombose do acesso vascular, como a presença de hiperhomocisteinemia, inflamação crônica, patologias associadas (diabetes e aterosclerose) e o tipo de acesso vascular utilizado (cateter permanente, FAV ou enxerto arteriovenoso) (BROPHY *et al.*, 2009).

No presente estudo foram investigados alguns marcadores de inflamação e fibrose em pacientes submetidos à hemodiálise, no intuito de avaliar uma possível associação com complicações trombóticas do acesso vascular. Dessa forma, foram determinados os níveis plasmáticos de PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1.

A PCR é uma proteína de fase aguda cuja produção no fígado é mediada por várias citocinas, principalmente a IL-6. Na ausência de inflamação, os níveis plasmáticos de PCR são baixos, podendo aumentar até 1000 vezes na vigência de um processo inflamatório. Portanto, a PCR é um marcador importante de resposta inflamatória na população em geral e em pacientes com DRC. Vários estudos têm revelado um aumento significativo de PCR nos pacientes submetidos à hemodiálise quando comparados a indivíduos hígidos (SCHINDLER *et al.*, 2002; CAGLAR *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2008). Existem evidências de que a PCR não é apenas um marcador preciso de inflamação, mas pode contribuir diretamente para a lesão endotelial e a patogênese da aterosclerose, sendo um preditor de risco para DCV (KOENIG & KHUSEYINOVA, 2007).

No presente estudo, foi observado que 38% e 41% dos pacientes dos grupos I e II, respectivamente, apresentaram níveis elevados de PCRus ( $> 5,0$  mg/L), confirmando um estado inflamatório crônico em grande parte dos pacientes submetidos à hemodiálise. No entanto, não houve diferença significativa entre as medianas dos valores obtidos para o grupo I e II, 3,7 mg/L (1,7-8,4 mg/L) e 3,2 mg/L (1,6-8,9 mg/L), respectivamente ( $p=0,811$ ) (**Figura 17**). A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

A IL-8 é uma quimiocina produzida por células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células de Langerhans em resposta a um estímulo inflamatório. A IL-8, secretada pela matriz subendotelial ou ligada a superfície do endotélio, promove a adesão e migração de neutrófilos e linfócitos para o local da inflamação (URAKAZE *et al.*, 1996; LARSEN *et al.*, 1989).

Mezzano *et al.* (2001) encontraram níveis plasmáticos maiores de IL-8 em pacientes com DRC antes de iniciar o tratamento dialítico ( $n = 64$ ) comparados ao grupo controle ( $n= 40$ ). Rysz *et al.* (2006) observaram níveis reduzidos de IL-8 durante os 20 e 60 minutos da sessão de hemodiálise. Porém, esses níveis aumentaram significativamente no final da sessão comparando-se ao valor inicial.

Diversos estudos avaliando o efeito da hemodiálise sobre os níveis de IL-8 e outras citocinas inflamatórias são encontrados na literatura (AYDIN *et al.*, 2007; PANICHI *et al.*, 2008). No entanto, não foram encontrados estudos que avaliaram o papel da IL-8 na trombose do acesso vascular.

No presente estudo, a maioria dos pacientes apresentou níveis plasmáticos de IL-8 dentro da faixa de normalidade (< 31,2 pg/mL). Não houve diferença significativa ( $p=0,574$ ) entre as medianas dos valores obtidos para os grupos I e II, 5,0 pg/mL (3,0-9,0 pg/mL) e 6,0 pg/mL (4,0-9,0 pg/mL), respectivamente (**Figura 18**). A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

Um paciente do grupo II apresentou níveis de IL-8 muito elevados (345 pg/mL). Na reavaliação dos prontuários, um ano após a coleta dos dados, foi verificado que este paciente apresentou todos os marcadores hemostáticos e inflamatórios elevados, exceto o F VIII e PAI-1, e teve uma segunda trombose do acesso vascular 14 dias após a coleta da amostra de sangue. Estes dados permitem inferir que este paciente apresentava um estado de hipercoagulabilidade no momento da coleta, que resultou em consumo do F VIII.

Alguns estudos mostraram que a inflamação está relacionada à hiperplasia da íntima, a qual contribui para a trombose do acesso vascular. Em resposta a lesão vascular, as células musculares lisas passam por alterações fenotípicas, caracterizadas pelo aumento da afinidade das integrinas por seus ligantes, expressão de moléculas de adesão, citocinas e fatores de crescimento, incluindo a IL-1, MCP-1, TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$ . Essas alterações facilitam a quimiotaxia de leucócitos e a infiltração na parede do vaso, além de estimular a expressão de moléculas de adesão sobre o endotélio e a produção de componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, elastina e proteoglicanos. As células musculares lisas ativadas também proliferam e migram para a camada íntima, onde o ambiente inflamatório promove a manutenção do estado ativado, com contínua produção de citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento de hiperplasia da íntima e conseqüente trombose do acesso vascular (TIONG & BRIEGER, 2005; DAVIS *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008).

O TGF- $\beta$ 1 é um fator de crescimento secretado por vários tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos, células musculares lisas e plaquetas, sendo liberado

na forma latente inativa e ativado proteoliticamente pela plasmina. Diversos estudos sugerem que o TGF- $\beta$ 1 tem um papel importante na aterogênese por inibir a migração e a proliferação de células musculares lisas e de macrófagos, induzir apoptose de células envolvidas nas lesões vasculares, reduzir a adesão de células inflamatórias ao endotélio e inibir as metaloelastases responsáveis pela instabilidade da placa ateromatosa (BLOBE *et al.*, MCCAFFREY *et al.*, 1999; NEWBY & GEORGE, 1996; GAMBLE & VADAS, 1998; LEFER, 1991; FEINBERG *et al.*, 2000). Paradoxalmente, outros pesquisadores mostraram que o TGF- $\beta$ 1 tende a ser altamente expresso em locais de lesão vascular, favorecendo a estenose que compromete o fluxo sanguíneo, resultando em um ambiente protrombótico (NIKOL *et al.*, 1999; WOLF *et al.*, 1994).

Poucos estudos avaliaram os níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 nos pacientes submetidos à hemodiálise com o objetivo de definir seu papel na trombose do acesso vascular. Stefoni *et al.* (2002) observaram uma redução dos níveis deste marcador durante 30 minutos da sessão de hemodiálise com um retorno progressivo aos valores basais, três horas após o término da sessão. Lazo-Langner *et al.* (2006) observaram que a baixa expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* é um fator de risco para trombose do acesso vascular em pacientes sob hemodiálise. Paradoxalmente, Heine *et al.* (2003) observaram que os pacientes com genótipos que elevam a síntese de TGF- $\beta$ 1 são mais propensos a desenvolver estenose e subsequente comprometimento do acesso vascular, devido à indução da síntese de matriz extracelular, acelerando o desenvolvimento de hiperplasia da íntima. Weiss *et al.* (2001) também mostraram que a expressão de TGF- $\beta$ 1 estava associada à proliferação da camada íntima da FAV e do enxerto de PTFE.

No presente estudo, foi observado que 91% e 87% dos pacientes dos grupos I e II, respectivamente, apresentaram níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 (> 1654 pg/mL). No entanto, não houve diferença significativa ( $p=0,540$ ) entre as medianas dos valores obtidos para os grupos I e II, 2665 pg/mL (2149-3064 pg/mL) e 2461 pg/mL (1997-3228 pg/mL), respectivamente (**Figura 19**). A comparação da mediana obtida para o grupo I com aquela obtida para os pacientes do grupo II que desenvolveram mais de um evento trombótico, também não revelou diferença significativa (**Tabela 11**).

Uma interrelação entre os sistemas hemostático e inflamatório é proposta na literatura. Sabe-se que as proteínas da coagulação, além de atuarem em cascata promovendo a formação do coágulo de fibrina, têm ação também de forma isolada

em outros processos fisiopatológicos. Dessa forma, o FT, o F VII, o F X e a trombina têm participação importante no processo inflamatório (SCHOENMAKERS *et al.* 2005). Sabe-se, ainda, que a PCR, TNF- $\alpha$  e IL-1 estimulam a expressão de FT pelos monócitos e células endoteliais (BUTENAS & MANN, 2002; HOFFMAN, 2003).

O estado inflamatório observado nos pacientes com DRC poderia justificar a ativação da coagulação observada nesses pacientes (COSTA *et al.*, 2008) No presente estudo foram obtidas correlações entre marcadores dos sistemas hemostático e inflamatório, corroborando com a idéia da interrelação entre esses fatores (**Tabela 10**). Correlações significativas foram observadas entre os níveis plasmáticos do PAI-1 e PCRus, PAI-1 e TGF- $\beta$ 1, D-Di e PCRus, FvW e TGF- $\beta$ 1 nos grupos I e II. No grupo I foram obtidas, ainda, correlações significativas entre D-Di e TGF- $\beta$ 1, FvW e PCRus, F VIII e PCRus, F VIII e TGF- $\beta$ 1.

Mezzano *et al.* (2001) observaram correlação significativa entre os níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda (PCR, fibrinogênio e  $\alpha$ 1-antitripsina), marcadores de lesão endotelial (FvW e TM) e de ativação da coagulação (FnDP e FgDP) em 64 pacientes com DRC. Costa *et al.* (2008) também mostraram correlações significativas entre os níveis de D-Di e os marcadores inflamatórios (PCR, albumina, receptor solúvel de IL-2 e IL-6) em 50 pacientes submetidos à hemodiálise.

Uma ressalva a ser feita para o presente estudo diz respeito à não inclusão da investigação de outros fatores trombofílicos, como as deficiências de PC, PS e AT, embora essas deficiências sejam raras na população em geral. Um outro ponto refere-se ao desenho do estudo, que foi proposto como transversal. Este tipo de estudo é capaz de identificar questões relacionadas aos fatores de risco de ocorrência de um determinado evento. No entanto, este desenho não é o mais adequado quando o tempo de risco de ocorrência do evento deve ser considerado. Dessa forma, a avaliação pontual dos pacientes constitui uma limitação deste estudo. É oportuno ressaltar que estudos transversais são essenciais para direcionar os estudos longitudinais que, de modo geral, são mais onerosos e complexos.

A reavaliação dos prontuários, um ano após a coleta dos dados para este estudo, revelou que 15 pacientes do grupo I tiveram trombose do acesso vascular nesse período. A comparação dos valores obtidos para os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios entre os subgrupos Ia (que tiveram

trombose) e Ib (que permaneceram sem essa complicação) não revelou diferença significativa (**Tabela 12**).

A ocorrência de trombose do acesso vascular em pacientes do grupo I, após a inserção desses no estudo, aliada aos resultados alterados dos parâmetros hemostáticos e inflamatórios avaliados nos pacientes sob hemodiálise (grupos I e II), permite inferir que esse procedimento resulta em uma condição trombogênica, associada a um risco elevado de trombose do acesso vascular. O esperado é que estes pacientes em algum momento venham a desenvolver trombos na fístula, uma vez que essa constitui um ambiente protrombótico. Portanto, estudos longitudinais podem constituir o desenho ideal para elucidar os fatores de risco associados ao desenvolvimento da complicação trombótica nos pacientes sob hemodiálise.

O mérito do presente estudo está relacionado ao seu ineditismo na população brasileira. A investigação da relação entre o grupo sanguíneo do sistema ABO e os níveis plasmáticos de FvW e F VIII, também inédito em pacientes submetidos à hemodiálise, confirmou o que está estabelecido na literatura acerca desta relação. Além disso, a investigação pioneira da ADAMTS-13 nestes pacientes mostrou um resultado surpreendente e, certamente, servirá de base para estudos futuros visando elucidar o papel dessa enzima no desencadeamento de trombose em pacientes sob hemodiálise.

## *7 Conclusões*

---

- ✓ A frequência da mutação no gene da protrombina (G20210A) mostrou-se associada à ocorrência de complicações trombóticas do acesso vascular nos pacientes submetidos à hemodiálise.
- ✓ Não houve associação entre a presença da mutação no gene do F V (Fator V Leiden) e complicações trombóticas do acesso vascular nos pacientes submetidos à hemodiálise.
- ✓ Os níveis plasmáticos de ADAMTS-13 e PAI-1 mostraram-se reduzidos significativamente nos pacientes submetidos à hemodiálise (que apresentaram ou não complicações trombóticas do acesso vascular) em relação aos indivíduos hígidos.
- ✓ Os níveis plasmáticos de FvW e D-Di, bem como a atividade do FVIII mostraram-se aumentados significativamente nos pacientes sob hemodiálise (que apresentaram ou não complicações trombóticas do acesso vascular) em relação aos indivíduos hígidos.
- ✓ Não houve associação entre os níveis plasmáticos dos marcadores hemostáticos FvW, ADAMTS-13, D-Di e PAI-1, bem como da atividade do FVIII e complicações trombóticas do acesso vascular nos pacientes submetidos à hemodiálise.
- ✓ A frequência do grupo sanguíneo ABO foi similar entre os três grupos.
- ✓ Não houve associação entre o grupo sanguíneo ABO e complicações trombóticas do acesso vascular nos pacientes submetidos à hemodiálise.
- ✓ Os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos FVIII e FvW foram mais elevados nos pacientes sob hemodiálise (que não apresentaram complicações trombóticas do acesso vascular), bem como indivíduos hígidos portadores do grupo sanguíneo “não O”, comparando-se àqueles do grupo “O”.
- ✓ Não houve associação entre os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios PCRus, IL-8 e TGF- $\beta$ 1 e complicações trombóticas do acesso vascular nos pacientes submetidos à hemodiálise.

- ✓ Houve correlação positiva leve entre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos (PAI-1, D-Di, FvW e F VIII) e os marcadores inflamatórios (PCRus e TGF- $\beta$ 1) nos integrantes do grupo de pacientes submetidos à hemodiálise sem complicações trombóticas do acesso vascular (grupo I).
  
- ✓ Houve correlação positiva leve entre os níveis plasmáticos de PAI-1 e os marcadores inflamatórios (PCRus e TGF- $\beta$ 1), D-Di e PCRus e entre FvW e TGF- $\beta$ 1 nos integrantes do grupo de pacientes submetidos à hemodiálise que apresentaram trombose do acesso vascular (grupo II).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKMAN, B.; AFSAR, B.; ATAÇ, F.B.; IBIS, A.; ARAT, Z.; SEZER, S.; OZDEMIR, F.N.; HABERAL, M. Predictors of vascular access thrombosis among patients on the cadaveric renal transplantation waiting list. **Transplantation Proceedings**, 2006, vol. 38(2), p. 413-5.

AMBUHL, P.M.; WUTHRICH, R.P.; KORTE, W.; SCHMID, L.; KRAPP, R. Plasma hypercoagulability in haemodialysis patients: impact of dialysis and anticoagulation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 1997, vol. 12 (11), p. 2355-64.

ANDREOLI, T.E.; BENNET, J.C.; CARPENTER, C.C.G.; PLUM, F. **Medicina Interna Básica**. (4<sup>a</sup> ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 965.

ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; COSTA, F.F.; REISTMA, P.H. Fator V Leiden (FVQ 506) is a common in a brazilian population. **American Journal of Hematology**, v. 49, p. 242-243, 1995.

ATAC, B.; YAKUPOGLU, U.; OZBEK, N.; OZDEMIR, F.N.; BILGIN, N. Role of genetic mutations in vascular access thrombosis among hemodialysis patients waiting for renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, 2002, vol. 34(6), p. 2030–2032.

AYDIN M, OZKOK E, OZTURK O, AGACHAN B, YILMAZ H, YAYLIM I, KEBABCIOGLU S, ISPIR T. Relationship between interleukin-8 and the oxidant-antioxidant system in end-stage renal failure patients. **Experimental and Clinical Transplantation**, 2007, vol. 5(1), p. 610-3.

BAGLIA, F.A.; WALSH, P.N. Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin. *Biochemistry*, 1998;37:2271–81.

BAJZAR, L.; MANUEL, R.; NESHEIM, M.E. Purification and characterization of TAFI, a thrombinactivable fibrinolysis inhibitor. **Journal of Biology Chemistry**, 1995, vol. 270(24), p. 14477–84.

BARTELS, P.C.M.; SCHOORL, M.; SCHOORL, M.; NUBÉ, M.J. Deviations in coagulation activation due to treatment with different haemodialysis membranes. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratorial Investigation**, 2003, vol. 63(6), p. 417-24.

BAUER, K.A. Management of thrombophilia. **Thrombosis and Haemostasis**, 2003, vol. 1(7), p. 1429-34.

BAZILINSKI, N.; SHAYKH, M.; DUNEA, G.; MAMDANI, B.; PATEL, A.; CZAPEK, E.; AHMED, S. Inhibition of platelet function by uremic middle molecules. **Nephron**, 1985, vol. 40(4), p. 423-8.

BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Tratado de Medicina Interna**. (20<sup>a</sup> ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 1297.

BERTINA, R.M. Genetic approach to thrombophilia. **Thrombosis and Haemostasis**, 2001, vol. 86(1), p. 92-103.

BERTINA, R.M. Molecular risk factors for thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1999, vol. 82(2), p. 601-9.

BERTINA, R.M.; KOELEMAN, B.P.; ROSENDAAL, F.R.; DRIVEN, R.J.; DEROND, H.; KOSTER, T. Mutation in blood coagulation factor V associates with resistance to activated protein C. **Nature**, 1994, vol.369, p. 64-7.

BESARAB, A.; MEDINA, F.; MUSIAL, E.; PICARELLO, N.; MICHAEL, H. Recombinant human erythropoietin does not increase clotting in vascular access. **American Society for Artificial Internal Organs (ASAIO) Transactions**, 1990, vol. 36(3), p. M749-53.

BLOBE, G.C.; SCHIEMANN, W.P.; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **New England Journal of Medicine**, 2000, vol. 342(18), p. 1350-8.

BOWEN, D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2003, vol. 1(1), p. 33-40.

BREMER, C.; SCHAEFER, R.M. Heterozygosity for factor V Leiden in a haemodialysis patient with recurrent shunt thrombosis. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 1997, vol. 12(8), p. 1775-6.

BRONISZ, M.; ROSÉ, D.; BRONISZ, A.; MANITIUS, J.; NARTOWICZ, E. The role of intrinsic fibrinolytic system activation in pathogenesis of hemostasis disturbances in hemodialyzed patients with chronic renal failure. **Renal Failure**, 2004, vol. 26(3), p. 223-9.

BROPHY, D.F.; BUKAVECKAS, B.L.; FERREIRA-GONZALEZ, A.; ARCHER, K.J.; MARTIN, E.J.; GEHR, T.W. A pilot study of genetic polymorphisms and hemodialysis vascular access thrombosis. **Hemodialysis International**, 2009, vol. 13(1), p. 19-26.

BROZE, G.J. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. **Seminars in Hematology**, 1992, vol. 29(3), p. 159-69.

BUTENAS, S.; MANN, K.G. Blood coagulation. **Biochemistry**, 2002, vol. 67(1), p. 3-12.

CAGLAR, K.; PENG, Y.; PUPIM, L.B.; FLAKOLL, P.J.; LEVENHAGEN, D.; HAKIM, R.M.; IKIZLER, T.A. Inflammatory signals associated with hemodialysis. **Kidney International**, 2002, vol. 62(4), p. 1408-16.

CAI, W.; ZHU, L.; CHEN, X.; URIBARRI, J.; PEPPA, M. Association of advanced glycoxidation end products and inflammation markers with thrombosis of

arteriovenous grafts in hemodialysis patients. **American Journal of Nephrology**, 2006, vol. 26(2), p. 181-5.

CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S. Técnicas laboratoriais e interpretação, Belo Horizonte, 1990, págs114-115, 139p.

CARVALHO, S.M.; CARVALHO, D.R.B.M. Hemodiálise, hemofiltração e hemoperusão. In: JUNIOR, A.N.; SANTOS, O.R. **Doenças dos Rins**. (1ª ed). São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1998, p. 527-42.

CASES, A.; REVERTER, J.C.; ESCOLAR, G.; SANZ, C.; LOPEZ-PEDRET, J.; REVERT, L.; ORDINAS, A. Platelet activation on hemodialysis: influence of dialysis membranes. **Kidney International Supplement**, 1993, vol. 43, suppl 41, p. S217-20.

CASTALDI, P.A.; ROZENBERG, M.C.; STEWART, J.H. The bleeding disorder of uremia: a qualitative platelet defect. **Lancet**, 1966, vol. 2(7454), p. 66-9.

CASTRO, A.C.L.C. *et. al.* Uma nova alternativa para tratamento da insuficiência renal: a diálise peritoneal crônica intermitente com cateter de permanência e sistema fechado. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 1985, vol. 7(1), p. 33-38.

CATTANEO, M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1999, vol.81(2),:p. 65-76.

CELLA, G.; VERTOLLI, U.; NASO, A.; VIANELLO, A.; RAMPIN, E.; SBARAI, A.; BOERI, G.; STRAUSS, W.E. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activity in uremic patients during hemodialysis. **Thrombosis Research**, 1996, vol. 81(6), p. 671-7.

CHANG, C.J.; KO, Y.S.; KO, P.J.; HSU, L.A.; CHEN, C.F.; YANG, C.W.; HSU, T.S.; PANG, J.H. Thrombosed arteriovenous fistula for hemodialysis access is characterized by a marked inflammatory activity. **Kidney International**, 2005, vol. 68(3), p. 1312-9.

CHUANG, Y.C.; CHEN, J.B.; YANG, L.C.; KUO, C.Y. Significance of platelet activation in vascular access survival of haemodialysis patients. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 2003, vol. 18(5), p. 947-54.

CHURCHILL, D.N.; TAYLOR, D.W.; COOK, R.J. Canadian hemodialysis morbidity study. **American Journal of Kidney Diseases**, 1992, vol. 19(3), p. 214-34.

COLMAN, R.W.; SCOTT, C.F.; SCHMAIER, A.H.; WACHTFOGEL, Y.T.; PIXLEY, R.A.; EDMUNDS, L.H. JR. Initiation of blood coagulation at artificial surfaces. **Annals of the New York Academic of Science**, 1987, vol. 516, p. 253-67.

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

CONLAN, M.G.; FOLSOM, A.R.; FINCH, A.; DAVIS, C.E.; SORLIE, P.; MARGUCCI, G.; WU, K.K. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex and risks factors for atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC). **Thrombosis and Haemostasis**, 1993, vol. 70(3), p. 380-385.

COSTA, E.; LIMA, M.; ALVES, J.M. Inflammation, T-cell phenotype and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. **Journal of Clinical Immunology**, 2008, vol. 28(3), p. 268-75.

COSTA, E.; ROCHA, S.; ROCHA, P.P.; CASTRO, E.; REIS, F.; TEIXEIRA, F.; MIRANDA, V.; DO SAMEIRO, M.F.; LOUREIRO, A.; QUINTANILHA, A.; BELO, L.; SANTOS, A.S. Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients. **Journal of Vascular Access**, 2008, vol. 9(4), p. 248-53.

CROWTHER, M.A.; KELTON, J.G. Congenital thrombophilic states associated with thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. **Annals of Internal Medicine**, 2003, vol. 138(2), p. 128-34.

CULP, K.; FLANIGAN, M.; TAYLOR, L.; ROTHSTEIN, M. Vascular access thrombosis in new hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, 1995, vol. 26(2), p. 341-6.

CUSHMAN, M.; YANEZ, D.; PSATY, B.M.; FRIED, L.P.; HEISS, G.; LEE, M.; POLAK, J.F.; SAVAGE, P.J.; TRACY, R.P. Association of fibrinogen and coagulation factors VII and VIII with cardiovascular risk factors in the elderly: the Cardiovascular Health Study: Cardiovascular Health Study Investigators. **American Journal of Epidemiology**, 1996, vol. 143(7), p. 665-676.

DAHLBÄCK, B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. **Blood**, 2008, vol. 112(1), p. 19-27.

DAHLBACK, B. Blood coagulation. **Lancet**, 2000, vol. 355(9215), p. 1627-32.

DAHLBACK, B.; HILDEBRAND, B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 1994, vol. 91(4), p. 1396-400.

DANIS, R.; OZMEN, S.; AKIN, D.; BATUN, S.; KAHVECIOGLU, S.; ALTINTAS, A.; YILMAZ, M.E.; POLAT, A. Thrombophilias and arteriovenous fistula dysfunction in maintenance hemodialysis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 2009, vol. 27(3), p. 307-15.

DAUGIRDAS, J.T & STONE, J.C.V. Princípios fisiológicos e modelo de cinética da uréia. In: DAUGIRDAS, J.T. **Manual de Diálise**. (3ª ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap. 2, p. 15-67.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, 1991, 30(43), p. 10363-68.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, 1964; vol. 145, p. 1310-12.

DAVIS, C.; FISCHER, J.; LEY, K.; SAREMBOCK, I.J. The role of inflammation in vascular injury and repair. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2003, vol. 1(8), p. 1699-709.

DAVIS, J.W.; MCFIELD, J.R.; PHILLIPS, P.E.; GRAHAM, B.A. Guanidinosuccinic acid on human platelet: effects of exogenous urea, creatinine, and aggregation in vitro. **Blood**, 1972, vol. 39(3), p. 388-97.

DE MARCHI, S.; FALLETI, E.; GIACOMELLO, R.; STEL, G.; CECCHIN, E.; SEPIACCI, G.; BORTOLOTTI, N.; ZANELLO, F.; GONANO, F.; BARTOLI, E. Risk factors for vascular disease and arteriovenous fistula dysfunction in hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1996, vol. 7(8), p. 1169-77.

DE PAULA SABINO, A.; GUIMARÃES, D.A.; RIBEIRO, D.D.; PAIVA, S.G. DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P. Increased Factor V Leiden frequency is associated with venous thrombotic events among young Brazilian patients. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 2007, vol. 24(3), p. 261-6.

DE PAULA SABINO, A.; RIBEIRO, D.D.; CARVALHO, M.G.; CARDOSO, J.; DUSSE, L.M.S.; FERNANDES, A.P. Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young Brazilian patients. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, 2006, vol. 17(4), p. 271-5.

DE STEFANO, V.; CHIUSOLO, P.; PACIARONI, K.; CASORELLI, I.; ROSSI, E.; MOLINARI, E. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. **Blood**, 1998, vol. 91(10), p. 3562-5.

DE VISSER, M.C.; ROSENDAAL, F.R.; BERTINA, R.M. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. **Blood**, 1999, vol. 93(4), p. 1271-6.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; HERBELIN, A.; NGUYEN, A.T.; ROUX-LOMBARD, P.; ZINGRAFF, J.; MOYNOT, A.; VERGER, C.; DAHMANE, D.; DE GROOTE, D.; JUNGERS, P. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. **Journal of Immunology**, 1995, vol. 154(2), p. 882-92.

DOQI (DIALYSIS OUTCOMES QUALITY INITIATIVE). Clinical practice guideline for vascular access. National Kidney Foundation, 1997, New York.

DULÍČEK, P.; MALY, J.; SAFAROVA, M. Risk of thrombosis in patients homozygous and heterozygous for factor V Leiden in the East Bohemian region. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, 2000, vol. 6(2), p. 87-9.

EKNOYAN, G.; WACKSMAN, S.J.; GLUECK, H.I.; WILL, J.J. Platelet function in renal failure. **New England Journal of Medicine**, 1969, vol. 280(13), p. 677-81.

ELEFThERIADIS, T.; ANTONIADI, G.; AKRITIDOU, A.; KASIMATIS, E.; APOSTOLIDIS, G.; PASHALIDOU, S.; SALMAS, M.; LIAKOPOULOS, V.;

BARBOUTIS, K. A case report of recurrent vascular access thrombosis in a hemodialysis patient reveals combined acquired and inherited thrombophilia. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, 2008, vol. 12(2), p. 190-2.

ERDEM, Y.; HAZNEDAROGLU, I.C.; CELIK, I.; YALCIN, A.U.; YASAVUL, U.; TURGAN, C.; CAGLAR, S. Coagulation, fibrinolysis and fibrinolysis inhibitors in hemodialysis patients: contribution of arteriovenous fistula. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, 1996, vol. 11 (7), p. 1299-305.

EUROPEAN BEST PRACTICE GUIDELINES FOR HAEMODIALYSIS. Measurement of renal function, when to refer and when to start dialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 2002, vol. 17 (Supl. 7), p. 7-15.

FEINBERG, M.W.; JAIN, M.K.; WERNER, F. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits cytokine mediated induction of human metalloelastase in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, 2000, vol. 275(33), p. 25766-73.

FELDMAN, H.I.; KIBRIN, S.; WASSRSTEIN, A. Hemodialysis vascular access morbidity. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1996, vol. 7(4), p. 523-35.

FISCHER, K.G. Essentials of anticoagulation in hemodialysis. **Hemodialysis International**, 2007, vol. 11(2), p. 178-89.

FODINGER, M.; MANNHALTER, C.; PABINGER, I.; KOIZAR, D.; RINTELEN, C. HORL, W.H.; SUNDER-PLASSMANN, G. Resistance to activated protein C (APC): mutation at Arg506 of coagulation factor V and vascular access thrombosis in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, 1996, vol. 11(4), p. 668-72.

FOLSOM, A.R.; WU, K.K.; ROSAMOND, W. D., SHARRETT, A.R.; CHAMBLESS, L.E. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Circulation**, 1997, vol. 96(4), p. 1102-8.

FRANCHINI, M.; CAPRA, F.; TARGHER, G.; MONTAGNANA, M.; LIPPI, G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. **Thrombosis Journal**, 2007, vol. 25, p. 5-14.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. (1ª ed). São Paulo: Atheneu, 2001. p. 739-48.

FRANCO, R. F. Trombofilias. bases moleculares. In: ZAGO M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001b. cap 76, p. 843-854.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARÓ, C. A.; MATTHEWS, R. G. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, 1995, vol. 10(1), p. 111-3.

FUKASAWA, M.; MATSUSHITA, K.; KAMIYAMA, M.; MIKAMI, Y.; ARAKI, I.; YAMAGATA, Z.; TAKEDA, M. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T point mutation is a risk factor for vascular access thrombosis in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, 2003, vol. 41(3), p. 637-42.

FUNDAÇÃO HEMOMINAS. **Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia** de Minas Gerais – Folheto informativo Doação de Sangue, 2006. Disponível em: [www.hemominas.mg.gov.br](http://www.hemominas.mg.gov.br). Acesso em : 10 nov. 2009.

GAD, M.Z.; EL-MESALLAMY, H.O.; SANAD, E.F. hsCRP, sICAM-1 and TAFI in hemodialysis patients: linking inflammation and hypofibrinolysis to cardiovascular events. **Kidney & Blood Pressure Research**, 2008, vol. 31(6), p. 391-7.

GAMBLE, J.R.; VADAS, M.A. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth-factor beta 1. **Science**, 1998, vol. 242(4875), p. 97–9.

GILL, J.C.; ENDRES-BROOKS, J.; BAUER, P.J.; MARKS, W.J. JR.; MONTGOMERY, R.R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. **Blood**, 1987, vol. 69(6), p. 1691-5.

GIRNDT, M.; HEINE, G.H.; ULRICH, C.; KÖHLER, H. Gene polymorphism association studies in dialysis: vascular access. **Seminars in Dialysis**, 2007, vol. 20(1), p. 63-7.

GIRNDT, M.; KAUL, H.; SESTER, U.; ULRICH, C.; SESTER, M.; GEORG, T.; KOHLER, H. Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. **Kidney International**, 2002, vol. 62(3), p. 949–55.

GODOI, L.C.; FERNANDES, A.P.; VIEIRA, L.M.; MELGAÇO, D.A.; BASTOS, M.; RIBEIRO, M.F.; CARVALHO, M.G.; DUSSE, L.M.S. Hypercoagulability markers in young asymptomatic heterozygous carriers of factor V Leiden (G1691A) or prothrombin (G20210A) variant. **Clinica Chimica Acta**, 2006, vol. 365(1), p. 304-9.

GOLDWASSER, P.; AVRAM, M.M.; COLLIER, J.; MICHEL, M.A.; GUSIK, S.A.; MITTMAN, N. Correlates of vascular access occlusion in hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, 1994, vol. 24(5), p. 785-94.

GOLDWASSER, P.; MICHEL, M.A.; COLLIER, J.; MITTMAN, N.; FEIN, P.A.; GUSIK, S.A.; AVRAM, M.M. Prealbumin and lipoprotein (a) in hemodialysis: relationship with patient and vascular access survival. **American Journal of Kidney Diseases**, 1993, vol. 22(1), p. 215-25.

GORDGE, M.P. & NEILD, G.H. Platelet function in uremia. **Platelets**, 1991, vol. 2, p. 115-23.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **American Journal of Human Genetics**, 1995; vol. 56(5), p. 1052-9.

GRIS, J.C.; BRANGER, B.; VÉCINA, F.; AL SABADAMI, B.; FOURCADE, J.; SCHVED, J.F. Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. **Kidney International**, 1994, vol. 46(3), p. 807-13.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Formação de urina pelos rins. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. (9ª ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p. 291-322.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hemostasia e coagulação do sangue. In: **Tratado de fisiologia médica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap.36, p.341-49.

HAKIM, R.M. & SCHAFFER, A.I. Hemodialysis-associated platelet activation and thrombocytopenia. **American Journal of Medicine**, 1985, vol. 78(4), p. 575-80.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman and Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. (ed). Rio de Janeiro: Mac Graw-Hill, 1996, p. 1436.

HEINE, G.H.; ULRICH, C.; SESTER, U.; SESTER, M.; KÖHLER, H.; GIRNDT, M. Transforming growth factor beta1 genotype polymorphisms determine AV fistula patency in hemodialysis patients. **Kidney International**, 2003, vol. 64(3). P. 1101-7.

HERGESELL, O.; ANDRASSY, K.; GEBERTH, S.; NAWROTH, P.; GABATH, S. Plasma thrombomodulin levels are dependent on renal function. **Thrombosis Research**, 1993, vol. 72(5), p. 455-8.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 2003, vol. 16(1/2), p. 17-20.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North American**, 2007, vol. 21(1), p.1-11.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M.; OLIVER, J.A.; ROBERTS, H.R. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. **Blood**, 1995, vol. 86(5) p. 1794–1801.

HONG, S.Y. & YANG, D.H. Insulin levels and fibrinolytic activity in patients with end-stage renal disease. **Nephron**, 1994, vol. 68(3), p. 329-33.

HOROWITZ, H.I.; STEIN, I.M.; COHEN, B.D.; WHITE, J.G. Further studies on the platelet inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. **American Journal of Medicine**, 1970, v. 49(3), p. 336-45.

HUBER, K.; CHRIST, G.; WOJTA, J.; GULBA, D. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. **Thrombosis Research**, 2001, vol. 103(1), p. S7-19.

HUBER, S.; MC MASTER, K.J.; VOLELKERDING, K.V. Analytical evaluation primer engineered multiplex polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism for detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 2000, vol. 29(3), p. 153-7.

IKIZLER, T.A. Nutrition, inflammation and chronic kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 2008, vol. 17(2), p. 162-7

INOUE, A.; WADA, H.; TAKAGI, M.; YAMAMURO, M.; MUKAI, K.; NAKASAKI, T.; SHIMURA, M.; HIYOYAMA, K.; DEGUCHI, H.; GABAZZA, E.C.; MORI, Y.; NISHIKAWA, M.; DEGUCHI, K.; SHIKU, H. Hemostatic abnormalities in patients with thrombotic complications on maintenance hemodialysis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, 2000, vol. 6(2), p. 100-3.

ISHANI, A.; COLLINS, A.J.; HERZOG, C.A.; FOLEY, R.N. Septicemia, access and cardiovascular disease in dialysis patients: the USRDS Wave 2 study. **Kidney International**, 2005, vol. 68(1), p. 311-8.

ISHII, H.; UCHIYAMA, H.; KAZAMA, M. Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. **Thrombosis and Haemostasis**, 1991, vol. 65(5), p. 618-23.

JAGER, A.; VAN HINSBERGH, V.W.M.; KOSTENSE, P.J.; EMEIS, J.J.; YUDKIN, J.S.; NIJPELS, G.; DEKKER, J.M.; HEINE, R.J.; BOUTER, L.M.; STEHOUWER, C.D.A. Von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and non-diabetic subjects. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1999, vol. 19(12), p. 3071-8.

JENKINS, P.V.; O'DONNELL, J.S. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion**, 2006, vol. 46(10), p. 1836-44.

JICK, H.; SLONE, D.; WESTERHOLM, B. INMAN, W.H.; VERSEY, M.P.; SHAPIRO, S.; LEWIS, G.P.; WORCESTER, J. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. **Lancet**, 1969, vol. 1(7594), p. 539-42.

KAMPHUISEN, P.W.; EIKENBOOM, J.C.J.; BERTINA, R.M. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2001, vol. 21(5), p.731-8.

KARIO, K.; MATSUO, T.; MATSUO, M.; KOIDE, M.; YAMADA, T.; NAKAMURA, S.; SAKATA, T.; KATO, H.; MIYATA, T. Marked increase of activated factor VII in uremic patients. **Thrombosis and Haemostasis**, 1995, vol. 73(5), p. 763-75.

KARIO, K.; MATSUO, T.; YAMADA, T.; MATSUO, M. Increased tissue factor pathway inhibitor levels in uremic patients on regular hemodialysis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1994, vol. 71(3), p. 275-9.

KAYSEN, G.A.; STEVENSON, F.T.; DEPNER, T.A. Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Disease**, 1997, vol. 29(5), p. 658-68.

KNOLL, G.A.; WELLS, P.S.; YOUNG, D.; PERKINS, S.L.; PILKEY, R.M.; CLINCH, J.J.; RODGER, M.A. Thrombophilia and the risk for hemodialysis vascular access thrombosis. **Journal of the American Society Nephrology**, 2005, vol. 16(4), p. 1108-14.

KOENIG, W.; KHUSEYINOVA, N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2007, vol. 27(1), p. 15-26.

KOSTER, T.; BLANN, A.D.; BRIËT, E.; VANDENBROUKE, J.P.; ROSENDAAL, F.R. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. **Lancet**, 1995, vol. 345(8943), p. 152–5.

KOSTER, T.; ROSENDAAL, F.R.; DE RONDE, H.; BRIËT, E.; VANDENBROUKE, J.P.; BERTINA, R.M. Venous thrombosis due to a poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. **Lancet**, 1993; vol. 342(8886-8887), p. 1503–6.

KOYAMA, T. NISHIDA, K.; OHDAMA, S.; SAWADA, M.; MURAKAMI, N.; HIROSAWA, S.; KURIYAMA, R.; MATSUZAWA, K.; HASEGAWA, R.; AOKI, N. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. **British Journal of Haematology**, 1994, vol. 87(2), p. 343-7.

KOZEK-LANGENECKER, S.A.; MASAKI, T.; MOHAMMAD, H.; GREEN, W.; MOHAMMAD, S.F.; CHEUNG, A.K. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. **Kidney International**, 1999, vol. 56(1), p. 299-305.

KRAAIJENHAGEN, R.A.; INT' ANKER, P.S.; KOOPMAN, M.M.; REITSMA, P.H.; PRINS, M.H.; VAN DEN ENDE, A.; BULLER, H.R. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**, 2000, vol. 83(1), p. 5-9.

KUSHIYA, F.; WADA, H.; SAKAKURA, M.; MORI, Y.; GABAZZA, E.C.; NISHIKAWA, M.; NOBORI, T.; NOGUCHI, M.; IZUMI, K.; SHIKU, H. Atherosclerotic and hemostatic abnormalities in patients undergoing hemodialysis. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, 2003, vol. 9(1), p. 53-60.

LAI, K.; YIN, J.A.; YUEN, P.M.P.; LI, P.K.T. Effect of hemodialysis on protein C, protein S and a antithrombin III levels. **American Journal of Kidney Diseases**, 1991, vol. 17(1), p. 38-42.

LANE, D.A.; GRANT, P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. **Blood**, 2000, vol. 95(5), p. 1517-32.

LARSEN, C.G.; ANDERSON, A.O.; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J.J.; MATSUSHIMA, K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. **Science**, 1989, vol. 243(4897), .p. 1464-6.

LARSEN, T.B.; JOHNSEN S.P.; GISLUM, M.; MOLLER, C.A.I.; LARSEN, H.; SORENSEN, H.T. ABO blood groups and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. A population-based, nested case-control study. **J Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2005, vol. 3(2), p.300-4.

LARSSON, S.O. On coagulation and fibrinolysis in renal failure. **Scandinavian Journal of Haematology Supplementum**, 1971, vol. 15, p. 1-59.

LAZO-LANGNER, A.; KNOLL, G.A.; WELLS, P.S.; CARSON, N.; RODGER, M.A. The risk of dialysis access thrombosis is related to the transforming growth factor-beta1 production haplotype and is modified by polymorphisms in the plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. **Blood**, 2006, vol. 108(13), p. 4052-8.

LEE, D.H.; HENDERSON, P.A.; BLAJCHMAN, M.A. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. **Canadian Medical Association Journal**, 1996, vol. 155(3), p. 285-9.

LEE, R.T.; LIBBY, P. The unstable atheroma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1997, vol. 17(10), p. 1859-67.

LEFER, A.M. Mechanisms of the protective effects of by transforming growth factor beta in reperfusion injury. **Biochemical Pharmacology**, 1991, vol. 42(7), p. 1323-7.

LEWIS, J.H.; ZUCKER, M.B.; FERGUNSON, J.H. Bleeding tendency in uremia. **Blood**, 1956, vol. 11(12), 1073-6.

LIANI, M.; SALVATI, F.; GOLATO, M.; TRESKA, E. Platelet glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa abnormalities in uremia. **Nephron**, 1996a, vol. 72(4), p. 716.

LIANI, M.; SALVATI, F.; TRESKA, E.; DI PAOLO, G.; VITACOLONNA, L.; GOLATO, M.; VELUSSI, C. Arteriovenous fistula obstruction and expression of platelet receptors for von Willebrand factor and for fibrinogen (glycoproteins GPIIb/IIIa) in haemodialysis patients. **International Journal of Artificial Organs**, 1996b, vol. 19(8), p. 451-4.

LIBBY, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. **Circulation**, 1995, vol. 91(11), p. 2844-50.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, 2002, vol. 105(9), p. 1135-43.

LIN, C.C.; YANG, W.C. Prognostic factors influencing the patency of hemodialysis vascular access: literature review and novel therapeutic modality by far infrared therapy. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2009, vol. 72(3), p. 109-16.

LIU, B.C.; LI, L.; GAO, M.; WANG, Y.L.; YU, J.R. Microinflammation is involved in the dysfunction of arteriovenous fistula in patients with maintenance hemodialysis. **Chinese Medical Journal**, 2008, vol. 121(21), p. 2157-61.

LORAND, L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academic of Science**, 2001, vol. 936, p. 291-311.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica** (4<sup>a</sup>ed). São Paulo: MEDSI, 2006, p. 145-95.

LOWE, E.J.; WERNER, E.J. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome in children and adolescents. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 2005, vol. 31(6), p. 717-30.

LOWE, G.D.; HAVERKATE, F.; THOMPSON, S.G.; TURNER, R.M.; BERTINA, R.M.; TURPIE, A.G.; *et al.* Prediction of deep vein thrombosis after elective hip replacement surgery by preoperative clinical and haemostatic variables: the ECAT DVT Study. European Concerted Action on Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1999, vol. 81(6), p. 879-86.

LOWE, J. The blood group-specific human glycosyltransferases. **Bailliere's Clinical Haematology**, 1993, vol. 6(2), p. 465-490.

LUX, S.E.; STOSSEL, T.P.; HANDIN, R.I. **Blood: Principles and Practice of Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, 1964, vol. 202 (2), p.498-9.

MALLAMACI, F.; BONANNO, G.; SEMINARA, G.; RAPISARDA, F.; FATUZZO, P.; CANDELA, V.; SCUDDO, P.; SPOTO, B.; TESTA, A.; TRIPEPI, G.; TECH, S.; ZOCCALI, C. Hyperhomocysteinemia and arteriovenous fistula thrombosis in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, 2005, vol. 45(4), p. 702-7.

MALYSZKO, J.; MALYSZKO, J.S.; MYSLIWIEC, M. Comparison of hemostatic disturbances between patients on CAPD and patients on hemodialysis. **Peritoneal Dialysis International**, 2001, vol. 21(2), p. 158-65.

MALYSZKO, J.S.; MALYSZKO, J.; HRYSZKO, T.; KOZMINSKI, P.; PAWLAK, K.; MYSLIWIEC, M. Markers of endothelial damage in patients on hemodialysis and hemodiafiltration. **Journal of Nephrology**, 2006, vol. 19(2), p. 150-4.

MALYSZKO, J.S.; MALYSZKO, J.S.; PAWLAK, D.; PAWLAK, K.; BUGZKO, W.; MYSLIWIEC, M. Hemostasis, platelet function and serotonin in acute and chronic renal failure. **Thrombosis Research**, 1996, vol. 83(5), p. 351-61.

MANNS, B.J.; BURGESS, E.D.; PARSONS, H.G.; SCHAEFER, J.P.; HYNDMAN, M.E.; SCOTT-DOUGLAS, N.W. Hyperhomocysteinemia, anticardiolipin antibody status, and risk for vascular access thrombosis in hemodialysis patients. **Kidney International**, 1999, vol. 55(1), p. 315-20.

MATHIAS, F.R. & PALINSKI, W. Prostaglandin-endoperoxides and cyclic 3'5'-AMP in platelets of patients with uremia. **Thrombosis and Haemostasis**, 1977, vol. 38, p. 34.

MATSUI, T.; TITANI, K.; MIZUOCHI, T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. **Journal of Biological Chemistry** 1992, vol. 267(13), p. 8723-31.

MATSUO, T.; KOBAYASHI, H.; KARIO, K.; SUZUKI, S. Fibrin D-dimer in thrombogenic disorders. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 2000, vol. 26(1): 101-7.

MCCAFFREY, T.A.; BAOHENG, D.; FU, C. The expression of TGF $\beta$  receptors in human atherosclerosis: Evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 1999, 31(9), p. 1627–42.

McCOLL, M.D.; WALKER, I.D.; GREER, I.A. The role of inherited thrombophilia in venous thromboembolism associated with pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, 1999, vol. 106(8), p. 756-66.

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

MEZZANO, D.; PAIS, E.; ARANDA, E.; PANES, O.; DOWNEY, P.; ORTIZ, M.; TAGLE, R.; GONZÁLEZ, F.; QUIROGA, T.; CACERES, M.S.; LEIGHTON, F.; PEREIRA, J. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. **Kidney International**, 2001, vol. 60(5), p. 1844-50.

MEZZANO, D.; TAGLE, R.; PAIS, E.; PANES, O.; PÉREZ, M.; DOWNEY, P.; MUÑOZ, B.; ARANDA, E.; BARJA, P.; THAMBO, S.; GONZÁLEZ, F.; MEZZANO, S.; PEREIRA, J. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. **Thrombosis Research**, 1997, vol. 88(6), p. 465-72.

MEZZANO, D.; TAGLE, R.; PANES, O.; PÉREZ, M.; DOWNEY, P.; MUÑOZ, B.; ARANDA, E.; BARJA, P.; THAMBO, S.; GONZÁLEZ, F.; MEZZANO, S.; PEREIRA, J. Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1996, vol. 76(3), p. 312-21.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Assistência à Saúde – Avaliação Econômico - Epidemiológica das Modalidades de Terapias Renais Substitutivas no Brasil. Belo Horizonte (MG), 2005.

MOAKE, J.L.; RUDY, C.K.; TROLL, J.H.; WEINSTEIN, M.J.; COLANNINO, N.M.; AZOCAR, J.; SEDER, R.H.; HONG, S.L.; DEYKIN, D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. **New England Journal of Medicine**, 1982; vol. 307(23), p. 1432–5.

MOAL, V.; BRUNET, P.; DOU, L.; MORANGE, S.; SAMPOL, J.; BERLAND, Y. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 2003, vol. 18(9), p. 1834-41.

MOELLER, A.; WEIPPERT-KRETSCHMER, M.; PRINZ, H.; KRETSCHMER, V. Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. **Transfusion**, 2001, vol. 41(1), p. 56-60.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H.R. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, 1996; vol. 7(4), p. 459–64.

MONROE, D.M.; ROBERTS, H.R.; HOFFMAN, M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. **British Journal of Haematology**, 1994, vol. 88(2), p. 364–71.

MORELLI, V.M.; DE VISSER, M.C.H.; VOS, H.L.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. ABO blood group genotypes and risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2005, vol. 3(1), p. 183-5.

MUDD, S.H.; SKOVBY, F.; LEVY, H.L.; PETTIGREW, K.D.; WILCKEN, B.; PYERITZ, R.E.; ANDRIA, G.; BOERS, G.H.; BROMBERG, I.L.; CERONE, R. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. **American Journal of Human Genetics**, 1985, vol. 37(1), p. 1-31.

MUNDA, R.; FIRST, M.R.; ALEXANDER, J.W.; LINNEMANN, C.C.; FIDLER, J.P.; KITTUR, D. Polytetrafluoroethylene graft survival in hemodialysis. **JAMA**, 1983, vol. 249(2), p. 219-22.

NAKAMURA, Y.; CHIDA, Y.; TOMURA, S. Enhanced coagulation-fibrinolysis in patients on regular hemodialysis treatment. **Nephron**, 1991, vol. 58(2), p. 201-4.

NAKAMURA, Y.; TOMURA, S.; TACHIBANA, K.; CHIDA, Y.; MARUMO, F. Enhanced fibrinolytic activity during the course of hemodialysis. **Clinical Nephrology**, 1992, vol. 38(2), p.90-6.

NAMPOORY, M.R.; DAS, K.C.; JOHNY, K.V.; AL-HILALI, N.; ABRAHAM, M.; EASOW, S.; SAED, T.; AL-MUZEIREI, I.A.; SUGATHAN, T.N.; AL MOUSAWI, M. Hypercoagulability, a serious problem in patients with ESRD on maintenance hemodialysis, and its correction after kidney transplantation. **American Journal of Kidney Diseases**, 2003, vol. 42(4), p. 797-805.

NARAYANAN, S.; HAMASAKI, N. Current concepts of coagulation and fibrinolysis. **Advances in Clinical Chemistry**, 1998, vol. 33, p. 133-68.

NASCIMENTO, M.M. & RIELLA, M.C. Avaliação de acesso vascular em hemodiálise: um estudo multicêntrico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 1999, vol. 21(1), p. 22-9.

NASCIMENTO, M.M.; PECOITS-FILHO, R.; QURESHI, A.R.; HAYASHI, S.Y.; MANFRO, R.C.; PACHALY, M.A.; RENNER, L.; STENVINKEL, P.; LINDHOLM, B.; RIELLA, M.C. The prognostic impact of fluctuating levels of C-reactive protein in Brazilian haemodialysis patients: a prospective study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 2004, vol. 19(11), p. 2803-9.

NEWBY, A.C. & GEORGE, S.J. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. **Current Opinion in Cardiology**, 1996, 11(6), p. 574–82.

NIKOL, S.; ISNER, J.M.; PICKENING, J.G. Expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 is increased in human vascular restenosis lesions. **Journal of Clinical Investigation** 1992; 90(4): 1582–1592.

NORRIS, L.A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology**, 2003, vol. 17(3), p. 369-83.

O'DONNELL, J.; BOULTON, F.E.; MANNING, R.A.; LAFFAN, M.A. Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2002, vol. 22(2), p. 335-41.

O'DONNELL, J.S.; MCKINNON, T.A.; CRAWLEY, J.T.; LANE, D.A.; LAFFAN, M.A. Bombay phenotype is associated with reduced plasma-VWF levels and an increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis. **Blood**, 2005, vol. 106(6), p. 1988-91.

OFOSU, F.A. Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin. **Transfusion and Apheresis Science**, 2003, vol. 28(3), p. 265-8.

OHIRA, T.; CUSHMAN, M.; TSAI, M.Y.; ZHANG, Y.; HECKBERT, S.R.; ZAKAI, N.A.; ROSAMOND, W.D.; FOLSOM, A.R. ABO blood group, other risk factors and incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2007, vol. 5(7), p. 1455-61.

OLIVER, J.; MONROE, D.; ROBERTS, H.; HOFFMAN, M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1999, vol. 19(1), p.170-7.

ORSTAVIK, K.H.; MAGNUS P.; REISNER, H.; BERG, K.; GRAHAM, J.B.; NANCE, W. Factor VIII and factor IX in a twin population: evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. **American Journal of Human Genetics**, 1985, vol. 37(1), p. 89-101

O'SHEA, S.I.; LAWSON, J.H.; REDDAN, D.; MURPHY, M.; ORTEL, T.L. Hypercoagulable states and antithrombotic strategies in recurrent vascular access site thrombosis. **Journal of Vascular Surgery**, 2003, vol. 38(3), p. 541-8.

OUVINA, S.M.; LA GRECA, R.D.; ZANARO, N.L.; PALMER, L.; SASSETTI, B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. **Thrombosis Research**, 2001, vol. 102 (2): 107-14.

PAIVA, S.G; SABINO, A.P.; DUSSE, L.M.S.; GOMES, K.B.; RIBEIRO, D.D.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P. Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, 2009, vol. 20(2), p. 122-8.

PALDER S.B., KIRKMAN R.L., WHITMORE A.D., HAKIM R.M., LAZARUS, J.M., TILNEY, N.L. Vascular access for hemodialysis: patency rates and results of revision. **Annals of Surgery**, 1985, vol. 202(2), p. 235-239.

PANICHI V, RIZZA GM, PAOLETTI S, BIGAZZI R, ALOISI M, BARSOTTI G, RINDI P, DONATI G, ANTONELLI A, PANICUCCI E, TRIPEPI G, TETTA C, PALLA R; RISCAVID STUDY GROUP. Chronic inflammation and mortality in haemodialysis: effect of different renal replacement therapies. Results from the RISCAVID study. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 2008, vol. 23(7), p. 2337-43.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003, vol. 100(1), p. 177-182.

PEREIRA, B.J.; SHAPIRO, L.; KING, A.J.; FALAGAS, M.E.; STROM, J.A.; DINARELLO, C.A. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. **Kidney International**, 1994, vol. 45(3), p. 890-6.

POORT, P.; ROSENDAAL, F. R.; REISTMA, P. H.; BERTINA, R. M. A common genetic variation in the 3' - untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, 1996, vol. 88, p. 3668-70.

PORILE, J.L.; RICHTER, M. Preservation of vascular access. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1993, vol. 4(4), p. 997-1003.

QUINTON, W.; DULLARD, D.; SCRIBNER, B.H. Cannulation of blood vessels for prolonged hemodialysis. **American Society for Artificial Internal Organs (ASAIO) Transactions**, 1960, vol. 6, p. 104-13.

RABELINK, T.J.; ZWAGINGA, J.J.; KOOMANS, H.A.; SLXMA, J.J. Thrombosis and hemostasis in renal failure. **Kidney International**, 1994, vol. 46(2), p. 287-96.

RABINER, S.F. & MOLINAS, F. The role of phenol and phenolic acids on the thrombocytopathy and defective platelet aggregation of patients with renal failure. **American Journal of Medicine**, 1970, v. 49(3), p. 346-51.

RAWALA-SHEIKH, R.; AHMAD, S.S.; MONROE, D.M.; ROBERTS, H.R.; WALSH, P.N. Role of gamma-carboxyglutamic acid residues in the binding of factor IXa to platelets and in factor-X activation. **Blood**, 1992, vol. 79(2), p. 398-405.

RAY, J.G. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. **Archives of Internal Medicine**, 1998, vol. 158(19), p. 2101-6.

RAZEGHI, E.; OMATI, H.; MAZIAR, S.; KHASHAYAR, P.; MAHDAVI-MAZDEH, M. Chronic inflammation increases risk in hemodialysis patients. **Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation**, 2008, vol. 19(5), p. 785-9.

REMUZZI, G.; BENIGNI, A.; DODESINI, P.; SCHIEPPATI, A.; LIVIO, M.; DE GAETANO, G.; DAY, S.S.; SMITH, W.L.; PINCA, E.; PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Reduced platelet thromboxane formation in uremia: evidence for a functional cyclooxygenase defect. **Journal of Clinical Investigation**, 1983, vol. 71(3), p. 762-8.

RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; LINDPAINTNER, K.; STAMPFER, M.J.; EISENBERG, P.R.; MILETICH, J.P. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. **New England Journal of Medicine**, 1995, vol. 332(14), p. 912-7.

RIDKER, P.M.; MILETICH, J.P.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. **JAMA**, 1997, vol. 277(16), p. 1305-7.

RIEGER, M.; MANNUCCI, P.M.; KREMER, J.A.; HERZOG, A.; GERSTENBAUER, G.; KONETSCHNY, C.; ZIMMERMANN, K.; SCHARRER, I.; PEYVANDI, F.; GALBUSERA, M.; REMUZZI, G.; BOHM, M.; PLAIMAUER, B.; LAMMLE, B.; SCHEIFLINGER, F. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. **Blood**, 2005, vol. 106 (4): 1262-7.

RIELLA, M.C.. Insuficiência renal crônica – Fisiopatologia da uremia. In: RIELLA, M.C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. (3ª ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 456-76.

RIJKEN, D.C.; SAKHAROV, D.V. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. **Thrombosis Research**, 2001, vol. 103(1), p. S41-S49.

ROCHA, P.N.; BRAGA, P.S.; RITT, G.F.; GUSMÃO, L.F.; PONTES, L.C.S.; SANTOS, M.L.M. Complicações Imediatas Relacionadas à Inserção de Cateteres Duplo lúmen para Hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2008, vol. 30(1), p. 54-8

RODEGHIERO, F.; TOSETTO, A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. **Annals of Internal Medicine**, 1999, vol. 130(8), p. 643-50.

ROMÃO, J.E.; PINTO, S.W.L.; CANZIANI, J.N.P.; SANTELLO, J.L.; MOREIRA, J.C.M. Censo SBN 2002: informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2003, vol. 25(4), p. 188-99.

ROSENDAAL, F.R. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors, a focus on venous thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1997, vol. 78(1), p. 1–6.

ROSENDAAL, F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. **Lancet**, 1999, vol. 353(9159), p. 1167-73.

ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J.; ZIVELIN, A.; ARRUDA, V.R.; AIACH, M.; SISCOVICK, D.S.; HILLARP, A.; WATZKE, H.H.; BERNARDI, F.; CUMMING, A.M.; PRESTON, F.E.; REITSMA, P.H. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Thrombosis and Haemostasis**, 1998, vol. 79(4), p. 706-8.

ROSENDAAL, F.R.; SISCOVICK, D.S.; SCHWARTZ, S.M.; BEVERLY, R.K.; PSATY, B.M.; LONGSTRETH, W.T. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. **Blood**, 1997, vol. 89(8), p. 2817–21.

ROSENTHAL, J.J. Vascular access for hemodialysis. **Major Problems in Clinical Surgery**, 1981, vol. 4, p. 455-68.

ROUMEN-KLAPPE, E.M.; DEN HEIJER, M.; VAN UUM, S.H.; VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J.; VAN DER GRAAF, F.; WOLLERSHEIM, H. Inflammatory

response in the acute phase of deep vein thrombosis. **Journal of Vascular Surgery**, 2002, vol. 35(4), p. 701-6.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2003, vol. 1(7), p. 1335-42.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor. **Journal of Clinical Investigation**, 1993, vol. 70, p. 11-118.

RUGGERI, Z.M.; MANNUCCI, P.M.; LOMBARDI, R., FEDERICI, A.B.; ZIMMERMAN, T.S. Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand disease subtypes. **Blood**, 1982, vol. 59(6), p. 1272-8.

RYSZ, J.; BANACH, M.; RYSZ, A.C.; STOLAREK, R.; BARYLSKI, M.; DROZDZ, J.; OKONSKI, P. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in patients on maintenance hemodialysis. **Cellular and Molecular Immunology**, 2006, vol. 3(2), p. 151-4.

SABOVIC, M.; SALOBIR, B.; ZUPAN, I.P.; BRATINA, P.; BOJEC, V.; PONIKVAR, J.B. The influence of the hemodialysis procedure on platelets, coagulation and fibrinolysis. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, 2005, vol. 34(6), p. 274-8.

SAGRIPANTI, A.; CUPISTI, A.; BAICCHI, U.; FERDEGHINI, M.; MORELLI, E.; BARSOTTI, G. Plasma parameters of the prothrombotic state in chronic uremia. **Nephron**, 1993, vol. 63(3), p. 273-8.

SALOBIR, B.; SABOVIC, M.; ZUPAN, I.P.; PONIKVAR, J.B. Platelet (dys)function and plasma plasminogen levels in hemodialysis patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, 2008, vol. 12(2), p. 133-6.

SALOMON, O.; STEINBERG, D.M.; ZIVELIN, A.; GITEL, S.; DARDIK, R.; ROSENBERG, N.; *ET AL.* Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 1999, vol. 19(3), p. 511-8.

SALVATI, F. & LIANI, M. Role of platelet surface receptor abnormalities in the bleeding and thrombotic diathesis of uremic patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. **International Journal of Artificial Organs**, 2001, vol. 24(3), p. 131-5.

SALZMAN, E.W. & NERI, L.L. Adhesiveness of blood platelets in uremia. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, 1966, vol. 15(1), p. 84-92.

SALZMAN, E.W.; LINDON, J.; MCMANAMA, G.; WARE, J.A. Role of fibrinogen in activation of platelets by artificial surfaces. **Annals of the New York Academic of Science**, 1987, vol. 516, p. 184-95.

SANTORO, A. Confounding factors in the assessment of delivered hemodialysis dose. **Kidney International Supplement**, 2000; vol. 77, p. S19-27.

SAVAGE, B. & RUGGERI, Z.M. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb/IIIa on nonactivated platelets. **Journal of Biological Chemistry**, 1991, vol. 266(17), p. 11227-33.

SBN (Sociedade Brasileira de Nefrologia) Temas em nefrologia – Diálise. Disponível em <http://www.sbn.org.br/.s.d>. Acessado em 12 jan. 2007.

SCAZZIOTA, A., ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. **Revista Iberoamericana Trombosis y Hemostasia**, 1996, Buenos Aires, vol. 1, p.9-26.

SCHINDLER, R.; SENF, R.; FREI, U. Influencing the inflammatory response of haemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 2002, vol. 17(1), p. 17-9.

SCHLEEF, M.; STROBEL, E.; DICK, A.; FRANK, J.; SCHRAMM, W.; SPANNAGL, M. Relation between ABO and Secretor genotype with plasma levels of factor VIII and von Willebrand factor in thrombosis patients and control individuals. **British Journal of Haematology**, 2004, vol. 128, p. 100-7.

SCHWAB, S.J. Vascular access for hemodialysis. **Kidney International**, 1999, vol. 53(5), p. 2078-90.

SEGERS, K.; DAHLBÄCK, B.; NICOLAES, G.A. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. **Thrombosis and Haemostasis**, 2007, vol. 98(3), p. 530-42.

SESSO, R.; LOPES, A.A.; THOMÉ, .S.; BEVILACQUA, J.L.; ROMÃO JR, J.E; LUGON, J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2008, vol. 30(4), p. 233-8.

SEYREK, N.; KARAYAYLALI, I.; BALAL, M.; PAYDAS, S.; AIKIMBAEV, K.; CETINER, S.; SEYDAOGLU, G. Is there any relationship between serum levels of interleukin-10 and atherosclerosis in hemodialysis patients? **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, 2005, vol. 39(5), p. 405-9.

SEZER, S.; OZDEMIR, F.N.; ARAT, Z.; TURAN, M.; HABERAL, M. Triad of malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in hemodialysis patients. **Nephron**, 2002, vol. 91(3), p. 456-62.

SHEMIN, D.; LAPANE, K.L.; BAUSSERMAN, L.; KANAAN, E.; KAHN, S.; DWORKIN, L.; BOSTOM, A.G. Plasma total homocysteine and hemodialysis access thrombosis: a prospective study. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1999, vol. 10(5), p. 1095-9.

SHIMA, M.; FUJIMURA, Y.; NISHIYAMA, T.; TSUJIUCHI, T.; NARITA, N; MATSUI, T.; TITANI, K.; KATAYAMA, M.; YAMAMOTO, F.; YOSHIOKA, A. ABO blood group genotype and plasma von Willebrand factor in normal individuals. **Vox Sanguinis**, 1995, vol. 68(4), p.: 236-40.

SIMIONI, P.; TORMENE, D.; PRANDONI, P.; ZERBINATI, P.; GAVASSO, S.; CEFALO, P.; GIROLAMI, A.. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic

family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. **Blood**, 2002, vol. 99(6), p. 1938-42.

SLOAND, E.M.; SLOAND, J.A.; PRODOUZ, K.; KLEIN, H.G.; YU, M.W.; HARVATH, L.; FRICKE, W. Reduction of platelet glycoprotein Ib in uremia. **British Journal of Haematology**, 1991, vol. 77(3), p. 375-81.

SLOAND, J.A. & SLOAND, E.M. Studies on platelet membrane glycoproteins and platelet function during hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1997, vol. 8(5), p. 799-803.

SMITS, J.H.M.; LINDEN, J.; BLANKESTIJN, P.J.; RABELINK, T.J. Coagulation and haemodialysis access thrombosis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, 2000, vol. 15 (11), p. 1755-60.

SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial**, 2007, vol. 43 (5), p. 329-37.

SONG, S.; YANG, W.S.; KIM, S.B.; LEE, J.; KWON, T.; PARK, J.S. Association of plasma fibrinogen concentration with vascular access failure in haemodialysis patients. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, 1999, vol. 14 (1), p. 137-41.

SOUSA, C.M.; ANICCHINO-BIZZACCHI, J.M.; LOCATELLI, M.F.; CASTRO, V.; BARJAS-CASTRO, L. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. **Haematologica**, 2007, vol. 92(2), p. 236-9.

SOUTO, J.C.; ALMASY, L.; MUNIZ-DIAZ, E.; SORIA, J.M.; BORRELL, M.; BAYEN, L.; MATEO, J.; MADDOZ, P.; STONE, W.; BLANGERO, J.; FONTCUBERTA, J. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2000, vol. 20(8), p. 2024-8.

SREEDHARA, R.; ITAGAKI, I.; HAKIM, R.M. Uremic platelets have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. **American Journal of Kidney Diseases**, 1996, vol. 27(3), p. 355-64.

STEFONI, S.; CIANCIOLO, G.; DONATI, G.; DORMI, A.; SILVESTRI, M.G.; COLÌ, L.; DE PASCALIS, A.; IANNELLI, S. Low TGF-beta1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. **Kidney International**, 2002, vol. 61(1), p. 324-35.

STEGNAR, M.; VENE, N.; BOZIC, M. Do haemostasis activation markers that predict cardiovascular disease exist? **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, 2004, vol. 33(5-6), p. 302-8.

STENVINKEL, P. Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 2002, vol. 17 (Suppl 8), p. 33-8.

SULTAN, Y.; LONDON, G.M.; GOLDFARB, B.; TOULON, P.; MARCHAIS, S.J. Activation of platelets, coagulation and fibrinolysis in patients on long-term

hemodialysis: influence of cuprophane and polacrylonitrile membranes. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, 1990, vol. 5(5), p. 362-8.

SUMPIO, B.E.; RILEY, J.T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2002, vol. 34(12), p. 1508-12.

SZYMANSKI, L.M.; PATE, R.R.; DURSTINE, J.L. Effects of maximal exercise and venous occlusion on fibrinolytic activity in physically active and inactive men. **Journal of Applied Physiology**, 1994, vol. 77(5), p. 2305-10.

TAKAGI, M.; WADA, H.; MUKAI, K.; KIHARA, H.; YANO, S.; MINAMIKAWA, K.; WAKITA, Y.; NAKASE, T.; NAGAYA, S.; DEGUCHI, K. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, 1994, vol. 5(5), p. 713-7.

TARAKÇIOĞLU, M.; ERBAGCI, A.B.; USALAN, C.; DEVECI, R.; KOCABAS, R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. **Mediators of Inflammation**, 2003, vol. 12(1), p. 15-9.

TIONG, A.Y.; BRIEGER, D. Inflammation and coronary artery disease. **American Heart Journal**, 2005, vol. 150(1), p. 11-8.

TIRADO, I.; MATEO, J.; SORIA, J.M.; OLIVER, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, E.; VALLVÉ, BORRELL, M.C.; URRUTIA, T.; FONTCUBERTA, J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, 2005, vol. 93(3), p. 468-74.

TOMURA, S.; NAKAMURA, Y.; DEGUCHI, F.; CHIDA, Y.; OHNO, Y.; KODAMA, S.; HAYASHI, T.; SUZUKI, K.; MARUMO, F. Plasma von Willebrand factor and thrombomodulin as markers of vascular disorders in patients undergoing regular hemodialysis therapy. **Thrombosis Research**, 1990, vol. 58(4), p. 413-9.

TRIPODI, A.; MANNUCCI, P.M. Laboratory investigation of thrombophilia. **Clinical Chemistry**, 2001, vol. 47(9), p. 1597-606.

TRIPODI, A.; MANNUCCI, P.M. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**, 1996, vol. 42(5), p. 664-9.

TSAI, Y.C.; LEE, C.T.; HUANG, T.L.; CHENG, B.C.; KUO, C.C.; SU, Y.; NG, H.Y.; YANG, C.C.; CHUANG, F.R.; LIAO, S.C. Inflammatory marker but not adipokine predicts mortality among long-term hemodialysis patients. **Mediators of Inflammation**, 2007, vol. 2007, p. 19891.

TSIRPANLIS, G.; BAGOS, P.; IOANNOU, D.; BLETA, A.; MARINO, I.; LAGOURANIS, A. Exploring inflammation in hemodialysis patients: persistent and superimposed inflammation. A Longitudinal Study. **Kidney & Blood Pressure Research**, 2004, vol. 27(2), p. 63-70.

TURITTO, V.T. & HALL, C.L. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. **Thrombosis Research**, 1998, vol. 92(6), suppl. 2, p. S25-31.

URAKAZE, M.; TEMARU, R.; SATOU, A.; YAMAZAKI, K.; HAMAZAKI, T.; KOBAYASHI, M. The IL-8 production in endothelial cells is stimulated by high glucose. **Hormone and Metabolic Research**, 1996, vol. 28(8), p. 400-401

VAN DER BOM, J.G.; BOTS, M.L.; HAVERKATE, F.; SLAGBOOM, P.E.; MEIJER, P.; DE JONG, P.T.V.M. Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. **Annals of Internal Medicine**, 1996, vol. 125(4), p. 265-9.

VAN HYLCKAMA, V.A.; VAN DER LINDEN, I.K.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. **Blood**, 2000; vol. 95(12), p. 3678-82.

VANDENBROUCKE, J.P.; KOSTER, T.; BRIET, E.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. **Lancet**, 1994, vol. 344(8935), p. 1453-7.

VAUGHAN, D.E. PAI-1 and atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2005, vol. 3 (8), p. 1879-83.

VAZIRI, N.D.; GONZALES, E.C.; WANG, J.; SAID, S. Blood coagulation, fibrinolytic and inhibitory proteins in end-stage renal disease: effect of hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, 1994, vol. 23(6), p. 828-35.

VERSTRAETE, M.; VERMYLEN, J. *Determinantes celulares, químicos e reológicos da trombose e fibrinólise* In: Trombose. São Paulo, Sarvier, 1989, cap.1, p.1-45.

VIENER, A.; AVIRAM, M.; BETTER, O.S.; BROOK, J.G. Enhanced in vitro platelet aggregation in hemodialysis patients. **Nephron**, 1986, vol. 43(2), p. 139-43.

VLOT, A.J.; MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P.; ZARKOVA, A.G.; HAAN, E.; KRUITWAGEN, C.L.; SIXMA, J.J.; VAN DEN BERG, H.M. The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. **Thrombosis and Haemostasis**, 2000, vol. 83(1), p. 65-9.

WAKEFIELD, T.W.; STRIETER, R.M.; WILKE, C.A.; KADELL, A.M.; WROBLESKI, S.K.; BURDICK, M.D.; SCHMIDT, R.; KUNKEL, S.L.; GREENFIELD, L.J. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1995, vol. 15(2), p. 258-68.

WALKER, F.J. Protein S and the regulation of activated protein C. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 1984, vol. (1), p. 131-8.

WATKINS, W.M. Blood-group substances. **Science**, 1966, vol. 152(3719), p. 172-81.

WAUTRECHT, J.C.; GALLE, C.; MOTTE, S. The role of ABO blood groups in the incidence of deep vein thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, 1998, vol. 79(3), p. 688-9.

WEISS, M.F.; SCIVITTARO, V.; ANDERSON, J.M. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. **American Journal of Kidney Disease**, 2001, vol. 37(5), p. 970-80.

WILSON, S.E.; STABILE, B.E.; WILLIAMS, R.A.; OWENS, M.L. Current status of vascular access techniques. **Surgery Clinical of North America**, 1982, vol. 62(3), p. 531-51.

WINDUS, D.W.; JENDRISAK, M.D.; DELMEZ, J.A. Prosthetic fistula survival and complications in hemodialysis patients: effects of diabetes and age. **American Journal of Kidney Diseases**, 1992, vol. 19(5), p. 448-452.

WINDUS, D.W.; SANTORO, S.; ROYAL, H.D. The effects of hemodialysis on platelet deposition in prosthetic graft fistulas. **American Journal of Kidney Diseases**, 1995, v. 26(4), p. 614-21.

WOLF, Y.G.; RASMUSSEN, L.M.; RUOSLAHTI, E. Antibodies against transforming growth factor  $\beta$ 1 suppress intima hyperplasia in a rat model. **Journal of Clinical Investigation** 1994, vol. 93(3), p. 1117-8.

YAO, Q.; AXELSSON, J.; HEIMBURGER, O.; STENVINKEL, P.; LINDHOLM, B. Systemic inflammation in dialysis patients with end-stage renal disease: causes and consequences. **Minerva Urologica e Nefrologica**, 2004, vol. 56(3), p. 237-48.

YORIOKA, N.; TANIGUCHI, Y.; YAMASHITA, K.; UEDA, C.; NAKAMURA, C.; HARADA, S.; YAMAKIDO, M. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in hemodialysis patients. **International Journal of Artificial Organs**, 1998, vol. 21(11), p. 699-701.

YU, A.; EGBERG, N.; JACOBSON, S.H. Haemostatic complications in haemodialysis patients: effect of type of vascular access and dialysis filter. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, 2003, vol. 63(2), p. 127-34.

ZATZ, R. Insuficiência renal crônica: mecanismos de adaptação e progressão. In: RIELLA, M.C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. (3ª ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 450-5.

ZAWADA, E.T. Indicações para diálise. In: DAUGIRDAS, J.T.; ING. T.S. **Manual de diálise** (3ª ed). Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003, cap. 1, p. 1-14.

ZWAGINGA, J.J.; IJSSELDIJK, M.J.; DE GROOT, P.G.; VOS, J.; de BOS KUIL, R.L.; SIXMA, J.J. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorders can be attributed to factors in plasma. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, 1991, vol. 11(3), p. 733-44.

**ANEXO 1**

|      |  |
|------|--|
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais<br>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP |
|------|--|

**Parecer nº. ETIC 099/07**

**Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse**  
**Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Fac. Farmácia -UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de abril de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Hemodiálise e complicações trombóticas: Frequência e possíveis mecanismos envolvidos”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP-UFMG**

**ANEXO 2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DEPTº. DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PROJETO DE PESQUISA**  
**HEMODIÁLISE E COMPLICAÇÕES TROMBÓTICAS: FREQUÊNCIA E POSSÍVEIS**  
**MECANISMOS ENVOLVIDOS.**

Prezado (a) Senhor(a),

Você está sendo convidado para participar deste estudo que visa uma melhor compreensão da coagulação do sangue e dos processos inflamatórios que podem ocorrer nos pacientes submetidos à hemodiálise.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 10mL do seu sangue, quando você for ao Instituto Mineiro de Nefrologia ou ao Hospital das Clínicas/UFMG para realizar a sessão de hemodiálise. O sangue será utilizado para realizar alguns exames de Laboratório com o objetivo de verificar se esses exames poderão contribuir para o acompanhamento do paciente, durante o tempo que estiver fazendo hemodiálise. A coleta de sangue será feita por um profissional experiente usando agulhas e tubos descartáveis.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento do seu atendimento e tratamento no Serviço de Hemodiálise.

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo poderá ser apresentada à Profª. Luci Maria Sant Ana Dusse da Faculdade de Farmácia/ UFMG ou à farmacêutica Danyelle Romana Alves Rios.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

De acordo: \_\_\_\_\_  
(Assinatura)

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Responsáveis pelo projeto

Prof. Luci Maria Sant Ana Dusse (3409-6880)

Danyelle Romana Alves Rios (3409-6900)

Faculdade de Farmácia/ UFMG.

**ANEXO 3****FICHA CLÍNICA**

Projeto: “**Hemodiálise e complicações trombóticas: frequência e possíveis mecanismos envolvidos**”

Número de identificação do participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**1. Identificação:**

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

**2. Dados Clínicos:**

a) Peso (Kg): \_\_\_\_\_ Altura (m) \_\_\_\_\_ IMC (Kg/m<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_

b) Há quanto tempo tem doença renal? \_\_\_\_\_

c) Doença primária: \_\_\_\_\_

d) Data de início da hemodiálise: \_\_\_\_\_

e) Esquema de diálise: \_\_\_\_\_

f) Dose de heparina na diálise (fracionada ou não): \_\_\_\_\_

g) Medicamentos em uso: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

h) Eficácia da hemodiálise (Kt/v): \_\_\_\_\_

i) Histórico da fístula arteriovenosa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**4. Resultados dos exames laboratoriais realizados no Laboratório do HC:**

|                  |                 |                    |                          |                  |
|------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|------------------|
| Hemograma        | Hm<br>Hb<br>Hct | VCM<br>HCM<br>CHCM | Leu<br>Fe sérico<br>CtLF | IST<br>Ferritina |
| Plaquetas        |                 |                    |                          |                  |
| Uréia pré        |                 |                    |                          |                  |
| Uréia pós        |                 |                    |                          |                  |
| Creatinina       |                 |                    |                          |                  |
| Colesterol total |                 |                    | LDLc                     |                  |
| Triglicérides    |                 |                    | VLDLc                    |                  |
| HDLc             |                 |                    |                          |                  |
| Cálcio           |                 |                    |                          |                  |
| Potássio         |                 |                    |                          |                  |
| Fósforo          |                 |                    |                          |                  |
| PTH              |                 |                    |                          |                  |
| ALT              |                 |                    |                          |                  |
| Fosf. alcalina   |                 |                    |                          |                  |
| Proteínas totais |                 |                    | Albumina<br>Globulina    |                  |

## ANEXO 4

Clinica Chimica Acta 411 (2010) 135–139



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim)

Invited critical review

## Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis

Danyelle Romana Alves Rios, Maria das Graças Carvalho, Bashir A. Lwaleed, Ana Cristina Simões e Silva, Karina Braga Gomes Borges, Luci Maria SantAna Dusse\*

Clinica and Toxicological Analysis Department – Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 September 2009  
 Received in revised form 6 November 2009  
 Accepted 20 November 2009  
 Available online 27 November 2009

## Keywords:

Hemodialysis  
 Coagulation  
 Fibrinolysis  
 Platelets  
 End stage renal disease

## ABSTRACT

Patients undergoing hemodialysis may show both thrombotic complications and bleeding abnormalities. Hemostatic changes in patients on hemodialysis may result from alterations in vessel wall integrity and platelet function, and reduced blood flow in the native arteriovenous fistula. Vascular complications represent 20–25% of all hospitalizations of patients on hemodialysis. Literature survey revealed that changes in the hemostatic system may play a major role in vascular complications observed in these patients. Thus, it is essential to investigate hemostatic alterations in patients on hemodialysis so that adequate regimens for anticoagulant therapy could be implemented. In this review we discuss hemostatic abnormalities in end stage renal disease patients undergoing hemodialysis.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

|   |     |
|---|-----|
| 1. Introduction                         | 135 |
| 2. Platelet dysfunction                 | 135 |
| 3. Coagulation and fibrinolytic changes | 136 |
| 4. Conclusion                           | 138 |
| Acknowledgments                         | 138 |
| References                              | 138 |

## 1. Introduction

Renal replacement therapy is currently offered to end stage renal disease (ESRD) patients. This treatment is frequently performed by hemodialysis resulting in alterations of platelet function and changes in both coagulation and fibrinolytic systems [1]. Thrombotic events result from alterations in vessel wall integrity, platelet activation and reduced blood flow into the fistula used to access the vessel [2,3]. Hypercoagulability states are associated with cardiac disease, cerebral spill, pulmonary embolism as well as thrombus formation in vascular access for dialysis, especially in cases where fistula of polytetrafluorethylene (PTFE) is used. Vascular complications represent 20–25% of all hospitalizations of patients on

hemodialysis [3–5]. Usually stenosis caused by gradual hyperplasia of the intima and muscular layers of the vessels results in thrombosis. Stenosis, in turn, results in blood flow reduction, which favors hypercoagulability, hypotension and hypovolemia. These factors contribute to thrombosis but the exact mechanisms are not completely clear. Some of the described risk factors include diabetes mellitus, hypoalbuminemia, presence of anticardiolipin antibodies, high plasma levels of both lipoprotein (a) and fibronectin, and advanced age [6–9]. However, a significant percentage of vascular thrombosis occurs without explanation, suggesting that other predisposing factors may be involved.

## 2. Platelet dysfunction

Alterations in platelet function is observed in patients with chronic uremia including decreased sensitivity to platelet agonists [10] and adhesion to strange surfaces [11,12], reduced procoagulant activity [13] and thromboxane A2 synthesis [14], decrease in platelet clot retraction

\* Corresponding author. Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Sala 4104 – B3, Campus Pampulha – Belo Horizonte/ Minas Gerais CEP: 31270-901, Brazil. Tel.: +55 31 3409 6880; fax: +55 31 3409 6985. E-mail address: [lucim@farmacia.ufmg.br](mailto:lucim@farmacia.ufmg.br) (L.M.S. Dusse).

time [15] and in platelet glycoprotein Ib expression [16], and increase of cyclical adenosine monofosfato (cAMP) [17]. Excess of some toxins, including urea and other components, such as guanidinosuccinic acid and phenols are, at least in part, responsible for platelet dysfunction [18–22]. Most patients on hemodialysis showed both abnormal bleeding time and platelet aggregation. Dialysis partially corrects these abnormalities [23]. Fibrinogen fragments can occupy some of platelet glycoproteins IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors, hindering the link of the fibrinogen to them and consequently reducing the cross linked fibrin between platelets to form platelet plug [24]. Kozek-Langenecker et al. [25] showed that fibrinogen fragments reduce platelet aggregation in normal platelet rich plasma (PRP) and with isolated platelets. They demonstrated a decrease in fibrinogen binding to platelet receptors through a decrease in binding anti-GPIIIa (anti-CD61) and <sup>125</sup>I-fibrinogen which activates platelets via ADP in the presence of fibrinogen fragment. Hemodialysis can be associated with transitory platelet dysfunction, determined by prolongation of bleeding time immediately after hemodialysis compared with that obtained prior to the procedure. However, in the following day bleeding time returns into normal levels. In general, prolongation of bleeding time is associated with decrease in platelet sensitivity to thrombin and reduction in platelet agglutination with ristocetin. The binding of monoclonal antibodies to platelet glycoproteins was also significantly affected by hemodialysis. For example, the binding of anti-GPIIb (anti-CD42b) reduced immediately after hemodialysis and increased in the subsequent day, correlating with alterations in bleeding time and thrombin sensitivity test [23]. Reduction in GPIIb expression seems to be associated with the severity of renal insufficiency, while GPIIb/IIIa expression does not [26–28]. Decreased in platelet aggregation in response to ADP, collagen, arachidonic acid and ristocetin in patients with ESRD patients was observed compared to the healthy volunteers [29]. Platelet abnormalities, at first, favor bleeding tendency. However, in some cases, these alterations can lead to an increase in thrombotic events. Contrary to the above reports, Liani et al. [30] suggested an abnormal activation of platelet receptors (GPIIb and GPIIb/IIIa) and an increase in the number of these receptors which may induce blockage of the vascular access to hemodialysis. Moreover, hemodialysis can activate platelets, due to contact with the extracorporeal surface and the high shear stress and turbulence in the vascular access [31–34]. The artificial surface of PTFE fistula or native arteriovenous fistula (AVF) promotes fibrinogen adhesion resulting into clot formation in the vascular access [35,36]. Plasma fibrinogen, which is increased in patients under hemodialysis, binds to platelet GPIIb/IIIa glycoprotein resulting into platelet plug formation [6,36]. An additional factor that can contribute to platelet plug formation is the activation of FXII, resulting into local thrombin production with subsequent activation and increased platelet deposition [37]. Activated platelets release growth factors, including platelet-derived growth factor (PDGF) which contributes to increase hyperplasia in the vascular access reducing blood flow favoring to platelet plug formation [38]. Chuang et al. [39] studied the relationship between platelet activation and half-life of the vascular access in patients undergoing hemodialysis. They demonstrated that the majority of patients with recurrent problems of vascular access presented higher amount of circulating activated platelets. Activated platelets predispose to a hypercoagulability state and this condition leads to frequent occurrences of thrombosis in the vascular access.

### 3. Coagulation and fibrinolytic changes

Hemodialysis can affect the hemostatic system via two distinct ways: 1) hemodialysis procedure itself – This includes contact of blood constituents with the negative charge surfaces of the dialysis membranes (as polyacrylonitrile), the composition of the extracorporeal circuit and the flow rate inside the circuit. 2) anticoagulant effect – This is usually added to the dialysis liquid [3,40,41]. Hemodialysis results in a turbulent blood flow resulting into platelet aggregation and leukocyte

activation. Neutrophils attach to the dialysis membrane and release their granular content and monocytes express tissue factor (TF), the natural initiator of the coagulation process [42]. Endothelial injury frequently occurs in patients with chronic renal disease, probably resulting from uremia, dyslipidemia, hypertension, hyperparathyroidism, high levels of plasma interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) [43]. Increased endothelium expression of other proteins such as von Willebrand factor (vWF) [44], thrombomodulin (TM) [45–48] and TF [49,50] has been reported to occur in patients under hemodialysis. Similar findings have been reported for plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [46,48,51,52]. Mezzano et al. [53] proposed that events which leads to prolongation of bleeding time in ESRD patients includes endothelial cells activation, increased thrombin and plasmin production and depletion of platelet ADP and ATP. These findings suggest a common mechanism which could explain both thrombotic and hemorrhagic risk in ESRD patients. It has been suggested that an increase in markers of endothelial dysfunction including vWF, soluble thrombomodulin, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), thrombin–antithrombin complex (TAT), prothrombin fragment 1+2 (F1+2), plasmin–antiplasmin complex (PAP), fibrin degradation products (FDP) are present in patients with chronic uremia prior to the initiation of dialysis process. These markers showed positive association with plasma creatinine levels, suggesting a relationship with chronic renal disease. Moreover, increased generation of thrombin and plasmin levels were related to platelet defects [54,55]. Rabelink et al. [56] confirmed this finding and further suggested that hypercoagulability in these patients was due to alterations in coagulation and fibrinolytic profiles that occur frequently in patients with renal failure. Indeed, increased plasma fibrinogen, D-Dimer (D-Di), TAT, FVII levels and reduced protein C (PC) levels were reported in ESRD patients [57–59].

De Marchi et al. [60] evaluated the impact of some risk factors of thrombosis and vessels hyperplasia in patients under hemodialysis with AVF. Of the 30 patients studied, 11 developed progressive venous stenosis and 3 had severe stenosis followed by thrombosis. F1+2 and D-Di levels were raised, suggesting activation of the coagulation and fibrinolytic systems in patients under dialysis. However, tissue-plasminogen activator (t-PA) and PAI-1 levels did not differ significantly from controls. Moreover, this group showed reduced PC and increased both fibrinogen and FVII levels. Only PAI-1 and FVII showed to be independent predictors of AVF dysfunction.

Erdem et al. [2] evaluated molecular markers of coagulation and fibrinolysis [F1+2, TAT, t-PA, urokinase-plasminogen activator (u-PA), PAP, plasminogen,  $\alpha$ 2-antiplasmin and  $\alpha$ 2-macroglobulina] in 26 ESRD patients and suggested that both coagulation and fibrinolytic parameters are activated. Furthermore, this group indicated that AVF could be an independent factor for such activation. Probably changes in endothelial morphology and increase in blood flow may contribute to local activation of coagulation and fibrinolysis resulting into an unbalance between these systems which contribute to AVF thrombosis.

Ambühl et al. [61] evaluated the status of blood coagulation in 39 patients by measuring plasma F1+2, TAT and D-Di before and during hemodialysis. They concluded that hemodialysis results in the activation of blood coagulation and that TAT and F1+2 levels should be used individually to monitor anticoagulant therapy, especially in patients at high risk of thrombosis.

Song et al. [62] in a cohort study evaluated the association between plasma fibrinogen and loss of vascular access by thrombosis in 102 patients undergoing hemodialysis. They reported increased plasma fibrinogen levels with advanced age. PTFE fistula and erythropoietin were considered as independent risk factors for thrombosis on vascular access.

Bartels et al. [40] in a longitudinal study (10 patients) have evaluated and quantified the effect of hemodialysis membranes (polymethylmethacrylate and polysulfone) on blood coagulation profile. This group

concluded that the dialysis process with both membranes stimulated FXI and fibrinogen generation and increased TAT and F1+2.

Yu et al. [3] assessed plasma levels of D-Di, TF and F1+2 in 82 patients before and after hemodialysis. Patients were classified according to vascular access (arteriovenous fistula, prosthetic native or central venous catheter) and the dialysis equipment (polysulfone or cellulose acetate). This group reported that the studied markers were increased prior to the initiation of dialysis and tended to increase during the process. They also observed a reduction in blood coagulation markers in patients with arteriovenous fistula. However, no significant difference was found in blood coagulation profile when the 2 membranes were compared.

Kushiya et al. [63] studied the relationship between hemostatic markers, atherosclerosis and the time on hemodialysis. They did not observe any significant difference in activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), fibrinogen, vWF, TAT and TM and the hemodialysis time, however, this group had hemostatic changes compared to healthy subjects. These changes may constitute a risk factor for ischemic diseases.

A prospective study aimed at identifying risk factors for hypercoagulability in patients undergoing hemodialysis suggested that patients on hemodialysis show a hypercoagulability state compared with healthy subjects. Lupus antibody as well as PC and protein S (PS) deficiencies significantly correlated with vascular access thrombosis. Longitudinal study following 20 renal transplant patients showed that PC, PS and antithrombin (AT) deficiencies were completely corrected some months after renal transplant, indicating that hypercoagulability is essentially an acquired and reversible event [64].

Controversial results have been reported for plasma tissue factor pathway inhibitor (TFPI) levels in patients on hemodialysis. Several studies have reported an increase in plasma TFPI levels in patients undergoing hemodialysis compared to healthy subjects [65–67]. However, Cella et al. [68] found normal TFPI levels in patients on hemodialysis. Heparin use during the hemodialysis procedure could increase TFPI activity in these patients [67]. Yorioka et al. [66] found high levels of TFPI in patients under hemodialysis with vascular access thrombosis.

The fibrinolytic system was evaluated in 43 patients on hemodialysis by measuring u-PA, PAP, fibrinogen degradation products (FDP) and C1-inhibitor activities before and after hemodialysis. Patients on hemodialysis showed activation of the fibrinolytic system compared with healthy subjects. However, no significant differences in these parameters before and after hemodialysis were observed [4].

Sabovic et al. [41] evaluated platelet aggregation, markers of hypercoagulability (TAT, F1+2, D-Di and fibrinogen) and fibrinolysis (plasminogen, t-PA and PAI-1) before and immediately after hemodialysis. The results showed that during the hemodialysis procedure there was no significant platelet and coagulation activation. Salobir et al. [69] evaluated the same parameters of the previous study in 15 patients undergoing hemodialysis and observed elevated D-Di, TAT e F1+2 levels and reduced plasminogen levels compared with healthy group. Moreover, they had observed a decreased of the platelet aggregation in the hemodialysis patients that was positively correlated with plasminogen levels. They had suggested that the factors that contribute for reducing plasminogen levels, such as fibrinogen fragments or plasmin, influence the platelet aggregation.

Salobir et al. [69] evaluated the same parameters of the previous study in 15 hemodialysis patients and found elevated levels of fibrinogen, D-Di, TAT and F1+2 and low levels of plasminogen comparing to the control group. They also observed a decrease in platelet aggregation in hemodialysis patients that correlated positively with plasminogen levels. Therefore, they suggested that the factors contributing to reducing levels of plasminogen, such as fragments of fibrinogen or plasmin, influence platelet aggregation.

Costa et al. [70] observed reduced PAI-1 levels and increased t-PA/PAI-1 ratio and D-Di levels in 50 patients undergoing hemodialysis

compared to healthy subjects. They also observed that the levels of D-Di, t-PA and inflammatory markers levels were higher in patients with central venous catheter compared with those with AVF, which led this group to propose a relationship between the type of venous access and risk of thrombosis.

O'Shea et al. [71] evaluated a specific group of 31 patients undergoing hemodialysis with recurrent thrombosis of vascular access (average 3.7 events/patient/year). This group found a high prevalence of antibodies antiphospholipid (58%), antifactor 4 platelet-heparin (18%) and elevated FVIII (93.5%), fibrinogen (63%), C-reactive protein (PCR) (41.9%) and hyperhomocysteinemia (80.6%). For mutations that predispose to thrombophilia they found only one patient heterozygous for G20210A, none carrying FV Leiden and three patients with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism (one homozygous and two heterozygous). Thus, all patients had at least one risk factor for thrombosis and 25 of 31 patients had two or more risk factors. Other studies have also suggested that the presence of mutations may predispose to thrombophilia and could contribute to the occurrence venous thrombosis in the vascular access [5].

Fodinger et al. [72] studied 152 patients on hemodialysis and found 7 (4.6%) heterozygous for FV Leiden. None of the patients showed thrombotic complications in the central venous catheter or fistula. Atac et al. [73] studied 46 patients with vascular access thrombosis and 44 patients without complications (control group) and reported a significant increase in the prevalence of FV Leiden and prothrombin gene mutation (G20210A) in the first group of patients (13% vs. 4% and 9% vs. 0%, respectively).

Knoll et al. [5] in a case-control study involving 419 patients evaluated gene polymorphisms of FII, FV, FXIII and MTHFR. Other risk factors for access thrombosis were controlled. These include FVIII, total homocysteine, lupus anticoagulant, fibrinogen, anticardiolipin antibody, lipoprotein, albumin, folate and vitamin B12. The presence of FV Leiden and raised FVIII, Lp(a) and homocysteine levels were associated with vascular access thrombosis [5].

Akman et al. [74] studied 109 patients awaiting renal transplantation and reported that FV Leiden and D-Di levels were the most important risk factors for thrombosis. No differences in genetic and biochemical parameters between the different forms of dialysis were observed, suggesting that ESRD is the main cause of hypercoagulability.

Plasma homocysteine levels and the occurrence of vascular access thrombosis have been investigated but different results were reported. Shemin et al. [75] found that in 84 patients on hemodialysis, thrombosis occurred in 56% of patients within a period of 18 months. A recent study of patients with native fistulas alone also showed that plasma homocysteine levels predict the occurrence of vascular access thrombosis [76]. However, other studies did not confirm such association. Manns et al. [77] in a retrospective study of 118 patients reported similar increase in plasma homocysteine levels in patients who developed thrombosis and those who did not.

A retrospective study of 337 Japanese patients showed that MTHFR gene mutation in homozygosis was found in 20% of patients and was the highest risk factor for vascular access thrombosis compared to normal genotypes and heterozygosis [78].

Mallamaci et al. [76] also confirmed the relationship between plasma homocysteine levels and risk of thrombosis but did not detect MTHFR gene mutation as an additional risk factor.

A critical review of the literature on hemostatic changes in patients on hemodialysis showed many confounding factors and highlighted the need for strict observation of several criteria. Laboratory markers are subject to a number of changes induced during the pre-analytical phase (e.g., blood collection and processing, plasma storage, etc) as well as the use of different detection methods. Furthermore, conditions associated with ESRD and the hemodialysis process must be carefully standardized between hospitals.

#### 4. Conclusion

Vascular access thrombosis is a frequent complication in patients undergoing hemodialysis, although bleeding abnormalities also occur. It is believed that in patients on hemodialysis a state of hypercoagulability could result from vascular changes including platelets, coagulation and fibrinolytic factors activation. It is therefore essential to evaluate hemostatic profiles in patients undergoing hemodialysis and determine changes so that adequate regimes for anticoagulant therapy could be implemented. In this context few randomized studies on anti-platelet and oral anticoagulants have been performed. To date pharmacological prevention of vascular access thrombosis in patients on hemodialysis has been a major therapeutic challenge. This area certainly warrants further investigation.

#### Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG and CNPq/Brazil. LMSD, MGC and ACSs are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

#### References

- Jubelirer SJ. Hemostatic abnormalities in renal disease. *Am J Kidney Dis* 1985;5:219–25.
- Erdem Y, Haznedaroglu IC, Celik I, et al. Coagulation, fibrinolysis and fibrinolysis inhibitors in hemodialysis patients: contribution of arteriovenous fistula. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1299–305.
- Yu A, Eberg N, Jacobson SH. Haemostatic complications in haemodialysis patients: effect of type of vascular access and dialysis filter. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:127–34.
- Bronisz M, Rosé D, Bronisz A, Manitus J, Nartowicz E. The role of intrinsic fibrinolytic system activation in pathogenesis of hemostasis disturbances in hemodialyzed patients with chronic renal failure. *Ren Fail* 2004;26:223–9.
- Knoll GA, Wells PS, Young D, et al. Thrombophilia and the risk for hemodialysis vascular access thrombosis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1108–14.
- Windus DW, Santoro S, Royal HD. The effects of hemodialysis on platelet deposition in prosthetic graft fistulas. *Am J Kidney Dis* 1995;26:614–21.
- Porille JL, Richter M. Preservation of vascular access. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:997–1003.
- Goldwasser P, Avram MM, Collier J, Michel MA, Gusik SA, Mittman N. Correlates of vascular access occlusion in hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1994;24:785–94.
- Goldwasser P, Michel MA, Collier J, et al. Prealbumin and lipoprotein (a) in hemodialysis: relationship with patient and vascular access survival. *Am J Kidney Dis* 1993;22:15–25.
- Castaldi PA, Rozenberg MC, Stewart JH. The bleeding disorder of uremia: a qualitative platelet defect. *Lancet* 1966;2:66–9.
- Larsson SO. On coagulation and fibrinolysis in renal failure. *Scand J Haematol Suppl* 1971;15:1–59.
- Salzman EW, Neri LL. Adhesiveness of blood platelets in uremia. *Thromb Diath Haemorrh* 1966;15:84–92.
- Horowitz HL, Stein IM, Cohen BD, White JG. Further studies on the platelet inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Am J Med* 1970;49:336–45.
- Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, et al. Reduced platelet thromboxane formation in uremia: evidence for a functional cyclooxygenase defect. *J Clin Invest* 1983;71:762–8.
- Mathias FR, Palinski W. Prostaglandin-endoperoxidase and cyclic 3′/5′-AMP in platelets of patients with uremia. *Thromb Haemost* 1977;38:34.
- Lewis JH, Zucker MB, Ferguson JH. Bleeding tendency in uremia. *Blood* 1956;11:1073–6.
- Sloand EM, Sloand JA, Prodouk K, et al. Reduction of platelet glycoprotein IIb in uremia. *Br J Haematol* 1991;77:375–81.
- Bazilinski N, Shaykh M, Dunea G, et al. Inhibition of platelet function by uremic middle molecules. *Nephron* 1985;40:423–8.
- Davis JW, Mcfield JR, Phillips PE, Graham BA. Guanidinosuccinic acid on human platelet: effects of exogenous urea, creatinine, and aggregation in vitro. *Blood* 1972;39:388–97.
- Eknoyan G, Wacksman SJ, Glueck HI, Will JJ. Platelet function in renal failure. *N Engl J Med* 1969;280:677–81.
- Rabiner SF, Molinas F. The role of phenol and phenolic acids on the thrombocytopeny and defective platelet aggregation of patients with renal failure. *Am J Med* 1970;49:346–51.
- Zwagning JJ, Ijsseldijk MJ, de Groot PG, Vos J, de Bos Kuil RL, Sixma JJ. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorders are attributed to factors in plasma. *Arterioscler Thromb* 1991;11:733–44.
- Sloand JA, Sloand EM. Studies on platelet membrane glycoproteins and platelet function during hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:799–803.
- Sreedhara R, Itagaki I, Hakim RM. Uremic platelets have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb–IIIa receptors. *Am J Kidney Dis* 1996;27:355–64.
- Kozek-Langenecker SA, Masaki T, Mohammad H, Green W, Mohammad SF, Cheung AK. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. *Kidney Int* 1999;56:299–305.
- Liani M, Salvati F, Golato M, Tresca E. Platelet glycoproteins GPIIb and GPIIb/IIIa abnormalities in uremia. *Nephron* 1996;72:716.
- Moal V, Brunet P, Dou L, Morange S, Sampol J, Berland Y. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uremic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1834–41.
- Salvati F, Liani M. Role of platelet surface receptor abnormalities in the bleeding and thrombotic diathesis of uremic patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Int J Artif Organs* 2001;24:131–5.
- Malyszko JS, Malyszko JS, Pawlak D, Pawlak K, Buczek W, Mysliwiec M. Hemostasis, platelet function and serotonin in acute and chronic renal failure. *Thromb Res* 1996;83:351–61.
- Liani M, Salvati F, Tresca E, et al. Arteriovenous fistula obstruction and expression of platelet receptors for von Willebrand factor and for fibrinogen (glycoproteins GPIIb/IIIa) in haemodialysis patients. *Int J Artif Organs* 1996;19:451–4.
- Cases A, Reverter JC, Escobar G, et al. Platelet activation on hemodialysis: influence of dialysis membranes. *Kidney Int Suppl* 1993;43:S217–20.
- Hakim RM, Schafer AI. Hemodialysis-associated platelet activation and thrombocytopenia. *Am J Med* 1985;78:575–80.
- Turitto VT, Hall CL. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 1998;92:S25–31.
- Viener A, Aviram M, Better OS, Brook JG. Enhanced in vitro platelet aggregation in hemodialysis patients. *Nephron* 1986;43:139–43.
- Salzman EW, Linton J, Mcmanama G, Ware JA. Role of fibrinogen in activation of platelets by artificial surfaces. *Ann N Y Acad Sci* 1987;516:184–95.
- Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb/IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem* 1991;266:11227–33.
- Colman RW, Scott CF, Schmaier AH, Wachtfogel YT, Pixley RA, Edmunds LH. Initiation of blood coagulation at artificial surfaces. *Ann N Y Acad Sci* 1987;516:253–67.
- Smits JHM, Linden J, Blankestijn PJ, Rabelink TJ. Coagulation and hemodialysis access thrombosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1755–60.
- Chuang YC, Chen JB, Yang LC, Kuo CY. Significance of platelet activation in vascular access survival of hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 2003;18:947–54.
- Bartels PCM, Schoorl M, Schoorl M, Nubé MJ. Deviations in coagulation activation due to treatment with different haemodialysis membranes. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:417–24.
- Sabovic M, Salobir B, Zupan IP, Bratina P, Bojec V, Ponikvar JB. The influence of the haemodialysis procedure on platelets, coagulation and fibrinolysis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005;34:274–8.
- Fischer KG. Essentials of anticoagulation in hemodialysis. *Hemodial Int* 2007;11:178–89.
- Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Comparison of hemostatic disturbances between patients on CAPD and patients on hemodialysis. *Perit Dial Intern* 2001;21:158–65.
- Gordge MP, Neild GH. Platelet function in uremia. *Platelets* 1991;2:115–23.
- Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 1991;65:618–23.
- Gris JC, Branger B, Vécina F, Al Sabadami B, Fourcade J, Schved JF. Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int* 1994;46:807–13.
- Hergesell O, Andrassy K, Geberth S, Nawroth P, Gabath S. Plasma thrombomodulin levels are dependent on renal function. *Thromb Res* 1993;72:455–8.
- Takagi M, Wada H, Mukai K, et al. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:713–7.
- Kario K, Matsuo T, Yamada T, Matsuo M. Increased tissue factor pathway inhibitor levels in uremic patients on regular hemodialysis. *Thromb Haemost* 1994;71:275–9.
- Koyama T, Nishida K, Ohdama S, et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994;87:343–7.
- Hong SY, Yang DH. Insulin levels and fibrinolytic activity in patients with end-stage renal disease. *Nephron* 1994;68:329–33.
- Nakamura Y, Tomura S, Tachibana K, Chida Y, Marumo F. Enhanced fibrinolytic activity during the course of hemodialysis. *Clin Nephrol* 1992;38:90–6.
- Mezzano D, Tagle R, Pais E. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. *Thromb Res* 1997;88:465–72.
- Mezzano D, Tagle R, Panes O, et al. Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1996;76:312–21.
- Mezzano D, Pais E, Aranda E, et al. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int* 2001;60:1844–50.
- Rabelink TJ, Zwagning JJ, Koomans HA, Sixma JJ. Thrombosis and hemostasis in renal failure. *Kidney Int* 1994;46:287–96.
- Vaziri ND, Gonzales EC, Wang J, Said S. Blood coagulation, fibrinolytic, and inhibitory proteins in end-stage renal disease: effect of hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 1994;23:828–35.
- Sagripanti A, Cupisti A, Baicchi U, Ferdeghini M, Morelli E, Barsotti G. Plasma parameters of the prothrombotic state in chronic uremia. *Nephron* 1993;63:273–8.
- Lai K, Yin JA, Yuen PMP, Li PKT. Effect of hemodialysis on protein C, protein S and an antithrombin III levels. *Am J Kidney Dis* 1991;17:38–42.

- [60] De Marchi S, Falletti E, Giacomello R, et al. Risk factors for vascular disease and arteriovenous fistula dysfunction in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1169–77.
- [61] Ambühl PM, Wüthrich RP, Korte W, Schmid L, Krapf R. Plasma hypercoagulability in haemodialysis patients: impact of dialysis and anticoagulation. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2355–64.
- [62] Song S, Yang WS, Kim SB, Lee J, Kwon T, Park JS. Association of plasma fibrinogen concentration with vascular access failure in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:137–41.
- [63] Kushiya F, Wada H, Sakakura M, et al. Atherosclerotic and hemostatic abnormalities in patients undergoing hemodialysis. *Clin Appl Tromb Hemost* 2003;9:53–60.
- [64] Nampoory MR, Das KC, Johnny KV, et al. Hypercoagulability, a serious problem in patients with ESRD on maintenance hemodialysis, and its correction after kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2003;42:797–805.
- [65] Inoue A, Wada H, Takagi M. Hemostatic abnormalities in patients with thrombotic complications on maintenance hemodialysis. *Clin Appl Tromb Hemost* 2000;6:100–3.
- [66] Yorioka N, Taniguchi Y, Yamashita K, et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs* 1998;21:699–701.
- [67] Kario K, Matsuo T, Matsuo M, et al. Marked increase of activated factor VII in uremic patients. *Thromb Haemost* 1995;73:763–7.
- [68] Cella G, Vertoli U, Naso A, et al. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) activity in uremic patients during hemodialysis. *Thromb Res* 1996;81:671–7.
- [69] Salobir B, Sabovic M, Zupan IP, Ponikvar JB. Platelet (dys)function and plasma plasminogen levels in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2008;12(2):133–6.
- [70] Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, et al. Cross-talk between inflammation, coagulation/fibrinolysis and vascular access in hemodialysis patients. *J Vasc Access* 2008;9:248–53.
- [71] O'shea SI, Lawson JH, Reddan D, Murphy M, Ortel TL. Hypercoagulable states and antithrombotic strategies in recurrent vascular access site thrombosis. *J Vasc Surg* 2003;38:541–8.
- [72] Fodinger M, Mannhalter C, Pabinger I, et al. Resistance to activated protein C (APC): mutation at Arg506 of coagulation factor V and vascular access thrombosis in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transpl* 1996;11:668–72.
- [73] Ataç B, Yakupoglu U, Ozbek N, Ozdemir FN, Bilgin N. Role of genetic mutations in vascular access thrombosis among hemodialysis patients waiting for renal transplantation. *Transpl Proc* 2002;34:2030–2.
- [74] Akman B, Afsar B, Ataç FB, et al. Predictors of vascular access thrombosis among patients on the cadaveric renal transplantation waiting list. *Transpl Proc* 2006;38:413–5.
- [75] Shemin D, Lapane KL, Bausserman L, et al. Plasma total homocysteine and hemodialysis access thrombosis: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1095–9.
- [76] Mallamaci F, Bonanno G, Seminara G, et al. Hyperhomocysteinemia and arteriovenous fistula thrombosis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:702–7.
- [77] Manns BJ, Burgess ED, Parsons HG, Schaefer JP, Hyndman ME, Scott-Douglas NW. Hyperhomocysteinemia, anticardiolipin antibody status, and risk for vascular access thrombosis in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;55:315–20.
- [78] Fukasawa M, Matsushita K, Kamiyama M, et al. The methylentetrahydrofolate reductase C677T point mutation is a risk factor for vascular access thrombosis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41:637–42.