

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

DANIELA AMORIM MELGAÇO GUIMARÃES DO BEM

**ESTUDO DE PARÂMETROS
POTENCIALMENTE TROMBOGÊNICOS
EM USUÁRIAS DE TERAPIA
HORMONAL (TH)**

Belo Horizonte-MG

2009

Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem

**ESTUDO DE PARÂMETROS POTENCIALMENTE
TROMBOGÊNICOS EM USUÁRIAS DE TERAPIA
HORMONAL (TH)**

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: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes -UFMG

Co-Orientadoras: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, Profa. Dra. Marinez de Oliveira Souza - UFMG

Belo Horizonte- MG

2009

À minha orientadora e amiga Profª Ana Paula Fernandes, seu incentivo, dedicação e persistência foram fundamentais nesta etapa.

Ao Paulinho, pelo amor e companheirismo sempre presente.

À minha família, meus pais Hamilton e Maria José, Aline e Fernanda, pelo amor, apoio e incentivo em meus estudos.

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Prof^a Maria das Graças Carvalho, que me orientou e acompanhou com dedicação, paciência e carinho. Muito obrigada.

À minha co-orientadora Prof^a Marinez de Oliveira Sousa, que me orientou no Laboratório de Bioquímica. Obrigada pelo apoio, carinho e amizade.

À Prof^a Luci Maria Sant'Ana Dusse, obrigada pela amizade, carinho e pelos ensinamentos.

À amiga Karina Braga Gomes. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos e pela amizade.

Aos médicos Dr. Romerson M. Franco e Dr. George da S. Teixeira, obrigada por terem participado da elaboração deste projeto e pelo encaminhamento das pacientes. Agradeço também pela dedicação e preocupação com o projeto.

Ao amigo farmacêutico-bioquímico Jarbas E. Cardoso, obrigada pelo apoio, amizade e colaboração no laboratório de Biologia Molecular.

À Geralda de Fátima G. Lages, obrigada pelo apoio e colaboração no laboratório de Hematologia.

À Mariana Silva dos Santos, a sua participação neste trabalho foi imprescindível para que ele fosse concluído. Não tenho como agradecer a dedicação, a amizade, o companheirismo e o carinho.

Ao prof. Alexandre Correia Fernandes da UNIPAC/Lafaiete pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular: Renata Celi, Daniela Diniz, Blima, Poliana, Adriano, Caleb, Mariana Santana, Daniel, Lucas, Fábio, Fernanda, Isabela, Nathália, Katrina e Mirian. Obrigada pelo apoio, amizade e pelas festas do laboratório.

À Danyelle Romana, obrigada pela constante ajuda no laboratório de Hematologia.

À Prof. Ângela Maria Quintão Lana e ao Danilo Bastos da Escola de Veterinária da UFMG, pela orientação na análise estatística.

Ao Márcio Jacinto de Oliveira pela ajuda na coleta e na utilização de equipamento do laboratório de Análises Clínicas da UFMG.

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

Ao Bioquímico Thales e funcionárias do Laboratório Geraldo Lustosa, pela disponibilidade e auxílio durante a coleta.

Ao Bioquímico Cláudio, do Laboratório Humberto Abraão, pela disponibilidade e ajuda nas dosagens bioquímicas.

Aos Profs. Adolfo Firmino, Kátia Milagres e Érika da UNIPAC/Lafaiete, pela disponibilidade, apoio e trocas de aula quando necessário.

À minha avó Nali e a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para a realização desta etapa.

Aos meus sogros Paulo e Elizabeth do Bem, Taís e D. Ará obrigada pelo apoio e carinho.

À amiga Bianca Bianco do Carmo, obrigada pelo apoio, carinho e amizade sempre presentes.

Aos meus alunos e ex-alunos dos cursos de Enfermagem, Medicina Veterinária e Terapia Ocupacional da UNIPAC/Lafaiete, que inúmeras vezes me apoiaram.

Aos colegas do Laboratório Hemolab, especialmente, Valéria, Andréa e Nilza, obrigada pelo apoio.

À todas as mulheres que contribuíram voluntariamente com este estudo.

“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que tivesse toda a fé, a ponto de transportar os montes, se não tivesse amor, eu nada seria”. (I Cor 13, 2)

RESUMO

A ativação da cascata da coagulação e fibrinólise, o grupo sanguíneo ABO, o polimorfismo -675 4G/5G no gene do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), bem como o perfil lipídico e apolipoproteico foram investigados em mulheres usuárias de terapia hormonal (TH) oral (n=61) e no grupo controle (n=101). Na avaliação dos marcadores de hipercoagulabilidade foi observado aumento significativo nos níveis de D-Di ($335,67 \pm 132,68$ vs $527,15 \pm 420,51$) e FVIII ($100,22 \pm 29,25$ vs $112,73 \pm 35,42$), e diminuição dos níveis de PAI-1 ($38,47 \pm 22,61$ vs $29,57 \pm 16,89$) em usuárias de TH oral. A frequência dos grupos sanguíneos entre controles e usuárias de TH não apresentou diferença significativa. Neste estudo, as mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos não-O comparadas às mulheres grupo O, apresentaram aumento significativo de FVIII e FvW, independente do uso ou não da TH ($p < 0,05$). Mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos não-O usuárias de TH apresentaram aumento significativo dos níveis de FVIII ($p = 0,023$) e D-Di ($p = 0,003$), comparadas com as mulheres controles também não-O. Os níveis de PAI-1 foram significativamente menores em mulheres sob TH oral pertencentes ao grupo sanguíneo O ($p = 0,007$). As usuárias de TH oral e pertencentes aos grupos sanguíneos não-O apresentaram risco 25 vezes maior de apresentar níveis de D-Di acima do valor de referência (OR= 25,14; IC: 5,61-109,24), comparando com o grupo de não-usuárias portadoras do tipo sanguíneo O. Não foi observada diferença estatística na composição dos grupos controle e usuárias de TH em relação à frequência dos genótipos do polimorfismo 4G/5G. No grupo controle níveis de PAI-1 significativamente mais baixos foram observados comparando os genótipos 4G/4G com 5G/5G e 4G/5G com 5G/5G, enquanto nas mulheres usuárias de TH oral não foi observada diferença significativa. Comparando os dois grupos em relação ao polimorfismo 4G/5G observou-se diminuição significativa nos níveis de PAI-1 em usuárias de TH homozigotas 4G/4G ($p = 0,027$) e nas heterozigotas 4G/5G ($p = 0,018$). Usuárias de TH oral apresentaram diminuição dos níveis de colesterol total (CT) ($207,08 \pm 44,28$ vs $192,18 \pm 48,01$), LDLc ($130,90 \pm 37,11$ vs $118,53 \pm 41,40$), e apo B ($108,04 \pm 21,01$ vs $101,35$), além do aumento significativo nos níveis de HDLc ($45,89 \pm 9,48$ vs $49,55 \pm 11,11$) e apo A-I ($179,62 \pm 26,25$ vs $188,72 \pm 33,60$). Foi observada também uma diminuição significativa no índice apoB/apoA-I ($0,62 \pm 0,16$ vs $0,56 \pm 0,14$). Mulheres, usuárias de TH oral por cerca de 3 meses, apresentaram tendência à hipercoagulabilidade demonstrada por aumento nos níveis de FVIII e D-Di bem como tendência ao aumento da fibrinólise devido à redução nos níveis de PAI-1. A TH e os efeitos do locus ABO nos níveis do FVIII e D-Di em mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos não-O podem aumentar o risco de apresentar níveis de D-Di acima dos valores de referência, sugerindo efeito sinérgico entre grupos sanguíneos não-O e TRH sobre a ativação da cascata da coagulação. Considerando o grupo sanguíneo ABO e o polimorfismo 4G/5G como variáveis importantes, estudos adicionais devem ser realizados em mulheres na pós-menopausa em uso de TH com o objetivo de avaliar o significado clínico das alterações nos marcadores de hipercoagulabilidade e o risco de trombose.

Palavras-chave: terapia hormonal, hipercoagulabilidade, sistema sanguíneo ABO, perfil lipídico, apolipoproteínas.

ABSTRACT

The activation of the coagulation and fibrinolysis, the ABO blood group, the -675 4G/5G polymorphism in the gene of the inhibitor of plasminogen activator-1 (PAI-1) and the lipidic and apolipoprotein profiles were studied in women using oral hormone therapy (HT) (n= 61) and in control group (n= 101). In the assessment of hypercoagulability markers, a significant increase in levels of D-Di (335.67 ± 132.68 vs 527.15 ± 420.51) and FVIII (100.22 ± 29.25 vs $112.73 \pm 35, 42$), and decreased of PAI-1 (38.47 ± 22.61 vs 29.57 ± 16.89) were observed in users of oral HT. The frequencies of blood groups among users of HT and controls were not significantly different. Women belonging to non-O blood groups compared to the O blood group showed a significant increase in FVIII and VWF, independent of oral HT ($p < 0.05$). Non-users of HT belonging to O blood group had a significant increase in levels of FVIII ($p = 0.023$) and D-Di ($p = 0.003$), compared with the non-O controls. The levels of PAI-1 were significantly lower in women under oral HT belonging to O blood group ($p = 0.007$). The users of oral HT belonging to non-O blood groups had 25 times increased risk of presenting D-Di levels above the reference value (OR = 25.14, CI: 5.61-109.24) as compared to the group of non-users carrying the blood type O. There was no statistical difference in the composition of the control group and users of HT in relation to the frequency of genotypes of the 4G/5G polymorphism. In control group, levels of PAI-1 were significantly lower comparing the 4G/4G genotype with 5G/5G and between 4G/5G and 5G/5G, while in the oral HT group no significant differences were observed. Comparing the two groups in relation to the 4G/5G polymorphism, a significant decrease in levels of PAI-1 in users of HT homozygous 4G/4G ($p = 0.027$) and 4G/5G heterozygous ($p = 0.018$) was observed. Users of oral HT had decreased levels of total cholesterol (TC) (207.08 ± 44.28 vs 192.18 ± 48.01), LDLc (130.90 ± 37.11 vs 118.53 ± 41.40) and apo B (108.04 ± 21.01 vs 101.35), in addition to the significant increase in levels of HDLc (45.89 ± 9.48 vs 49.55 ± 11.11) and apo A-I (179.62 ± 26.25 vs 188.72 ± 33.60). There was also a significant decrease in the ratio apoB/ApoA-I (0.62 ± 0.16 vs 0.56 ± 0.14). Women, users of oral HT for 3 months, showed a tendency to hypercoagulability demonstrated by increased levels of FVIII and D-Di as well as the increasing trend of fibrinolysis due to reduction in levels of PAI-1. The HT and the effect of ABO locus on levels of FVIII and D-Di in women belonging to non-O blood groups may increase the risk for D-Di levels above the reference values, suggesting a synergistic effect of non-O blood groups and HT on activation of coagulation. Considering the ABO blood group and the 4G/5G polymorphism as important variables, additional studies must be conducted in post menopausal women in use of HT to evaluate the clinical significance of changes in markers of hypercoagulability and risk of thrombosis.

Keywords: Hormone therapy, hypercoagulability, ABO blood system, lipid profile, apolipoproteins.

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Representação esquemática da cascata de coagulação (*in vitro*) e fibrinólise. Os inibidores da cascata de coagulação e da fibrinólise estão representados em cor verde: Inibidor do fator tissular (TFPI), proteína C ativada (PCa), proteína S (PS), antitrombina (AT), inibidor do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e antiplasmina. Os marcadores de hipercoagulabilidade estão representados em vermelho: fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT), fibrinopeptídeo A (FPA), produtos de degradação da fibrina (PDF) e dímero-D (D-Di). Os fatores da coagulação ativados estão representados em cor azul: XIIIa, XIa, IXa, VIIIa, VIIa, Xa, Va, IIa e XIIIa 25
- 2 - Modelo atual da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares (in vivo) adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação. 27
- 3 - Estrutura do gene da glicosiltransferase (ABO) e esquema dos genes dos grupos sanguíneos. 34
- 4 - Açúcares imunodominantes eritrocitários A, B e H, antígenos do sistema ABO. As setas indicam as posições que diferem a estrutura química da n-acetilgalactosamina da galactose (Watkins, 2001), o antígeno H consiste no açúcar L-fucose. 35
- 5 - Risco do primeiro evento de TEV em mulheres sob TH, Fonte: CANONICO *et al.* (2008b). 39
- 6 - Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do sistema ABO, obtidos após realização da PCR e digestão com as endonucleases *MspI* e *KpnI*. 58
- 7 - Digestão dos produtos de PCR da protrombina, para o diagnóstico da mutação G20210A em mulheres do grupo controle e em uso de TH. 67
- 8 - Digestão dos produtos de PCR do Fator V para diagnóstico da mutação Fator V Leiden (G1691A), em , em mulheres do grupo controle e em uso de TH. 67
- 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1, através da técnica de PCR alelo específico. 68
- 10 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1), em mulheres do grupo controle e em uso de TH. 69
- 11 - Distribuição dos grupos sanguíneos entre as participantes dos grupos controles e usuárias de TRH. 70
- 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após reação de PCR, seguida de digestão com as endonucleases de restrição *MspI* e *KpnI* para determinação dos genótipos do sistema ABO. 70
- 13 - Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) e D-Di (ng/mL), FVIII (%) e FvW (ng/mL), das participantes dos grupos controle (n=101) e usuárias de TH oral (n=61), com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo (p<0,05). 73
- 14 - Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de FVIII (%), FvW (ng/mL), D-Di (ng/mL) e PAI-1 (ng/mL) das participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral, pertencentes aos grupos sanguíneos O e não-O, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo (p<0,05). 79
- 15 - Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 das participantes do grupo controle, de acordo com os genótipos do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo (p<0,05). 81

- 16 - Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 das participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral, de acordo com os genótipos do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75°, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$). 82
- 17- Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de CT (mg/dL), HDL-C (mg/dL) e LDLc (mg/dL) das participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$). 85
- 18- Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de apo a-I (mg/dL), apo B (mg/dL) e índice apoB/apoA-I das participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$). 86

LISTA DE QUADROS

1- Distribuição dos grupos sanguíneos numa amostragem de doadores da Fundação Hemominas (estimativa para população geral de Minas Gerais).	36
2- Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas diferentes PCRs, para amplificação dos segmentos genômicos específicos.	53
3- Concentrações de reagentes utilizados nas PCR's.	54
4- Programas de PCR utilizados no termociclador.	54
5- Condições padronizadas de digestão por enzimas de restrição para detecção das mutações FV Leiden e nos genes da protrombina (G20210A), através do polimorfismo de tamanho de restrição (RFLP).	55
6- Perfil de bandas para genotipagem das mutações por RFLP (PT e FVL) ou PCR alelo específica (PAI-1).	55
7- Tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO .	56
8- Oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação dos exons 6 e 7 do sistema ABO.	57
9- Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação dos exons 6 e 7 do sistema ABO.	57
10- Programas utilizados no termociclador para a PCR dos exons 6 e 7 do sistema ABO.	57
11- Condições padronizadas de digestão dos exons 6 e 7 para investigação dos genótipos do sistema ABO.	58

LISTA DE TABELAS

1- Características das participantes do estudo, expressas como média e desvio padrão ou percentagem e valor de p.	61
2- Níveis plasmáticos de D-Di, PAI-1, FVIII e FvW no grupo controle e em usuárias de TRH oral, expressos como médias, desvios padrão, mediana, valores mínimos e máximos, e valor de p.	72
3- Coeficiente de Correlação (r) de Spearman e valor de p para os marcadores FVIII, FvW, D-Di, nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral	74
4- Níveis plasmáticos de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1 das mulheres dos grupos controle e usuárias de TH, de acordo com o grupo sanguíneo, expressos como médias e desvios padrão, mediana, valores mínimo e máximo.	76
5- Comparação dos grupos sanguíneos O e não-O, das mulheres dos grupos controle e usuárias de TH, em relação aos níveis plasmáticos de FVIII, FvW e D-Di, expressos como média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, e valor de p .	77
6- Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII, FvW e D-Di nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH, pertencentes aos grupos sanguíneos O e não O, expressos como média, desvio padrão, e valor de p.	78
7- <i>Odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%) e valor de p para as mulheres que apresentaram níveis elevados de D-Di (>500ng/mL).	80
8- Níveis plasmáticos de PAI-1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -675 4G/5G no gene do PAI-1, expressos como média, desvios padrão, mediana, valores mínimo e máximo, e valor de p.	82
9- Níveis plasmáticos de colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides, apolipoproteína A-I, apolipoproteína B, e os índices CT/HDLc, LDLc/HDLc, apo B/apo A-I em mulheres do grupo controle e em uso de TH.	84
10- Coeficiente de Correlação (r) de Pearson e valor de p para os marcadores do perfil lipídico, nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral.	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
ADP	Adenosina difostato
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo A-II	Apolipoproteína A-II
Apo B	Apolipoproteína B
ANOVA	Análise de variância
Arg	Arginina
AT	Antitrombina
C	Citosina
CT	Colesterol total
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
COEP	Comitê de ética em pesquisa da UFMG
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
D-Di	D-dímero
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELFA	<i>Enzyme linked fluorescent assay</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immune assay</i>
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
F 1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FI	Fibrinogênio
Fia	Fibrina
FII	Protrombina
FIIa	Trombina
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado
FPA	Fibrinopeptídeo A
FPB	Fibrinopeptídeo B
FT	Fator tissular
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FV Leiden	Fator V Leiden
FVL	Fator V Leiden
F VII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativado
FvW	Fator Von Willebrand
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
FXIIa	Fator XII ativado
FXIII	Fator XIII
FXIIIa	Fator XIII ativado
FvW	Fator von Willebrand
G	Guanina
HCII	Co-fator II da heparina

HDLc	Lipoproteína de alta densidade
HDL2	Sub-fração 2 da lipoproteína de alta densidade
HMWK	Cinogênio de alto peso molecular
hsCRP	Proteína C reativa ultra sensível
IDLc	Lipoproteína de densidade intermediária
KDa	Kilodaltons
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoproteína a
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NCEP	<i>National cholesterol education program</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
Pb	Pares de base
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PK	Pré-caliceína
PLAQ	Fosfolípidos plaquetários
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PS	Proteína S
PT	Protrombina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
rpm	Rotações por minuto
rPCA	Resistência à proteína C ativada
RR	Risco relativo
SOBRAC	Sociedade Brasileira de Climatério
T	Timina
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado por trombina
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TE	Terapia estrogênica
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TG	Triglicérides
TM	Trombomodulina
TMB	perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina
TVP	Trombose venosa profunda
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
Val	Valina
VLDLc	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
χ^2	Teste de qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Climatério	22
2.2 Terapia hormonal	22
2.3 Hemostasia	24
2.3.1 Coagulação sanguínea	24
2.3.2 Anticoagulantes naturais	27
2.3.3 Fibrinólise	28
2.4 Trombose venosa	29
2.5 Predisposição genética e trombose venosa	30
2.5.1 Fator V Leiden	31
2.5.2 Mutação no gene da protrombina (Fator II)	32
2.5.3 Polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1	32
2.6 Sistema ABO e predisposição à trombose venosa	33
2.6.1 Grupo Sanguíneo ABO	33
2.6.2 Sistema ABO, FVIII, FvW e trombose venosa	36
2.7 TH e risco de trombose venosa	38
2.8 TH, apolipoproteínas, perfil lipídico e doença arterial coronariana	42
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Casuística	50
4.1.1 Seleção das mulheres participantes do estudo	50
4.1.2 Critérios de exclusão	51
4.2 Material	51
4.2.1 Amostra biológica	51
4.3 Métodos	52
4.3.1 Extração de DNA	52
4.3.2 Investigação das mutações nos genes do fator V (FVL: G1691A), da protrombina (G20210A) e polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1	52
4.3.3 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO	55
4.3.4 Investigação dos polimorfismos do Sistema ABO	56
4.3.5 Avaliação do perfil hemostático	59
4.3.5.1 Determinação do dímero D (D-Di)	59
4.3.5.2 Determinação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)	60
4.3.5.3 Determinação do fator VIII	60
4.3.5.4 Determinação do fator von Willebrand (FvW)	60
4.3.6 Avaliação do perfil lipídico	61

4.3.6.1 Determinação do colesterol total (CT)	61
4.3.6.2 Determinação de HDL colesterol (HDLc)	61
4.3.6.3 Determinação de Triglicérides (TG)	62
4.3.6.4 Estimativa de LDL Colesterol (LDLc)	62
4.3.6.5 Apolipoproteína A-I (Apo A-I)	62
4.3.6.6 Apolipoproteína B (Apo B)	62
4.4 Análise estatística	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Caracterização das participantes do estudo	65
5.2 Investigação da presença das mutações nos genes do Fator V (FVL), da protrombina (G20210A) e do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1	66
5.3 Fenotipagem e genotipagem dos polimorfismos do sistema ABO	69
5.4 Avaliação dos marcadores de hipercoagulabilidade	71
5.5 Avaliação do grupo sanguíneo ABO e sua correlação com os níveis de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1	74
5.6 Correlação do polimorfismo -675 4G/5G no gene do PAI-1 com os níveis plasmáticos de PAI-1	80
5.7 Avaliação do perfil lipídico e das apolipoproteínas A-1 e B	83
6 DISCUSSÃO	88
6.1 Caracterização das participantes do estudo	89
6.2 Avaliação dos marcadores de hipercoagulabilidade	90
6.3 Perfil lipídico e apolipoproteínas	102
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICE 1 – Ficha clínica	122
APÊNDICE 2 – Consentimento livre e esclarecido	124
APÊNDICE 3 – Aprovação do Comitê de Ética	125
ANEXO 1 - Valores de referência dos marcadores do perfil hemostático.	126
ANEXO 2 - Valores de referência do perfil lipídico e das apolipoproteínas.	126

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A terapia hormonal (TH) vem sendo empregada em todo o mundo no tratamento dos sintomas da menopausa. Vários estudos relatam que o uso de TRH oral aumenta o risco de tromboembolismo venoso, sendo o risco maior no primeiro ano de uso da terapia. Embora em muitos estudos os efeitos da TH sobre os mecanismos da coagulação e fibrinólise tenham sido avaliados, relativamente poucos investigaram simultaneamente a contribuição dos fatores genéticos, principalmente em nossa população. Tem sido descrito que a TH afeta muitos parâmetros biológicos, incluindo aumento do fator VII e aumento da atividade fibrinolítica do plasminogênio devido à diminuição dos níveis do inibidor do ativado do plasminogênio-1 (PAI-1). Entretanto, os resultados que descrevem esses efeitos não são consistentes entre os estudos (KOH *et al.*, 1999a; TEED *et al.*, 2000; DOUKETIS *et al.*, 2000; ROSENDAAL *et al.*, 2001). Portanto, não se encontra completamente esclarecido como a TH ou a sua interação com fatores de risco genéticos ou adquiridos, que podem afetar a ativação da coagulação, a fibrinólise e, conseqüentemente, o risco de trombose venosa.

Em estudos prévios, conduzidos pelo grupo de pesquisa em Hipercoagulabilidade da Faculdade de Farmácia da UFMG, verificou-se que não houve diferença significativa nos níveis de homocisteína em mulheres usuárias de TH oral ou transdérmica, independente da presença da mutação C677T no gene da *metileno-tetra-hidrofolato-redutase* (MTHFR) (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Os dados obtidos entre as em mulheres usuárias de TH por via oral, como aumento significativo nos níveis dos marcadores de geração de trombina, como o dímero D (D-Di) e o fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), e redução dos níveis de PAI-1 sugerem que a ativação da cascata da coagulação é equilibrada pelo aumento da atividade do sistema fibrinolítico durante a TH oral, prevenindo o episódio trombótico. Além disso, o uso de TH pode elevar marcadores de hipercoagulabilidade em algumas mulheres portadoras de fatores de risco conhecidos ou não que, provavelmente sinergem com a TRH (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Diferentes estudos têm demonstrado a correlação do sistema ABO e trombose venosa, indicando que indivíduos dos grupos sanguíneos A, B ou AB apresentam maior risco ao evento trombótico que indivíduos do grupo O (SCHLEEF *et al.*, 2004; LARSEN *et al.*, 2005; MORELLI *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2009). Os grupos sanguíneos não-O estão associados a níveis plasmáticos mais elevados de

fator VIII (FVIII) e fator von Willebrand (FvW) que o grupo sanguíneo O, o que predispõe os primeiros ao maior risco de desenvolver trombose venosa (O'DONNELL *et al.*, 1997; VAN HYLCKAMA VLIET *et al.*, 2000; KRAAIJENHAGEN *et al.*, 2000; SOUSA *et al.*, 2007). No entanto, apenas um estudo foi encontrado na literatura, até o momento, correlacionando especificamente o uso de TH, grupo sanguíneo ABO e o risco de desenvolver trombose em mulheres europeias participantes do estudo ESTHER (CANONICO *et al.*, 2008a). Considerando que a trombose é uma doença de caráter multifatorial e que os fatores genéticos e adquiridos associados a esta podem variar em diferentes populações, seria importante conduzir estudos adicionais em mulheres da população brasileira que se encontram sob TH.

É possível, portanto, que as alterações nos níveis de FVIII, de marcadores de hipercoagulabilidade e da fibrinólise, frequentemente observadas e relatadas na literatura em usuárias de TH, possam ser influenciadas pelos grupos sanguíneos do sistema ABO. Dessa forma, foi proposto como objetivo do presente estudo correlacionar, em mulheres em uso de TH oral e do grupo controle, os grupos sanguíneos do sistema ABO com os níveis plasmáticos de FVIII e FvW, D-Di e PAI-1 e ainda este último com o polimorfismo -675 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1*.

Diante do exposto, é nossa intenção ampliar o estudo anterior visando uma melhor caracterização das alterações hemostáticas em um maior número de mulheres em uso de TH (apenas um único esquema) em função do grupo sanguíneo e outras variáveis, buscando consolidar achados anteriores e agregar novas informações, o que vem conferir importância à presente investigação. Considerando os resultados preliminares sobre o assunto obtidos por nosso grupo de estudos (GUIMARÃES *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009), o que nos possibilitou importante fundamentação teórica e prática, a relevância do tema e as controvérsias e lacunas existentes na literatura, acreditamos que este estudo se justifica plenamente podendo gerar conhecimentos adequados à nossa realidade, o que poderá implicar em maior confiança e segurança para os médicos ginecologistas quando da prescrição da TH em nosso meio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CLIMATÉRIO

O climatério é definido como o período que precede e sucede o término da vida reprodutiva da mulher, marcado por alterações somáticas e psíquicas (HOUAISS, 2001; I DIRETRZ, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996), a menopausa é o período na vida da mulher onde sua capacidade reprodutora termina em consequência da perda definitiva da atividade folicular ovariana ocorrendo, na maioria dos países industrializados, em torno dos 51 anos de idade (45-55).

Os principais sintomas e consequências do climatério na fase precoce são: alterações menstruais, fogachos, sudorese, insônia, alterações psíquicas; na perimenopausa: atrofia vaginal, atrofia da pele, disfunção sexual, urgência/incontinência; e na fase tardia: osteoporose, doença cardiovascular e Alzheimer. Na prática, sua manifestação é menos ordenada e ocorre uma intercessão entre as manifestações que podem ocorrer (THORNEYCROFT, 1995, citado por FERNANDES *et al.*, 1999; SOBRAC, 2003a).

2.2 TERAPIA HORMONAL (TH)

As primeiras modalidades de terapia hormonal (TH) consistiam na administração de estrogênios somente. Devido à evidência de que esse tipo de terapia aumentava os riscos de câncer de endométrio, esta modalidade de tratamento foi restringida, atualmente, às pacientes histerectomizadas. Em mulheres não histerectomizadas, a modalidade mais frequentemente empregada é a TH oral, com um estrogênio associado a um progestogênio. Alternativamente, a TH pode ser administrada pelas vias transdérmica, percutânea (géis), subcutânea e, mais raramente, nasal (FERNANDES *et al.*, 1999; ROSENDAAL *et al.*, 2001; SOBRAC, 2003a).

Devido aos diversos hormônios e vias disponíveis, vários esquemas terapêuticos podem ser utilizados. Não existe um esquema ideal, e a terapia deve ser individualizada e alterada conforme a necessidade ou mesmo a aceitabilidade de cada composto ou via. Os principais esquemas utilizados são: apenas estrogênio (terapia estrogênica - TE), estrogênio contínuo ou cíclico associado a um

progestogênio cíclico, estrogênio associado a um progestogênio de forma contínua, ou esquemas alternativos. No esquema cíclico, o progestogênio é adicionado nos últimos 12 ou 14 dias do ciclo. O padrão de sangramento da paciente depende do esquema utilizado, variando entre amenorréia, observada na maioria dos esquemas combinados e contínuos, e sangramentos cíclicos programados, o que ocorre nos esquemas sequenciais (FERNANDES *et al.*, 1999; MARINHO *et al.*, 2000; SOBRAC, 2003a; I DIRETRZ, 2008).

A dose utilizada, a via de administração, o uso isolado ou associado e o tempo de duração do tratamento são fatores que influenciam os efeitos adversos (ERBERICH *et al.*, 2001). Mas há evidências de que a TH exerce efeitos benéficos importantes sobre a mulher climatérica, como a prevenção e/ou a eliminação da “síndrome climatérica” e demais manifestações conseqüentes ao hipoestrogenismo (pele, cérebro, estado anímico, sexualidade), assim como a prevenção e o tratamento da osteoporose com a conseqüente redução da incidência de fraturas e a melhora da qualidade de vida, entre outros (PINHO, 2003; SAUERBRONN, 2003; SOBRAC, 2003b; I DIRETRIZ, 2008).

Os principais riscos associados à TH, além da trombose venosa, são o câncer de endométrio e o câncer de mama. Os riscos de hiperplasia e câncer endometriais, com o uso isolado de estrogênios, estão bem documentados na literatura. Quando se adiciona progestogênios (10-12 dias/mês ou em uso contínuo) obtêm-se adequada proteção endometrial (MARINHO, 2000; PINHO, 2003; SOBRAC, 2003a).

A relação entre câncer de mama e TH é ainda assunto controverso, havendo evidências na literatura de que o risco para essa neoplasia aumenta quando o tempo de uso ultrapassa os dez anos (HUMPHRIES & GILL, 2003; PINHO, 2003; SOBRAC, 2003a; SOBRAC, 2003b). O estudo WHI (Women`S Health Initiative, 2002) terminou prematuramente devido ao aumento da incidência de câncer de mama nas usuárias de TH em esquema combinado contínuo (risco relativo de 1,26). O USPSTF (US PREVENTIVE SERVICE TASK FORCE, 2002) conclui, em uma revisão da literatura, que há evidências de que a TH aumenta a incidência de câncer de mama, mas que estes efeitos sobre a mortalidade ainda não estão claros.

2.3. HEMOSTASIA

A hemostasia consiste em um processo fisiológico, no qual uma série de substâncias procoagulantes e anticoagulantes se inter-relacionam prevenindo o surgimento de hemorragia e/ou trombose. O processo hemostático depende da interação complexa e harmônica entre o endotélio vascular, e os componentes intravasculares que incluem as plaquetas, as proteínas plasmáticas da coagulação, da anticoagulação e da fibrinólise (JOBE, 1992; LOTSPEICH-STEININGER *et al.*, 1992; COLVIN, 2004).

2.3.1 Coagulação sanguínea

O complexo processo hemostático envolve a interação entre vasos, plaquetas, fatores procoagulantes e anticoagulantes e, ainda, sistema fibrinolítico. À luz do conhecimento atual, a ativação do mecanismo hemostático deve ser entendida sob dois ângulos: ativação *in vivo* e *in vitro* (HOFFMAN & MONROE, 2006).

O modelo clássico da cascata da coagulação apresenta uma série de reações seqüenciais envolvendo plaquetas, os fatores de coagulação, os cofatores, e os anticoagulantes naturais (**Figura 1**). De acordo com este modelo, pode ser produzida uma grande quantidade de trombina, por meio da ativação da via extrínseca (dependente de fator tissular) e/ou intrínseca (dependente do contato com uma superfície carregada negativamente). Entretanto, tal modelo explica apenas as interações que ocorrem entre fatores da coagulação *in vitro*, suportando avaliações laboratoriais, porém não explica satisfatoriamente os mecanismos hemostáticos fisiopatológicos *in vivo*. Além do mais, o modelo não explica por que certos pacientes apresentam uma tendência hemorrágica, bem como não fornece informação segura sobre quais pacientes vão sangrar (HOFFMAN, 2003).

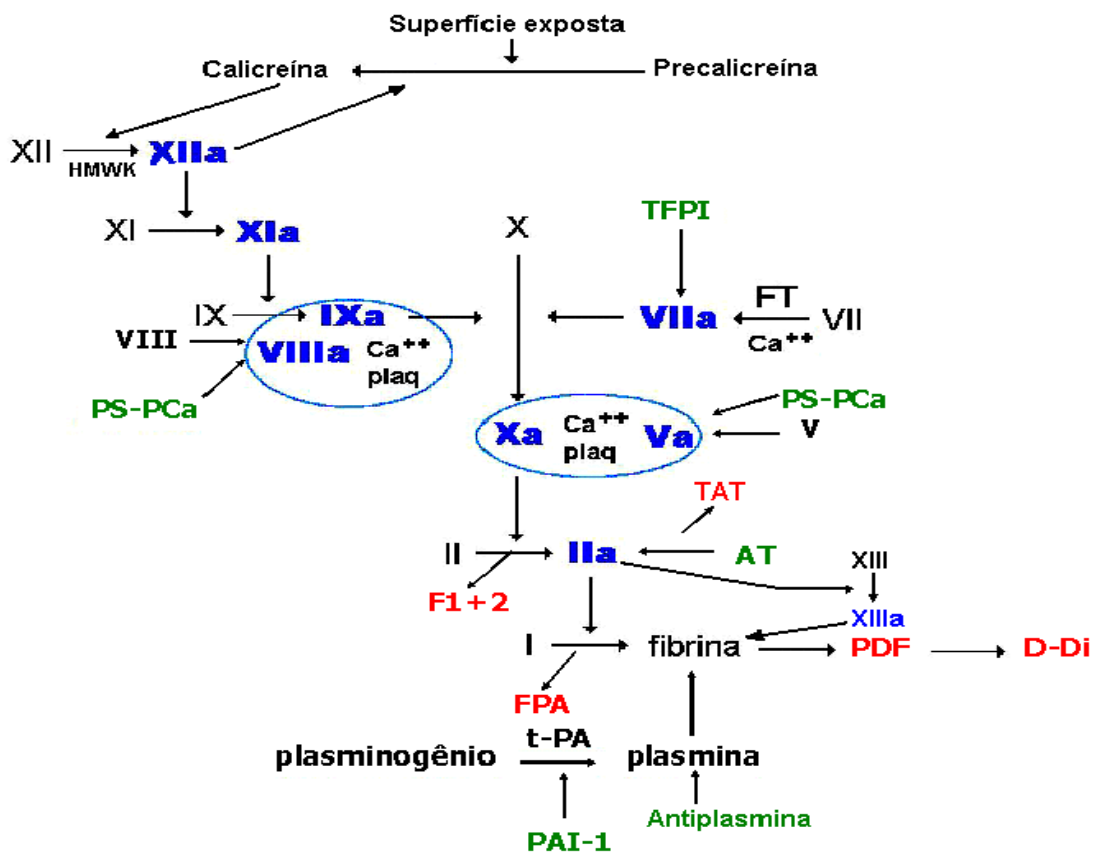


Figura 1- Representação esquemática da cascata de coagulação (*in vitro*) e fibrinólise. Os inibidores da cascata de coagulação e da fibrinólise estão representados em cor verde: Inibidor do fator tissular (TFPI), proteína C ativada (PCa), proteína S (PS), antitrombina (AT), inibidor do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e antiplasmina. Os marcadores de hipercoagulabilidade estão representados em vermelho: fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT), fibrinopeptídeo A (FPA), produtos de degradação da fibrina (PDF) e D-dímero (D-Di). Os fatores da coagulação ativados estão representados em cor azul: XIIa, XIa, IXa, VIIIa, VIIa, Xa, Va, IIa e XIIIa.

Em uma tentativa de explorar o complexo sistema hemostático sob outro ângulo, foram desenvolvidos modelos conceituais e experimentais que permitiram um maior entendimento de como o sistema hemostático realmente funciona *in vivo* em condições normais. Assim foi desenvolvido um novo modelo hemostático baseado em interações dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas, cujo entendimento vem explicar muitas das questões que permaneciam obscuras pela tradicional teoria da cascata da coagulação (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2006).

O modelo atual (**Figura 2**), baseado em superfícies celulares, estabelece que o processo de coagulação ocorre em uma série de três etapas simultâneas que acontecem sobre diferentes superfícies celulares. A primeira etapa (fase de iniciação) ocorre sobre uma superfície celular que expõe fator tissular. Na segunda

etapa (fase de amplificação), plaquetas e cofatores são ativados para produzir trombina em larga escala. Finalmente, a terceira etapa (fase de propagação) ocorre sobre a superfície de plaquetas e resulta na produção de grande quantidade de trombina, resultando também em grande quantidade de fibrina (HOFFMAN, 2003).

A **Figura 2** mostra o modelo atual da hemostasia *in vivo*, no qual fator VII é ativado por se ligar ao fator tissular exposto em uma superfície celular (células endoteliais e monócitos principalmente), cujo complexo (FT-FVIIa) é capaz de ativar o fator X (Xa), o qual em presença de fator Va, é capaz de transformar protrombina em quantidades pequenas de trombina. O complexo FT-FVIIa ativa também o fator IX (IXa) (fase de iniciação). Por outro lado, na fase de amplificação, a trombina formada vai exercer suas várias funções que incluem ativação plaquetária, clivagem do complexo FvW-FVIII resultando na liberação de fator von Willebrand e de fator VIII livres, ativação dos cofatores V em Va e VIII em VIIIa, além da ativação do fator XI em XIa. Na fase de propagação, IXa combina com seu cofator FVIIIa sobre a superfície de plaquetas ativadas. Uma vez formado, o complexo FIXa/FVIIIa ativa o FX em FXa, que imediatamente combina com seu cofator Va. O complexo FXa/FVa então converte grandes quantidades de protrombina em trombina, resultando na clivagem de fibrinogênio para monômeros de fibrina, que se polimerizam em presença do FXIIIa (ativado por trombina), resultando em um coágulo estável de fibrina (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2006).

Este novo modelo da hemostasia, baseado em superfícies celulares, permite um melhor entendimento sobre o processo *in vivo*, ao mesmo tempo em que apresenta uma maior consistência com observações clínicas de vários distúrbios da coagulação (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2006).

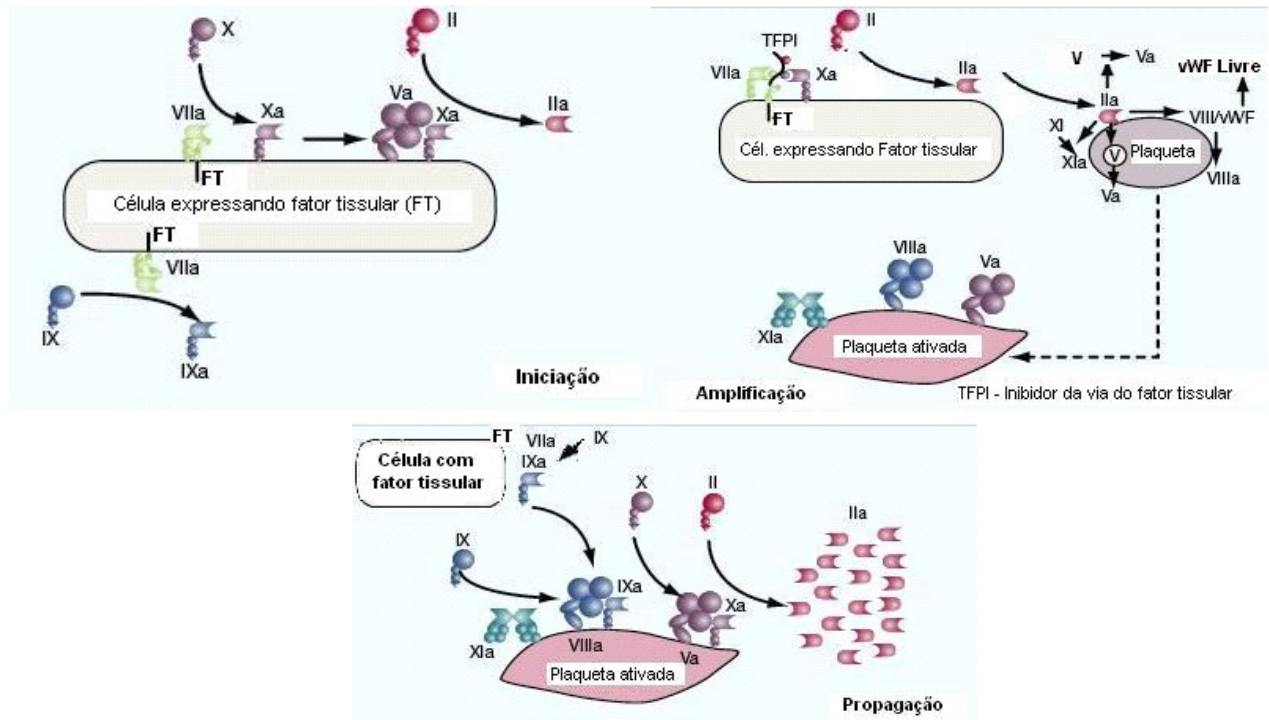


Figura 2- Modelo atual da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares (in vivo) adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação.

2.3.2 Anticoagulantes Naturais

Com o objetivo de controlar a formação do coágulo, substâncias com ação anticoagulante tornam-se ativadas. Dessa forma, os anticoagulantes naturais permitem que a coagulação se processe localmente, em resposta à lesão endotelial e evitam que se torne um processo sistêmico e potencialmente perigoso. Os três anticoagulantes naturais mais importantes são a antitrombina (AT), a proteína C (PC) e a proteína S (PS), mas outros, como o co-fator II da heparina (HCII) e o inibidor da via do fator tissular (TFPI) também têm sua atividade anticoagulante reconhecida (HANDIN *et al.*, 1995).

A antitrombina (AT) é o inibidor primário da trombina, mas também inibe outras serinoproteases como Xa, IXa, XIa e XIIa (BOMBELI *et al.*, 1997). A AT neutraliza a atividade da trombina formando um complexo estequiométrico (1:1), irreversível, denominado trombina-antitrombina (TAT), o qual não tem atividade proteolítica. A molécula de sulfato de heparan, presente na superfície da célula endotelial íntegra, catalisa a reação de inibição. Dessa forma, a AT elimina a atividade enzimática pró-coagulante excessiva ou indesejável (FRANCO, 2001a). O

complexo TAT (trombina-antitrombina) é considerado um marcador de ativação da coagulação, pois reflete o processo de geração de trombina (HANDIN *et al.*, 1995).

A PC atua como anticoagulante através da regulação da atividade dos fatores Va e VIIIa (HANDIN *et al.*, 1995; SCAZZIOTA *et al.*, 1996; DAHLBÄCK, 2000). Essa via anticoagulante inicia quando a trombina se liga à trombomodulina (TM) presente na superfície da célula endotelial. Este complexo ativa a PC quando a mesma se encontra ligada ao receptor endotelial de proteína C (EPCR) (ESMON, 2000). Quando a PC ativada (PCa) dissocia do EPCR, esta interage com o co-fator PS que catalisa a inativação dos co-fatores Va e VIIIa (ESMON, 2000).

O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) apresenta dois domínios, um que inibe o complexo VIIa-FT-Xa e um segundo que inibe Xa. O TFPI atua na regulação permanente da expressão do FT na superfície celular em monócitos e fibroblastos. Devido à ativação do TFPI, o complexo fator VIIa-FT tem vida curta (SCAZZIOTA *et al.*, 1996; BOMBELLI *et al.*, 1997; LORENZI *et al.*, 2003).

2.3.3 Fibrinólise

Após a reconstituição da parede vascular, o coágulo formado no vaso sanguíneo é efetivamente degradado e removido pelo sistema fibrinolítico (HOFFMAN & MONROE, 2006), permitindo o restabelecimento do fluxo sanguíneo.

Os ativadores fisiológicos que promovem a ativação do plasminogênio são: o ativador do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) (HANDIN *et al.*, 1995; FRANCO, 2001a).

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, 2006). Quando a plasmina degrada o fibrinogênio (fibrinogénólise) ou a fibrina (fibrinólise), ocorre uma seqüência de reações de degradação que leva à formação de fragmentos moleculares específicos, denominados produtos de degradação da fibrina (PDF), que podem ser detectados no plasma, e sua concentração indicará a magnitude da fibrinólise ou da fibrinogénólise (SCAZZIOTA *et al.*, 1996). O menor fragmento formado pela degradação da fibrina pela plasmina é o dímero D (D-Di) (JOBÉ, 1992).

O D-Di representa um indicador sensível da formação e degradação de fibrina sendo, portanto, um marcador de ativação da coagulação e da fibrinólise. A determinação dos níveis de D-Di é comumente utilizada para medir alterações fibrinolíticas secundárias e diferenciá-las da fibrinólise primária. A dosagem de D-Di tem se mostrado útil para auxiliar no diagnóstico de trombose venosa (GRAAF *et al.*, 2000; MICHIELS *et al.*, 2005; MICHIELS *et al.*, 2006)

Da mesma forma que as proteínas da coagulação, as proteínas do sistema fibrinolítico são submetidas à regulação por antiproteases. Os principais inibidores da fibrinólise são o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), a α_2 -antiplasmina, o TAFI (inibidor da fibrinólise ativado por trombina), a α_2 -macroglobulina e a α_1 -antitripsina.

O PAI-1 é produzido principalmente pelas células endoteliais e plaquetas, sendo capaz de inibir o t-PA (HANDIN *et al.*, 1995; SCAZZIOTA *et al.*, 1996). Em condições normais, deve haver um equilíbrio entre a produção de t-PA e de PAI-1. Quando esse equilíbrio se altera, podem aparecer fenômenos tromboembólicos. Altos níveis de PAI-1 estão relacionados com estados trombóticos como o infarto agudo do miocárdio e trombose venosa profunda. Pode-se ter um comprometimento do sistema fibrinolítico em situações nas quais observa-se presença de níveis aumentados de PAI-1. Tal condição favorece a permanência do coágulo de fibrina e conseqüentemente o desenvolvimento de trombos (HANDIN *et al.*, 1995).

O TAFI é uma pró-enzima plasmática que atua como um potente inibidor da fibrinólise. É ativado pela trombina, tripsina e plasmina, e na sua forma ativada é capaz de inibir a fibrinólise por remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo (FRANCO *et al.*, 2001a; COLVIN, 2004).

O mecanismo de ativação e inibição do sistema fibrinolítico encontra-se representado na **Figura 1**.

2.4 TROMBOSE VENOSA

O desenvolvimento de trombose é resultante da hiperativação do mecanismo de coagulação e/ou hipoativação dos mecanismos anticoagulantes naturais ou da fibrinólise, com a subsequente formação de um trombo intravascular venoso. A

trombose venosa constitui um problema clínico de considerável gravidade, com uma incidência aproximada de um a três casos a cada 10000 pessoas, sendo responsável, nos Estados Unidos, por 50.000 óbitos por ano (ROSENDAAL *et al.*, 2001; FRANCO, 2001b).

As apresentações clínicas mais comuns do evento trombótico são o tromboembolismo venoso (TEV) e a trombose venosa profunda (TVP) de membros inferiores e o tromboembolismo pulmonar (TEP), embora mais raramente o episódio trombótico possa ocorrer em outros sítios. O TEV é reconhecido como uma doença multifatorial e multigênica, com interações de fatores genéticos e ambientais. Pacientes portadores de fatores genéticos ou adquiridos possuem predisposição para a ocorrência de trombose venosa, que tende a ser recorrente e acometer predominantemente indivíduos relativamente jovens e, em até um terço dos casos, pode ser detectada uma história familiar para trombose venosa (FRANCO, 2001b).

Dentre os fatores adquiridos que contribuem para a trombose venosa podemos citar a idade, os anticoncepcionais orais e a terapia de reposição hormonal, hiperhomocisteinemia, gravidez e puerpério, a imobilização de membros ou de parte do corpo, os traumas locais, câncer, a presença de anticorpos antifosfolípidos, as cirurgias de grande porte, doenças malignas, infecções, síndrome nefrótica, história pregressa de tromboembolismo venoso (BERTINA, 2001; ROSENDAAL *et al.*, 2001; ROSENDAAL *et al.*, 2002a). Um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da trombose venosa parece ser a estase venosa, sendo freqüente nas veias dos membros inferiores (ROSENDAAL *et al.*, 2001; ROSENDAAL *et al.*, 2002a; LORENZI *et al.*, 2003).

A combinação das deficiências de AT, PC e PS, a mutação G20210A no gene da protrombina e o FVL, quando associados a fatores de risco adquiridos tais como gestação, puerpério, uso de contraceptivos orais ou TRH, pode resultar em um efeito interativo e, conseqüentemente, em risco aumentado para trombose (FRANCO, 2001b).

2.5 PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA E TROMBOSE VENOSA

Os principais fatores genéticos relacionados à trombofilia hereditária compreendem as deficiências de antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS), além da resistência à proteína C ativada (PCA) resultante principalmente da

mutação no gene do fator V (G1691A, Fator V Leiden), mutação no gene da protrombina G20210A e hiperhomocisteinemia, que pode ser resultante da mutação C677T no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (POORT *et al.*, 1996; ROSENDAAL *et al.*, 2001; FRANCO, 2001b; BAUER, 2003).

Outros marcadores estudados estão sendo associados ao aumento do risco de trombose venosa: aumento dos níveis plasmáticos de TAFI, além de mutações em vários genes envolvidos no processo hemostático tais como TFPI, t-PA, PAI -1 e EPCR (LANE & GRANT, 2000; BERTINA, 2001; HERRINGTON & KLEIN, 2001). Mais recentemente, o desenvolvimento de trombose venosa tem sido também relacionado com polimorfismos do sistema ABO (SCHLEEF *et al.*, 2004; LARSEN *et al.*, 2005; MORELLI *et al.*, 2005).

Em estudos conduzidos com pacientes jovens do estado de Minas Gerais, observou-se que o FVL é um importante fator de risco para o desenvolvimento de trombose arterial (DE PAULA SABINO *et al.*, 2006), como também de trombose venosa (DE PAULA SABINO *et al.*, 2007). Observou-se ainda que as mulheres constituíam a maior parte dos pacientes que apresentaram trombose venosa (73,8%), e que o uso de estrógeno (28,6%) foi o fator de risco mais freqüente entre estas. Entre estas mulheres (n = 57), o FVL foi detectado em 5 (8,8%), a mutação 20210A em 4 (7,0%) e a mutação C677T em 24 (42,1%), em heterozigose e em 3, em homozigose (5,3%). Estes dados permitiram concluir que 66,6% das mulheres em uso de estrógeno apresentavam pelo menos um fator de risco genético para trombose (DE PAULA SABINO *et al.*, 2007).

2.5.1 Fator V Leiden (FVL)

O *fator V Leiden (FVL)* é resultante de uma mutação pontual (G1691A) no gene do *fator V*. A transição de uma guanina para uma adenina no nucleotídeo 1691, no exon 10, acarreta a troca de uma arginina (Arg) por uma glutamina na posição 506 (BERTINA *et al.*, 1994). O FVL é ativado corretamente pelo fator Xa, entretanto, não é inativado corretamente pela PCa, resultando num quadro de hipercoagulabilidade (BERTINA, 1997). O FVL aumenta o risco para trombose venosa em aproximadamente 3 a 8 vezes quando presente em heterozigose, e em 50 a 100 vezes quando em homozigose (ROSENDAAL *et al.*, 1995; LANE & GRANT, 2000; FRANCO, 2001b; HERRINGTON & KLEIN, 2001).

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%.

2.5.2 Mutação no gene da protrombina (Fator II)

A ação da protrombina é central no processo de trombose e hemostasia, pois possui ambas as atividades pro e anticoagulante, sendo extremamente importante no estágio final da coagulação do sangue, na formação do coágulo de fibrina (FURIE & FURIE, 1988). A mutação pontual, 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, podendo ocorrer aumento da transcrição do gene, com maior estabilidade do RNA mensageiro, ou uma tradução mais eficiente (POORT *et al.*, 1996; LANE & GRANT, 2000; BERTINA, 2001), resultando em elevação dos níveis plasmáticos de protrombina, da ordem de 30% (hiperprotrombinemia), formação aumentada de trombina e conseqüente coagulação exacerbada com risco aumentado para trombose venosa (POORT *et al.*, 1996).

O risco relativo de desenvolver trombose em portadores da mutação G20210A no gene da *PT* 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 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%.

2.5.3 Polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1

O inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), um regulador da atividade do sistema fibrinolítico, pode estar relacionado com a patogênese da trombose venosa e da doença coronariana.

A inserção ou deleção de um nucleotídeo na região promotora do gene do *PAI-1* (-675 4G/5G) foi identificada a 675 pb antes do início da transcrição. Este polimorfismo produz dois alelos contendo quatro ou cinco seqüências de guaninas (G). O polimorfismo 4G/5G tem sido relatado em pacientes jovens com infarto do

miocárdio e pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Os indivíduos homozigotos para a deleção (4G/4G) apresentam níveis plasmáticos de PAI-1 elevados e os portadores da adição (5G/5G) níveis reduzidos, enquanto indivíduos heterozigotos (4G/5G) possuem níveis intermediários (MANSFIELD *et al.*, 1995). Portanto, a genotipagem deste polimorfismo pode ser relevante para avaliar o risco de trombose ou doença coronariana (NAUCK *et al.*, 1999).

Embora vários estudos tenham mostrado associação entre a presença do polimorfismo 4G/5G e infarto do miocárdio, poucos têm mostrado sua associação com trombose venosa e ainda com o uso de TH, como ressaltado por Morange *et al.* (2000).

2.6 SISTEMA ABO E PREDISPOSIÇÃO À TROMBOSE VENOSA

Estudos recentes têm demonstrado a correlação do sistema ABO e trombose venosa, indicando que indivíduos dos grupos sanguíneos A, B ou AB apresentam maior risco ao evento trombótico que indivíduos do grupo O (SCHLEEF *et al.*, 2004; LARSEN *et al.*, 2005; MORELLI *et al.*, 2005).

2.6.1 Grupo Sanguíneo ABO

O sistema de grupo sanguíneo ABO, descoberto por Karl Landsteiner no início do século XX, 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 nas secreções que são biossintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no gene *ABO*. O locus *ABO* estende-se por uma região 18-20 kilobases (kb), na posição 9q34.1-9q34.2, consistindo de 7 exons (cujo tamanho varia entre 26-688 pares de base) e 6 introns, sendo a maior parte das enzimas codificadas pelos exons 6 e 7 que constituem 77% do gene *ABO*. Assim, o gene *ABO* tem no total 19514 pares de base (pb), contando desde o códon de iniciação até o terminal (BATISSOCO *et al.*, 2003; OLSSON *et al.*, 2001; ZAGO *et al.*, 2001). O gene da glicosiltransferase responsável pelo sistema ABO está representado na **Figura 3**.

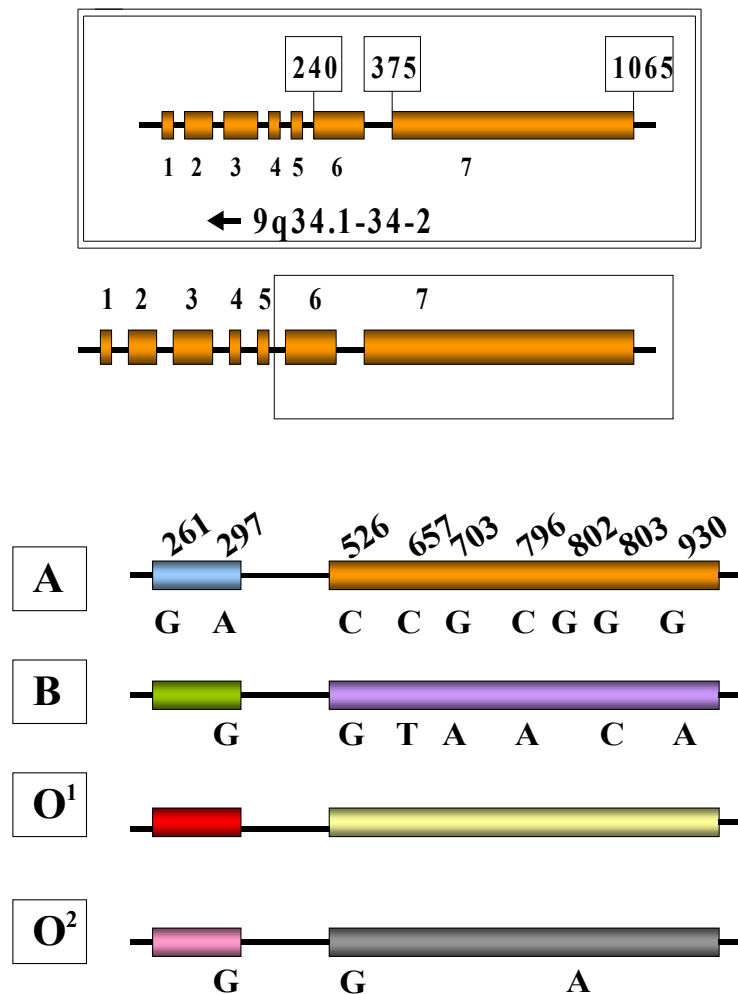


Figura 3 - Estrutura do gene da glicosiltransferase (ABO) e esquema dos genes dos grupos sanguíneos.

As glicosiltransferases incorporam moléculas de açúcar sobre um substrato básico. Este último é o paraglobosídeo, que é um tetrassacarídeo cujo resíduo terminal é uma galactose. Dependendo do tipo de ligação da galactose à estrutura básica, ligação $\beta(1-3)$ ou $\beta(1-4)$, obtemos o paraglobosídeo do tipo 1 e do tipo 2, respectivamente. Paraglobosídeos do tipo 1 são encontrados nas secreções, enquanto os paraglobosídeos do tipo 2 estão presentes nas hemácias.

A adição de uma fucose através de ligação $\alpha(1-2)$ à galactose terminal do paraglobosídeo tipo 2 produz o antígeno H. Esta reação é catalisada por uma α -2-fucosiltransferase codificada pelo gene H localizado no locus FUT 1 do cromossomo 19. O alelo H apresenta alta frequência populacional, o que indica que grande parte das pessoas apresentam o antígeno H nas suas hemáceas (ZAGO *et al.*, 2001).

Alguns estudos demonstraram que a proteína transferase apresenta três domínios: um N-terminal, transmembrana hidrofóbica e um C-terminal. A ausência dos domínios N-terminal e da transmembrana hidrofóbica demonstrou que provavelmente, a porção C-terminal da enzima é a responsável pela sua atividade catalítica, sendo os exons 6 e 7, responsáveis pela tradução do domínio C-terminal da enzima glicosiltransferase (BATISSOCO *et al.*, 2003).

Os genes dos grupos sanguíneos A e B são muito semelhantes, diferindo apenas em sete bases dos exons 6 e 7 (A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A). Destas sete diferenças, apenas quatro (526, 703, 796 e 803) promovem diferenças na estrutura protéica, de modo que as glicosiltransferases A e B apresentam entre si quatro aminoácidos diferentes no domínio catalítico. Sendo assim, ocorre diferença nas suas especificidades, pois a glicosiltransferase A adiciona um resíduo de N-acetilgalactosamina à substância H, transformando-a em antígeno A, enquanto a glicosiltransferase B adiciona um resíduo de galactose, transformando-a em antígeno B. O grupo sanguíneo O origina-se pela ausência das enzimas glicosiltransferases A ou B, porque o gene *ABO* está silencioso devido a variadas alterações genéticas (BATISSOCO *et al.*, 2003; ZAGO *et al.*, 2001). A **Figura 4** ilustra a diferença estrutural entre os antígenos A e B.

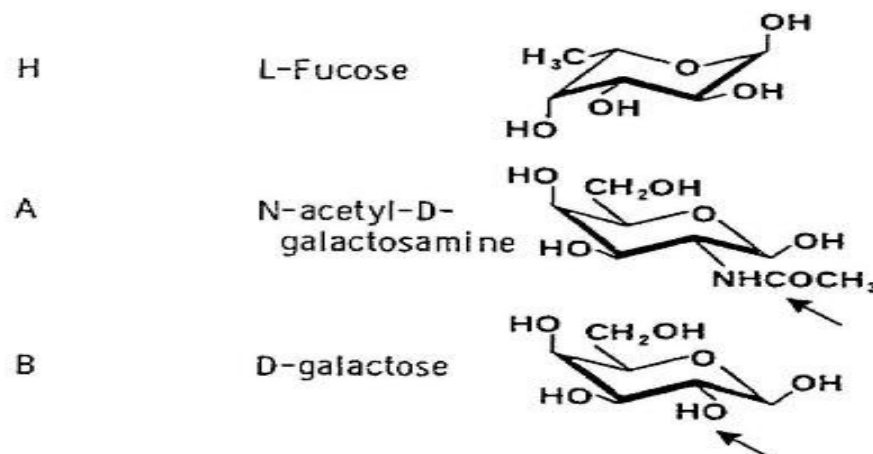


Figura 4 - Açúcares imunodominantes eritrocitários A, B e H, antígenos do sistema ABO. As setas indicam as posições que diferem a estrutura química da n-acetilgalactosamina da galactose (Watkins, 2001), o antígeno H consiste no açúcar L-fucose.

Dados da literatura mostram que o locus ABO apresenta uma ampla variação em diferentes populações. O alelo B, por exemplo, é comum entre asiáticos, mas ausentes nas populações americanas nativas (NUSSBAUM *et al.*, 2002). É importante ressaltar que a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultante de cinco séculos de miscigenação, o que torna complicado definir a origem étnica dos indivíduos e estabelecer a frequência de determinados alelos, como os do sistema ABO. Variações de frequências alélicas podem ocorrer de região para região (PARRA *et al.*, 2003).

Numa amostragem de doadores da Fundação Hemominas, 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 (estimativa para população geral de Minas Gerais).

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

(Fundação Hemominas, 2006)

2.6.2 Sistema ABO, FVIII, FvW e trombose venosa

Os grupos sanguíneos não-O estão associados a níveis plasmáticos mais elevados de FVIII 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 FVIII, como diabetes mellitus, elevadas concentrações plasmáticas de insulina, fibrinogênio, triglicérides, uso de contraceptivos orais e TRH. Variações no gene do FVIII aumentam sua expressão, enquanto variações no gene do FvW aumentam sua afinidade pelo FVIII. A diminuição (genética ou adquirida) no clearance do FVIII e FvW e variações em outros genes envolvidos na biossíntese de FvW também constituem possíveis determinantes de níveis plasmáticos elevados de FVIII

(CONLAN *et al.*, 1993; CUSHMAN, *et al.*, 1996; FOLSOM, *et al.*, 1997). Estudos demonstraram que 66% das variações nos níveis plasmáticos do FvW foram resultantes de alterações genéticas e que 30% dessas alterações genéticas estavam relacionadas ao efeito dos grupos sanguíneos ABO (KAMPHUISEN *et al.*, 2001; SCHLEEF *et al.*, 2004).

Grande parte dos efeitos do grupo sanguíneo sobre os níveis plasmáticos de FVIII é mediada pelo FvW, tendo sido identificadas neste, oligossacarídeos correspondentes aos antígenos do grupo A, B e O, que podem afetar o “clearance” de FvW e do complexo FvW/FVIII (O’DONNELL *et al.*, 1997; VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000; KRAAIJENHAGEN *et al.*, 2000).

O FvW é uma glicoproteína multimérica que apresenta uma diversidade de estruturas oligossacarídicas, incluindo moléculas similares aos antígenos do grupo sanguíneo A, B e H (O). Os antígenos que determinam o sistema ABO são resíduos terminais encontrados nos carboidratos presentes na superfície das hemácias e nas secreções e são biossintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no gene ABO. A maior parte dessas enzimas são codificadas pelos exons 6 e 7 que constituem 77% do gene ABO (OLSSON *et al.*, 2001; COVAS & ZAGO, 2001; BATISSOCO *et al.*, 2003). Os genes A e B diferem em sete substituições de nucleotídeos localizadas nas posições 297, 526, 657, 703, 796, 803 e 930 e o gene O¹ é idêntico ao gene A, exceto pela deleção de uma base nitrogenada guanina na posição 261 do exon 6. Essas diferenças contribuem para a troca de quatro aminoácidos nas posições (176, 235, 266 e 268) das transferases A e B e, portanto, determinam suas especificidades (BATISSOCO *et al.*, 2003; COVAS & ZAGO, 2001).

As enzimas glicosiltransferases incorporam moléculas de açúcar sobre um substrato básico, o antígeno H. O gene H está localizado no locus FUT 1 do cromossomo 19. O alelo H apresenta alta frequência populacional, o que indica que grande parte das pessoas apresenta o antígeno H nas suas hemácias (ZAGO *et al.*, 2001). A glicosiltransferase A adiciona um resíduo de N-acetilgalactosamina à substância H, transformando-a em antígeno A, enquanto a glicosiltransferase B adiciona um resíduo de galactose, transformando-a em antígeno B. O grupo sanguíneo O origina-se pela ausência das enzimas glicosiltransferases A ou B, uma vez que o gene está silencioso devido à variadas alterações genéticas (COVAS & ZAGO, 2001; BATISSOCO *et al.*, 2003).

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 pacientes que nunca apresentaram 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%) foram associados com um alto risco de trombose quando comparados com genótipo OO (29.1%). Além disso, entre os 471 pacientes estudados, 92 (19.5%) apresentavam FVL comparados com 14 (3.0%) dos 471 pacientes do grupo controle. Estes pesquisadores concluíram que a combinação dos genótipos dos grupos sanguíneos não-O e FVL, comparados com genótipos do grupo O sem FVL, aumenta o risco de trombose venosa em 23 vezes.

Canonico *et al.* (2008a) observaram maior risco de TEV entre mulheres na posmenopausa pertencentes aos grupos sanguíneos não O (RR = 1,4 – 2,9). Além disso, a TRH oral, mas não transdérmica, foi associada a um aumento do risco (RR = 4,4 - 17,8) de TEV em mulheres não O, indicando uma interação entre a TRH oral e grupo sanguíneo.

Recentemente, observamos 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 de nossa população. Nesse estudo, também observamos maior prevalência de trombose venosa em mulheres que fizeram uso de estrogênio, sob a forma de anticoncepcionais ou TRH (PAIVA *et al.*, 2009).

2.7 TH E RISCO DE TROMBOSE VENOSA

No primeiro estudo sistemático dos efeitos adversos da TH (BOSTON,1974) foi encontrada uma incidência maior de trombose em mulheres que se encontravam sob TH, comparando-se com o grupo controle (14% contra 8%). Vários estudos posteriores, em que um número maior de pacientes foi avaliado e quando a TH já era amplamente utilizada, confirmaram que o risco de trombose é realmente maior entre as pacientes em uso de TH. No entanto, o risco absoluto de trombose idiopática estimado para não usuárias de TH é de 0,9 a 1,3 por 10.000 mulheres por ano, enquanto que para mulheres sob TH o risco absoluto é de cerca de 3,2 por 10.000 mulheres por ano, o que representa um aumento de cerca de dois casos em 10.000 mulheres por ano (DALY *et al.*, 1996a; DALY *et al.*,1996b; GRODSTEIN *et*

al., 1996; JICK *et al.*, 1996; PÉREZ GUTTHANN *et al.*, 1997; VARAS-LORENZO *et al.*, 1998; GRADY *et al.*, 2000).

Canonico *et al.* (2008b), em uma sistemática revisão e meta-análise de estudos anteriores que avaliaram o risco de TEV entre usuárias de TH e controles, verificaram que o risco de sofrer eventos tromboembólicos em mulheres sob TH oral é maior no primeiro ano de uso da terapia (RR= 4,0, IC: 2,9-5,7) , e após este período o risco relativo passa a ser menor (RR= 2,1, IC: 1,3-3,8; $p < 0,05$) (**Figura 5**). Resultados semelhantes foram obtidos em meta-análises anteriores (MILLER *et al.*, 2002; WU, 2005a).

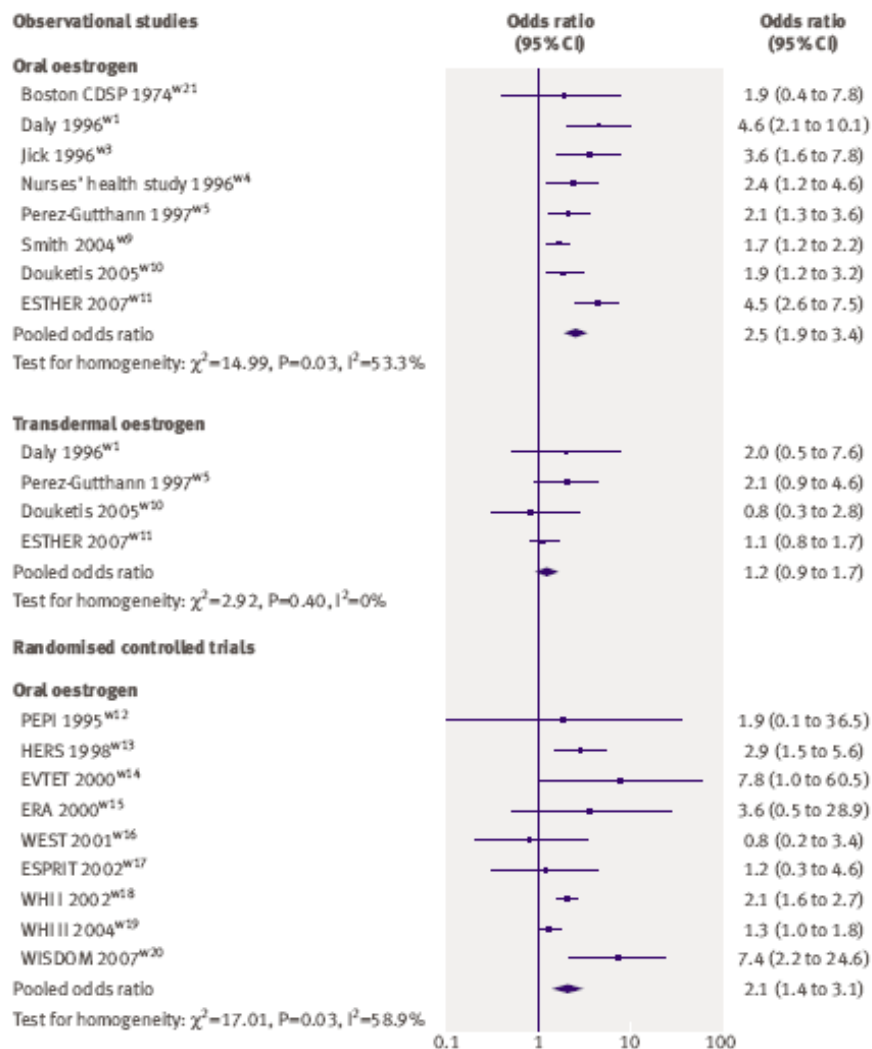


Fig 2 | Risk of first episode of venous thromboembolism by study design and route of oestrogen administration

Figura 5- Risco do primeiro evento de TEV em mulheres sob TRH, Fonte: CANONICO *et al.* (2008b).

Alguns estudos demonstraram uma relação entre dose maior de estrogênio e o aumento do risco de trombose (JICK *et al.*, 1996; GRODSTEIN *et al.*, 1996; WU, 2005a; EILERTSEN *et al.*, 2006), enquanto outros estudos não observaram esta diferença (PÉREZ GUTTHANN *et al.*, 1997; DALY *et al.*, 1996a). Vários autores demonstraram um risco relativo maior quando se utiliza estrogênios combinados com progestogênios (RR= 2,2 a 5,0), comparando-se com o uso de somente estrogênio (RR= 1,4 a 1,9) (JICK *et al.*, 1996; PÉREZ GUTTHANN *et al.*, 1997; VARAS-LORENZO *et al.*, 1998; WU, 2005a), embora Canonico *et al.* (2008b), em sua meta-análise, não tenham observado esta diferença. Cushman *et al.* (2004) relacionaram o aumento do risco de trombose em mulheres sob TH oral, participantes do estudo WHI (Women's Health Initiative), com o aumento da idade, sobrepeso e presença da mutação *FVL*.

Os mecanismos pelos quais a TH aumenta o risco de tromboembolismo venoso ainda não estão claros. A maioria dos estudos conduzidos até 1998 que investigou os efeitos da TRH no sistema da coagulação são limitados, como ressaltado por Douketis *et al.* (2000), uma vez que os parâmetros da coagulação analisados (fibrinogênio, plasminogênio, fator VII), não são os mais eficientes para avaliar o aumento do risco para trombose. Após este período os estudos têm investigado os efeitos da TH por meio de marcadores específicos da geração de trombina (F 1+2, TAT e D-Di), e dos níveis plasmáticos e/ou atividade do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), o qual reflete o potencial fibrinolítico.

Diferentes efeitos sobre o sistema da coagulação têm sido relatados em mulheres usuárias de TH. Estes incluem aumento dos níveis de fatores procoagulantes como fatores VII, X, XII e XIII, redução dos anticoagulantes naturais, como AT, PC e PS, aumento da resistência à proteína C ativada (rPCA), e aumento da atividade fibrinolítica do plasminogênio devido à diminuição dos níveis de PAI-1 (KOH *et al.*, 1999b; DOUKETIS *et al.*, 2000; TEED *et al.*, 2000, GOTTSÄTER *et al.*, 2001; ROSENDAAL *et al.*, 2001; ROSENDAAL *et al.*, 2002a; SALOBIR *et al.*, 2002; BORGFELDT *et al.*, 2004; COSMAN *et al.*, 2005; ZEGURA, *et al.*, 2006; BONDUCK *et al.*, 2007; KERAMARIS *et al.*, 2007; SGARABOTTO *et al.*, 2007; GUIMARÃES, *et al.*, 2009). Níveis elevados dos marcadores de geração de trombina em mulheres sob TRH foram encontrados em estudos anteriores, como aumento de D-Di (KOH *et*

al., 1999a; TEEDE *et al.*, 2000; VEKAVAARA *et al.*, 2001; SALOBIR *et al.*, 2002; COSMAN, *et al.*, 2005; ZEGURA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009), F1+2 ou TAT (TEED *et al.*, 2000; HOIBRAATEN *et al.*, 2001, SGARABOTTO *et al.*, 2007; GUIMARÃES, *et al.*, 2009).

A via de administração da TH pode influenciar o risco de TEV, uma vez que as evidências atuais sugerem que a via transdérmica parece não aumentar o risco de TEV comparado à via oral (SCARABIN *et al.*, 2003; WU, 2005a; CANONICO *et al.*, 2007; CANONICO *et al.*, 2008b). Estudos anteriores mostraram diferenças nas alterações hemostáticas comparando as vias de administração oral e transdérmica, as alterações observadas entre as mulheres que se encontravam sob TH oral podem ser devidas ao efeito de primeira passagem dos estrogênios no fígado (LOWE *et al.*, 2001; VEKAVAARA *et al.*, 2001). Zegura *et al.* (2006) relacionaram a TH oral à redução dos níveis de PAI-1, t-PA, AT e atividade de PC, e aumento nos níveis de D-Di, enquanto a via transdérmica foi associada apenas à diminuição de t-PA.

Hoibraaten *et al.* (2000) verificaram, em estudo com mulheres que sofreram evento prévio de trombose venosa ou embolia pulmonar, que o grupo que se encontrava sob TRH mostrou uma alta recorrência de eventos trombóticos, com uma incidência de 10,7%, comparado ao grupo controle (2,3%). Considerando que vários fatores hematológicos são normalmente afetados pela TH, a presença de um risco maior para trombose venosa em pacientes sob esta terapia sugere a existência de um subgrupo de pacientes com predisposição genética à trombose, as quais se encontram particularmente em risco quando do início do tratamento.

ROSENDAAL *et al.* (2002b) investigaram a presença de *Fator V Leiden* e da mutação no gene da *protrombina* (G20210A) em mulheres que estavam sob TH e sofreram evento trombótico. Entre as pacientes do estudo que sofreram trombose, 23% apresentavam alguma mutação genética, enquanto no grupo controle apenas 7%. As mulheres que tinham *FVL* e estavam sob TH apresentaram um risco 15 vezes maior, indicando um efeito sinérgico entre TH e a presença desta mutação (mulheres só sob TH: risco de 3,2; mulheres portadoras de *FVL*: risco de 3,9). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos (HERRINGTON *et al.*, 2002a; CUSHMAN *et al.*, 2004; WU *et al.* 2005b). Psaty *et al.* (2001) demonstraram que mulheres portadoras da mutação G20210A no gene da *protrombina* e que se

encontram sob TH possuem risco aumentado (cerca de 11 vezes) de infarto do miocárdio, e este aumento foi mais pronunciado em mulheres hipertensas.

Eilertsen *et al.* (2006) compararam diferentes hormônios (estradiol 1mg ou 2mg e acetato de noretisterona e tibolona) e observaram aumento significativo de D-Di apenas no grupo de mulheres usuárias de estradiol 2 mg, sugerindo que doses menores de hormônios na TH podem estar associadas com uma menor ativação da coagulação. Como os efeitos da TH nos marcadores de hipercoagulabilidade e fibrinólise são controversos e novos hormônios vêm sendo lançados no mercado, como a tibolona, vários estudos continuam investigando os efeitos da TH e o risco de trombose.

2.8 TR, LIPÍDEOS, APOLIPOPROTEÍNAS E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morbiletalidade, tanto para homens quanto para mulheres, nos países desenvolvidos. Aproximadamente 50% das mulheres na pós-menopausa desenvolvem doença cardiovascular (DCV), sendo que entre estas, 30% morrem e 20% sofrem infarto (STEVENSON, 2000).

A principal causa de doença cardiovascular é a aterosclerose dos vasos cujos fatores de risco são a hipertensão arterial, o tabagismo, diabetes *mellitus*, obesidade, sedentarismo, dislipidemia, estresse, antecedente familiar de doença cardiovascular e menopausa prematura (VARAS-LORENZO *et al.*, 2000; MARINHO, 2000; I DIRETRIZ, 2008).

Níveis de triglicérides ≥ 150 mg/dL e HDL ≤ 50 mg/dL são componentes da dislipidemia que caracterizam a síndrome metabólica, apresentando maior impacto na incidência de doenças cardiovasculares em mulheres do que em homens, especialmente aquelas na fase de menopausa, segundo o *National Cholesterol Education Program* (NCEP) (MOSCA, 2007, citado por I DIRETRIZ, 2008). Na última década outros fatores têm demonstrado influência marcante no sexo feminino, como a proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us), a homocisteína, a lipoproteína(a) e o fibrinogênio (I DIRETRIZ, 2008).

A TH tem sido relacionada em muitos estudos como benéfica, promovendo modificações favoráveis ao perfil lipídico incluindo elevação dos níveis de HDLc, e a diminuição dos níveis de LDLc (KOH *et al.*, 1999b; STEVENSON, 2000; HERRINGTON *et al.*, 2000; ERBERICH *et al.*, 2001; VEHKAVAARA *et al.*, 2001; LUYER *et al.*, 2001; STRANDBERG *et al.*, 2003; MERCURO *et al.*, 2003; ALPERT *et al.*, 2004; CHRISTODOULAKOS *et al.*, 2004; ZEGURA *et al.*, 2006; BAYRACK *et al.*, 2006). Um dos mecanismos intra-hepáticos que explicam estas modificações inclui aumento das apolipoproteínas (apo) A-I e A-II que induzem a um aumento na produção de HDLc (MARTINEZ *et al.*, 1997). A estrogênio terapia tende a elevar os níveis de HDLc, principalmente a fração HDL₂, que é a de maior cardioproteção (STEVENSON, 2000; ERBERICH *et al.*, 2001; STRANDBERG *et al.*, 2003). O estrogênio também atua elevando os níveis de TG, provavelmente por aumentar a produção hepática de VLDLc, e diminuindo os níveis séricos de LDLc, pelo aumento do número de receptores para esta lipoproteína, que passa a ser metabolizada em maior velocidade (MARTINEZ *et al.*, 1997; ALOYSIO *et al.*, 1999; STEVENSON, 2000). Strandberg *et al.* (2003) observaram que TRH, oral e transdérmica, exerceram efeitos favoráveis na proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us).

Uma disfunção na fibrinólise também tem sido relacionada com o aumento do risco de doença cardiovascular, e o efeito da TH na fibrinólise pode ser um dos benefícios desta terapia em relação às doenças cardiovasculares (GRANCHA *et al.*, 1999; MADSEN *et al.*, 2003; BLADBJERG *et al.*, 2003).

As diferenças qualitativas e quantitativas da TH oral e transdérmica sobre os lípidos, e outros efeitos metabólicos, ocorrem devido ao efeito de primeira passagem no metabolismo hepático da via oral, bem como da diferença na quantidade de estrogênio introduzida no organismo por diferentes vias (STRANDBERG *et al.*, 2003). No entanto, tanto os estrogênios administrados por via oral, quanto por outras vias, como adesivo transdérmico ou gel percutâneo, podem determinar reduções significativas do CT e LDLc e aumento dos níveis de HDLc. Entretanto, a via oral de administração da TH possui maior impacto positivo sobre o perfil lipídico, normalmente sobre as frações do colesterol, enquanto a via transdérmica atua principalmente sobre os níveis plasmáticos de TG e VLDLc (FERNANDES *et al.*, 1999). Os progestogênios com maior atividade androgênica, como a noretisterona, também reduzem o nível de TG (MARINHO, 2000).

Em 1998, um estudo com ampla repercussão mundial, o HERS “Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study” (HULLEY *et al.*, 1998), teve como objetivo avaliar a cardioproteção secundária em usuárias de TH. O estudo concluiu que o uso de TH não reduziu o índice total de eventos coronarianos em mulheres na pós-menopausa com doença coronariana estabelecida e que, além disso, a terapia aumentou o índice de TEV e colelitíase no primeiro ano de exposição. Os autores não recomendam o início da TH com o propósito de prevenção cardiovascular secundária. Resultados semelhantes foram obtidos por Herrington *et al.* (2000) em mulheres com aterosclerose e usuárias de TH oral.

Entretanto, estudos demonstraram que devido ao padrão favorável de eventos coronarianos nos anos subseqüentes de terapia, poderia ser adequado a manutenção do tratamento para mulheres que já estão recebendo TH (HULLEY *et al.*, 1998; MARINHO, 2000). No entanto, em mulheres participantes do estudo HERS foi observado que o uso de sinvastatina associado à TH estava relacionada à diminuição de eventos cardiovasculares, TEV e mortalidade total (HERRINGTON *et al.*, 2002b). Acredita-se que o ponto fundamental e crítico do estudo HERS, foi ter utilizado somente o esquema combinado contínuo, no qual a maioria dos efeitos benéficos cardiovasculares está neutralizado pelo progestogênio (MARINHO, 2000).

O estudo WHI (WOMENS`S HEALTH INITIATIVE, 2002) teve como objetivo primário avaliar os efeitos da TH sobre o risco de infarto do miocárdio e de câncer de mama num período de 8,5 anos. Este estudo foi interrompido após 5,2 anos de seguimento médio das mulheres que utilizaram estrogênio conjugado e medroxiprogesterona em regime terapêutico combinado contínuo, porque a incidência de câncer invasivo de mama ultrapassou os limites de segurança pré-estabelecidos para as pacientes do estudo. Os resultados encontrados neste grupo foram: aumento do risco de câncer de mama (8 casos em 10.000 mulheres a cada ano), infarto do miocárdio (7 casos em 10.000 mulheres a cada ano), acidente vascular cerebral (8 casos em 10.000 mulheres a cada ano) e tromboembolismo venoso (8 casos em 10.000 mulheres a cada ano). Por outro lado, houve diminuição do risco de fraturas do quadril (5 casos em 10.000 mulheres a cada ano) e de câncer de colo-retal (6 casos em 10.000 mulheres a cada ano). O estudo com o grupo de mulheres que está usando apenas estrogênios não foi interrompido, pois os limites de segurança estão preservados. O estudo WHI concluiu que a TH não deve ser

utilizada como prevenção primária de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

O estudo WHI avaliou apenas um tipo de regime terapêutico, com doses convencionais, e uma única via de administração dos medicamentos foi testada. Atualmente, existe uma tendência mundial para a administração de baixas doses de hormônios nas mulheres com maior tempo de pós-menopausa e/ou idade mais avançada, o que não foi avaliado no estudo WHI. Assim, o papel protetor da TRH sobre a doença cardiovascular continua sendo alvo de intensa discussão.

Atualmente, os níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I (apo A-I) e B (apo B) têm sido descritos como melhores preditores de doenças ateroscleróticas do que as concentrações de lípidos e lipoproteínas (WALLDIUS & JUNGNER, 2004). As apolipoproteínas são proteínas associadas com lípidos nas partículas de lipoproteínas que desempenham funções como: transporte destas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular para direcionar corretamente os lípidos para os órgãos-alvo e tecidos do organismo, e ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (BEISIEGEL, 1998).

Tem sido sugerido que o índice apo B/apo A-I representa um parâmetro superior para predição de risco cardiovasculares (WALLDIUS *et al.*, 2004), além de risco de doença arterial periférica e acidente vascular cerebral isquêmico, em pacientes jovens (DE PAULA SABINO *et al.*, 2008a). A apo A-I é o maior componente da partícula de HDLc, representando cerca de 45% de sua massa molecular (FRANK & MARCELL, 2000). As partículas de LDLc, colesterol da lipoproteína de densidade intermediária (IDLc) e VLDLc apresentam uma molécula de apo B em sua estrutura, e desta forma, a concentração plasmática de apo B indica o número total de partículas potencialmente aterogênicas, correlacionando-se com o nível de colesterol não-HDLc (WALLDIUS & JUNGNER, 2004).

Poucos estudos têm correlacionado o uso de TH com as apolipoproteínas A-I e B, e com o índice apoB/apoA-I. Vehkavaara *et al.* (2001) observaram que após três meses de TRH oral, mas não transdérmica ou no grupo controle, as concentrações de LDLc, apo B e lipoproteína a, Lp(a), diminuíram significativamente, enquanto as HDLc, apo A-I e A-II aumentaram significativamente. Christodoulakos *et al.* (2004) e Bayrack *et al.* (2006) observaram resultados semelhantes no perfil lipídico em usuárias de TH. Um estudo recente (CELILOGLU *et al.*, 2009) associou o

uso de alendronato de sódio à um efeito positivo no índice apoB/apoA-I em mulheres na pós-menopausa com osteoporose.

De acordo com a I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da TH (I DIRETRIZ, 2008) a TH não está recomendada com a finalidade exclusiva de reduzir o risco de DCV em mulheres na pós-menopausa, embora existam evidências de benefícios cardiovasculares quando a TH é iniciada nos primeiros anos de pós-menopausa. Há numerosas lacunas quanto aos diferentes esquemas de TH usados, especialmente em relação a estudos que envolvam resultados cujos eventos finais considerados sejam os desfechos clínicos (infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e eventos tromboembólicos) (I DIRETRIZ, 2008).

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros potencialmente trombogênicos em mulheres usuárias de TH oral e a associação entre estes, incluindo variáveis hemostáticas e moleculares, grupo sanguíneo, perfil lipídico e apolipoproteínas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da TH oral sobre o mecanismo hemostático através de marcadores específicos: dímero D (D-Di), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), fator VIII (FVIII) e fator von Willebrand (FvW).
- Realizar a fenotipagem dos grupos sanguíneos do Sistema ABO e correlacionar com os níveis plasmáticos de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1 em mulheres usuárias de TH oral.
- Identificar, entre as participantes do estudo, o polimorfismo -675 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1* e correlacionar com os níveis plasmáticos de PAI-1.
- Avaliar o efeito da TH oral sobre o perfil lipídico (colesterol total, HDLc, LDLc e triglicérides) e apolipoprotéico (apolipoproteínas A-I e B) e determinar o índice apoB/apoA-I para mulheres usuárias de TH oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 265/08). As participantes foram previamente selecionadas, de acordo com critérios pré estabelecidos (item 4.1.1), por uma equipe de médicos ginecologistas da Maternidade Otaviano Neves de Belo Horizonte, que participaram do estudo. Após a avaliação dos médicos, as mulheres foram encaminhadas ao Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, local onde foi realizada a coleta do material. Para cada paciente foi preenchida uma ficha clínica pelo médico (APÊNDICE 1), a qual era entregue no momento da coleta. Após conferir a ficha clínica, as mulheres receberam esclarecimentos, utilizando-se linguagem clara, sobre os exames que seriam realizados e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2), aprovado pelo COEP da UFMG.

Após a coleta da amostra biológica, foram investigadas as mutações G20210A (no gene da *protrombina*) e G1691A (no gene do *Fator V*). O laudo com os resultados das participantes foi encaminhado para os médicos. Todas as participantes que possuíam mutações nos genes do Fator V ou da protrombina foram imediatamente comunicadas através de seus médicos. As participantes que possuíam uma destas mutações foram aconselhadas a não iniciar ou a interromper a TH, sendo esta decisão tomada em conjunto entre a paciente e seu médico. Estas mulheres foram excluídas do estudo.

4.1.1 Seleção das mulheres participantes do estudo

Neste estudo, foram avaliadas 162 mulheres, não hysterectomizadas, na faixa etária de 40 a 65 anos, distribuídas nos seguintes grupos:

- **Grupo controle (n= 101):** mulheres na menopausa, que não fazem uso de TRH, ou que fizeram, mas interromperam por, pelo menos, três meses.
- **Grupo sob TH ORAL (n= 61):** mulheres na menopausa que fazem uso de TRH por via oral por um período de três meses, com a associação de estrogênio e progestogênio no seguinte esquema cíclico: 2mg de estradiol e 1mg de acetato de noretisterona (nos últimos 12 ou 14 dias).

4.1.2- Critérios de exclusão

Para composição dos grupos foram excluídas:

- Mulheres que estivessem fazendo uso de aspirina ou outro antiagregante plaquetário, anticoagulantes (warfarina sódica ou heparina) ou outros medicamentos que potencialmente possam afetar o mecanismo da coagulação.
- Mulheres usuárias de TH por um período menor que três meses ou superior a quatro meses.
- Mulheres portadoras de neoplasias, doenças renais ou hepáticas, diagnosticadas por equipe médica.
- Mulheres que possuem mutações em homozigose ou heterozigose nos genes do *Fator V* (FVL) e *protrombina* (PT).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Amostra biológica

As mulheres participantes do estudo foram submetidas a jejum de 12 a 14 horas. Foram coletadas, de cada participante envolvida no estudo, amostras de 15 mL de sangue venoso diretamente em tubos do sistema *Vacurette*®, sendo 5 mL em citrato de sódio 0,129 mol/L, 5 mL em EDTA e 5 mL em tubo sem anticoagulante. A amostra obtida em citrato foi utilizada para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), sendo imediatamente centrifugada a 2.500 rpm durante 20 minutos, à temperatura ambiente (utilizando-se centrífuga de mesa FANEN). O plasma foi aliqotado em tubos *ependorf* devidamente identificados, os quais foram armazenados à temperatura de aproximadamente -70°C até o momento da realização dos testes laboratoriais. A amostra coletada em tubo com EDTA foi destinada à extração de DNA.

A amostra coletada em tubo sem anticoagulante foi utilizada para obtenção do soro. Esta amostra foi imediatamente centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente (utilizando-se centrífuga de mesa FANEN). O coágulo de fibrina foi separado, e a amostra novamente centrifugada nas mesmas condições. O soro obtido foi aliqotado em tubo *ependorf* devidamente identificado, e

armazenado à temperatura de 2 a 8°C. O soro foi utilizado para as determinações do perfil lipídico e de apolipoproteínas.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Extração de DNA

As amostras de sangue (5 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 foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL estéril e incubada com uma solução de lise de hemácias durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a lise das hemácias, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 1 minuto em microcentrífuga FANEN. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de leucócitos ressuspenso em solução de lise celular. Posteriormente, foi adicionada a solução de precipitação de proteínas, 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 isopropanol. A amostra foi misturada por inversão cerca de 50 vezes para que ocorresse a precipitação do DNA, e posteriormente centrifugada a 14.000 rpm durante 1 minuto. Após o descarte do isopropanol, foi adicionado 1 mL de etanol a 70% para lavar o sedimento de DNA. Em seguida foi realizada outra centrifugação, descartado o etanol e adicionado 100 µL de solução de hidratação (Tris 10 mM/ EDTA 0,1 mM). Após este procedimento, as amostras foram armazenadas no freezer a – 20° C para posterior pesquisa das mutações.

4.3.2 Investigação das mutações nos genes do *fator V* (FVL: G1691A), da *protrombina* (G20210A) e polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1*

O DNA extraído das amostras de sangue de todas as participantes do estudo foi submetido à investigação da presença de mutações nos genes da *protrombina* (G20210A), *Fator V Leiden* (G1691A) e polimorfismo -675 4G/5G no gene do *PAI-1*.

A técnica descrita a seguir para a detecção das mutações nos genes da *PT* e *FVL* 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). A técnica de PCR alelo específica para detecção do polimorfismo inserção/deleção (-675 4G/5G) na região promotora do gene do *PAI-1* foi padronizada anteriormente (DE PAULA SABINO, 2008b) de acordo com condições previamente descritas, utilizando-se os oligonucleotídeos descritos na literatura (MANSFIELD, *et al.*, 1995).

Nas reações de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen®, desoxirribonucleotídeos (GIBCO BRL®), tampão (15 mM de MgCl₂, 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. As seqüências dos oligonucleotídeos específicos para cada uma das mutações investigadas se encontram listadas no **Quadro 2**.

O número de ciclos, concentração de 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. As técnicas foram padronizadas utilizando-se como controle indivíduos previamente diagnosticados para a presença das referidas mutações. As condições padronizadas se encontram nos **Quadros 3 e 4** (GODOI, 2002; DE PAULA SABINO, 2008b).

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

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

Mutação	Óligo senso	Óligo antisense
<i>PT (G20210A)</i>	5' TCTAGAAACAGTTGCCTGGC 3'	5' ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC 3'
<i>FVL (G1691A)</i>	5' TCAGGCAGGAACAACACCAT 3'	5'GGTTACTTCAAGGACAAAATACCTGTAAAGCT3'
<i>PAI-1 4G</i>	5' GTC TGG ACA CGT GGG GA 3'	
<i>PAI-1 5G</i>	5' GTC TGG ACA CGT GGG GG 3'	
<i>PAI-1 4G/5G</i>	5' AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT 3'	5' TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G 3'

PT: *Protrombina* (POORT *et al.*, 1996); FVL: *Fator V Leiden* (HUBER *et al.*, 2000);

PAI-1 4G, 5G e 4G/5G: polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* (MANSFIELD, *et al.*, 1995).

Quadro 3 - Concentrações de reagentes utilizados nas PCR's.

Reagentes	Concentração		Concentrações de uso		
	Estoque	PT	FVL	PAI-1 4G	PAI-1 5G
Tampão	10X (15mM MgCl ₂)	1X (1,5mM MgCl ₂)	1X (1,5mM MgCl ₂)	1X (1,5mM MgCl ₂)	1X (1,5mM MgCl ₂)
dNTP	2mM	0,2mM	0,2mM	0,2 mM	0,2 mM
Óligo senso	10 µM	1,0µM	1,0µM	1,0 µM (4G)	1,0 µM (5G)
Óligo antisenso	10µM	1,0µM	1,0µM	1,0 µM	1,0 µM
Taq polimerase	5µ/µL (unidades)	1U	1U	1U	1U
DNA	150µg/µL (média)	75µg	75µg	20µg	20µg
Água q.s.p.		20µL	20µL	20µL	20µL

PT: *protrombina*; FVL: *fator V Leiden*; PAI-1 4G/ PAI-1 5G: polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1*
q.s.p.: quantidade suficiente para

Quadro 4 - Programas de PCR utilizados no termociclador

Etapas	PT	Gene a ser amplificado		
		FVL	PAI-1 (4G/5G)	
Desnaturação prévia	95° - 10 min	95° - 10 min	95° - 5 min	95° - 5 min
Desnaturação	94° - 1 min	94° - 1 min	95° - 1 min	95° - 1 min
Anelamento	57° - 1 min	55° - 1 min	59° - 1 min	59° - 1 min
Extensão	72° - 1 min	72° - 1 min	72° - 1 min	72° - 1 min
N ° de ciclos	40 ciclos	40 ciclos	15 ciclos	15 ciclos
Extensão final	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min

PT: *protrombina*; FVL: *fator V Leiden*; PAI-1 4G/5G: polimorfismo no gene do *PAI-1*

Após detecção da amplificação do segmento específico para os genes do *FV* e *PT*, em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, uma alíquota de 10 µL da reação de amplificação foi digerida com endonuclease de restrição específica (quadro 4), sendo incubada com 10 µL da mistura de digestão a 37°C durante o mínimo de 4 horas. As condições de digestão 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 por enzimas de restrição para detecção das mutações FV Leiden e no gene da protrombina (G20210A), através do polimorfismo de tamanho de restrição (RFLP).

Reagentes	Concentração estoque	Concentrações de uso	
		<i>PT</i>	<i>FVL</i>
Tampão da enzima	10X	2X	2X
Enzima de restrição	<i>Hind III</i> : 10U/μL	<i>Hind III</i> : 7U	<i>Hind III</i> : 7U
Água q.s.p.		10μL	10μL

PT: protrombina; FVL: fator V Leiden; 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 6% (*FVL* e *PAI-1*) e a 8% (*PT*) corado pela prata. O polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição obtido após a digestão dos produtos de PCR e a PCR alelo específica (*PAI-1*) permitem verificar se o indivíduo analisado é heterozigoto, homozigoto ou não portador da mutação pesquisada, conforme **Quadro 6**.

Quadro 6- Perfil de bandas para genotipagem das mutações por RFLP (*PT* e *FVL*) ou PCR alelo específica (*PAI-1*).

<i>PT</i> (G20210A)		<i>FVL</i> (G1691A)		<i>PAI-1</i> (4G5G)		
Perfil de bandas	Genótipo	Perfil de bandas	Genótipo	4G	5G	Genótipo
345pb	GG	241pb	GG	260pb	260pb	Controle
322 e 23pb	AA	209 e 32 pb	AA	139 pb	-----	4G4G
345, 322 e 23pb	GA	241, 209 e 32 pb	GA	-----	139 pb	5G5G
				139 pb	139 pb	4G5G

PT: protrombina; FVL: fator V Leiden; PAI-1 4G/5G: polimorfismo no gene do PAI-1

4.3.3 Fenotipagem do grupo sanguíneo ABO

Quando hemácias são testadas em condições propícias, com soros conhecidamente dotados de anticorpos específicos e não ocorre interação entre hemácias e anti-soro, pode-se presumir que estas células sejam destituídas de antígeno contra o qual o anticorpo é dirigido. Inversamente, qualquer interação subentende que as células possuem o antígeno em questão.

A fenotipagem foi realizada pela técnica indireta, uma vez que as amostras que estavam disponíveis foram de plasma citratado. Inicialmente deve-se preparar

as suspensões de hemácias a 5%, usando sangue previamente identificado dos grupos A, B e O. Posteriormente, colocar 2 gotas do plasma do paciente e adicionar em seus respectivos tubos, devidamente identificados, 2 gotas da suspensão de hemácias a 5% dos tipos A, B e O. Centrifugar por 3000 r.p.m. durante 2 minutos e observar a aglutinação (CARVALHO & SILVA, 1990).

A interpretação da tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO encontra-se resumida no **Quadro 7**.

Quadro 7 - Tipagem indireta do grupo sanguíneo ABO.

Grupo Sanguíneo	Hemácia-A	Hemácia-B	Hemácia-O
AB	-	-	-
A	-	+	-
B	+	-	-
O	+	+	-

CARVALHO & SILVA, 1990

4.3.4 Investigação dos polimorfismos do Sistema ABO

Os polimorfismos do gene *ABO* podem ser estudados, quase que exclusivamente nos exons 6 e 7, uma vez que estes codificam 77% da proteína (glicosiltransferase) e 91% do domínio catalítico das mesmas (YAMAMOTO *et al.*, 1995; SELTSAM *et al.*, 2003; ROUBINET *et al.*, 2004).

A investigação dos polimorfismos do sistema *ABO* foi feita através da amplificação dos exons 6 e 7 numa única reação (PCR multiplex) do gene *ABO*. Os fragmentos de DNA amplificados foram digeridos com as enzimas *KpnI* e *MspI* para realizar a genotipagem dos alelos A¹, A², B, O¹ ou O² (OLSSON *et al.*, 1995).

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR foram previamente descritos por Olsson *et al.* (1995) e encontram-se no **Quadro 8**. O protocolo para genotipagem do sistema *ABO* foi padronizado para as condições do nosso laboratório (PAIVA, 2007). As concentrações dos reagentes empregados na reação de PCR encontram-se descritas no **Quadro 9**. Os reagentes tiveram seus valores duplicados em relação à padronização prévia para facilitar o processo de otimização da digestão, devido ao gasto de produto de PCR.

Quadro 8 - Oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação dos exons 6 e 7 do sistema ABO.

Gene ABO	Óligo senso	Óligo antisenso
Exon 6	5'CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA 3'	5'CGGAATTCACCTCGCCACTGCCTGGGTCTC3'
Exon 7	5' CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTTGCA 3'	5' GGGCTAGGCTTCAGTTACTC 3'

OLSSON *et al.*,1995

Quadro 9 - Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação dos exons 6 e 7 do sistema ABO.

Reagente	Estoque	ABO
MgCl ₂	15mM	1,5mM
dNTPs	2 mM	0,2 mM
Óligos senso	10 µM	0,4 µM
Óligos antisenso	10 µM	0,4 µM
Taq polimerase	5U/ µL (unidades)	1,0 U
DNA ¹	100ng/µL(media)	100ng/ µL(media)
Água q.s.p		20 µL

OLSSON *et al.*,1995; q.s.p- quantidade suficiente para

As condições de amplificação para os fragmentos correspondentes aos exons 6 e 7 foram reunidas numa única reação (PCR multiplex) (**Quadro 10**). O produtos de PCR de 252 pb e 844 pb resultantes correspondem aos exons 6 e 7 do gene ABO, respectivamente (OLSSOM *et al.*, 1995).

Quadro 10 - Programas utilizados no termociclador para a PCR dos exons 6 e 7 do sistema ABO.

Programa PCR Multiplex	Fragmentos do gene a serem amplificados
Etapas	Exons 6 e 7 (gene ABO)
Desnaturação inicial	94°C – 2 min
Desnaturação	94°C – 10 seg
Anelamento	63°C – 30 seg
Extensão	72°C – 30 seg
Nº de ciclos	10 ciclos
Desnaturação	94°C – 10 seg
Anelamento	61°C – 30seg
Extensão	72°C – 30 seg
Nº de ciclos	25 ciclos

OLSSON *et al.*,1995

Os produtos de PCR obtidos de 252 pb e 844 pb foram então submetidos à digestão a 37°C durante o mínimo de 4 horas, com as enzimas *KpnI*, que cliva o exon 6, e *MspI*, que cliva o exon 7, conforme as condições descritas no **Quadro 11**.

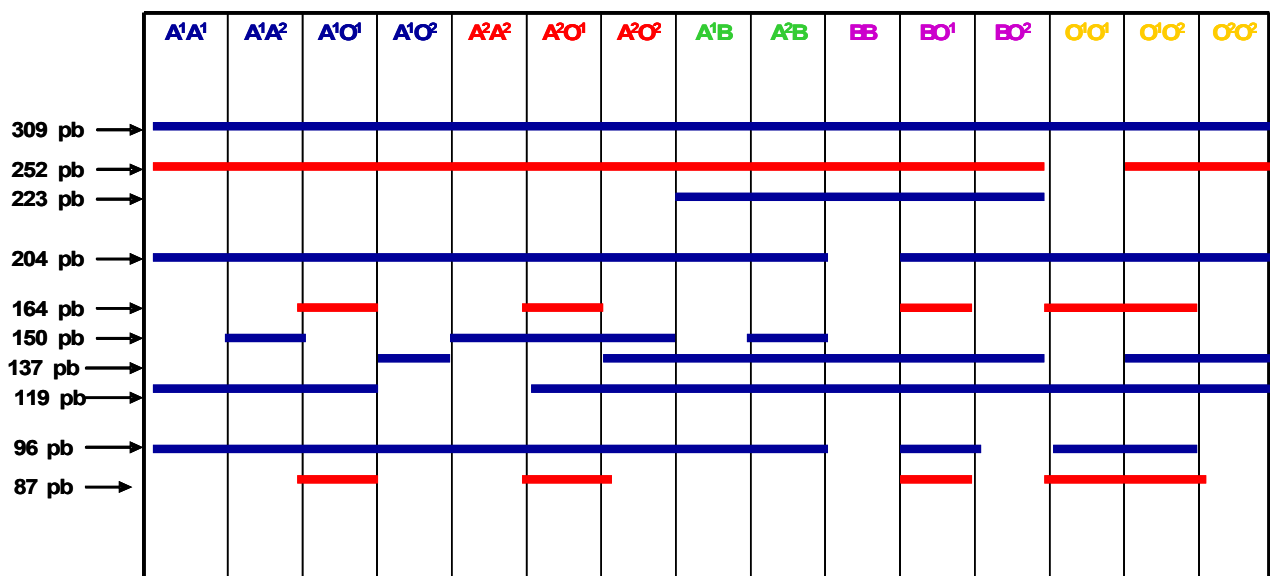
Quadro 11 - Condições padronizadas de digestão dos exons 6 e 7 para investigação dos genótipos do sistema ABO.

Reagentes	Concentração Estoque	Volume
Tampão A	10 X	4,0 µL
Enzima de restrição <i>KpnI</i>	10 µ/µL	2 U
Enzima de restrição <i>MspI</i>	10 u/ µL	2 U
Água q.s.p.		5 µL

OLSSON *et al.*, 1995

A **Figura 6** mostra o perfil eletroforético de cada genótipo do sistema ABO obtido após digestão com as enzimas de restrição específicas.

Figura 6: Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do sistema ABO, obtidos após realização da PCR e digestão com as endonucleases *MspI* e *KpnI*.



As bandas azuis representam fragmentos obtidos da amplificação do exon 7 e as bandas vermelhas representam os fragmentos obtidos da amplificação do exon 6.

4.3.5 Avaliação do perfil hemostático

Para a avaliação do perfil hemostático das participantes do estudo foi realizada a determinação dos níveis plasmáticos de marcadores de ativação da cascata da coagulação e da atividade fibrinolítica e de fatores de coagulação.

4.3.5.1 Determinação do dímero D (D-Di)

A determinação plasmática do D-Di foi feita pelo método de ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*, utilizando-se o conjunto de reagentes VIDAS® D-dimer New (bioMérieux), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio da dosagem associa o método imunoenzimático de captura em duas etapas com uma detecção final em fluorescência (ELFA). O cone de utilização única serve tanto de fase sólida com o anticorpo anti D-Di adsorvido na sua superfície quanto de suporte de pipetagem. Os outros reagentes estão prontos a ser usados e compartimentalizados na barrete. Todas as etapas da reação são realizadas automaticamente no aparelho. Estas são constituídas por uma sucessão de ciclos de aspiração e dispensação do meio reacional.

Numa primeira etapa, a amostra é coletada e depois transferida para o poço que contém o anticorpo anti D-Di, marcado com fosfatase alcalina. A mistura amostra/conjugado é aspirada e dispensada várias vezes no cone para aumentar a velocidade de reação. Esta operação permite ao D-Di ligar-se por um lado às imunoglobulinas fixadas no cone e, por outro, ao conjugado, formando assim um sanduíche. Na segunda etapa, dá-se uma saturação dos locais do D-Di que ficaram livres, efetuada por aspiração e dispensação do conjugado no quinto poço do barrete. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Em seguida, são efetuadas duas etapas de revelação sucessivamente. Em cada etapa, o substrato é aspirado e dispensado no cone, a enzima do conjugado cataliza a reação de hidrólise deste substrato num produto cuja fluorescência é medida. Esta é proporcional à concentração de D-Di presente na amostra.

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho VIDAS em relação às duas curvas de calibração memorizadas correspondentes às duas etapas de revelação. Em seguida os resultados são impressos.

4.3.5.2 Determinação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)

A determinação dos níveis de PAI-1 foi feita pelo método de ELISA, cujo princípio já foi descrito, utilizando-se o uso do conjunto diagnóstico IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica® Inc. – Estados Unidos), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura a 490nm foi realizada utilizando-se o leitor de ELISA.

4.3.5.3 Determinação do fator VIII

A determinação do fator VIII foi feita por método coagulométrico, utilizando-se o *Kit* (Dade Behring), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O método se baseia na determinação do tempo de coagulação após adição de tromboplastina e de um plasma deficiente em fator VIII contendo todos os fatores da coagulação, com exceção do FVIII, que será proveniente da amostra a ser testada.

O ensaio foi realizado utilizando-se o coagulômetro DADE BEHRING (BFTII).

4.3.5.4 Determinação do fator von Willebrand (FvW)

A determinação do FvW foi feita por ELISA 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 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.

4.3.6 Avaliação do perfil lipídico

Para a determinação do perfil lipídico foram realizadas as dosagens de triglicérides, colesterol total e frações, em amostras de soro obtidas após jejum de 12 a 14 horas, através de métodos enzimáticos convencionais.

O controle interno de qualidade foi realizado para todas as dosagens utilizando-se soros controles comerciais (LABTEST® e DOLES®), com dois níveis de concentrações, cobrindo a faixa de valores de decisão clínica, para verificar a precisão dos ensaios. O desempenho analítico dos métodos que compõem o perfil lipídico foi avaliado em termos do erro total (%), de acordo com as metas recomendadas pelo “*National Cholesterol Education Program*” (NCEP) (RECOMENDAÇÕES, 1999).

A interpretação clínica dos resultados foi estabelecida de acordo com os valores de referência preconizados pelas IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (RESUMO, 2007).

4.3.6.1 Determinação do colesterol total (CT)

Para a determinação do colesterol total foi utilizado o método enzimático colorimétrico de Trinder, utilizando o conjunto de reagentes COLESTEROL COD CLIN (Bioclin®), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias do padrão, das amostras e dos soros controles foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811, a 510 nm.

4.3.6.2 Determinação de HDL colesterol (HDLc)

Para a determinação da fração HDLc foi utilizado o método de precipitação seletiva, utilizando o conjunto de reagentes COLESTEROL HDL ENZIMÁTICO (Bioclin®), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. As lipoproteínas VLDLc, a LDLc e os quilomícrons foram precipitados com a mistura de ácido

fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado às HDL foi determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático de Trinder. A leitura das absorbâncias foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811.

4.3.6.3 Determinação de Triglicérides (TG)

Para a determinação dos triglicérides foi utilizado o método enzimático colorimétrico de Trinder, utilizando o conjunto de reagentes TRIGLICÉRIDES ENZIMÁTICO (Bioclin®), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em Espectrofotômetro BIOTRON BTR 811, a 510 nm.

4.3.6.4 Estimativa de LDL Colesterol (LDLc)

A concentração do LDL colesterol foi calculada baseando-se na fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972). Com níveis de triglicérides > 400 mg/dL, na presença de quilomícrons e hiperproteinemia tipo 3 (Fredrickson), os valores de LDLc não podem ser estimados através desta equação (ATHEROS, 1999). Nestes casos, recomenda-se que o LDLc seja quantificado por métodos diretos específicos disponíveis.

Equação de Friedewald: $LDLc = CT - (HDLc + VLDLc)$

$VLDLc = TG/5$ (para $TG < 400$ mg/dL)

4.3.6.5 Apolipoproteína A-I (apo A-I)

A determinação da apo A-I foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA A-I (APO A-I) (BioTécnica®), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado.

4.3.6.6 Apolipoproteína B (apo B)

A determinação da apo B foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico APOLIPOPROTEÍNA B (APO B) (BioTécnica®), pelo método turbidimétrico, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi

realizado utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus® em sistema completamente automatizado.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre dois grupos foram realizadas 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. A análise de variância (ANOVA) com arranjo fatorial seguida de teste-t foi utilizada para identificação da diferença entre as médias dos grupos para a determinação da possível interação os fatores estudados. O teste de qui-quadrado (χ^2), ou o teste exato de Fisher, foi utilizado na detecção de possíveis diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis clínicas, distribuição de frequências e para o cálculo de *odds ratio*. A investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada através da correlação de Spearman para as variáveis não paramétricas e Pearson para as variáveis normais. Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas “Sigma Stat” (versão 2.03) e “SAS” versão 8.0. Foram consideradas como diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Após a aprovação do projeto pelo COEP da UFMG, as participantes foram encaminhadas à Faculdade de Farmácia pelos médicos ginecologistas, totalizando 164 mulheres participantes. No entanto, duas mulheres foram excluídas do trabalho por serem portadoras da mutação G20210A no gene da *protrombina*.

O grupo controle foi composto por 101 mulheres na pós-menopausa não usuárias de TH. O grupo em uso de TH oral foi formado por 61 mulheres em uso de 2mg de estradiol e 1mg de acetato de noretisterona, durante um período médio de 3,3 meses. A partir das informações coletadas na ficha clínica preenchida pelos médicos ginecologistas, foram levantadas as características clínicas das participantes desse estudo. A **Tabela 1** mostra a média das idades das participantes, o índice de massa corporal (IMC), a presença de osteoporose, entre outras características clínicas nos grupos estudados. Não houve diferença significativa na média da idade nos dois grupos ($52,43 \pm 6,16$ vs $53,55 \pm 5,59$). O grupo controle apresentou IMC significativamente superior ao grupo de mulheres usuárias de TH oral (**Tabela 1**). As características mais comumente observadas, que incluem fatores de risco para doenças cardiovasculares, entre as mulheres participantes foram: hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e doença cardiovascular. É importante ressaltar que entre as participantes do grupo controle 36 (35,64%) e entre as mulheres usuárias de TH oral 17 (27,86%) apresentavam mais de um fator de risco.

Tabela 1 – Características das participantes do estudo, expressas como média e desvio padrão ou percentagem e valor de p.

	Grupo Controle (n= 101)	Grupo TRH (n= 61)	p
Idade	52,43 ± 6,16	53,55 ± 5,59	0,10
Índice de massa corporal (IMC)	26,75 ± 4,44	25,02 ± 4,13	0,02*
Osteoporose	16 (15,84%)	9 (14,75%)	1,00
Tabagismo	15 (14,85%)	8 (13,11%)	0,82
Dislipidemia	22 (21,78%)	11 (18,03%)	0,69
Hipertensão arterial	37 (36,63%)	19 (31,14%)	0,50
Doença cardiovascular	14 (13,86%)	3 (4,9%)	0,11
Hipotireoidismo	1 (0,99%)	2 (3,27%)	0,56
Diabetes mellitus	3 (2,97)	1 (1,63%)	1,00
Artrite reumatóide	6 (5,94%)	3 (4,91%)	1,00
Presença de varizes	11 (10,89%)	9 (14,75%)	0,47

teste t: idade e IMC;

χ^2 : Osteoporose, Tabagismo, Dislipidemia, Hipertensão arterial, Doença cardiovascular, Hipotireoidismo, Diabetes mellitus, Artrite reumatóide, Presença de varizes.

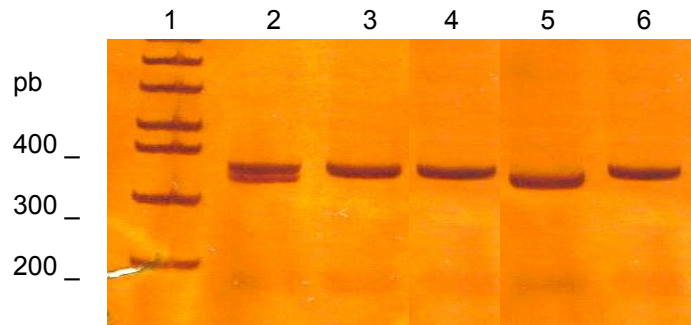
* Indica significância para $p < 0,05$

5.2 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES NOS GENES DO FATOR V (FVL), DA PROTROMBINA (G20210A) E DO POLIMORFISMO 4G/5G NO GENE DO PAI-1

A investigação da presença das mutações nos genes do *Fator V* (G1691A), da *protrombina* (G20210A) e do polimorfismo para a deleção/inserção 4G/5G no gene do *PAI-1* foram realizadas em todas as mulheres encaminhadas para o estudo.

A **Figura 7** ilustra o resultado da digestão dos produtos de PCR realizada para diagnóstico da mutação G20210A no gene da protrombina de quatro mulheres que foram encaminhadas para este estudo e de um indivíduo portador da mutação em homozigose (canaleta 5), cujo DNA foi utilizado como controle positivo da reação. Verifica-se que, entre as quatro participantes, três apresentaram perfil normal (canaletas 3, 4 e 6) e uma o perfil de heterozigose para a referida mutação (canaleta 2). Na canaleta 1, tem-se o padrão de peso molecular.

Figura 7 - Digestão dos produtos de PCR da protrombina, para o diagnóstico da mutação G20210A em mulheres do grupo controle e em uso de TH.

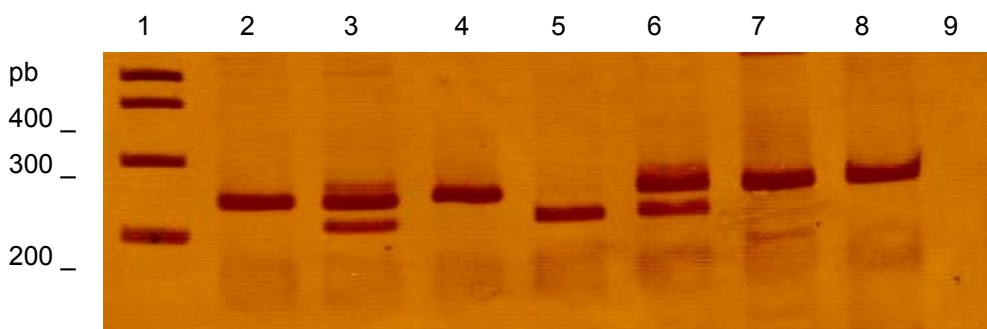


Legenda: canaletas: 1: padrão de peso molecular, 2: indivíduo heterozigoto, 3, 4 e 6: perfil de indivíduo não portador da mutação, 5: controle positivo homozigoto.

A **Figura 8** corresponde ao resultado da digestão dos produtos de PCR para o diagnóstico da mutação no gene do *Fator V* (G1691A) de algumas participantes do estudo. Nas canaletas 2, 4, 7 e 8 observa-se o perfil de digestão do produto de PCR de indivíduos normais, não portadores do *FVL*. Na canaleta 5, observa-se o perfil de um indivíduo portador da mutação em homozigose, controle positivo, e nas canaletas 3 e 6, de controles positivos em heterozigose. Na canaleta 9, tem-se o branco da reação, e na 1 o padrão de peso molecular.

A mutação G20210A no gene da *protrombina* foi detectada em heterozigose em duas mulheres do grupo controle, sendo estas excluídas do estudo. A mutação *FVL* não foi detectada nas participantes.

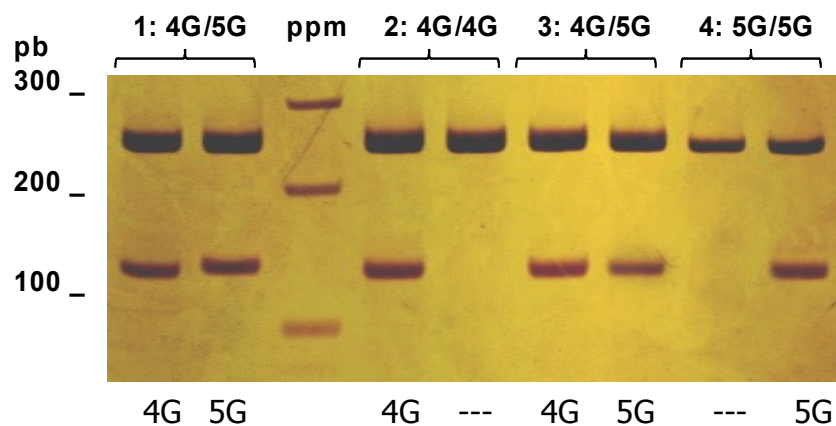
Figura 8 - Digestão dos produtos de PCR do Fator V para diagnóstico da mutação Fator V Leiden (G1691A), em mulheres do grupo controle e em uso de TH.



Legenda: canaletas: 1: padrão de peso molecular, 2, 4, 7 e 8 : não portadoras da mutação, 3 e 6: portadoras em heterozigose , 5: controle positivo homozigoto, 9: branco.

A **Figura 9** representa a detecção do polimorfismo deleção/inserção 4G/5G no gene do *PAI-1*, através da técnica de PCR alelo específico. A canaleta 3 corresponde ao padrão de peso molecular. As canaletas 1-2 e 6-7 representam o genótipo heterozigoto 4G/5G, as canaletas 4-5 mostram o genótipo homozigoto para a deleção (4G/4G), enquanto as canaletas 8-9 mostram o homozigoto para a inserção (5G/5G).

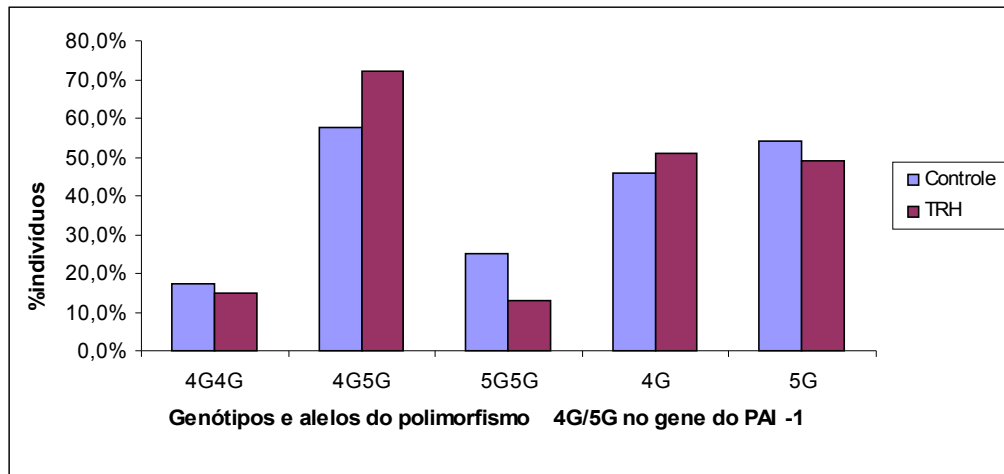
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1*, através da técnica de PCR alelo específico.



Legenda: canaleta 3: padrão de peso molecular (ppm), 1-2 e 6-7: genótipo: 4G/5G, 4-5: 4G/4G; 8-9: 5G/5G.

O resultado da investigação do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1* encontra-se na **Figura 10**, foram genotipadas 99 mulheres do grupo controle e 61 usuárias de TH. No grupo controle, 17 (17,2%) mulheres foram homozigotas para a deleção (4G/4G), 57 (57,6%) mulheres heterozigotas (4G/5G) e 25 (25,3%) homozigotas 5G/5G. Entre as mulheres usuárias de TH, 9 (14,8%) foram homozigotas 4G/4G, 44 (72,1%) foram heterozigotas 4G/5G e 8 (13,1%) homozigotas 5G/5G. A frequência observada para o alelo 4G foi 0,46 no grupo controle e 0,51 entre as mulheres usuárias de TH oral, enquanto para o alelo 5G esteve presente em 0,54 das participantes do grupo controle e em 0,49 das mulheres do grupo sob TH (**Figura 10**). Não foi observada diferença estatística na composição dos grupos controle e usuárias de TH em relação à frequência dos genótipos do polimorfismo 4G/5G ($p=0,13$), ou à frequência dos alelos 4G e 5G ($p=0,47$).

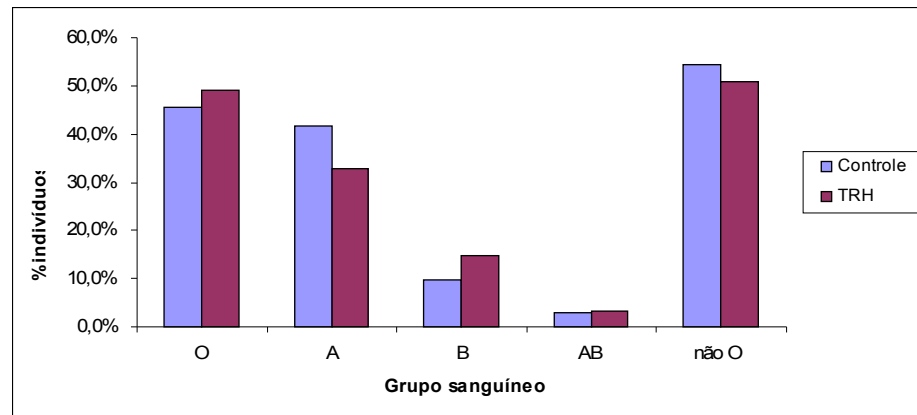
Figura 10 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1* , em mulheres do grupo controle e em uso de TH.



5.3 Fenotipagem e Genotipagem dos polimorfismos do sistema ABO

A fenotipagem do grupo sanguíneo ABO foi realizada para todas as participantes do estudo. Em relação à distribuição dos grupos sanguíneos, observa-se nas mulheres do grupo controle 46 (45,5%) do grupo O, 42 (41,6%) do grupo A, 10 (9,9%) do grupo B e 3 (3,0%) do grupo AB. Entre as mulheres usuárias de TH oral, 30 (49,2%) do grupo O, 20 (32,8%) do grupo A, 9 (14,8%) do grupo B e 2 (3,3%) do grupo AB, como mostra a **Figura 11**. Devido ao fato de alguns subgrupos contarem com um número reduzido de mulheres, as participantes dos grupos sanguíneos A, B e AB foram agrupadas como não-O. Não foi observada diferença estatística na composição dos grupos controle e usuárias de TH em relação à frequência dos grupos sanguíneos ($p=0,78$).

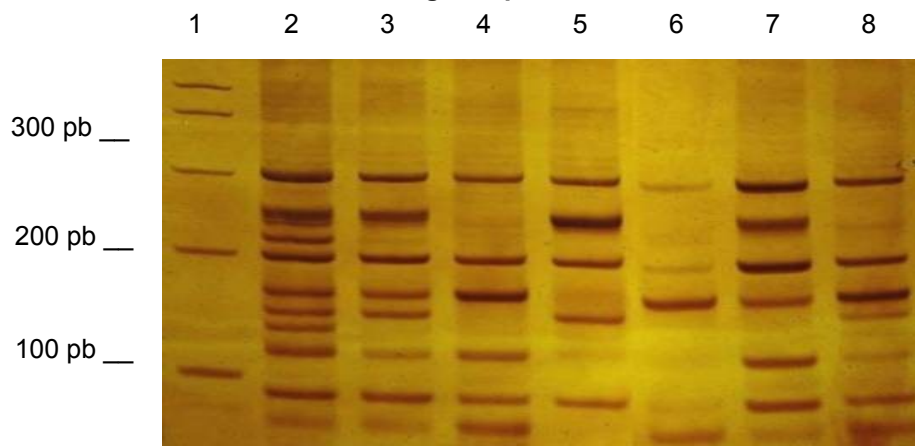
Figura 11 - Distribuição dos grupos sanguíneos entre as participantes dos grupos controles e usuárias de TRH.



A distribuição dos grupos sanguíneos nos grupos controle e usuárias de TH foi similar à distribuição entre doadores cadastrados da população local (Fundação Hemominas, 2006). Não houve diferença significativa entre a frequência dos grupos sanguíneos nas participantes do grupo controle em comparação com doadores do Hemominas ($p=0,213$).

Com intuito de confirmar a fenotipagem indireta do sistema ABO, foi realizada a genotipagem de algumas mulheres participantes do estudo. A **Figura 12** ilustra os resultados obtidos após otimização da reação de PCR-RFLP multiplex para genotipagem do sistema ABO. No grupo controle, foram genotipadas 31 (30,7%) mulheres, e 15 (24,6%) mulheres do grupo de usuárias de TH.

Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após reação de PCR, seguida de digestão com as endonucleases de restrição *MspI* e *KpnI* para determinação dos genótipos do sistema ABO.



Legenda: canaleta1: padrão de peso molecular; canaleta 2: a escada alélica; canaletas 3-8: A^2O^1 , O^1O^1 , A^1A^2 , O^1O^1 , A^1O^1 , A^2O^1 , respectivamente.

Com o método de genotipagem utilizado foram discriminados os alelos A^1 , A^2 , B , O^1 e O^2 . Houve 100% de concordância entre o fenótipo e genótipo das participantes previamente tipados pelo método sorológico.

5.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE HIPERCOAGULABILIDADE

Na avaliação dos marcadores de hipercoagulabilidade, foram realizadas as determinações plasmáticas de D-Di, PAI-1, FVIII e FvW. Foram observadas diferenças significativas nos níveis de D-Di, PAI-1 e FVIII, comparando-se os grupos controle e usuárias de TH, sendo observado aumento nos níveis de D-Di ($335,67 \pm 132,68$ vs $527,15 \pm 420,51$), e FVIII ($100,22 \pm 29,25$ vs $112,73 \pm 35,42$), e diminuição dos níveis de PAI-1 ($38,47 \pm 22,61$ vs $29,57 \pm 16,89$). Os níveis de FvW ($6,12 \pm 1,88$ vs $6,40 \pm 2,10$) não variaram comparando-se os dois grupos em estudo. A **Tabela 2** e a **Figura 13** apresentam os resultados obtidos nas comparações dos dois grupos, referentes aos níveis plasmáticos de D-Di, PAI-1, FVIII e FvW.

Tabela 2 - Níveis plasmáticos de D-Di, PAI-1, FVIII e FvW no grupo controle e em usuárias de TRH oral, expressos como médias, desvios padrão, mediana, valores mínimos e máximos, e valor de p.

Marcador	Controle (n=101)		TRH (n=61)		p
	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	
D-Di (ng/mL)	335,67 ± 132,68	319,67 (99,88 - 820,40)	527,15 ± 420,51	379,52 (145,00- 1956,07)	0,006*
PAI-1 (ng/mL)	38,47 ± 22,61	34,43 (2,54- 129,34)	29,57 ± 16,89	28,82 (2,00- 63,09)	0,009*
FVIII (%)	100,22 ± 29,25	98,00 (51,70 - 187,90)	112,73 ± 35,42	104,20 (60,80 - 229,60)	0,047*
FvW (ng/mL)	6,12 ± 1,88	5,79 (0,35 - 10,55)	6,40 ± 2,10	6,58 (2,38 - 10,85)	0,379

D-Di: D dímero; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1; FVIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand

Teste-t de *Student*: FvW; Teste de Mann-Whitney: D-Di, PAI-1 e FVIII

* Indica significância para $p < 0,05$

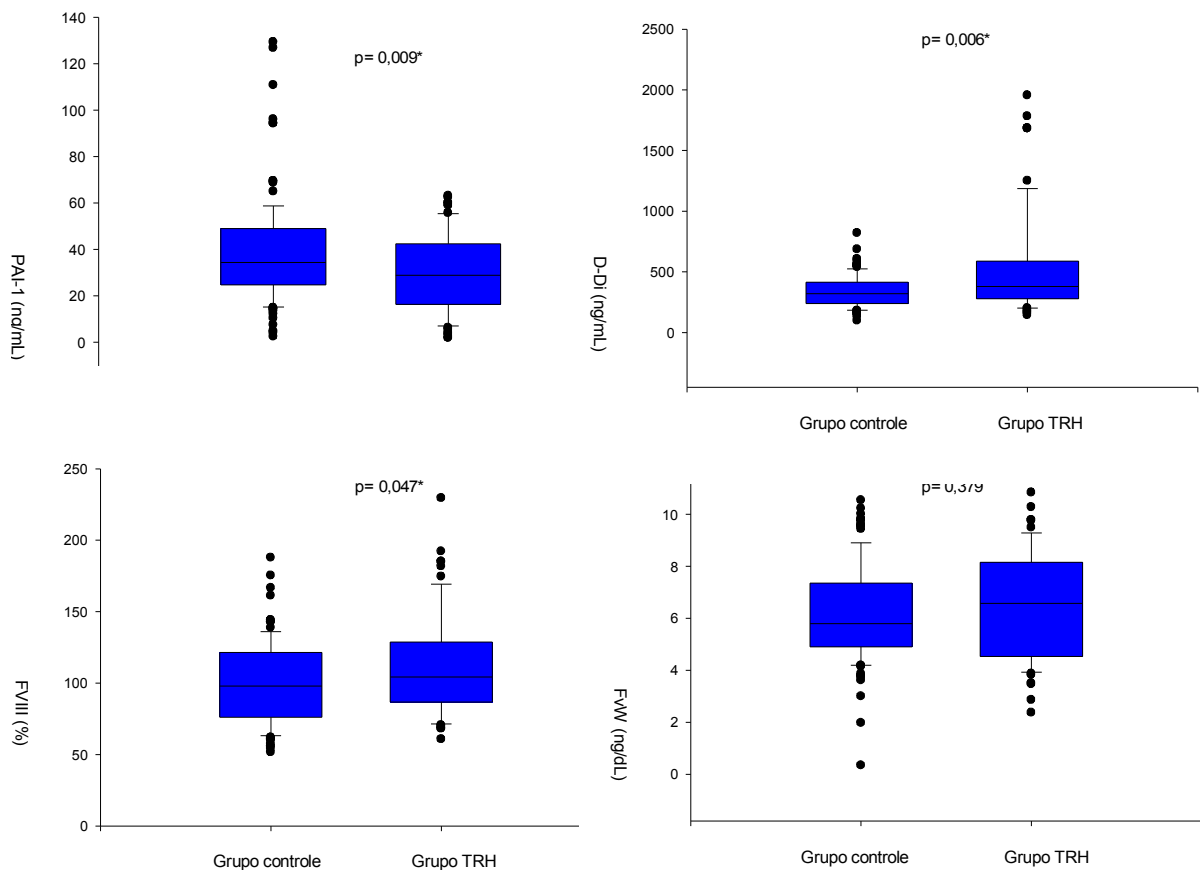


Figura 13 – Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) e D-Di (ng/mL), FVIII (%) e FvW (ng/mL), das participantes dos grupos controle (n=101) e usuárias de TRH oral (n=61), com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

Na **Figura 13**, os gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de FVIII (%), e D-Di (ng/mL) mostram nas participantes usuárias de TH oral, comparadas com o grupo controle, aumento de todos os percentis (10°, 25°, 50°, 75° e 90°), além de aumento também na amplitude de variação nos níveis de D-Di e FVIII, correspondente às pessoas que estão entre o 75° e 90° percentis, bem como dos *outliers*, inclusive ultrapassando os valores de referência.

As correlações significativas entre os marcadores de hipercoagulabilidade avaliados encontram-se apresentadas na **Tabela 3**. Foi observada correlação positiva entre os níveis plasmáticos de FvW e FVIII no grupo controle, e entre FvW e FVIII, FVIII ou FvW e D-Di no grupo de mulheres usuárias de TH.

Tabela 3- Coeficiente de Correlação (r) de Spearman e valor de p para os marcadores FVIII, FvW, D-Di, nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral.

Grupo	Marcadores	r	p
Controle	FVIII e FvW	0,40	<0,0001*
TH oral	FVIII e FvW	0,28	0,03*
	FVIII e D-Di	0,41	0,001*
	FvW e D-Di	0,27	0,03*

r: Coeficiente de Correlação; D-Di: D dímero; FVIII: Fator VIII;

FvW: Fator von Willebrand

* Indica significância para $p < 0,05$

5.5 AVALIAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO ABO E SUA CORRELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE FVIII, FvW, D-Di E PAI-1

Após a determinação fenotípica do grupo sanguíneo, as participantes do estudo foram distribuídas de acordo com o grupo sanguíneo, nos seguintes subgrupos: O, A, B, AB e não-O. A **Tabela 4** mostra as médias e desvios padrão obtidos nas dosagens de FVIII, FvW e D-Di de acordo com os grupos sanguíneos O, A, B, AB e não-O.

Entre as participantes de um mesmo grupo (controle ou usuárias de TH) foram comparados os níveis plasmáticos de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1 de acordo com o grupo sanguíneo. Entre as participantes do grupo controle, foi observada diferença significativa em relação aos níveis de FVIII, comparando-se os seguintes grupos sanguíneos: O e B ($p = 0,001$), O e AB ($p = 0,073$), A e B ($p = 0,018$), e O e não-O ($p = 0,028$). Entre as usuárias de TH foi observada diferença significativa nos níveis de FVIII, entre as mulheres dos grupos sanguíneos O e A ($p = 0,014$), B e AB ($p = 0,033$), O e AB ($p = 0,049$) e entre O e não-O ($p = 0,011$).

Em relação aos níveis de FvW, foi observada diferença significativa nas participantes do grupo controle, comparando-se os grupos sanguíneos O e A ($p = 0,005$), O e B ($p = <0,001$), O e AB ($p = 0,010$), A e B ($p = 0,035$), e entre O e não-O ($p = 0,0006$). Nas usuárias de TH foi observada diferença significativa nos níveis de FvW para as comparações entre O e B ($p = 0,013$), e O e não-O ($p = 0,016$).

Os níveis de D-Di foram significativamente diferentes comparando-se as participantes do grupo controle, pertencentes aos grupos sanguíneos O e B ($p < 0,001$), A e B ($p = 0,013$), B e AB ($p = 0,040$), enquanto entre as usuárias de TH foi observada diferença significativa comparando-se mulheres dos grupos O e B ($p = 0,033$), e entre O e não-O ($p = 0,006$). No entanto, os níveis de PAI-1 não variaram

entre as participantes do grupo controle ou usuárias de TH, de acordo com o grupo sanguíneo.

A **Tabela 5** e a **Figura 14** mostram os resultados obtidos na comparação dos níveis plasmáticos de FVIII, FvW e D-Di dentro do mesmo grupo (controle ou usuárias de TH) entre mulheres dos grupos sanguíneos O e não-O. Observa-se que houve aumento significativo nos níveis de FVIII e FvW entre as mulheres que pertencem aos grupos sanguíneos não-O, comparado às mulheres grupo O.

Posteriormente, foi realizada a comparação dos níveis plasmáticos de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1 entre controles e usuárias de TH, pertencentes ao mesmo grupo sanguíneo. Em relação aos níveis plasmáticos de FVIII, foi observada diferença significativa comparando-se controles e usuárias de TH dos grupos sanguíneos A ($p=0,005$) e não-O ($p=0,023$). Para os níveis de FvW, não foi observada diferença significativa comparando-se controles e mulheres sob TH oral, pertencentes ao mesmo grupo sanguíneo. Em relação aos níveis de D-Di, foi observada diferença significativa comparando controles e usuárias de TH dos grupos sanguíneos A ($p=0,023$), AB ($p=0,010$), O ($p=0,049$) e não-O ($p=0,003$). Os níveis de PAI-1 foram significativamente menores em mulheres usuárias de TH oral pertencentes ao grupo sanguíneo O ($p=0,007$), no entanto, entre as mulheres dos grupos sanguíneos não-O não foi observada diferença significativa ($p=0,259$) nos níveis desse marcador. A **Tabela 6** e a **Figura 14** mostram apenas os resultados das comparações entre controles e usuárias de TH dos grupos sanguíneos O e não-O.

Tabela 4 - Níveis plasmáticos de FVIII, FvW, D-Di e PAI-1 das mulheres dos grupos controle e usuárias de TH, de acordo com o grupo sanguíneo, expressos como médias e desvios padrão, mediana, valores mínimo e máximo.

Marcador/grupo	Grupo sanguíneo*				
	O	A	B	AB	Não-O
FVIII (%) (Controle)	93,07 ± 26,26 89,70 (51,70 - 142,90)	100,96 ± 28,13 105,55 (54,10 - 166,70)	126,60 ± 36,58 120,65 (74,50 - 187,90)	121,43 ± 16,52 128,20 (102,60-133,50)	106,74 ± 30,74 108,70 (54,10 - 187,90)
FVIII (%) (TH)	102,45 ± 33,71 92,00 (60,80 - 181,80)	125,91 ± 38,04 117,85 (85,80 - 229,60)	108,66 ± 14,52 103,60 (93,30 - 137,80)	153,55 ± 45,00 153,55 (114,80-192,30)	122,68 ± 34,68 113,60 (85,80-229,60)
FvW (ng/mL) (Controle)	5,31 ± 1,35 5,02 (3,00 - 9,41)	6,36 ± 1,99 6,10 (0,35 - 10,02)	7,86 ± 1,75 7,77 (5,01 - 10,55)	7,53 ± 2,11 7,88 (5,26 - 9,45)	6,70 ± 2,02 6,51 (0,35 - 10,55)
FvW (ng/mL) (TH)	5,80 ± 1,97 5,17 (2,38 - 9,77)	6,57 ± 2,19 6,14 (3,47 - 10,85)	7,73 ± 1,91 8,10 (3,83 - 10,28)	7,76 ± 0,79 7,76 (7,20 - 8,32)	6,98 ± 2,09 7,20 (3,47 - 10,85)
D-Di (ng/mL) (Controle)	306,12 ± 110,41 308,17 (99,88 - 555,15)	341,04 ± 137,96 317,50 (155,71- 820,40)	467,53 ± 143,29 504,96 (254,78 - 686,69)	356,61 ± 36,00 350,51 (324,05-395,27)	364,89 ± 142,54 330,51 (155,71 -820,40)
D-Di (ng/mL) (TH)	439,53 ± 340,18 339,66 (145,00-1683,35)	544,87 ± 393,57 386,89 (255,01-1783,35)	802,09 ± 649,36 416,75 (233,80-1956,07)	527,04 ± 21,92 527,04 (511,54-542,54)	618,40 ± 474,18 416,75 (233,80-1956,07)
PAI-1 (ng/mL) (Controle)	41,05 ± 26,33 34,23 (10,40-129,34)	36,94 ± 19,69 34,86 (2,54-110,86)	40,28 ± 25,84 33,89 (13,47-94,35)	32,04 ± 24,73 38,00 (4,88-53,24)	37,28 ± 20,77 34,51 (2,54-110,86)
PAI-1 (ng/mL) (TH)	28,08 ± 17,05 29,17 (2,00-62,53)	31,40 ± 14,05 29,03 (9,39-56,78)	36,12 ± 25,38 41,99 (4,25-73,09)	18,99 ± 21,93 18,99 (3,48-34,50)	31,97 ± 18,15 29,23 (3,48-73,09)

D-Di: D dímero; FVIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio

* Comparações estatísticas são descritas no texto

Tabela 5 – Comparação dos grupos sanguíneos O e não-O, das mulheres dos grupos controle e usuárias de TH, em relação aos níveis plasmáticos de FVIII, FvW e D-Di, expressos como média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, e valor de p.

Marcador/grupo	Grupo sanguíneo				p
	O	Não-O			
	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	
FVIII (%)	93,07 ± 26,26	89,70	106,74 ± 30,74	108,70	0,028*
(Controle)		(51,70 - 142,90)		(54,10 - 187,90)	
FVIII (%)	102,45 ± 33,71	92,00	122,68 ± 34,68	113,60	0,011*
(TH)		(60,80 - 181,80)		(85,80 - 229,60)	
FvW (ng/mL)	5,31 ± 1,35	5,02	6,70 ± 2,02	6,51	0,0006*
(Controle)		(3,00 - 9,41)		(0,35 - 10,55)	
FvW (ng/mL)	5,80 ± 1,97	5,17	6,98 ± 2,09	7,20	0,016*
(TH)		(2,38 - 9,77)		(3,47 - 10,85)	
D-Di (ng/mL)	306,12 ± 110,41	308,17	364,89 ± 142,54	330,51	0,078
(Controle)		(99,88 - 555,15)		(155,71 - 820,40)	
D-Di (ng/mL)	439,53 ± 340,18	339,66	618,40 ± 474,18	416,75	0,006*
(TH)		(145,00 - 1683,35)		(233,80 - 1956,07)	
PAI-1 (ng/mL)	41,05 ± 26,33	34,23	37,28 ± 20,77	34,51	0,396
(Controle)		(10,40-129,34)		(2,54-110,86)	
PAI-1 (ng/mL)	28,08 ± 17,05	29,17	31,97 ± 18,15	29,23	0,389
(TH)		(2,00-62,53)		(3,48-73,09)	

D-Di: D dímero; FVIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand

- Indica significância para $p < 0,05$, valor de p obtido por ANOVA, seguida de teste-t.

Tabela 6 – Comparação dos níveis plasmáticos de FVIII, FvW e D-Di nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH, pertencentes aos grupos sanguíneos O e não-O, expressos como média, desvio padrão, e valor de p.

Marcador	Grupo sanguíneo					
	O x O			Não-O x Não-O		
	Grupo Controle (média ± desvio padrão)	Grupo TH (média ± desvio padrão)	p	Grupo Controle (média ± desvio padrão)	Grupo TH (média ± desvio padrão)	p
FVIII (%)	93,07 ± 26,26	102,45 ± 33,71	0,198	106,74 ± 30,74	122,68 ± 34,68	0,023*
FvW (ng/mL)	5,31 ± 1,35	5,80 ± 1,97	0,335	6,70 ± 2,02	6,98 ± 2,09	0,492
D-Di (ng/mL)	306,12 ± 110,41	439,53 ± 340,18	0,049*	364,89 ± 142,54	618,40 ± 474,18	0,003*
PAI-1(ng/mL)	41,05 ± 26,33	28,08 ± 17,05	0,007*	37,28 ± 20,77	31,97 ± 18,15	0,259

D-Di: D dímero; FVIII: Fator VIII; FvW: Fator von Willebrand;

* Indica significância para $p < 0,05$, valor de p obtido por ANOVA, seguida de teste-t.

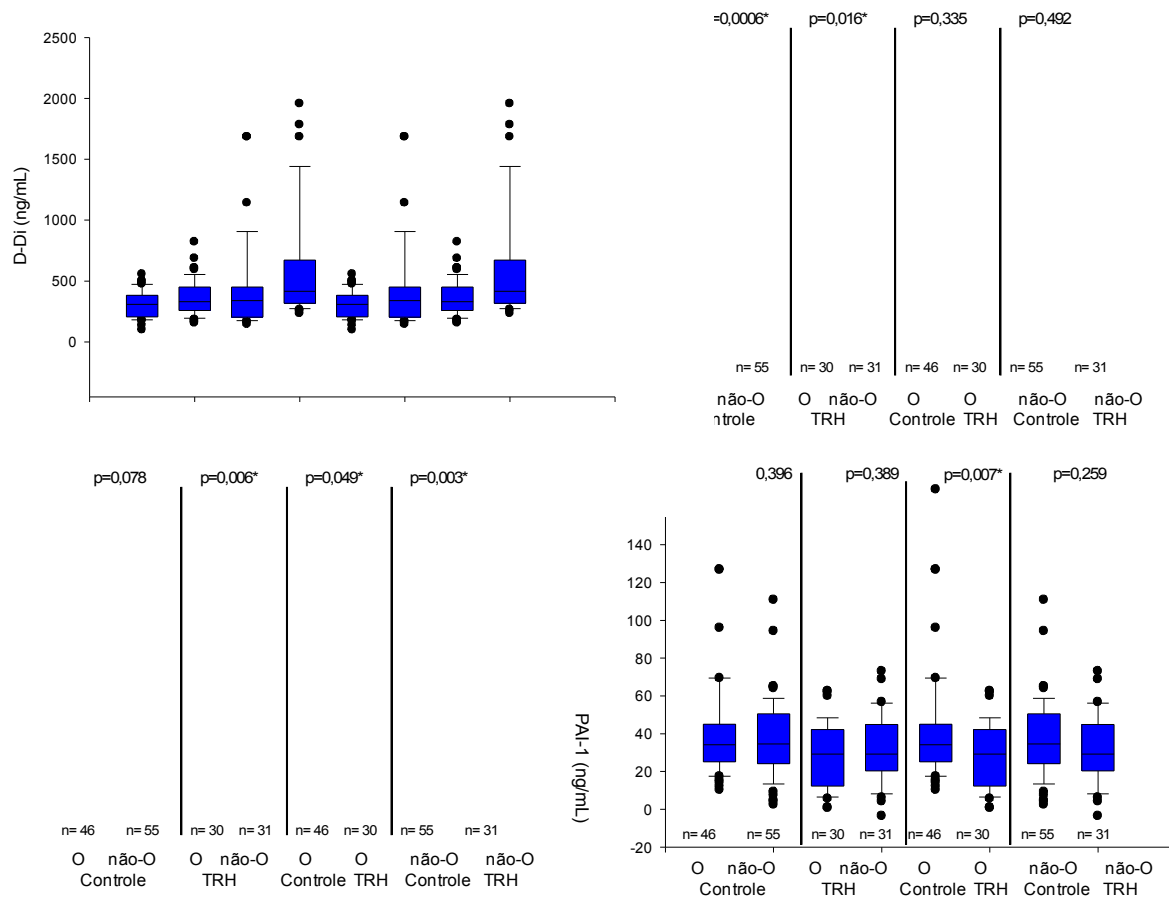


Figura 14 – Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de FVIII (%), FvW (ng/mL), D-Di (ng/mL) e PAI-1 (ng/mL) das participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral, pertencentes aos grupos sanguíneos O e não-O, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). Valor de p obtido por ANOVA, seguida de teste-t. * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

Em seguida, as participantes foram classificadas de acordo com os níveis de D-Di em relação ao valor de referência (500 ng/mL) para esse marcador de geração de fibrina. Para essa análise, foram calculados valores de *odds ratio* (OR) em relação ao uso de TH e/ou grupo sanguíneo das participantes, indicando o risco que as mesmas apresentam de ativação da cascata da coagulação seguido de formação de fibrina. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 7**. Mulheres usuárias de TH apresentam aumento de cerca de 3 vezes no risco de apresentar valores de D-Di acima do valor de referência, comparadas às mulheres do grupo controle (OR=3,22, IC: 1,54-6,72). Mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos não-O apresentam maior risco de apresentar valores de D-Di acima do valor de referência, sendo este resultado observado nos grupos controle (OR= 6,81; IC: 1,16-28,43) e entre as

usuárias de TH oral (OR= 3,92; IC: 1,32-11,61). As mulheres usuárias de TH oral e pertencentes aos grupos sanguíneos não-O mostraram um risco 25 vezes maior de apresentar níveis de D-Di elevados (OR= 25,14; IC: 5,61-109,24), comparando com portadoras do tipo sanguíneo O do grupo controle.

Tabela 7- Odds ratio, intervalo de confiança (95%) e valor de p para as mulheres que apresentaram níveis elevados de D-Di (>500ng/mL).

Grupo	Grupo sanguíneo	D-Di >500ng/mL (n)	D-Di <500ng/mL (n)	p	OR	IC
Controle	-	15	86		Referência	
TH	-	23	38	0,002*	3,22	1,54-6,72
Controle	O	2	44		Referência	
Controle	Não-O	13	42	0,010*	6,81	1,16-28,43
TH	O	7	24		Referência	
TH	Não-O	16	14	0,018*	3,92	1,32-11,61
Controle	O	2	44		Referência	
TH	O	7	24	0,026*	6,42	1,38-29,16
TH	Não-O	16	14	<0,0001*	25,14	5,61-109,24
Controle	Não-O	13	42		Referência	
TH	Não-O	16	14	0,032*	2,41	1,08-5,37

D-Di: D dímero; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança (95%)
teste χ^2 : para $n \geq 5$; teste exato de Fisher: para $n \leq 5$.

* Indica significância para $p < 0,05$

5.6 CORRELAÇÃO DO POLIMORFISMO -675 4G/5G NO GENE DO PAI-1 COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PAI-1

Após a determinação do polimorfismo -675 4G/5G, as participantes do estudo foram distribuídas de acordo com os genótipos apresentados. Entre as mulheres do grupo controle houve diferença significativa nos níveis deste marcador comparando os genótipos 4G/4G com 5G/5G ($p= 0,040$) e 4G/5G com 5G/5G ($p= 0,034$), estes resultados encontram-se na **Figura 15**. Entre as mulheres usuárias de TH oral não foi observada diferença significativa em relação aos níveis de PAI-1 de acordo com o polimorfismo inserção/deleção 4G/5G.

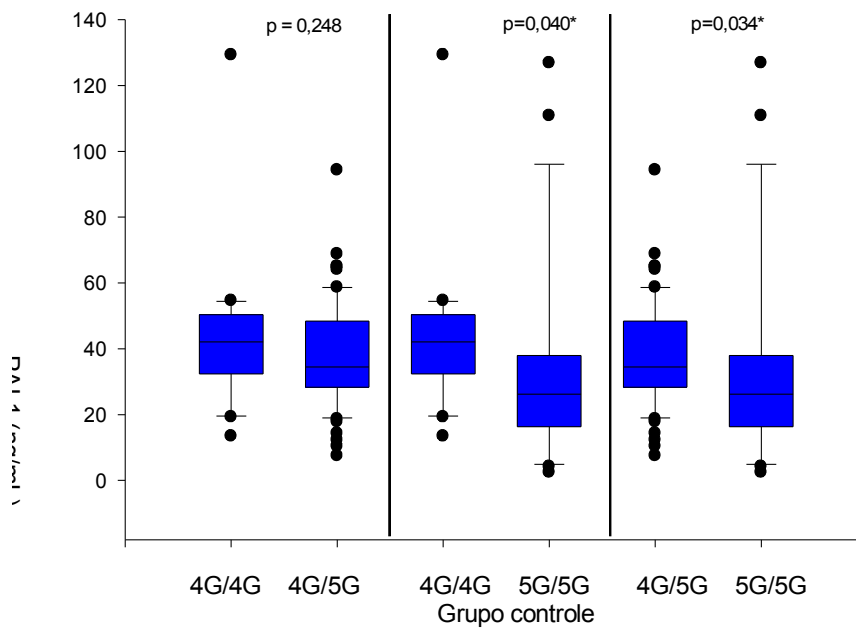


Figura 15 – Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 das participantes do grupo controle, de acordo com os genótipos do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

A correlação entre os níveis plasmáticos de PAI-1 e os genótipos do polimorfismo deleção/inserção 4G/5G no gene do *PAI-1* encontra-se apresentada na **Tabela 8** e na **Figura 16**. Comparando os grupos controle e usuárias de TRH em relação aos genótipos do polimorfismo 4G/5G, observou-se diminuição significativa nos níveis de PAI-1 nas mulheres usuárias de TRH homocigotas 4G/4G ($p=0,022$) e nas heterocigotas ($p=0,018$) para o polimorfismo 4G/5G.

Tabela 8 - Níveis plasmáticos de PAI-1 de acordo com os genótipos do polimorfismo -675 4G/5G no gene do PAI-1, expressos como média, desvios padrão, mediana, valores mínimo e máximo, e valor de p.

Poli morfismo	Níveis de PAI-1 (ng/mL)				p
	Controle		TRH		
	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	
4G/4G	44,33 ± 25,33	42,13 (13,47-29,34)	25,05 ± 15,56	24,50 (7,97-58,97)	0,022*
4G/5G	38,35 ± 16,13	34,43 (7,53-94,35)	30,32 ± 17,35	29,38 (2,00-63,09)	0,018*
5G/5G	35,77 ± 32,19	26,16 (2,54-126,87)	30,53 ± 16,92	31,58 (5,70-55,74)	0,785

PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1

* Indica significância para $p < 0,05$, valor de p obtido por ANOVA, seguida de teste-t.

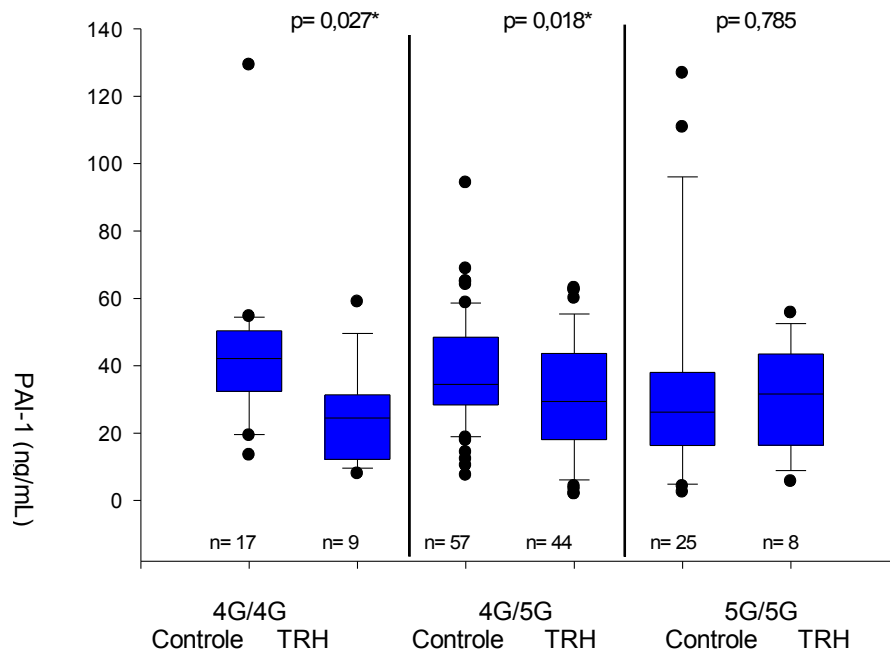


Figura 16 – Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 das participantes dos grupos controle e usuárias de TRH oral, de acordo com os genótipos do polimorfismo 4G/5G no gene do PAI-1, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10º, 25º, 50º, 75º e 90º percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10º e 90º percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

5.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E DAS APOLIPOPROTEÍNAS A-1 E B

Mediante a observação de que várias mulheres na pós-menopausa apresentam dislipidemia, a avaliação do perfil lipídico e das apo A-I e apo B foram incluídas neste estudo. Os parâmetros analisados para a determinação do perfil lipídico foram as concentrações no soro de CT, HDLc, LDLc e TG. Os resultados das médias e desvios padrão, medianas e valores mínimos e máximos, obtidos para os grupos controle e usuária de TRH oral se encontram na tabela 8.

Neste estudo, foram consideradas como dislipidemicas as mulheres com diagnóstico médico prévio desta alteração, sendo que muitas delas, como estavam sob medicação adequada, apresentaram níveis normais de CT. As mulheres que possuíam CT superior a 240 mg/dL, ou valores aumentados de ambos LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL) também foram consideradas como dislipidêmicas, de acordo com IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (RESUMO, 2007).

Como pode ser observado na **Tabela 9**, mulheres usuárias de TH em comparação com o grupo controle, apresentaram alterações significativamente favoráveis no perfil lipídico, como diminuição dos níveis de CT ($207,08 \pm 44,28$ vs $192,18 \pm 48,01$), LDLc ($130,90 \pm 37,11$ vs $118,53 \pm 41,40$), e apo B ($108,04 \pm 21,01$ vs $101,35 \pm 18,54$), além do aumento significativo nos níveis de HDLc ($45,89 \pm 9,48$ vs $49,55 \pm 11,11$) e apo A-I ($179,62 \pm 26,25$ vs $188,72 \pm 33,60$). Não foi observada alteração significativa nos níveis de TG entre os grupos. Pode-se observar também, uma diminuição significativa nos índices TC/HDLc ($4,80 \pm 1,92$ vs $4,05 \pm 1,32$), LDLc/HDLc ($3,01 \pm 1,12$ vs $2,52 \pm 1,03$), e apoB/apoA-I ($0,62 \pm 0,16$ vs $0,56 \pm 0,14$). As **Figuras 17 e 18** também ilustram estes resultados.

Tabela 9 – Níveis plasmáticos de colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides, apolipoproteína A-I, apolipoproteína B, e os índices CT/HDLc, LDLc/HDLc, apo B/apo A-I em mulheres do grupo controle e em uso de TH.

	Controle (n=101)		TH Oral (n=61)		p
	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	média ± desvio padrão	mediana (valores mínimo e máximo)	
TC (mg/dL)	207,08 ± 44,28	200,00 (119,00-390,00)	192,18 ± 48,01	180,00 (120,00-436,00)	0,005*
HDLc (mg/dL)	45,89 ± 9,48	46,00 (21,00-67,00)	49,55 ± 11,11	48,50 (32,00-77,00)	0,029 *
LDLc (mg/dL)	130,90 ± 37,11	127,00 (71,00-350,00)	118,53 ± 41,40	111,50 (51,00-270,00)	0,014 *
TG (mg/dL)	151,86 ± 95,79	134,50 (43,00 – 648,00)	134,52 ± 67,08	111,00 (44,00 – 366,00)	0,214
TC/HDLc	4,80 ± 1,92	4,41 (2,61-18,17)	4,05 ± 1,32	3,86 (1,99-7,65)	0,002*
LDLc/HDLc	3,01 ± 1,12	2,82 (1,30-8,14)	2,52 ± 1,03	2,35 (0,98-4,93)	0,005*
apo A-I (mg/dL)	179,62 ± 26,25	178,50 (116,00-249,00)	188,72 ± 33,60	189,00 (110,00-280,00)	0,046*
apo B (mg/dL)	108,04 ± 21,01	106,80 (69,10-166,20)	101,35 ± 18,54	98,30 (43,70-145,70)	0,043*
apoB/apoA-I	0,62 ± 0,16	0,60 (0,35-1,01)	0,56 ± 0,14	0,54 (0,17-0,97)	0,005*

CT: colesterol total; HDLc: lipoproteína de alta densidade; LDLc: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicérides;

apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B: apolipoproteína B

Teste de Mann-Whitney: CT, LDLc, TRG, TC/HDLc, LDLc/HDLc, apo B e apoB/apo A-I

Teste t: HDLc e apo B

* Indica significância para $p < 0,05$

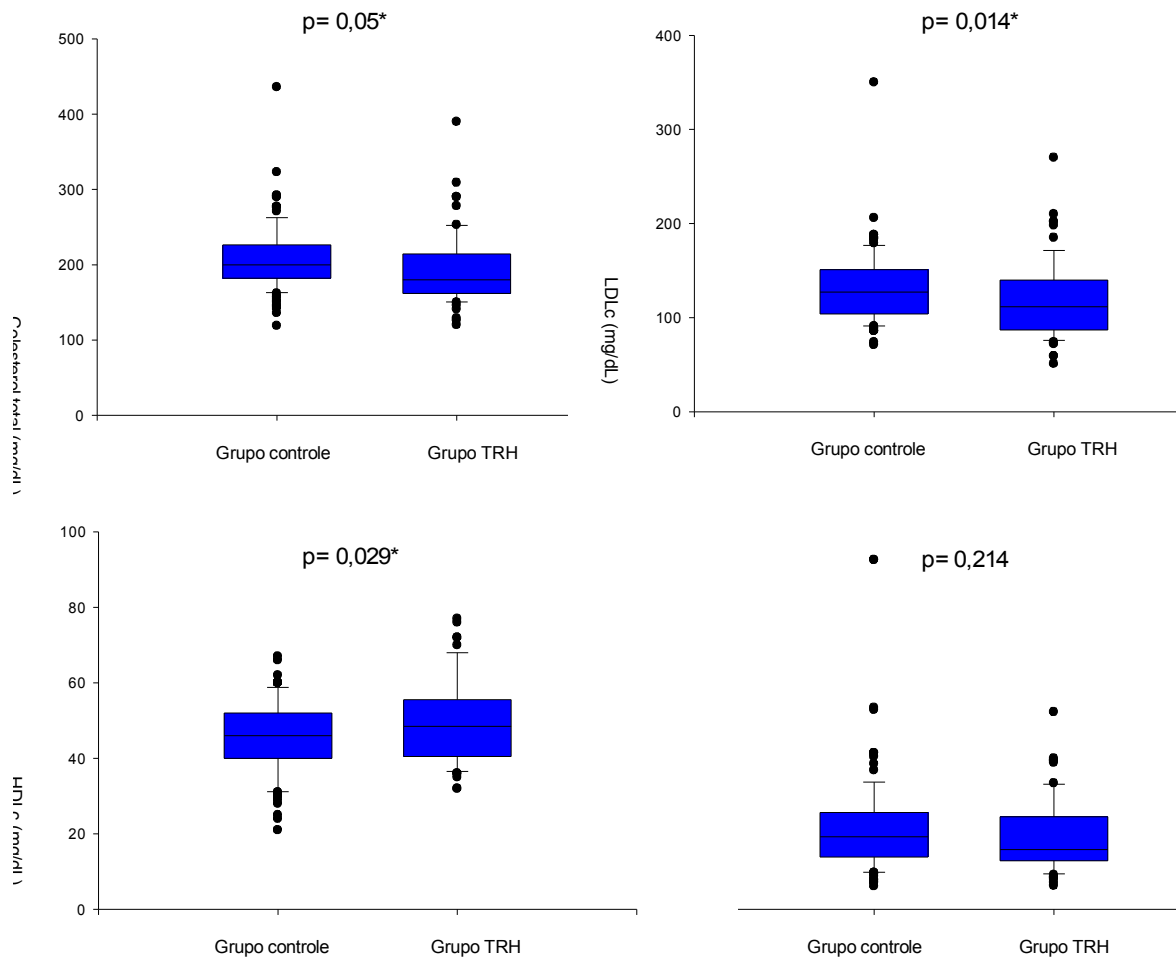


Figura 17 – Gráficos *Box-plots* correspondentes aos níveis plasmáticos de CT (mg/dL), HDL-C (mg/dL) e LDLc (mg/dL) das participantes dos grupos controle e usuárias de TRH oral, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

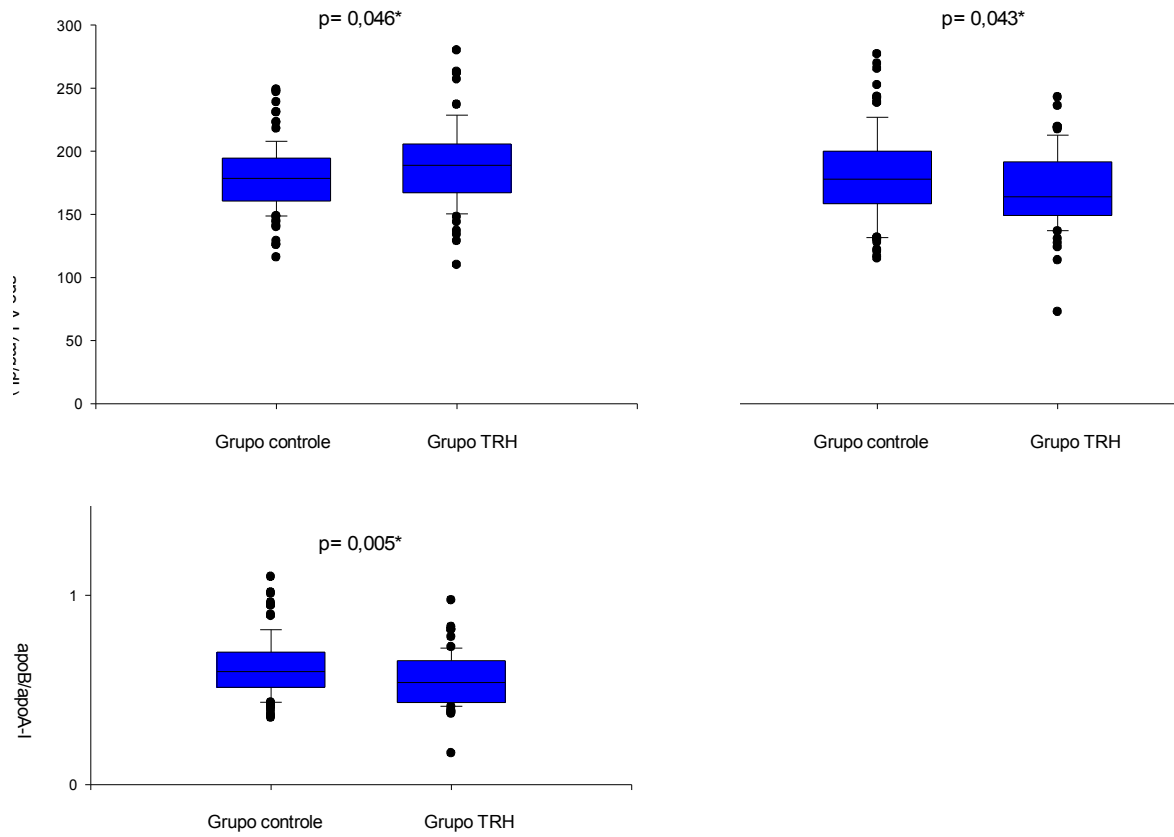


Figura 18 - Box-plots correspondentes aos níveis plasmáticos de apo a-I (mg/dL), apo B (mg/dL) e índice apoB/apoA-I das participantes dos grupos controle e usuárias de TRH oral, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis, bem como os *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). * Valor de p significativo ($p < 0,05$).

Foram observadas correlações positivas (**Tabela 10**) entre os níveis de CT e apo B nos grupos controle ($r= 0,22$, $p=0,031$) e sob TH ($r= 0,64$, $p<0,0001$), entre TG e apo B ($r= 0,50$, $p<0,0001$) e entre LDLc e PAI-1 ($r= 0,31$, $p= 0,015$) no grupo de mulheres sob TH, e entre o índice apoB/apoA-I e CT ($r=0,19$, $p= 0,05$) e entre apo A-I e HDLc ($r= 0,35$, $p=0,0004$), no grupo controle.

Tabela 10- Coeficiente de Correlação (r) de Pearson e valor de p para os marcadores do perfil lipídico, nas participantes dos grupos controle e usuárias de TH oral

Grupo	Marcadores	r	p
Controle	CT e apoB	0,22	0,031*
	apo A-I e HDLc	0,35	0,0004*
	apoB/apoA-I e CT	0,19	0,05*
TH oral	CT e ApoB	0,64	<0,0001*
	TG e apo B	0,50	<0,0001*
	LDLc e PAI-1	0,31	0,015*

r: Coeficiente de Correlação; CT: colesterol total; HDLc: lipoproteína de alta densidade; LDLc: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicérides; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B: apolipoproteína B

* Indica significância para $p < 0,05$

6 *DISCUSSÃO*

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Foram observadas, entre as participantes do estudo, características clínicas tais como hipertensão, dislipidemia, tabagismo, osteoporose, algumas delas consideradas fatores de risco para trombose arterial. Entre as mulheres nesta faixa etária é comum a incidência de, pelo menos, uma dessas características o que dificultou a seleção de participantes que não apresentassem as mesmas, bem como o pareamento ideal entre grupo controle e grupo experimental. Assim, devido à dificuldade de encontrar mulheres usuárias de TH oral, sob o mesmo esquema terapêutico, e que não possuíssem qualquer fator de risco para trombose venosa e/ou arterial, foram incluídas no estudo mulheres que apresentavam alguns destes fatores, como listado na **Tabela 1**. Não houve diferença significativa, no entanto, para a maioria das características clínicas (idade, tabagismo, osteoporose, diabetes mellitus, artrite reumatóide, dislipidemia, hipertensão e com doença cardiovascular) entre os dois grupos. No entanto, mulheres do grupo controle apresentaram IMC significativamente superior ao grupo de usuárias de TH oral.

É importante ressaltar que a faixa etária das participantes deste estudo foi inferior à de outros estudos descritos na literatura (WOMENS'S HEALTH INITIATIVE, 2002), correspondendo à média de $52,43 \pm 6,16$ anos para o grupo controle e $53,55 \pm 5,59$ anos para as mulheres usuárias de TH oral.

A investigação da presença da mutação no gene do *Fator V* (G1691A) demonstrou que nenhuma das participantes do estudo era portadora dessa mutação. As duas mulheres portadoras da mutação G20210A no gene da *protrombina* em heterozigose foram excluídas. Embora as duas mutações sejam pouco freqüentes na população brasileira, a inclusão de mulheres portadoras das mesmas de forma aleatória, poderia influenciar a avaliação dos parâmetros hemostáticos. Estudos anteriores (ROSENDAAL *et al.*, 2002b; HERRINGTON *et al.*, 2002a; WU *et al.*, 2005b; SMITH *et al.*, 2006) demonstraram um sinergismo entre a mutação FVL e TH, uma vez que as usuárias apresentaram um risco de trombose cerca de 13 a 15 vezes maior que o grupo controle.

É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos realizados até o momento não excluíram mulheres portadoras das mutações nos genes do *FV* e *protrombina* e nenhum estudo avaliou a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO sobre

os marcadores de hipercoagulabilidade, ativação da cascata da coagulação ou fibrinólise em mulheres em TRH.

6.2 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE HIPERCOAGULABILIDADE

Neste estudo, mulheres brasileiras na pós-menopausa e usuárias de TH oral por um período médio de 3,3 meses, quando comparadas com um grupo controle, apresentaram aumento estatisticamente significativo nos níveis de D-Di e FVIII e diminuição dos níveis de PAI-1 (**Tabela 2**). Embora os níveis FvW não tenham apresentado diferença significativa, comparando os dois grupos, foi observada aumento nos níveis deste fator nas mulheres usuárias de TH oral, como pode ser observada na **Figura 13**, indicada pelo aumento da mediana, do valor mínimo e da amplitude interquartilica.

O tromboembolismo venoso (TEV) é um dos importantes efeitos adversos da TRH (MILLER *et al.*, 2002; CANONICO *et al.* 2008b). No entanto, os mecanismos pelos quais a TH aumenta o risco de TEV ainda não estão claros. O uso da TH está relacionada ao aumento de fatores procoagulantes (FVII, FVIII, FX, FXII, FVIII, FvW) (LOWE *et al.*, 2001, VEHKAVAARA *et al.*, 2001) e redução dos anticoagulantes naturais (AT, PC e PS) (CUSHMAN *et al.*, 2001; SALOBIR *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2005; COSMAN *et al.*, 2005; ZEGURA *et al.*, 2006; KERAMARIS *et al.*, 2007; SGARABOTTO *et al.*, 2007; GUIMARÃES, *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm investigado os efeitos da TH por meio de marcadores específicos da geração de trombina (F1+2, TAT e D-Di), além dos níveis plasmáticos e/ou atividade do PAI-1, o qual reflete o potencial fibrinolítico, e possíveis alterações nos níveis dos anticoagulantes naturais, mas ainda assim os relatos são inconsistentes entre os estudos. Alguns estudos relatam que o uso da TH ou TE aumenta significativamente F1+2 ou TAT (TEED *et al.*, 2000; HOIBRAATEN *et al.*, 2001; SGARABOTTO *et al.*, 2007; GUIMARÃES, *et al.*, 2009), enquanto outros relatam que não há aumento significativo sobre os níveis destes marcadores em usuárias de TH (KOH *et al.* 1999a; DOUKETIS *et al.*, 2000; SALOBIR *et al.*, 2002; EILERTSEN *et al.*, 2006; BONDUCK *et al.*, 2007). Níveis elevados de D-Di após o uso de TRH foram encontrados também em outros estudos (KOH *et al.*, 1999a; TEEDE *et al.*, 2000; VEKAVAARA *et al.*, 2001; SALOBIR *et al.*, 2002; COSMAN, *et al.*, 2005; COSMAN *et al.*, 2005; ZEGURA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009),

embora alguns autores não tenham observado esta alteração (VIGEN *et al.*, 2007; FAIT *et al.*, 2008).

Nossos dados demonstraram claramente uma hiperativação do sistema hemostático em algumas mulheres sob TH. Conforme relatado anteriormente por Guimarães *et al.* (2009), foi observada uma redução nos níveis dos anticoagulantes naturais PS e AT, em mulheres em uso desta terapia oral ou transdérmica, respectivamente. Partindo desta premissa, pode-se admitir que os níveis elevados de FVIII observados em mulheres sob TH poderiam ser explicados em parte por comprometimento do sistema da anticoagulação natural mediado pelas proteínas C e S, o qual age proteolizando os fatores VIIIa e Va. Então níveis reduzidos de anticoagulantes naturais poderiam resultar em níveis mais elevados destes fatores contribuindo para maior produção de trombina e, conseqüentemente, de fibrina. Por outro lado, no presente estudo observou-se níveis reduzidos de PAI-1 em mulheres sob TRH, o que confere maior eficiência ao sistema fibrinolítico resultando em maior degradação da fibrina possibilitando o encontro de níveis mais elevados de D-Di. Dessa forma, obter-se-ia o equilíbrio hemostático prevenindo o aparecimento do estado pró-trombótico. Diante dos achados do presente estudo, aliados aos da literatura, é possível que mulheres que já apresentam uma leve deficiência na anticoagulação natural possam ser mais vulneráveis a fenômenos tromboembólicos sob TH (CUSHMAN *et al.*, 2001; GOTTSÄTER *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2005; COSMAN *et al.*, 2005; SGARABOTTO *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2009).

No presente estudo, mulheres usuárias de TH oral apresentaram níveis de FVIII significativamente elevados, comparadas ao grupo controle, enquanto os níveis de FvW não variaram. No entanto, houve correlação positiva entre os níveis de FVIII e FvW tanto no grupo controle como em usuárias de TH, mostrando que a regulação dos níveis plasmáticos do FVIII é dependente da complexação ao FvW, conforme indicado na literatura (SOUTO *et al.*, 2000; COVAS & ZAGO, 2001). Por outro lado, houve correlação positiva e significativa entre os níveis de FVIII ou FvW e D-Di no grupo sob TR, sugerindo que a TH oral influencia os níveis desses fatores, interferindo com a ativação do sistema da coagulação e, conseqüentemente, nos níveis de D-Di.

Níveis elevados de FVIII estão relacionados ao aumento do risco de trombose venosa (RR= 4,8; IC: 2,3 - 10,0) (TSAI *et al.*, 2002; TRIPODI, 2003), incluindo

trombose recorrente (KYRLE *et al.*, 2000). Além disso, marcadores de geração de trombina (TAT e F1+2) foram significativamente elevados em indivíduos com atividade de FVIII aumentada (O'DONNELL *et al.*, 2001). Wu *et al.* (2005b) relacionaram o aumento da atividade de FVIII com risco de trombose em mulheres usuárias de anticoncepcional oral (OR= 8,80; IC: 4,13 – 18,75). Estudos anteriores (EILERTSEN *et al.*, 2007; SGARABOTTO *et al.* 2007) também encontraram aumento nos níveis de FVIII em mulheres usuárias de TH oral, embora, outros autores não observaram diferença significativa nos níveis de FVIII ou FvW em mulheres na pós-menopausa sob TH (GOTTSÄTER, *et al.* 2001; COSMAN, *et al.*, 2005). No entanto, cabe ressaltar que nesses estudos não foi avaliada a influência do grupo sanguíneo das participantes, o que pode explicar as diferenças encontradas, uma vez que a literatura mostra que indivíduos dos grupos sanguíneos não-O possuem níveis elevados de FVIII e FvW (KAMPHUISEN *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

O FVIII desempenha um papel crucial na fase de propagação da ativação da coagulação. Uma vez formado o complexo FIXa/FVIIIa ocorrerá ativação do FX em FXa, que por sua vez ativará outros fatores culminando com a formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2006). Enquanto o FvW possui papel fundamental na hemostasia, formando pontes entre glicoproteínas plaquetárias e estruturas do endotélio vascular, sendo importante nos processos de adesão e agregação plaquetária. Diversas condições clínicas promovem um aumento da secreção de FvW pelo endotélio, resultando assim numa maior adesão e agregação plaquetária e consequente formação do trombo. Isto pode explicar a associação de níveis elevados de FVIII e FvW com o tromboembolismo e aterosclerose. Além disso, concentrações plasmáticas elevadas de FVIII estimulam a formação de trombina, o que intensifica a formação do trombo (RUGGERI, 1993; JAGER *et al.*, 1999). Da mesma forma, aumento nos níveis de FvW também foram associados ao risco de trombose (RR= 7,6; IC: 3,1 - 18) (TSAI *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado a correlação entre os níveis de FVIII e os grupos sanguíneos do sistema ABO e, conseqüentemente, trombose venosa. Indivíduos dos grupos sanguíneos A, B ou AB apresentam níveis elevados de FVIII e FvW e maior risco ao evento trombótico, quando comparados aos indivíduos do grupo sanguíneo O (SCHLEEF *et al.*, 2004; LARSEN *et al.*, 2005; MORELLI *et al.*,

2005). Assim é possível que as alterações nos níveis de FVIII observadas em usuárias de TH possam ser em parte relacionadas ao grupo sanguíneo. No entanto, poucos estudos têm correlacionado grupo sanguíneo e o risco de trombose venosa em mulheres na pós-menopausa usuárias ou não de TH. Além disso, diferenças na composição dos grupos avaliados em relação aos grupos sanguíneos poderiam explicar também as inconsistências quanto às alterações nos níveis de FVIII relatadas em diferentes estudos. Este se constituiu, portanto, em um dos principais objetivos desse estudo, sendo as participantes avaliadas quanto ao seu grupo sanguíneo e a influência do mesmo sob os marcadores de hipercoagulabilidade e fibrinólise.

Primeiramente, foram comparados os grupos estudados quanto à frequência dos diferentes grupos sanguíneos. A distribuição dos grupos sanguíneos das mulheres participantes nos grupos controle e usuárias de TH foi similar ($p=0,78$). Além disso, o grupo controle apresentou distribuição dos grupos sanguíneos do sistema ABO semelhante à obtida anteriormente em doadores de sangue de Minas Gerais (Fundação Hemominas, 2006).

Em mulheres participantes do grupo controle, o grupo sanguíneo afetou os níveis plasmáticos de FVIII. Mulheres do grupo sanguíneo O apresentaram níveis significativamente menores deste fator em comparação com as mulheres não-O. Além disso, as mulheres que possuem o grupo sanguíneo tipo O apresentaram níveis de FVIII significativamente menores que as mulheres tipo B ou AB, e mulheres tipo A apresentaram níveis menores que as mulheres do tipo B. Em relação aos níveis de FvW, foi observado nas participantes do grupo controle que as mulheres do grupo sanguíneo O apresentaram níveis deste fator significativamente menores que as mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos A, B, e AB e, conseqüentemente, menores que as não-O. Também se observou que mulheres do grupo A apresentaram níveis de FvW menores as do grupo B.

Esses dados estão de acordo com a literatura, uma vez que vários estudos mostram 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). Souto *et al* (2000) relataram que indivíduos do grupo AB têm níveis elevados de FvW, enquanto AA, AO, BB e BO possuem níveis intermediários.

A regulação dos níveis plasmáticos do FVIII é dependente da complexação ao FvW, do grupo sanguíneo e de estímulos endoteliais. Os grupos sanguíneos não-

O estão associados a níveis plasmáticos mais elevados de FVIII e FvW que o grupo sanguíneo O. Grande parte dos efeitos do grupo sanguíneo sobre os níveis plasmáticos de FVIII é mediada pelo FvW. O FvW é uma glicoproteína multimérica, que tem duas funções biológicas importantes: mediar a adesão plaquetária, nos locais de lesão vascular e atuar como transportador do FVIII, protegendo-o da inativação pela proteína C ativada e pelo FXa. No plasma, o FvW e o FVIII circulam unidos por ligações não covalentes, formando um complexo, constituído por 99% de FvW e 1% de FVIII (COVAS & ZAGO, 2001). O FvW apresenta uma diversidade de estruturas oligossacarídicas, incluindo moléculas similares aos antígenos do grupo sanguíneo A, B e H(O). Algumas de suas funções, como adesão plaquetária, susceptibilidade à degradação proteolítica e livre circulação, parecem ser afetadas pela remoção dos resíduos de açúcar, sugerindo que os carboidratos são importantes na relação estrutura/função do FvW. Provavelmente, determinantes do sistema ABO afetam o processo de liberação ou catabolismo do FvW, influenciando seus níveis plasmáticos e, indiretamente, os níveis de FVIII (KOSTER, *et al.*, 1995; SOUTO *et al.*, 2000; JENKINS & O'DONNELL, 2006).

Estudos recentes demonstraram que alterações na susceptibilidade de proteólise do FvW pela ADAMTS 13 representam um importante mecanismo pelo qual o grupo sanguíneo ABO pode afetar o catabolismo do FvW (JENKINS & O'DONNELL, 2006). A ADAMTS 13, uma metaloprotease, cliva grandes múltímeros do FvW, que são trombogênicos, prevenindo a agregação plaquetária e, conseqüentemente, afetando a homeostase do FvW e FVIII. O mecanismo pelo qual o grupo sanguíneo ABO afeta a proteólise do FvW permanece desconhecido. No entanto, a velocidade de proteólise deste fator é mais rápida em indivíduos do grupo sanguíneo O em comparação com não-O ($O \geq B > A \geq AB$) (BOWEN, 2003, citado por JENKINS & O'DONNELL, 2006).

As mesmas comparações anteriores foram realizadas para os níveis plasmáticos de D-Di. As participantes do grupo controle pertencentes ao grupo sanguíneo O apresentaram níveis plasmáticos de D-Di significativamente menores que as do grupo B. Também foi observada diferença significativa comparando as mulheres dos grupos A e B, e B com AB. A elevação dos níveis de D-Di indica uma maior geração de fibrina nas portadoras dos grupos sanguíneos não-O e que possivelmente está relacionada aos níveis elevados de FVIII e FvW que essas mulheres apresentaram. Como mencionado, o FVIII tem um papel fundamental na

fase de propagação da ativação da coagulação, geração de trombina, culminando com a formação do coágulo de fibrina. Posteriormente, a degradação da fibrina leva à formação de D-Di.

Como observado para o grupo controle, mulheres usuárias de TH oral pertencentes aos grupos sanguíneos não-O apresentaram níveis de FVIII e FvW significativamente mais elevados que mulheres do grupo O. No entanto, diferentemente do grupo controle, usuárias de TH dos grupos sanguíneos não-O, apresentaram níveis plasmáticos de D-Di significativamente superiores às portadoras do grupo O.

Vários outros fatores além dos grupos sanguíneos têm sido correlacionados ao aumento dos níveis plasmáticos de FVIII, tais como diabetes mellitus, uso de contraceptivos orais e TH. De forma similar, numerosos fatores influenciam a concentração plasmática do FvW, embora o sistema ABO é considerado um dos fatores de maior importância (SOUTO *et al.*, 2000; SOUSA *et al.*, 2007).

Torna-se importante, portanto, avaliar se as alterações observadas nos níveis de FVIII e FvW nas usuárias de TH relacionam-se ao grupo sanguíneo ou a TH, ou a ambos fatores. No presente estudo, somente mulheres usuárias de TH pertencentes aos grupos sanguíneos não-O apresentaram aumento significativo nos níveis de FVIII quando comparadas com as mulheres não-O do grupo controle, indicando interação entre os grupos sanguíneos não-O e o uso da TH. Ressalta-se que em mulheres do grupo sanguíneo O, as alterações dos níveis de FVIII desencadeadas pela TH não foram significativas. Desta forma, mulheres dos grupos sanguíneos não-O usuárias de TH apresentaram maior ativação da coagulação com consequente formação de trombina que usuárias do tipo O. Esses dados sugerem que o efeito da TH sob a ativação da cascata da coagulação é dependente do fato das mulheres portadoras de grupos sanguíneos não-O apresentarem, naturalmente, níveis aumentados de FVIII e FvW.

Para os níveis de FvW, não foi observada diferença significativa comparando-se controles e mulheres sob TH oral, pertencentes ao mesmo grupo sanguíneo, sugerindo que o uso da TH oral, neste estudo, não influenciou os níveis de FvW e que apenas o grupo sanguíneo, afetou os níveis plasmáticos de FvW em mulheres na pós-menopausa, uma vez que mulheres do grupo sanguíneo O apresentaram níveis significativamente menores deste fator em comparação com as mulheres não-

O, no grupo controle. Estudos anteriores também relataram ausência de alteração nos níveis de FvW em usuárias de TRH (GOTTSÄTER, *et al.* 2001; COSMAN, *et al.*, 2005). No entanto, a influência do grupo sanguíneo sob os níveis de FvW não foi considerada por esse autores.

O D-Di tem sido utilizado como uma importante ferramenta para excluir o diagnóstico de TEV, uma vez que possui valor preditivo negativo de 98,4 a 99,3% para níveis plasmáticos de D-Di menores que 500ng/mL (MICHIELS *et al.*, 2005; MICHIELS *et al.*, 2006). No entanto, valores de D-Di acima de 500ng/mL podem indicar apenas maior ativação do mecanismo da coagulação com consequente formação e degradação de fibrina pelo sistema fibrinolítico, e não, necessariamente, um evento trombótico, já que o D-Di se encontra elevado também em outras condições. Com base nestas considerações, no presente estudo, utilizou-se este marcador de geração de fibrina para avaliar risco de desenvolver estado de hipercoagulabilidade entre as usuárias de TH oral. Foi observado sinergismo significativo entre os grupos sanguíneos não-O e uso de TH oral, contribuindo para que mulheres nessas condições mostrassem um risco 25 vezes maior de apresentar níveis plasmáticos de D-Di acima dos valores de referência (OR= 25,14; IC: 5,61-109,24). Esse valor de OR é superior ao efeito observado para cada fator isoladamente, indicando sinergismo entre TH oral e grupo sanguíneo não-O.

Cumpramos ressaltar que, devido ao seu elevado valor preditivo negativo, os níveis de D-Di são úteis na avaliação laboratorial e clínica para descartar a hipótese diagnóstica de TEV. Nesse estudo, nenhuma das participantes apresentou evento trombótico durante o período de acompanhamento. No entanto, face à exclusão de vários fatores de risco que podem contribuir para elevação dos níveis de D-Di entre as participantes e o fato das mesmas se encontrarem sob TH, esses dados sugerem que mulheres dos grupos sanguíneos não-O deveriam ser acompanhadas para o risco de TEV durante o primeiro ano de TH, pois as mesmas apresentam alterações hemostáticas significativas conferindo um estado de hipercoagulabilidade em potencial às usuárias.

Em conjunto, esses dados podem ser também relacionados ao aumento de risco de trombose venosa em mulheres não-O sob TH oral (RR = 4,4 - 17,8) comparado às usuárias de TH do grupo sanguíneo O (RR = 1,1 - 6,6), como relatado por Canonico *et al.* (2008a) e podem explicar, portanto, a menor predisposição

dessas últimas ao desenvolvimento de TEV. Esses autores sugerem sinergismo entre uso de TH oral, mas não transdérmica e os grupos sanguíneos não-O para o maior risco de desencadeamento de eventos trombóticos em usuárias de TH. Dessa forma, torna-se importante ressaltar que mais de 50% da nossa população (Fundação Hemominas, 2006) pertence aos grupos sanguíneos não-O, estando predispostos ao desenvolvimento do evento trombótico. O uso de TH, assim como outros fatores de risco para trombose deveriam ser avaliados, principalmente em indivíduos não-O. De forma similar ao que se observa em relação à TH, risco elevado de trombose venosa na gravidez e no puerpério foi também identificado em mulheres dos grupos sanguíneos A ou AB, quando comparadas com mulheres do grupo sanguíneo O (LARSEN *et al.*, 2005).

Alguns estudos realizaram a genotipagem dos polimorfismos do sistema ABO e correlacionaram os alelos com o risco de trombose. Schleef *et al.* (2004), por meio de genotipagem do sistema ABO, encontraram uma frequência maior dos alelos A^1 e B em pacientes com trombose e de alelos O^1 , O^2 e A^2 no grupo controle. Pacientes com trombose e controles do grupo sanguíneo O apresentaram concentrações plasmáticas de FVIII e FvW significativamente mais baixas que os grupos sanguíneos não-O (SHCLEEF *et al.*, 2004). Morelli *et al.* (2005) observaram que indivíduos com genótipos representados pelos alelos A^1 e B para o sistema ABO e portadores de FVL apresentaram um risco duas vezes mais alto para o primeiro episódio de TVP que os indivíduos com genótipos representados apenas por alelos O e A^2 .

No presente estudo, algumas participantes foram genotipadas para os polimorfismos do sistema ABO. No entanto, devido ao pequeno número não foi possível estabelecer correlações entre os genótipos/alelos e os marcadores de hipercoagulabilidade e fibrinólise estudados. Recentemente, Paiva *et al.* (2009) observaram 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 de nossa população. Nesse estudo, também foi observada maior prevalência de trombose venosa em mulheres que fizeram uso de estrogênio, sob a forma de anticoncepcionais ou TH (PAIVA *et al.*, 2009). Assim, estudos adicionais são, necessários para confirmar o alelo A^2 como fator de risco para trombose venosa em nossa população. Sabe-se que indivíduos portadores desse alelo apresentam níveis

mais baixos de FVIII e FvW em relação aos demais grupos sanguíneos. No entanto, existem controvérsias em relação aos níveis desses dois fatores em portadores de alelo A² como relatado por Morelli *et al.* (2005) e Sousa *et al.*, (2007).

Vários estudos têm relacionado o uso da TH em mulheres na pós-menopausa com diminuição significativa dos níveis plasmáticos de PAI-1 e, portanto, com o aumento da atividade do sistema fibrinolítico (GILABERT, *et al.*, 1995; KOH, *et al.*, 1999a, DOUKETIS, *et al.*, 2000; TEED, *et al.*, 2000; SALOBIR, *et al.*, 2002; MADSEN, *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2005; COSMAN *et al.*, 2005; ZEGURA *et al.*, 2006; FAIT *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2009). Na **Figura 13**, o gráfico *Box-plots* correspondente aos níveis plasmáticos de PAI-1 mostra que as mulheres usuárias de TH, em comparação com o grupo controle, apresentaram diminuição de todos os percentis (10°, 25°, 50°, 75° e 90°), bem como dos *outliers* (valores fora do intervalo de variação compreendido entre o 10° e 90° percentis). Cumpre ressaltar que o aumento na fibrinólise pode representar um mecanismo de proteção contra um possível evento de tromboembolismo venoso.

No presente estudo, mulheres usuárias de TH oral, pertencentes ao grupo sanguíneo O, apresentaram níveis plasmáticos de PAI-1 significativamente reduzidos, quando comparadas com as mulheres do grupo controle pertencentes ao grupo sanguíneo O. Estes resultados indicam que nas mulheres sob TH oral do grupo O, ocorre um aumento da fibrinólise, devido à diminuição dos níveis de PAI-1. Esse achado pode estar relacionado ao menor risco de desenvolvimento de TEV em mulheres do grupo O e sob TH oral, como descrito por Canonico *et al.* (2008a). Além disso, as mulheres usuárias de TH oral e do grupo sanguíneo O apresentaram níveis de D-Di significativamente superiores àquelas do mesmo tipo sanguíneo, porém não usuárias de TH, confirmando que a fibrinólise estava aumentada nestas mulheres.

Embora em mulheres usuárias de TH oral pertencentes aos grupos sanguíneos não-O tenha sido observada diminuição dos níveis de PAI-1, quando comparadas às mulheres do grupo controle portadoras de grupos sanguíneos não-O, essa redução não foi significativa sugerindo que a fibrinólise não foi significativamente afetada nesse caso. Ressalta-se que não foi observada diferença significativa entre as mulheres O e não-O, dos grupos controle e usuárias de TH, em relação à frequência dos genótipos do polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* (p=

1,0), sugerindo que as alterações nos níveis de PAI-1 observadas não foram afetadas por uma distribuição heterogênea do polimorfismo 4G/5G entre as participantes dos grupos estudados.

Madsen *et al.* (2003) investigaram o efeito prolongado (durante 5 anos) da TH. Os autores observaram um aumento significativo na atividade de t-PA e diminuição dos níveis e da atividade de PAI-1. Este efeito foi independente do tabagismo e de polimorfismos analisados nos genes do PAI-1 (-675 4G/5G) e do t-PA. Entretanto, como ressaltado pelos autores, ainda há controvérsias na literatura em relação à presença do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1 e aumento ou diminuição nos níveis plasmáticos deste, associado ao uso da TRH.

Nossos resultados mostraram diferença significativa nos níveis de PAI-1 entre as mulheres do grupo controle, comparando os genótipos 4G/4G com 5G/5G ($p=0,040$) e 4G/5G com 5G/5G ($p=0,034$). Entretanto, não foi observada diferença significativa comparando mulheres do grupo controle 4G/4G com as heterozigotas 4G5G. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois estudos mostram que indivíduos homozigotos 4G/4G apresentam níveis plasmáticos de PAI-1 aumentados, enquanto os homozigotos 5G/5G apresentam níveis reduzidos, e indivíduos heterozigotos (4G/5G) possuem níveis intermediários (MANSFIELD *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 1995).

Os níveis plasmáticos de PAI-1 podem ser modulados por diversos fatores genéticos ou não, que atuam em concomitância. Fazendo a mesma comparação entre as mulheres usuárias de TH e os diferentes genótipos do polimorfismo 4G/5G, não houve diferença significativa em relação aos níveis de PAI-1 de acordo com o polimorfismo inserção/deleção 4G/5G. Comparando os grupos controle e usuárias de TH em relação ao polimorfismo 4G/5G, observou-se diminuição significativa nos níveis de PAI-1 nas mulheres usuárias de TH homozigotas 4G/4G ($p=0,027$), assim como para as heterozigotas ($p=0,018$) para o polimorfismo 4G/5G. Desta forma, neste estudo, o uso da TH foi relacionado à diminuição significativa dos níveis de PAI-1 em mulheres homozigotas (4G/4G) e heterozigotas (4G/5G) para o polimorfismo estudado (-675 4G/5G). Esses dados sugerem que a TH influencia a diminuição dos níveis de PAI-1, especialmente em mulheres na pós-menopausa portadoras do alelo 4G, conforme descrito também por Granha *et al.* (1999). Ressalta-se, no entanto, que CUSHMAN *et al.* (2004) não observaram associação

entre usuárias de TH oral, polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* e aumento do risco de trombose venosa.

Diante dos nossos resultados, embora com limitação no número de amostras, é possível sugerir que a TH oral age diferentemente sobre o sistema hemostático, provocando em algumas mulheres um estado de hiperativação, mesmo na ausência de mutações de importância em trombofilia, mas interagindo com os grupos sanguíneos e com polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1*. Em conjunto com dados da literatura, os resultados encontrados sugerem que mulheres portadoras dos grupos sanguíneos não-O e do polimorfismo 4G apresentam estado de hipercoagulabilidade significativo nos três primeiros meses de TH e, portanto, maior risco de desenvolver trombose que mulheres dos grupo sanguíneo O e portadoras do genótipo 5G. Investigações adicionais quanto à contribuição e interação desses fatores de risco para trombose venosa em mulheres sob uso de TH tornam-se, portanto, necessárias. Outro aspecto importante a ser aprofundado é a sua influência comparando as vias de administração da TH, oral e transdérmica e os diversos esquemas terapêuticos utilizados.

Como mencionado, os relatos dos efeitos da TH nos marcadores de geração de trombina são controversos entre os estudos. Vários fatores contribuem para que ocorram diferenças nos resultados encontrados na literatura. O primeiro deles é a diversidade de estrogênios que têm sido utilizados. Alguns trabalhos já demonstraram, que os efeitos da TH na coagulação são dose-dependentes (GRODSTEIN *et al.*, 1996; JICK *et al.*, 1996; DALY *et al.*, 1996a). Assim, a variedade de estrogênios usada pode ter diferentes efeitos na coagulação. Além disso, os estudos trabalham com diferentes esquemas terapêuticos, como o uso apenas de estrogênio (TE), combinado contínuo ou combinado cíclico. A administração de progestagênio tem implicações, uma vez que pode modificar as ações do estrogênio, e pode variar em seu potencial para causar trombose venosa. Outro fator que varia entre os estudos é o tempo de duração da TRH, cujos efeitos são avaliados após 1, 2, 3, 6, 9 e 12 meses ou mais (TEEDE *et al.*, 2000). Além disso, nesses estudos a influência dos grupos sanguíneos e de polimorfismos que modulam a expressão de fatores como *PAI-1*, *FVIII* e marcadores de hipercoagulabilidade não é avaliada. Considerando as inúmeras variáveis que podem interferir nos resultados e devido a essas inconsistências ou mesmo

controvérsias, muitas investigações sobre a TH e seus efeitos sobre os complexos mecanismos da coagulação e fibrinólise fazem-se ainda necessárias.

A TR tem sido alvo nos últimos anos de grandes modificações e várias modalidades de administração, hormônios e esquemas terapêuticos tem surgido. Portanto, a avaliação desses novos hormônios e esquemas terapêuticos em mulheres em nosso meio e sob condições muito bem definidas e controladas seria importante. Variáveis como o tipo de TH, a via de administração, a dose, o tempo de uso, a evidência de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos para trombozes venosas e/ou arteriais, a idade, devem ser criteriosamente considerados, especialmente em estudos prospectivos que avaliem o risco de trombozes venosas, sendo os resultados interpretados à luz do conhecimento de tais variáveis.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o climatério e a TH representam condições que requerem acompanhamento individualizado. Face aos efeitos benéficos da TH sobre os sintomas do climatério, cabe avaliar individualmente antes da sua adoção se a paciente é portadora de mutação de importância em trombofilia, a presença de fatores de risco adicionais como hipercolesterolemia, anticoagulante lúpico, tabagismo. De acordo com os resultados desse estudo, seu grupo sanguíneo e o polimorfismo 4G/5G do gene do *PAI-1* podem ser úteis para a composição de risco de desenvolver trombose venosa durante o uso da TH. Caberia avaliar também em condições ideais, periodicamente e no primeiro ano de uso da TH, se a mulher se encontra hipercoagulada, através de marcadores como D-Di, TAT e F1+2, especialmente para as mulheres pertencentes aos grupos sanguíneos A, B e AB.

Técnicas que permitem discriminar, em uma população, aqueles indivíduos apresentando risco em potencial para desenvolver trombose e técnicas moleculares para investigação destas mutações, já se encontram bem padronizadas, porém ainda não são de uso corrente em laboratórios clínicos, sendo pouco solicitadas e ainda não completamente acessíveis à população como um todo. À medida que tais métodos vão sendo disponibilizados e seus resultados analisados, através de projetos de pesquisa em nível local e contando com a participação de pessoas do nosso meio, torna-se altamente desejável a introdução desta metodologia específica para uso rotineiro em laboratório de Análises Clínicas para atender a demanda, principalmente, de mulheres com forte história familiar e importantes fatores de risco. A adesão aos recursos laboratoriais existentes poderá abrir importante perspectiva

de maior sucesso para as usuárias da TH, considerando a possibilidade de se evitar consequências indesejáveis.

6.3 PERFIL LIPÍDICO E APOLIPOPROTEÍNAS

As alterações dos lipídeos plasmáticos e as lipoproteínas comumente encontradas na pós-menopausa são elevações nos níveis de CT, TG, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDLc) e LDLc, e diminuição de HDLc e da fração HDL₂ (MARTINEZ *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 1999; ALOYSIO *et al.*, 1999; STEVENSON, 2000).

A TH tem sido relacionada a alterações favoráveis no perfil lipídico (STRANDBERG *et al.*, 2003; MERCURO *et al.*, 2003; MADSEN *et al.*, 2003; ALPERT *et al.*, 2004; ZEGURA *et al.*, 2006; BAYRACK *et al.*, 2006). Assim, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura, pois em mulheres usuárias de TH oral também foram observadas alterações favoráveis do perfil lipídico: diminuição dos níveis de CT, LDLc, e apo B, além do aumento significativo nos níveis de HDLc e apo A-I (**Tabela 9**). Não foi observada alteração significativa nos níveis de TG. No entanto, de acordo com Fernandes *et al.* (1999), a via oral de administração de TH possui pequeno impacto sobre os níveis de TG e VLDLc.

Neste estudo foi observada também uma diminuição significativa nos índices TC/HDLc, LDLc/HDLc, e apoB/apoA-I. É importante ressaltar que foi observada correlação positiva e significativa entre os níveis de apo B e CT nos dois grupos, entre apo B e TG no grupo de mulheres sob TH, e no grupo controle foram observadas correlações entre o índice apoB/apoA-I e CT e entre apo A-I e HDLc.

Tem sido sugerido que o índice apoB/apoA-I representa um parâmetro superior para predição de risco cardiovascular (WALLDIUS *et al.*, 2004; DE PAULA SABINO *et al.*, 2008), uma vez que representa o balanço entre as partículas de colesterol potencialmente aterogênicas ricas em apo B e as partículas de colesterol anti-aterogênicas ricas em apo A-I.

Entretanto, poucos estudos têm correlacionado o uso de TH com as apolipoproteínas A-I e B, e com o índice apoB/apoA-I (VEHKAVAARA, *et al.* 2001; CHRISTODOULAKOS *et al.*, 2004; BAYRACK *et al.*, 2006; CELILOGLU *et al.*, 2009). Assim, devido ao fato de poucos estudos correlacionarem este índice com o

risco de DAC em mulheres na pós-menopausa, e o custo mais elevado das dosagens das apo A-I e apo B, o perfil lipídico convencional ainda é mais utilizado como um fator preditor do risco de DC em mulheres na pós-menopausa.

Estudos relatam que uma disfunção na fibrinólise aumenta o risco de DC e que o efeito da TH na fibrinólise pode ser um dos benefícios desta terapia em relação às doenças cardiovasculares (GRANCHA *et al.*, 1999; MADSEN *et al.*, 2003; BLADBJERG *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2005). Grancha *et al.* (1999) avaliando a influência do polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* em mulheres na pós-menopausa com DAC, observaram aumento significativo nos níveis e na atividade de PAI-1, em comparação com o grupo controle, além disso, a análise multivariada revelou nas mulheres com DAC correlação entre níveis elevados de PAI-1 e o alelo 4G, que foram influenciados pelos níveis de TG. Nas mulheres com DAC, após o uso de TH, houve diminuição dos níveis de PAI-1, relacionada ao alelo 4G. Entretanto, Madsen *et al.* (2003) observaram um efeito favorável da TH após três meses, em relação à ativação da fibrinólise, uma vez que os níveis plasmáticos de PAI-1 apresentaram-se estatisticamente menores em usuárias desta terapia, embora este efeito foi independente do polimorfismo analisado no gene do *PAI-1* (-675 4G/5G).

No presente estudo, mulheres do grupo controle que possuem os genótipos 4G/5G ou 5G/5G apresentaram níveis reduzidos de PAI-1 em comparação com as mulheres 4G/4G (**Figura 16**). Além disso, é importante ressaltar a correlação positiva encontrada, neste estudo, para os níveis plasmáticos de LDLc e PAI-1 no grupo de mulheres usuárias da TH oral. O uso da TH foi relacionado à diminuição dos níveis de PAI-1 em mulheres homozigotas e heterozigotas para o polimorfismo 4G/5G, quando comparadas com mulheres do mesmo genótipo pertencentes ao grupo controle. Embora o polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* tenha já sido estudado, ainda existem controvérsias sobre a associação entre o desenvolvimento de DC e os possíveis genótipos, principalmente em mulheres da população brasileira, na pós-menopausa usuárias ou não de TH.

Embora os efeitos benéficos da TH no perfil lipídico já tenham sido descritos, vários estudos não recomendam iniciar a TH com o propósito de prevenção cardiovascular primária ou secundária (HULLEY *et al.*, 1998; HERRINGTON *et al.*, 2000; WOMENS`S HEALTH INITIATIVE, 2002; I DIRETRIZ, 2008). De acordo com a I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da TH (I DIRETRIZ, 2008) é importante lembrar

ainda que existem inúmeras possibilidades de formulações com diferentes estrogênios, progestagênios e androgênios que podem ser administrados em diferentes regimes terapêuticos, com variadas associações de hormônios, doses e vias de administração. Além disso, há numerosas lacunas de evidências quanto aos diferentes esquemas de TH usados, e poucos estudos têm sido conduzidos na população brasileira. Dessa forma, os dados ora apresentados, em relação ao perfil lipídico (CT, HDLc, LDLc e TG) e às apolipoproteínas (apo A-I e apo B), poderiam contribuir para uma melhor compreensão do efeito da TH oral sobre o metabolismo lipídico, com possível impacto nas condutas de monitoração de mulheres usuárias deste tratamento.

7 CONCLUSÕES

- Mulheres, usuárias de TH oral por cerca de 3 meses, apresentaram tendência à hipercoagulabilidade demonstrada por aumento nos níveis de FVIII e D-Di bem como tendência ao aumento da fibrinólise demonstrada por redução nos níveis de PAI-1, permitindo aparente equilíbrio hemostático;
- Os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos FVIII, FvW e D-Di se mostraram mais elevados não apenas em função da TH como também em função do grupo sanguíneo não-O, sendo que esses dois fatores parecem sinergir contribuindo para maior risco de apresentar níveis de D-Di acima dos valores de referência;
- O polimorfismo -675 4G/5G na região promotora do gene do gene do *PAI-1* influencia os níveis desse marcador em mulheres usuárias da TH oral;
- Mulheres, em TH oral por cerca de três meses, apresentaram perfil lipídico e apolipoproteico favorável quando comparado ao grupo controle, em consonância com achados da literatura.

Referências bibliográficas

ALOYSIO, D.; GAMBACCIANI, M.; MESCHIA, M.; PANSINI, F.; MODENA, A.B.; BOLIS, P.F.; MASSOBRIO, M.; MAIOCCHI, G.; PERUZZI, E. The icarus study group: the effect of menopause on blood lipid and lipoprotein levels. **Atherosclerosis**, v. 147, p. 147-153, 1999.

ALPER, T.; CETINKAYA, M.B.; KOKCU, A.; YANIK, F.F.; MALATYALIOGLU, E. Do lipid profiles of postmenopausal women under oral hormone replacement therapy remain stable or reveal a multiphasic course in time? **Gynecol. Endocrinol.**, v. 18, p. 199-205, 2004.

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

ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; GONÇALVES, M.S.; COSTA, F.F. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210a) in venous thrombosis and arterial disease. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1430-1433, 1997.

BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Molecular aspects of ABO blood group system. **Rev.Bras.hematol.hemoter.**, v.1, p.47-56, 2003.

BAUER, K.A. Management of thrombophilia. **Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 1429-1434, 2003.

BAYRAK, A.; ALDEMIR, D.A.; BAYRAK, T.; CORAKÇI, A.; DURSUN, P. The effect of hormone replacement therapy on the levels of serum lipids, apolipoprotein AI, apolipoprotein B and lipoprotein (a) in Turkish postmenopausal women. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v.274, p.289-96, 2006.

BEISIEGEL, U. Lipoprotein metabolism. **Eur. Heart. J.**, v.19, p. 20-23, 1998. Suplemento A.

BERTINA, R.M.; KOELEMAN, B.P.C.; KOSTER, T.; RESENDAAL F.R.; DIRVEM, R.J.; DERONDE, H.; VAN DER VELDER, P.A.; REITSMA, P.H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v.369, p. 64, 1994.

BERTINA, R.M. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 1678-1683, 1997.

BERTINA, R.M. Genetic approach to thrombophilia. **Thromb. Haemost.**, v. 86, p. 92-103, 2001.

BLADBJERG, E.M.; MADSEN, J.S.; KRISTENSEN, R.R.; ABRAHAMSEN, B.; BRIKEN, K.; MOSEKILDES, L.; JESPERSEN, J. Effect of long-term hormone replacement therapy on tissue factor pathway inhibitor and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in healthy postmenopausal women: a randomized controlled study. **Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 1208-1214, 2003.

BOWEN, D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. **J. Thromb. Haemost.**, v.1, p.33-40, 2003. apud JENKINS, P.V.; O'DONNELL, J.S. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion.**, v. 46, p.1836-44, 2006.

BOMBELI, T.; MUELLER, M.; HAEBERLI, A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. **Throm. Haemost.**, Stuttgart, v. 77, p. 408-423, 1997.

BONDUKI, C.E.; LOURENÇO, D.M.; MOTTA, E.L.; SOARES, Jr. J.M.; HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C. Effect of estrogen-progestin hormonal replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. **Clinics.**, v. 62, p. 553-60, 2007.

BORGFELDT, C.; LI, C.; SAMSIOE, G. Low-dose oral combination of 17beta-estradiol and norethisterone acetate in postmenopausal women decreases factor VII, fibrinogen, antithrombin and plasminogen activator inhibitor-1. **Climacteric.**, v. 7, p. 78-85, 2004.

BOSTON COLLABORATIVE DRUG SURVEILLANCE PROGRAM. Surgically confirmed gallbladder disease, venous thrombembolism and breast tumors in relation to postmenopausal estrogen therapy. **N. Engl. J. Med.**, v.290, p.15-19, 1974.

CANONICO, M.; OGER, E.; PLU-BUREAU, G.; CONARD, J.; MEYER, G.; LÉVESQUE, H.; TRILLOT, N.; BARRELLIER, M.T.; WAHL, D.; EMMERICH, J.; SCARABIN, P.Y. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. **Circulation**, v.115, p. 840-845, 2007.

CANONICO, M.; OLIÉ, V.; CARCAILLON, L.; TUBERT-BITTER, P.; SCARABIN P.Y. Estrogen and Thromboembolism Risk (ESTHER) Study Group. Synergism between non-O blood group and oral estrogen in the risk of venous thromboembolism among postmenopausal women: The ESTHER study. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 246-8, 2008.

CANONICO, M.; PLU-BUREAU, G.; LOWE, G.D.; SCARABIN, P.Y. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. **B. M. J.**, v.336, p. 1227-31, 2008.

CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S. Técnicas laboratoriais e interpretação, Belo Horizonte, 1990, págs 114-115, 139p.

CELILOGLU, M.; AYDIN, Y.; BALCI, P.; KOLAMAZ, T. The effect of alendronate sodium on carotid artery intima-media thickness and lipid profile in women with postmenopausal osteoporosis. **Menopause**, 2009. Resumo, In press.

CHRISTODOULAKOS, G.E.; LAMBRINOUDAKI, I.V.; PANOULIS, C.P.; PAPADIAS, C.A.; KOUSKOUNI, E.E.; CREATSAS, G.C. Effect of hormone replacement therapy, tibolone and raloxifene on serum lipids, apolipoprotein A1, apolipoprotein B and

lipoprotein(a) in Greek postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol.**, v.18, p. 244-57, 2004.

COLVIN, B.T. Physiology of haemostasis. **Vox Sanguinis**, v. 87, p. 43-46. 2004.

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). **Thromb. Haemost.**, v. 70, p. 380-385, 1993.

COSMAN, F.; BAZ-HECHT, M.; CUSHMAN, M.; VARDY, M.D.; CRUZ, J.D.; NIEVES, J.W.; ZION, M.; LINDSAY, R. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. **Thromb. Res.**, v.116, p.1-13, 2005.

COVAS, D.T.; ZAGO, M.A. Antígenos eritrocitários, leucocitários e plaquetários. In ZAGO M.A.; FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001.cap. 83, p. 951-976.

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. **Am. J. Epidemiol.**, v. 143, p. 665-676, 1996

CUSHMAN, M.; PSATY, B. M.; MEILAHN, E.N.; DOBS, A.S.; KULLER, L.H. Postmenopausal hormone therapy and concentrations of protein C and antithrombin in elderly women. **Brit. J. Haematol.**, v. 114, p. 162-168, 2001.

CUSHMAN, M.; KULLER, L.H.; PRENTICE, R.; RODABOUGH, R.J.; PSATY, B.M.; STAFFORD, R.S.; SIDNEY, S.; ROSENDAL, F.R.; Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. **JAMA.**, v.292, p. 1573-80, 2004.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v. 355, p. 1627 - 1632, 2000.

DALY, E.; VESSEY, M.P.; PAINTER, R., HAWKINS, M.M. Case-control study of venous thromboembolism risk in users of hormone replacement therapy. **Lancet**, v. 348, p. 1027, 1996.

DALY, E.; VESSEY, M.P.; HAWKINS, M.M.; CARSON, J.L.; GOUGH, P.; MARSH, S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. **Lancet**, v.348, p.977-980, 1996.

DE PAULA SABINO, A; RIBEIRO, D.D.; CARVALHO, M.G.; CARDOSO J.; DUSSE, L.M.; FERNANDES AP. Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young Brazilian patients. **Blood Coagul Fibrinolysis.**, v. 17, p.271-5, 2006.

DE PAULA SABINO, A; RIBEIRO, D. D.; GUIMARÃES, D.A.M., PAIVA, S.G; DUSSE, L.M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES AP. Factor V Leiden and increased risk for venous thrombosis in young Brazilian patients. **J. Thromb. Thrombolysis**, v.24, p. 261-266, 2007.

DE PAULA SABINO, A; SOUSA, M. de O.; LIMA, L.M.; RIBEIRO, D.D.; DUSSE, L.M.; CARVALHO, M. D.; FERNANDES, A.P. ApoB/ApoA-I ratio in young patients with ischemic cerebral stroke or peripheral arterial disease. **Transl Res.**, v.152, p. 113-118, 2008.

DE PAULA SABINO, Eventos trombóticos arteriais: avaliação de fatores genéticos e bioquímicos predisponentes em pacientes atendidos em serviço médico especializado em hematologia. 2008. 153f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DIAS, A.R. Jr; MELO, R.N.; GEBARA, O. C.; D'AMICO, E. A.; NUSSBACHER, A.; HALBE, H.W.; PINOTTI, J.A. Effects of conjugated equine estrogens or raloxifene on lipid profile, coagulation and fibrinolysis factors in postmenopausal women. **Climacteric.**, v.8, p. 63-70, 2005.

I DIRETRIZ Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 91,p.1-23, 2008.

DOUKETIS, J.D.; GORDON, M.; JOHNSTON, M.; JULIAN, J.A.; ADACHI, J.R.; GINSBERG, J.S. The effects of hormone replacement therapy on thrombin generation, fibrinolysis inhibition, and resistance to activated protein C: prospective cohort study and review of literature. **Thromb. Res.**, v. 99, p. 25-34, 2000.

EILERTSEN, A.L.; QVIGSTAD, E.; ANDERSEN, T.O.; SANDVIK, L.; SANDSET, P.M. Conventional-dose hormone therapy (HT) and tibolone, but not low-dose HT and raloxifene, increase markers of activated coagulation. **Maturitas**, v. 55, p. 278-87, 2006.

ERBERICH, L.C.N.; ALCÂNTARA, V.M.; PICHETH, G.; SCARTEZINI, M. Reposição hormonal na pós-menopausa e seus efeitos sobre os níveis plasmáticos de lípidos plasmáticos. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 33, p. 77-83, 2001.

ERIKSSON, P.; KALLIN, B.; van't HOOFT, F.M.; BÅVENHOLM, P.; HAMSTEN, A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p. 1851-5, 1995.

ESMON, C.T. The endothelial cell protein C receptor. **Thromb. Haemost.**, v. 83, p. 639-643, 2000.

FAIT, T.; VRABLIK, M.; ZIZKA, Z.; KOSTIROVA, M. Changes in hemostatic variables induced by estrogen replacement therapy: comparison of transdermal and oral

administration in a crossover-designed study. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v.65, p.47-51, 2008.

FERNANDES, C.E.; MELO, N.R.; WEHBA, S. **Climatério feminino**. São Paulo: Lemos, 1999, 341 p.

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**, v. 96, p. 1102-1108, 1997.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap 65, p. 739-747.

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

FRANK, P.G.; MARCEL, Y.L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. **J. Lipid. Res.**, v. 41, p.853-72, 2000.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY. R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p. 499-552, 1972.

FUNDAÇÃO HEMOMINAS. **Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia** de Minas Gerais – Folheto informativo Doação de Sangue, 2006. Disponível em : www.hemominas.mg.gov.br, Acesso em : 20 maio.2006.

FURIE, B.; FURIE, B.C. The molecular basis of blood coagulation. **Cell**, v. 53, p. 505-518, 1988

GODOI, L. C. Avaliação da hemostasia em indivíduos assintomáticos portadores de mutações de importância em trombofilia. 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

GOTTSÄTER, A.; RENDELL, M.; HULTHÉN, U.L.; BERNTORP, E.; MATTIASSON, I. Hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women: a randomized, placebo, placebo-controlled study of effects on coagulation and fibrinolytic factors. **Intern. Med.**, v. 249, p. 237-246, 2001.

GRAAF, F.; BORNE, H.; KOLK, M.; WILD, P.J.; JANSSEN, G.W.T.; UUM, S.H.M. Exclusion of deep venous thrombosis with D-Dimer testing: comparison of 13 D-dimer methods in 99 outpatients suspected of deep venous thrombosis using venography as refernce standard. **Thromb. Haemost.**, v. 83, p. 191-198, 2000.

GRADY D.; WENGER, N.K.; HERRINGTON, D.; KHAN, S.; FURBERG, C.; HUNNINGHAKE, D. *et al.* Postmenopausal hormone therapy increases risk for

venous thromboembolic disease. The heart and estrogen/progestin replacement study. **Ann. Intern. Med.**, v. 132, p. 689-696, 2000.

GRANCHA, S.; ESTELLÉS, A.; TORMO, G.; FALCO, C.; GILABERT, J.; ESPAÑA, F.; CANO, A.; SEGUI, R.; AZNAR, J. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease. **Thromb Haemost.**, v. 81, p. 516-21, 1999.

GRODSTEIN, F.; STAMPFER, M.J.; GOLDHABER, S.Z.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; HENNEKENS, C.H. Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. **Lancet**, v. 348, p. 983-987, 1996.

GUIMARÃES, D.A.; CARDOSO, J.; DUSSE, L.M.; FRANCO, R.M.; FRANCO, H. de A.; ALVIM, T.C.; TEIXEIRA, G. da S.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P. Effect of oral hormone replacement therapy on plasma homocysteine levels. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.85, p.1304-6, 2006.

GUIMARÃES, D.A.; CARVALHO, M.G.; SOUZA, M.O.; CARDOSO, J.; FRANCO, R.M.; FRANCO, H. de A.; ALVIM, T.C.; TEIXEIRA, G. da S.; DUSSE, L.M.; FERNANDES, A.P. . Assessment of hipercoagulability markers and lipid levels in postmenopausal women under either oral or transdermal Hormone replacement therapy. **J. Thromb. Thrombolysis**, v.27, p.135-140, 2009.

HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. **Blood: principles, practice of hematology.** Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. 2305 p.

HERRINGTON, D.M.; REBOUSSIN, D.M.; BROSNIHAN, K.B.; SHARP, P.C.; SHUMAKER, S.A.; SNYDES, T.E.; FURBERG, C.D.; KOWALCHUCK, G.J.; STUCKEY, T.C.; ROGERS, W.J.; GIVENS, D.H.; WATERS, D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. **N. Eng. J. Med.**, v. 343, p. 522-529, 2000.

HERRINGTON, D.M.; KLEIN, K.P. Genome and hormones: gender differences in physiology invites review: pharmacogenetics of estrogen replacement therapy. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 2776-2784, 2001.

HERRINGTON, D.M.; VITTINGHOFF, E.; HOWARD, T.D.; MAJOR, D.A.; OWEN, J.; REBOUSSIN, D.M.; BOWDEN, D.; BITTNER, V.; SIMON, J.A.; GRADY, D.; HULLEY, S.B. Factor V Leiden, hormone replacement therapy, and risk of venous thromboembolic events in women with coronary disease. **Artioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1012-1017, 2002.

HERRINGTON, D.M.; VITTINGHOFF, E.; LIN, F.; FONG, J.; HARRIS, F.; HUNNINGHAKE, D.; BITTNER, V.; SCHROTT, H.G.; BLUMENTHAL, R.S.; LEVY, R. HERS study group: statin therapy, cardiovascular events, and total mortality in the heart and estrogen/progestin replacement study. **Circulation**, v. 105, p. 2962-2967, 2002.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. [Coagulation 2006: a modern view of hemostasis.](#) **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 21, p. 1-11, 2007.

HOIBRAATEN, E.; QVIGSTAD, E.; ARNESEN, H.; LARSEN, S.; WICKSTROM, E.; SANDSET, P. M. Increased risk of recurrent venous thromboembolism during hormone replacement therapy: results of the randomized, double-blind, placebo-controlled estrogen in venous thromboembolism trial (EVTET). **Thromb. Haemost.**, v. 84, p. 961-967, 2000.

HOIBRAATEN, E.; QVIGSTAD, E.; ANDERSEN, T.O.; MOWINCKEL, M.; SANDSET, P.M. The effects of hormone replacement therapy (HTR) on hemostatic variables in women with previous venous thromboembolism: results from a randomized double-blind, clinical trial. **Tromb. Haemost.**, v. 85, p. 775-781, 2001.

HOUAISS, A. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. 2922 p.

HUBER, S., MCMASTER, K.J., VOELKERDING, K.V. Analytical Evaluation of Primer Engineered Multiplex Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A. **J. Mol. Diagn.**, v.2, p.153-157, 2000.

HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women (HERS). **JAMA**, v. 280, p. 605-613, 1998.

HUMPHRIES, K.H.; GILL, S. Risks and benefits of hormone replacement therapy: the evidence speaks. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 168, p. 1001-1010, 2003.

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. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 3071-3078, 1999.

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

JICK, H.; DERBY, L.E.; MYERS, M.W.; VASILAKIS, C.; NEWTON, K.M. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. **Lancet**, v. 348, p. 981-983, 1996.

JOBE, M.I. Mechanisms of coagulation and fibrinolysis. In: LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; STIENE-MARTIN, E.A.; KOEPKE, J.A. (Ed.). **Clinical hematology: principles procedures correlations.** London: J.B.Lippincott, 1992. p.579-598.

KAMPHUISEN, P.W.; EIKENBOOM, J.C.J.; BERTINA, R.M. Elevated Factor VIII levels and the risk of thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p.731-738, 2001.

KERAMARIS, N.C.; CHRISTODOULAKOS, G.E.; LAMBRINOUDAKI, I.V.; DALAMANGA, A.; ALEXANDROU, A.P.; BRAMIS, J.; BASTOUNIS, E.; CREATSAS, G.C. The differential effect of estrogen, estrogen-progestin and tibolone on coagulation inhibitors in postmenopausal women. **Climacteric.**, v. 10, p. 400-407, 2007.

KOH, K.K.; HORNE, M.K.; CSAKO, G.; WACLAWIW, M. A.; CANNON III, R.O. Relation of fibrinolytic potentiation by estrogen to coagulation pathway activation in postmenopausal women. **Am. J. Cardiol.**, v. 83, p. 466-469, 1999.

KOH, K.K.; CARDILLO, C.; BUI, M.N.; HATHAWAY, L.; CSAKO, G.; WACLAWIW, M. A.; PANZA, J.A.; CANNON III, R.O. Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Circulation**, v. 99, p. 354-360, 1999.

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. **Thromb. Haemost.**, v. 83. P. 5-9, 2000.

KYRLE, P.A.; MINAR, E.; HIRSCHL, M.; BIALONCZYCK, C.; STAIN, M.; SCHNEIDER, B.; WELTERMANN, A.; SPEISER, W.; LECHNER, K.; EICHINGER, S. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p.457-462, 2000.

LANE, D.A.; GRANT, P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. **Blood**, v. 95, p. 1517-1532, 2000.

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. Thromb. Haemost.**, v.3, p.300-304, 2005.

LORENZI, T.F.; D'AMICO, E.; DANIEL, M.M; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. **Manual de hematologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 641 p.

LOTSPEICH-STEININGER, C. A.; STIENE-MARTIN, E. A.; KOEPKE, J. A. **Clinical hematology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. 545p.

LOWE, G.D.O.; UPTON, M.N.; RUMLEY, A.; McCONNACHIE, A.; O'REILLY, D.S.J.; WATT, G.C.M. Different effects of oral transdermal hormone replacement therapies on factor IX, APC resistance, t-PA, PAI and C-reactive proteina: a cross-sectional population survey. **Thromb. Haemost.**, v. 86, p. 550-556, 2001.

LUYER, M.D.P.; KHOSLA, S.; OWEN, W.G., MILLER, V.M. Prospective randomized study of effects of unopposed estrogen replacement therapy on markers of

coagulation and inflammation in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 3629-3634, 2001.

MADSEN, J.S.; KRISTENSEN, S.R.; GRAM, J.; BLADBJERG, E.M.; HENRIKSEN, F.L.; GRAM, J.; CHRISTENSEN, K.; JESPERSEN, J. Positive impact of hormone replacement therapy on the fibrinolytic system: a long-term randomized controlled study in healthy postmenopausal women. **Thromb. Haemost.**, v.1, p. 1984-1991, 2003.

MANSFIELD, M.W.; STICKLAND, M.H.; GRANT, P.J. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Thromb. Haemost.**, v.74, p. 842-7, 1995.

MARINHO, R. **Climatério**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 410p.

MARTINEZ, T.L.R.; RABELO, L.M.; BERROS, M.A.V.; CANDOROGLO, M.S.; ALDRIGHI, J.M. Dislipidemias em mulheres. In: MARTINEZ, T.L.R. **Condutas clínicas nas dislipidemias**. São Paulo: Health, 1997. Cap. 11, p. 215-228.

MERCURO, G.; VITALE, C.; FINI, M.; ZONCU, S.; LEONARDO, F.; ROSANO, G.M. Lipid profiles and endothelial function with low-dose hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary artery disease: a randomized trial. **Int J Cardiol.**, v. 89, p. 257-65, 2003.

MICHIELS, J.J.; GADISSEUR, A.; van der PLANKEN, M.; SCHROYENS, W.; De MAESENEER, M.; HERMSEN, J.T.; TRIENEKENS, P.H.; HOOGSTEDEN, H.; PATTYNAMA, P.M. Screening for deep vein thrombosis and pulmonary embolism in outpatients with suspected DVT or PE by the sequential use of clinical score: a sensitive quantitative D-dimer test and noninvasive diagnostic tools. **Semin. Vasc. Med.**, v.5, p.351-64, 2005.

MICHIELS, J.J.; GADISSEUR, A.; van der PLANKEN, M.; SCHROYENS, W.; De MAESENEER, M.; HERMSEN, J.T.; TRIENEKENS, P.H.; HOOGSTEDEN, H.; PATTYNAMA, P.M. Different accuracies of rapid enzyme-linked immunosorbent, turbidimetric, and agglutination D-dimer assays for thrombosis exclusion: impact on diagnostic work-ups of outpatients with suspected deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 32, p. 678-93, 2006.

MILLER, J.; CHAN, B.K.S.; NELSON, H.D. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the U.S. preventive services task force. **Ann. Intern. Med.**, v. 136, p. 680-690, 2002.

MORANGE, P. E.; HENRY, M.; TREGOUËT, D.; GRANEL, B.; AILLAUD, M. F.; ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. The A- 844G polymorphism in the PAI-1 gene is associated with a higher risk of venous thrombosis in Factor V Leiden Carriers. **Artioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1387-11391, 2000.

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. **J. Thromb. Haemost.**, v.3, p. 183-185, 2005.

MOSCA, L.; BANKA, C.L.; BENJAMIN, E.J. et al. Evidence Based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. **Circulation**, v.115,p.1-21, 2007. apud I DIRETRIZ Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). **Arq Bras Cardiol.**, v. 91,p.1-23, 2008.

NAUCK, M.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI-1 gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. **Clin. Chem.**, v. 45, p. 1141-1147, 1999.

O'DONNELL, J.; TUDDENHAM, E.G.; MANNING, R.; KEMBALL-COOK, G.; JOHNSON, D.; LAFFAN, M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. **Thromb. Haemost.**, v. 77, p. 825-828, 1997.

O'DONNELL, J.; MUMFORD, A.D.; MANNING, R.A.; LAFFAN, M.A. Marked elevation of thrombin generation in patients with elevated FVIII:C and venous thromboembolism. **Br. J. Haematol.**, v. 115, p.687-91, 2001.

OLSSON, M.L.; CHESTER, M.A. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. **Vox Sang.**, v. 69, p. 242-247, 1995.

OLSSON, M.L.; IRSHAID, N.M.; HOSSEINI-MAAF, B, HELLBERG, A.; MOULDS, M.; SARENEVA, H.; CHESTER, M.A. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**, v.98, p. 1585-1593, 2001.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p. 177-182, 2003.

PAIVA, S. G. Trombose venosa: relação com genótipos do sistema ABO e polimorfismos que predisõem a trombofilia. 2008. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo horizonte, 2008.

PAIVA, S.G.; DE PAULA SABINO, A.; CARVALHO, M.G.; RIBEIRO, D.D.; GOMES, K.B.; SANTOS, M.S.; OLIVEIRA, M.S.; LAGES, G.F.G.; DUSSE, L.M.S.; FERNANDES, A.P. Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. **B. Coagulation And Fibrinolysis**, 2009. In press.

PEREZ, G.S.; GARCIA-RODRIGUES. L.A.; CASTELLSAGUE J.; DUQUE, O.A. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: population based case-control study. **BMJ**, v. 314, p.796-800, 1997.

PINHO, J.S.N. **Climatério**: abordagem terapêutica, 2003. Disponível em: <<http://www.vicnet.com.br/starfire/sobrac/index1.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2009.

POORT, R.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. A common genetic variant in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, v. 88, p. 3698-3703, 1996.

PSATY, B.M.; SMITH, N.S.L.; LEMAITRE, R.N.; VOS, H.;L.; HECKBERT, S.R.; LACROIX, A.Z.; ROSENDAAL, F.R. Hormone replacement therapy, prothrombotic mutations, and risk of incidence non-fatal myocardial infarction. **JAMA**, v. 285, p. 906-913, 2001.

RECOMENDAÇÕES para o exame do perfil lipídico para clínicos e laboratórios: documento integrado ao censo brasileiro de dislipidemias do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Atheros**, São Paulo, v.4, p. 109-120, 1999.

RESUMO das IV diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 88, supl. 1, p. 1-18, 2007.

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

ROSENDAAL, F.R.; HELMERHORST, F.M.; VANDENBROUCKE, J.P. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. **Thromb. Haemost.**, v. 86, p. 112-123, 2001.

ROSENDAAL, F.R.; HELMERHORST, F.M.; VANDENBROUCKE, J P. Female hormones and thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 201-210, 2002.

ROSENDAAL, F.R.; VESSEY, M.; RUMLEY, A.; DALY, E.; WOODWARD, M.; HELMERHORST, F.M.; LOWE, G.D.O. Hormonal replacement therapy, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. **Brit. J. Haematol.**, v. 116, p. 851-854, 2002.

ROUBINET, F.; DESPIAU, S.; CALAFELL, F.; JIN, F.; BERTANPETIT, J.; SAITOU, N.; BLANCHER, A. Evolution of O alleles of the human ABO blood group gene. **Transfusion**, v.44, p.707-715, 2004.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p. 111-118, 1993.

SALOBIR, B.G.; KEBER, I.; VRABIC, L. A randomized, placebo-controlled trial of the effects of continuous combined hormone replacement therapy on coagulation and fibrinolytic systems in healthy postmenopausal women. **Fertil. Steril.**, v. 79, p. 1178-1183, 2002.

SAUERBRONN, A.V.D. Indicações e contra-indicações da terapia de reposição hormonal, 2003. Disponível em:
<<http://www.vicnet.com.br/starfire/sobrac/index1.htm>>. Acesso em: 11 de mar. 2009.

SCARABIN, P.Y.; OGER, E.; PLU-BUREAU, G. Estrogen and ThromboEmbolic Risk Study Group. Differential association of oral and transdermal oestrogen replacement therapy with venous thromboembolism risk. **Lancet**, v. 362, p.428-432, 2003.

SCAZZIOTA, A.; ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. **Rev. Iberoamer. Thromb. Hemostasia**, v.1, p. 9-26, 1996.

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. **Brit. J. Haematol.**, v. 128, p. 100-107, 2004.

SELTSAM, A.; HALLENSLEBEN, M.; KOLLMANN, A.; BURKHART, J.; BLASCZYK, R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 PCR screening reveals new ABO alleles. **Transfusion**, v.43, p. 428-439, 2003.

SGARABOTTO, M.; BALDINI, M.; DEI CAS, A.; MANOTTI, C.; LUCIANA BARILLI, A.; RINALDI, M.; BENASSI, L.; BACCHI MODENA, A. Effects of raloxifene and continuous combined hormone therapy on haemostasis variables: a multicenter, randomized, double-blind study. **Thromb. Res.**, v.119, p. 85-91, 2007.

SMITH, N.L.; HECKBERT, S.R.; LEMAITRE, R.N.; REINER, A.P.; LUMLEY, T.; ROSENDAAL, F.R.; PSATY, B.M. Conjugated equine estrogen, esterified estrogen, prothrombotic variants, and the risk of venous thrombosis in postmenopausal women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, p. 2807-12, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CLIMATÉRIO – SOBRAC. **Consenso SOBRAC sobre TRH: Climatério**, 2003. Disponível em:
<<http://www.vicnet.com.br/starfire/sobrac/index1.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CLIMATÉRIO – SOBRAC. **Consenso da SOBRAC: Terapêutica Hormonal na Peri e na Pós-menopausa**, 2003. Disponível em:
<<http://http://www.sobrac.org.br/profissionais/imagens/consenso-SOBRAC-miolo.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2009.

SOUTO, J.C.; ALMASY, L.; MUÑIZ-DIAZ, E.; SORIA, J.M.; MONTSERRAT, B. et al. Functional effects of the ABO Locus Polymorphism on Plasma Levels of von Willebrand Factor, Factor VIII, and Activate Partial Thromboplastin Time. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, p. 2024-2028, 2000.

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

STEVENSON, J.C. Cardiovascular effects of estrogens. **J. Steroid Bioch. Mol. Biol.**, Oxford, v. 74, p. 387-393, 2000.

STRANDBERG, T.E.; YLIKORKALA, O.; TIKKANEN, M.J. Differing effects of oral and transdermal hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. **Am. J. Cardiol.**, v. 92, p. 212-214, 2003.

TEEDE, H.J.; MCGRATH, B.P.; SMOLICH, J.J.; MALAN, E.; KOTSOPOULOS, D.; LIANG, Y.L.; PEVERILL, R.E. Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p.1404-1409, 2000.

THORNEYCROFT I.H. Hormone replacement therapy: Dannemiller Memorial Educational Foundation, 1995 apud FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; WEHBA, S. **Climatério feminino**. São Paulo: Lemos, 1999, 341 p.

TRIPODI, A. Levels of coagulation factors and venous thromboembolism. **J. Hematology.**, v.88, p.705-11, 2003.

TSAI, A. W.; CUSHMAN, M.; ROSAMOND, W.D.; HECKBERT, S.R.; TRACY, R.P.; ALEKSIC, N.; FOLSOM, A.R. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). **Am. J. Med.**, v.113, p.636-42, 2002.

US PREVENTIVE SERVICE TASK FORCE – USPSTF. Postmenopausal hormone replacement therapy for primary prevention of chronic conditions: recommendations and rationale. **Ann. Intern. Med.**, v. 137, n. 10, p. 834-839, 2002.

VAN HYLCKAMA Vlieg, A.; VAN DER LINDEN, I.K.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R. High levels of factor XI increase the risk of venous thrombosis. **Blood**, v. 95, p. 3678-3682, 2000.

VARAS-LORENZO, C.; GARCIA-RODRIGUEZ, L.A.; CATTARUZZI, C.; TRONCON, M.G.; AGOSTINIS, L.; PEREZ-GUTTHANN, S. Hormone replacement therapy and the risk of hospitalization for venous thromboembolism: a population-based study in southern Europe. **Am. J. Epidemiol.**, v. 147, p. 387-390, 1998.

VARAS-LORENZO, C.; GARCIA-RODRIGUEZ, L.A.; PEREZ-GUTTHANN, S.; DUQUE-OLIART, A. Hormone replacement therapy and incidence of acute myocardial infarction: a population-based nested case-control study. **Circulation**, v. 101, p. 2572-2578, 2000.

VEHKAVAARA, S.; SILVEIRA, A.; HAKALA-ALA-PIETILA, T.; VIRKAMAKI, A.; HOVATTA, O.; HAMSTEN, A.; TASKINEN, M.R.; YKI-JARVINEN, H. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation,

fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. **Thromb. Haemost.**, v. 85, p. 619-625, 2001.

VIGEN, C.; HODIS, H.N.; CHANDLER, W.L.; LOBO, R.A.; MACK, W.J. Postmenopausal oral estrogen therapy affects hemostatic factors, but does not account for reduction in the progression of subclinical atherosclerosis. **J. Thromb. Haemost.**, v.5, p.1201-1208, 2007.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. **J Intern Med**, v. 255, p.188-205, 2004.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I.; AASTVEIT, A. H. HOLME, I.; FURBERG, C.D.; SNIDERMAN, A.D. The apoB/apoA-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, p.1355-1363, 2004.

WHO. **Progress in Reproductive Health Research**, n.40, 1996. Disponível em:<<http://www.who.int/reproductive-health/hrp/progress/40/prog40.pdf>> Acesso em: 11 mar. 2009.

WOMEN' S HEALTH INITIATIVE – WHI Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. **JAMA**, v. 288, p. 321-333, 2002.

WU, O. Postmenopausal hormone replacement therapy and venous thromboembolism. **Gend. Med.**, v. 2, p. 18-27, 2005.

WU, O.; ROBERTSON, L.; LANGHORNE, P.; TWADDLE, S.; LOWE, G.D.; CLARK, P.; GREAVES, M.; WALKER, I.D.; BRENKEL, I.; REGAN, L.; GREER, I. A. Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. **Thromb. Haemost.**, v.94, p.17-25, 2005.

YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P.D.; HAKOMORI, S. genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology*, v.5, p. 51-58, 1995.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PAQUINI, R. **Hematologia- Fundamentos e prática**-Cap. 77, p. 855-875; Cap. 83, p.952-959- SP. Atheneu, 2001, 1081p.

ZEGURA, B.; GUZIC-SALOBIR, B.; SEBESTJEN, M.; KEBER I. The effect of various menopausal hormone therapies on markers of inflammation, coagulation, fibrinolysis, lipids, and lipoproteins in healthy postmenopausal women. **Menopause**, v. 13, p. 643-50, 2006.

16. Diabetes: Sim Não

17. Doença Cardiovascular: Sim Não

18. Doença Auto-imune: Sim Não

19. Doença Renal: Sim Não

20. Doença Hepática: Sim Não

21. Câncer: Sim Não

22. Exames Laboratoriais:

Colesterol:.....Glicose:.....Triglicérides:.....

23. Prescrição:

Medicamento prescrito:.....

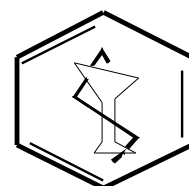
Dosagem:.....

Data das coletas de sangue: Inicial:...../...../..... Aos três meses:...../...../.....

APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **Avaliação da hemostasia e de fatores genéticos predisponentes a trombofilia em mulheres em terapia de reposição hormonal**

Prezada Senhora,

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo da coagulação do sangue e de marcadores moleculares em mulheres que se encontram em uso de terapia de reposição hormonal. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 15 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais. A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com grande capacidade técnica e experiência que estará atento para fazer compressão imediata do local da punção, visando estancar o sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos à vácuo), visando o êxito da coleta.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com a Professora Ana Paula Salles M. Fernandes da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3499-6884 ou através do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG / COEP, pelo telefone 3499-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG.

Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para você ou seus familiares.

Desde já agradeço sua colaboração

Prof^a. Ana Paula Salles M. Fernandes

(Orientadora do projeto, professora de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Farmacêutica-Bioquímica: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem

(Curso de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Nome: _____

Documento de identificação: _____

Assinatura: _____ **Data:** ____/____/____

APÊNDICE 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 265/08

Interessado(a): **Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes**
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de junho de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da hemostasia, do perfil lipídico e de fatores genéticos predisponentes a trombofilia em mulheres em terapia de reposição hormonal (TRH)**" 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.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 1

Valores de referência dos marcadores do perfil hemostático.

Marcador	Valor de referência
D-Di	até 500ng/mL
PAI-1	2 a 47 ng/mL
FVIII	70 a 150%

D-Di: D dímero; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1; FVIII: Fator VIII

ANEXO 2

Valores de referência do perfil lipídico (RESUMO, 2001) e das apolipoproteínas.

Valores de referência dos lípides para indivíduos > 20 anos de idade		
Lípides	Valores (mg/dL)	Categoria
Colesterol Total	< 200	Ótimo
	200 - 239	Limitrofe
	≥ 240	Alto
LDL colesterol	< 100	Ótimo
	100 - 129	Desejável
	130 -159	Limitrofe
	160 -189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL colesterol	< 40	Baixo
	> 60	Alto
Triglicérides	< 150	Ótimo
	150 -200	Limitrofe
	200 -499	Alto
	≥ 500	Muito alto
Apolipoproteínas		
Apolipoproteína A-I	110 a 210 mg/dL	
Apolipoproteína B	60 a 155 mg/dL	