

PARTE 12 **Investigação Laboratorial de Fibrinólise**

Silmara Montalvão

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Tempo de Lise do Coágulo Plasmático Induzida por tPA ✓ Ensaio de Geração de Plasmina
-

Fibrinólise é uma série de reações enzimáticas que degradam a fibrina insolúvel e depende da quantidade e qualidade de várias enzimas fibrinolíticas, como o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e a plasmina, seus respectivos inibidores, o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e a alfa-2-antiplasmina (α 2AP), bem como da estrutura do coágulo (Longstaff e Kolev, 2015). No cenário clínico, o aumento da taxa de fibrinólise é usado para reverter a oclusão trombótica (por exemplo, tPA recombinante para tratamento agudo de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio ou embolia pulmonar), enquanto a diminuição da taxa fibrinolítica é usada para reduzir o sangramento (por exemplo, ácido tranexâmico para tratamento agudo de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio ou embolia pulmonar) (Draxler e Medcalf, 2015; Ilich et al, 2017; Kwaan et al, 2017). Recentemente, na hemofilia, ensaios que medem a formação de coágulo e a fibrinólise têm sido utilizados para facilitar comparações diretas e funcionais entre agentes hemostáticos novos e emergentes que apresentam diferentes mecanismos de ação (Holle et al, 2024). No entanto, testes globais para identificar o potencial fibrinolítico de um indivíduo não são amplamente implementados. Em contraposição, pesquisas básicas sobre fibrinólise geralmente se baseiam na quantificação dos vários fatores fibrinolíticos. As concentrações totais são medidas por meio de ensaios baseados em antígenos e testes funcionais específicos para determinar sua atividade. Apesar da variedade de ensaios disponíveis, continua sendo um desafio atribuir fatores fibrinolíticos individuais que contribuem para o resultado fibrinolítico geral em razão da natureza dinâmica do ambiente que envolve o coágulo (Longstaff, 2018). Durante décadas, ensaios de lise de coágulos monitorados por turbidez têm sido utilizados como método padrão para quantificar o potencial fibrinolítico geral de uma amostra, e variações desse ensaio global e simplista foram desenvolvidas para abordar as funções dos fatores fibrinolíticos. Nesse contexto, dois ensaios foram explorados na prática clínica e apresentam resultados promissores para uso na avaliação do potencial fibrinolítico geral.

Tempo de Lise do Coágulo Plasmático Induzida por tPA: os tempos de lise do coágulo plasmático induzida por ativador do plasminogênio são frequentemente relatados para avaliar e quantificar a propriedade fibrinolítica geral de uma amostra (Longstaff, 2018). Esse teste é realizado adicionando simultaneamente agonistas para iniciar a coagulação (por exemplo, fator tecidual e Ca^{2+}) e a fibrinólise (por exemplo, tPA) ao plasma citratado. Como alternativa, os coágulos podem ser gerados primeiro e depois cobertos com tPA para simular o cenário clínico no qual o tPA é infundido para degradar trombos isquêmicos existentes (Longstaff et al, 2011). A simplicidade do sistema de reação e o processamento mínimo da amostra fazem desse ensaio o método ideal para investigar a suscetibilidade de coágulos plasmáticos à fibrinólise (Holle et al, 2024). O teste também é sensível a moléculas inibidoras que têm como alvo fatores específicos, como PAI-1 e α 2AP, que podem ser incluídas para inferir os respectivos papéis de PAI-1 e α 2AP na fibrinólise geral (Zheng et al, 2023).

Reagentes e método:

- Fosfolípidios [4 μM final]
- CaCl_2 [10 mM final]
- Fator tecidual [dilução 1:15.000 de Innovin, fator tecidual 1 pM final]
- Solução salina tamponada com HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM)
- tPA (0,5 $\mu\text{g/mL}$ final)

- 1) Em uma placa de 96 poços com fundo em U, pipete 10 µL de TF/PL/rtPA em cada poço (pipetagem reversa para o fundo do poço)
- 2) Adicione 40 µL de PPP em cada poço (pipetagem reversa para a lateral do poço na parte de cima)
- 3) Pré-aqueça a placa na incubadora por 5 minutos
- 4) Após 5 minutos de pré-aquecimento, use uma pipeta multicanal para transferir 10 µL de Ca, misture bem e evite a formação de bolhas
- 5) Coloque a placa rapidamente no leitor de placas e inicie a leitura
- 6) Monitore a reação por 2 horas, medindo a turbidez a 405 nm a cada 12 segundos usando um leitor de placas.

Ensaio de Geração de Plasmina: os ensaios de geração de plasmina desenvolvidos por vários grupos compartilham alguns elementos comuns (Longstaff, 2018; Zheng et al, 2023). Em geral, a atividade pró-coagulante no ensaio de geração de plasmina é iniciada pela adição de fator tecidual exógeno ao plasma recalcificado, e a atividade fibrinolítica é desencadeada pela adição de tPA exógeno. A geração de plasmina é detectada pela clivagem de um substrato fluorogênico, e os parâmetros são definidos a partir do acúmulo de fluorescência ou por meio de uma derivada matemática dessa curva de fluorescência. Diferenças sutis entre esses ensaios incluem as concentrações de fator tecidual e tPA usadas e a utilização ou não de plasma diluído. Algumas variações desses ensaios detectam trombina e plasmina simultaneamente, enquanto outras realizam essas medições separadamente, mas em paralelo. Estudos mostram que esses ensaios são específicos para plasmina e sensíveis à $\alpha 2AP$, com a atividade medida representando a plasmina livre. A geração de plasmina também é sensível ao ácido tranexâmico. Considerando as altas concentrações de tPA necessárias para desencadear a geração de plasmina mensurável, o teste não é sensível a concentrações plasmáticas de PAI-1 (Misztal et al, 2021). No entanto, a resposta de geração de plasmina à adição de tPA exógeno é dose-dependente. Um crescente corpo de estudos sugere que ensaios de geração de plasmina, especialmente quando usados com ensaios de geração de trombina e turbidez, produzem uma impressão multidimensional dos efeitos integrados das atividades pró-coagulante e fibrinolítica na saúde e na doença (Misztal et al, 2021; Zheng et al, 2023).

Reagentes e método:

- Solução salina tamponada com Tris (TBS), contendo 66 mM de Tris e NaCl 130 mM
 - 34 mM de $CaCl_2$
 - 10 pM de fator tecidual (fator tecidual humano recombinante lipídado, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemanha)
 - 900 ng/mL de tPA (ativador do plasminogênio tecidual de cadeia dupla recombinante, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Alemanha)
 - α -trombina (BOC-VAL-PrO-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmina (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Prepare a solução reagente com 34 mM de $CaCl_2$, 10 pM de fator tecidual e 900 ng/mL de tPA na solução TBS. A concentração final dos reagentes no plasma foi 5 pM de TF e 450 ng/mL de tPA.
 - 2) Dois substratos foram preparados com concentração final de 100 µM e utilizados na detecção das enzimas: α -trombina e plasmina.
 - 3) Os dois primeiros poços da placa (Greiner, 96 poços, fundo plano, preto transparente) devem ser usados como branco, e as amostras foram analisadas em duplicata, em fileiras paralelas, para cada substrato, evitando possível interferência e/ou interação na detecção do sinal.
 - 4) Adicione soluções de substrato (20 µL) aos poços da placa, seguido de 90 µL das amostras e do branco (solução TBS).
 - 5) Utilizando uma pipeta automática com múltiplas ponteiros, adicione 90 µL da solução de reação pré-aquecida (37°C por 3 min) a cada poço da placa.
 - 6) Por fim, a placa deve ser lida no fluorômetro com comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão de 450 nm por 4 horas em intervalos de 45 segundos.
 - 7) A análise de dados pode ser realizada pelo software Microsoft® Excel®. As curvas para trombina e plasmina devem ser geradas calculando a média em cada ponto de tempo para os poços de plasma duplicados,

subtraindo os valores de leitura do branco (para trombina e plasmina separadamente). Parâmetros a serem calculados nos dois ensaios, usando as ferramentas do aplicativo Shiny: início (tempo até o ponto de inflexão antes do aumento da turbidez), taxa máxima (inclinação de uma linha ajustada à taxa máxima de aumento da turbidez usando 5 a 10 pontos para determinar a linha), tempo até o platô/pico (tempo até o platô [formação de coágulo] ou pico [fibrinólise] de turbidez), alteração de turbidez (turbidez máxima do coágulo menos a turbidez inicial) e área sob a curva (AUC) (calculada como a soma dos trapézios formados pelas curvas de turbidez).

Referências

- Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.
- Holle LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Clot formation and fibrinolysis assays reveal functional differences among hemostatic agents in hemophilia A plasma. *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(1): 102337.
- Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.
- Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinolysis: Biochemistry, clinical aspects, and therapeutic potential. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.
- Longstaff C. Development of Shiny app tools to simplify and standardize the analysis of hemostasis assay data: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.
- Longstaff C. Measuring fibrinolysis: From research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.
- Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.
- Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: Kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011; 117(2): 661-668.
- Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de Laat B. Assessing plasmin generation in health and disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.
- Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Assays to quantify fibrinolysis: Strengths and limitations. Communication from the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.

TÓPICOS ABORDADOS

✓ Hemostasia do Desenvolvimento

✓ Parâmetros de Coagulação em Neonatos e Crianças
versus Adultos

O equilíbrio hemostático pediátrico, diferente do adulto, é um processo evolutivo conforme o sistema hemostático se modifica e amadurece da vida fetal até a vida adulta, principalmente durante os primeiros meses de vida. Compreender o conceito de hemostasia do desenvolvimento, hoje universalmente aceito, é fundamental para garantir o diagnóstico e o tratamento ideais de doenças hemorrágicas e trombóticas em crianças.

Hemostasia do Desenvolvimento: a hemostasia é um mecanismo complexo que envolve fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Ela permite que o sangue permaneça líquido ao circular em vasos intactos. Também evita o sangramento excessivo, promovendo a formação de coágulos após lesão endotelial, e a coagulação excessiva, limitando a formação de coágulos no local da lesão. O equilíbrio hemostático depende principalmente de muitos parâmetros, incluindo plaquetas, fatores de coagulação e inibidores, embora as células endoteliais e sanguíneas desempenhem um papel significativo. Crianças não são apenas adultos em miniatura, pelo menos no que diz respeito à hemostasia, pois o equilíbrio hemostático pediátrico é diferente do de adultos. Além disso, é um processo evolutivo, como demonstrado por Andrew M. et al (1987) há mais de 30 anos, tanto em recém-nascidos prematuros quanto em recém-nascidos a termo. Esses autores demonstraram que o sistema hemostático se modifica e amadurece ao longo do tempo, da vida fetal até a idade adulta, principalmente durante os primeiros meses de vida, e promoveram o conceito de hemostasia do desenvolvimento. Os fatores de coagulação de origem materna são incapazes de atravessar a barreira placentária devido ao seu tamanho. A síntese de fatores de coagulação pelo feto inicia-se precocemente (por exemplo, durante a quinta semana de gestação no caso do fibrinogênio), e o sangue se torna coagulável após onze semanas de gestação. As faixas de referência de parâmetros de coagulação para fetos foram estudadas em diferentes faixas etárias gestacionais, e os níveis plasmáticos medianos situaram-se entre 10% e 30% dos valores de adultos, dependendo do parâmetro avaliado, em fetos com idade entre 19 e 23 semanas, aumentando progressivamente para níveis entre 10% e 50% entre 30 e 38 semanas de gestação. Os achados iniciais de Andrew M et al (1987) foram confirmados por vários estudos que avaliaram diferentes populações pediátricas em diversas condições técnicas (ou seja, combinações de reagentes/analísadores). Os critérios de seleção dos indivíduos foram relativamente homogêneos entre os estudos; porém, alguns tiveram critérios de inclusão/exclusão e grupos etários ligeiramente diferentes. A principal diferença entre os estudos foi o número de indivíduos avaliados em cada faixa etária, que variou de 10 a mais de 500 indivíduos. O processo de coleta de amostras, um ponto-chave a ser considerado, visto que a coleta de sangue de bebês ou neonatos pode ser mais problemática do que em adultos, foi comparável nos diferentes estudos, com sangue coletado por punção venosa em tubos contendo citrato 3,2% (1 vol./9 vol.) usando agulhas de calibre 18 a 24, dependendo da idade dos pacientes. A maioria desses estudos se concentrou principalmente em ensaios de atividade para a maioria dos parâmetros envolvidos no sistema de coagulação, enquanto um estudo avaliou as concentrações de antígenos de vários analitos. Todos esses estudos mostraram que, ao nascimento, os níveis plasmáticos da maioria das proteínas de coagulação eram cerca de metade dos medidos em adultos, exceto FVIII:C e FVW, que são elevados, com os recém-nascidos prematuros apresentando níveis mais baixos do que os recém-nascidos a termo. Os valores de adultos foram atingidos entre alguns meses de idade e até mais de 16 anos para parâmetros específicos, como FVII ou proteína C da coagulação, conforme mostrado na Tabela 39. Embora a tendência global seja consistente entre os estudos, as diferenças nos valores absolutos provavelmente se devem a diferenças nos reagentes e/ou nos instrumentos utilizados para medir esses parâmetros, particularmente nos testes globais de coagulação, como TP

ou TTPA. Assim, o Subcomitê do Comitê Científico e de Padronização da ISTH recomenda que cada laboratório defina suas faixas de referência dependentes da idade, utilizando suas próprias condições técnicas. Para cumprir a diretriz C28A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), as faixas de referência devem ser estabelecidas testando pelo menos 30 indivíduos diferentes em cada faixa etária. A obtenção de plasma suficiente a partir de um grande número de crianças "aparentemente" saudáveis para a realização de inúmeros testes gera questões logísticas que estariam muito além da capacidade de muitos laboratórios. Para contornar essa dificuldade, é prática comum consultar dados da literatura levando em consideração condições técnicas idênticas, mesmo que o processo pré-analítico, e particularmente a coleta de sangue, possa ser diferente daquele utilizado em uma determinada instituição. As condições técnicas (ou seja, combinação de reagentes e instrumentos) utilizadas nas principais publicações são apresentadas na Tabela 40. A hemostasia primária foi menos estudada. Contudo, a contagem de plaquetas geralmente é normal ou elevada ao nascimento, atingindo os valores de adultos no período de 1 ano após aumentos transitórios. Apesar das plaquetas hiporreativas, particularmente no período neonatal, constatou-se que o tempo de sangramento e o tempo de fechamento plaquetário (PFA-100®) eram menores em recém-nascidos, sugerindo maior potencial hemostático. A normalização ocorreu antes do final do primeiro mês de vida. Em recém-nascidos, foram relatados níveis significativamente mais altos de FVW que depois diminuíram, atingindo os valores de adultos após 1 ano de vida, momento em que se observa um aumento significativo dos níveis plasmáticos nos grupos sanguíneos não O em comparação aos grupos sanguíneos O.

Conclusões

A compreensão do conceito de hemostasia do desenvolvimento, hoje universalmente aceito, é fundamental para garantir a prevenção, o diagnóstico e o tratamento ideais de doenças hemorrágicas e trombóticas em crianças. Portanto, é obrigatório que o laboratório utilize faixas de referência de parâmetros de coagulação específicas para cada idade. Parece impossível exigir que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência para cada parâmetro de coagulação em suas próprias condições técnicas, testando pelo menos 120 indivíduos saudáveis em cada faixa etária, conforme recomendado pela Diretriz EP 28-A3C do CLSI. Portanto, a melhor opção para um laboratório seria traduzir os achados da literatura em faixas de referência locais para neonatos e crianças, levando em consideração seu ambiente técnico específico. Nesse sentido, já foram disponibilizados dados de combinações de reagentes e analisadores de fabricantes atuais. No caso de novos fabricantes, estudos específicos e, de preferência, multicêntricos teriam que ser realizados para estabelecer as faixas de referência pediátricas específicas utilizando essas novas combinações de reagentes/analisadores.

Tabela 39. Parâmetros de coagulação em neonatos e crianças versus adultos: resumo dos resultados dos testes e efeito potencial na hemostasia (adaptado de Toulon et al, 2016)

Componente	Parâmetro	Período neonatal (valor médio)*	Normalização	Impacto na hemostasia
Hemostasia primária	Plaquetas FWW Tempo de fechamento plaquetário (PFA-100®)	Normais ou elevadas Elevado (153%)* Reduzido	1 A (após aumentos transitórios) 3 M 2-4 S	Hemostasia primária aumentada
Coagulação	FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, PK, HMWK FV FVIII Fibrinogênio TP TTPa	Diminuído (40-66%)* Diminuído (37-54%)* Normal ou diminuído (70%)* Normal ou aumentado (100)* Normal** Prolongado ou normal Prolongado	1 A (até 16 A para FVII) 1 A 1 A (até 16 A) 1 M 1 A 1 A 1 A (até 16 A)	Potencial de coagulação diminuído
Inibidores naturais da coagulação	Antitrombina Proteína C Proteína S	Diminuída (63%) Diminuída (35%) Diminuída (36%)*	3 M 16 A 3 M	Potencial regulatório/inibitório diminuído
Fibrinólise	Plasminogênio alfa 2 antiplasmina tPA dímero D	Diminuído (36%)* Normal ou diminuída (85%)* Aumentado Aumentado	6 M 6 M 1 S 16 A	Atividade fibrinolítica aumentada

*Em porcentagem (%) dos valores de adultos, de Andrew M, et al. (1987); **Fibrinogênio fetal pode estar presente; M: mês; S: semana; A: ano

Tabela 40. Condições técnicas (marcas de instrumentos e reagentes) utilizadas nos principais estudos que relataram valores habituais dos parâmetros de coagulação em populações pediátricas (*indica instrumentos e/ou reagentes que não estão mais disponíveis comercialmente)

Autores	Instrumentos	Reagentes
Andrew et al (1987, 1988)	ACL (Werfen)*	Vários*
Flanders et al (2005, 2006)	STA-R (Stago) BCS (Siemens)	Principalmente Stago
Monagle et al (2006, 2011)	STA Compact (Stago)	Stago
Apple et al (2012)	BCS (Siemens) CA-1500 (Sysmex)	Siemens
Attard et al (2013)	Leitor de microplacas	Stago
Toulon et al (2016)	ACL TOP 500/700 (Werfen)	Siemens

Referências

- Andrew M. Developmental hemostasis: Relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21(4): 341-356.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70(1): 165-172.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers P. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72(5): 1651-1657.
- Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80(8): 1998-2005.
- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays. *Clin Chem* 2005; 51(9): 1738-1742.
- Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for uncommon bleeding and thrombotic disorders. *J Pediatr* 2006; 149(2): 275-277.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pasce A, Sine HE, Zakowski J. CLSI Document EP28-A3C. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2010; Vol.28, n°30.
- Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P; Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Developmental hemostasis: Recommendations for laboratories reporting pediatric samples. *J Thromb Haemost* 2012; 10(2): 298-300.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Coagulation testing in pediatric patients: The young are not just miniature adults. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(8): 816-820.
- Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A et al. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006; 95(2): 362-372.
- Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: Secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(6): 294-300.
- Roschitz B1, Sudi K, Köstenberger M, Muntean W. Shorter PFA-100 closure times in neonates than in adults: Role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor. *Acta Paediatr* 2001; 90(6): 664-670.
- Toulon P. Developmental hemostasis: Laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hematol* 2016; 38 Suppl 1: 66-77.
- Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in pediatric populations. Results of a multicenter study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016(1); 116: 9-16.
- Williams MD, Chalmers EA, Gibson BE; Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. The investigation and management of neonatal haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2002; 119(2): 295-309.