

# Deficiência das proteínas inibidoras da coagulação em crianças e adolescentes com cirrose

## Coagulation-inhibiting proteins deficiency in children and adolescents with cirrhosis

### RESUMO

**Introdução:** Cirrose é uma das causas de deficiência das proteínas inibidoras da coagulação (PIC). O objetivo deste estudo é determinar a frequência da deficiência das proteínas C (PC), S (PS) e antitrombina (AT) em crianças e adolescentes cirróticos.

**Material e métodos:** Estudo transversal controlado com crianças e adolescentes com cirrose (n=24), diagnosticada por biópsia hepática e/ou exames complementares, e controles pareados por idade (n=28). A média da idade foi de  $8,2 \pm 5,5$  a. A maioria era caucasiano (23/24) do sexo feminino (14/24). Fator etiológico da cirrose: atresia biliar (10), hepatite auto-imune (3), hepatite viral B (1), C (1) e criptogênica (9). Pela classificação de Child-Pugh, 12/24 pertenciam à categoria A, 10/24, à B e 2/24, à C. Atividade da PC e PS determinada pelo método coagulométrico e da AT, pelo colorimétrico. Análise feita pelos testes de qui-quadrado e exato de Fischer.

**Resultados:** Dezesesseis crianças com cirrose (66,7%) apresentaram redução na atividade das PIC, deficiência da PC em 14/24, da PS em 11/24 e da AT em 11/24. A média da atividade de PC, PS e AT foi de  $49,23 \pm 33,10$ ;  $69,08 \pm 29,63$  e  $78,38 \pm 38,59$  ( $p < 0,05$  vs. controles). Grupo Child-Pugh A: média da atividade de PC, PS e AT:  $70,92 \pm 32,66$ ;  $86,75 \pm 27,65$  e  $102,08 \pm 35,11$  ( $p > 0,05$ ) e no Child-Pugh B e C de  $27,92 \pm 14,69$ ;  $51,42 \pm 19,75$  e  $54,67 \pm 25,58$  ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A atividade das PIC diminui com a progressão da doença hepática. A avaliação desses parâmetros hemostáticos pode auxiliar na avaliação da gravidade da hepatopatia.

**UNITERMOS:** Cirrose, Crianças, Proteínas Inibidoras da Coagulação, Proteína C, Proteína S, Antitrombina.

### ABSTRACT

**Introduction:** Cirrhosis is considered one of the acquired causes of deficiency of the coagulation inhibiting-proteins. The object of this study is to determine the frequency of deficiency of protein C (PS), S (PS) and antithrombin (AT) in cirrhotic children and adolescents.

**Casistic and methods:** A transversal study was carried out, including 24 children and adolescents with cirrhosis, diagnosed by hepatic biopsies and/or complementary exams, and an age-matched control group without liver disease (n = 28). The mean age of the patients was  $8,2 \pm 5,5$  years. The majority were female (14/24) and caucasians (23/24). The etiological factor of cirrhosis was biliary atresia (10), auto-immune hepatitis (3), Virus B (1) and C (1) hepatitis and cryptogenic (9). Considering Child-Pugh classification, 12/24 of the patients fall into category A, 10/24, B and 2/24, C. The activity of PC and PS was determined by the coagulation method and of AT by colorimetric analysis. The chi-square test and Fischer exact test was used for statistical analysis.

**Results:** Sixteen children (66,7%) presented a reduction in the activity level of coagulation inhibiting proteins. PC deficiency was observed in 14/24, of PS in 11/24 and of AT in 11/24. The average activity of PC, PS and AT was  $49,23 \pm 33,10$ ;  $69,08 \pm 29,63$  and  $78,38 \pm 38,59$  ( $p < 0,05$  vs. controls). In the Child-Pugh Group A, the average of PC, PS and AT was  $70,92 \pm 32,66$ ;  $86,75 \pm 27,65$  and  $102,08 \pm 35,11$  ( $p > 0,05$ ) and in the Child-Pugh B and C categories  $27,92 \pm 14,69$ ;  $51,42 \pm 19,75$  and  $54,67 \pm 25,58$  ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** The coagulation inhibiting-proteins activity decreases as the liver disease progresses. The assessment of this haemostatic parameter could be of assistance in the evaluation of the progression of liver impairment.

**KEY WORDS:** Cirrhosis, Children, Coagulation-Inhibiting Proteins, Protein C, Protein S, Antithrombin.

**RAQUEL BORGES PINTO** – Médica Pediatra, Doutora em Gastroenterologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
**THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA** – Doutora em Genética, Professor Adjunto de Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**LIANE MARISE RÖHSIG** – Farmacêutico-bioquímico, Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Serviço de Pediatria, Setor de Gastroenterologia Pediátrica e Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Este estudo é parte da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

✉ Endereço para correspondência:

**Prof. Themis Reverbel da Silveira**  
Rua 24 de Outubro 1181 – Auxiliadora  
90510-003 – Porto Alegre – RS, Brasil

☎ (51) 3342-5380

✉ tsilveira@hcpa.ufrgs.br

## I NTRODUÇÃO

A proteína C ativada apresenta atividade anticoagulante e fibrinolítica. A atividade anticoagulante é exercida em associação com seu co-fator não enzimático, a PS. A interação entre a PC e a PS resulta na inativação dos fatores Va e VIIIa (1). A AT pertence ao grupo dos inibidores diretos da trombina, os quais formam complexos estáveis com a trombina, enzima chave no processo da coagulação, com consequente neutralização da sua atividade. A AT é o principal anticoagulante desse grupo e também é responsável pela inibição dos fatores X, IX, XII e XI (2).

A deficiência das PIC está relacionada a uma maior tendência à trombose venosa. Pode ser primária, de origem genética, ou secundária, resultante de diversas situações em que ocorre um maior consumo ou diminuição da síntese. A deficiência secundária das PIC pode decorrer de coagulação in-

travascular disseminada, trombose ou inflamação aguda, neoplasias, deficiência de vitamina K, gravidez, Lúpus eritematoso sistêmico e uso de drogas como warfarin, heparina, estrógenos e L-asparaginase. Na cirrose também pode ocorrer deficiência das PIC, que constitui parte das alterações complexas da coagulação sanguínea que envolve proteínas pró-coagulantes e inibidores da coagulação (3).

O objetivo deste estudo é avaliar a frequência da deficiência de proteína C, proteína S e antitrombina em crianças e adolescentes com cirrose.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal controlado durante um período de 2 anos (junho de 1997 a junho de 1999) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram estudados 24 crianças e adolescentes com cirrose e 28 pacientes sem hepatopatia, pareados por idade.

O diagnóstico de cirrose foi realizado por exames complementares e/ou biópsia hepática. A média de idade dos pacientes com cirrose foi de 8 anos e 2 meses  $\pm$  5 anos e 5 meses. A maioria dos pacientes eram caucasianos (23/24) e pertenciam ao sexo feminino (14/24). Os fatores etiológicos da cirrose foram atresia biliar em 10 pacientes, hepatite auto-imune em 3, vírus B em 1 e vírus C em 1. Em 9/24 pacientes não foi identificada a causa da cirrose. Um paciente com cirrose apresentou trombose da veia porta. De acordo com a classificação de Child-Pugh (4), 12/24 pacientes com cirrose pertenciam à categoria A, 10/24 à B e 2/24 à C. Os dados demográficos dos pacientes estão expostos na Tabela 1. Para a análise dos resultados, foram divididos em dois subgrupos: Child-Pugh A e Child-Pugh B ou C.

O grupo-controle sem hepatopatia foi composto por crianças e adolescentes sem queixas relacionadas a fígado e vias biliares ou presença de trombose, selecionadas no Ambulatório de Gastroenterologia Infantil do HCPA. Este grupo foi constituído por pacien-

**Tabela 1** – Idade, gênero, grupo racial, classificação de Child-Pugh e fator etiológico de 24 crianças e adolescentes com cirrose

Caso	Idade (anos)	Gênero	Grupo racial	Child-Pugh	Fator etiológico
1	4,3	F	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
2	9	F	C	B	Desconhecido
3	10,7	M	C	B	Desconhecido
4	19,8	F	NC	A	Hepatite crônica auto-imune
5	8,9	F	C	B	Desconhecido
6	1,2	F	C	A	Desconhecido
7	5,7	M	C	B	Atresia de vias biliares extra-hepática
8	10,6	M	C	B	Desconhecido
9	5,2	M	C	A	Desconhecido
10	6,5	F	C	A	Desconhecido
11	1,6	F	C	B	Atresia de vias biliares extra-hepática
12	6,3	F	C	C	Desconhecido
13	4,9	M	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
14	14,11	F	C	B	Desconhecido
15	13,7	M	C	B	Hepatite viral B
16	12,8	F	C	A	Hepatite auto-imune
17	6,8	F	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
18	1,3	M	C	C	Atresia de vias biliares extra-hepática
19	2,4	M	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
20	13,1	F	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
21	15,7	M	C	B	Atresia de vias biliares extra-hepática
22	16	F	C	B	Talassemia/Hepatite viral C
23	8,11	F	C	A	Hepatite auto-imune
24	6	M	C	A	Atresia de vias biliares extra-hepática
Média	8,2 $\pm$	F14/24	C23/24		
( $\pm$ DP)	5,5				

F: feminino; M: masculino; C: caucasiano; NC: não caucasiano; Intensidade da doença de acordo com a classificação de Child-Pugh: A: leve; B: moderada; C: severa.

tes que apresentavam constipação crônica funcional de leve intensidade e/ou refluxo gastroesofágico sem repercussão no crescimento pândero-estatural. Foram excluídos pacientes com doenças neoplásicas, inflamatórias e/ou uso de drogas (estrogênio, L-Asparaginase). A média de idade do grupo-controle sem hepatopatia foi de 8 anos e 10 meses  $\pm$  4 anos e 5 meses. Todos os controles eram caucasianos e 15/28 pacientes pertenciam ao sexo masculino.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital, tendo sido obtido consentimento informado por todos os responsáveis pelas crianças e adolescentes incluídos no estudo.

### Coleta de sangue

A coleta de sangue dos indivíduos do estudo foi efetuada por punção venosa antecubital. Para a realização dos

exames, foram misturadas 9 partes da amostra com 1 parte de citrato de sódio a 3,8% em tubos de vidro siliconizado. O sangue foi então centrifugado por 15 minutos a 2.500 g. O plasma foi separado em pequenas alíquotas, colocado em tubos plásticos, identificado e armazenado a  $-80^{\circ}$ .

### Análises específicas

A dosagem quantitativa das proteínas C e S foi realizada pelo método coagulométrico, utilizando-se o kit STACLOT Protein C, Diagnostica Stago (5). Para dosagem da atividade da PS foi utilizado o kit STACLOT Protein S, Diagnostica Stago (6). A atividade da AT foi medida pelo teste colorimétrico utilizando-se o kit STACHROM AT III, Diagnostica Stago (7). Os valores foram interpolados em uma curva de calibração e os resultados

expressos em porcentagem de um plasma de referência. Os valores de referência para a atividade das proteínas foram obtidos através da subtração de 2 desvios-padrão da média da atividade das proteínas dos controles sem hepatopatia. Os valores de referência utilizados foram: 51%, 53% e 76% para as proteínas C, S e AT, respectivamente.

### Análise estatística

Na comparação das variáveis categóricas, adotou-se o teste de  $\chi^2$  e exato de Fisher, quando necessário. O nível de significância utilizado foi de  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram analisados com auxílio dos programas Epi-info V6 e Pepi V3.

## RESULTADOS (Tabela 2)

Na maioria das crianças com cirrose (16/24, 66,7%), verificou-se diminuição da atividade de uma ou mais

PIC. Quatorze delas (58,3%) apresentaram redução da atividade da PC, 7 (29,2%), diminuição da PS e 11 (45,8%), diminuição da AT. A média da atividade de PC, PS e AT nas crianças e adolescentes com cirrose foi de  $49,23 \pm 33,10$ ;  $69,08 \pm 29,63$  e  $78,38 \pm 38,59$ . Os valores mínimos das proteínas C, S e AT foram 3%, 17% e 7%, respectivamente.

### Pacientes com cirrose Child-Pugh A:

Apenas 4/12 (33,3%) crianças com cirrose Child-Pugh A apresentaram diminuição da atividade de uma ou mais proteínas. Três (25%) mostraram diminuição da atividade da PC, 2 (16,7%), diminuição da atividade da PS e 2 (16,7%), da AT. A média e o desvio-padrão da atividade das proteínas C, S e AT dos pacientes com cirrose Child-Pugh A foram  $70,92 \pm 32,66$ ,  $86,75 \pm 27,65$  e de  $102,08 \pm 35,11$ , respectivamente. Os valores mínimos da

atividade das proteínas C, S e AT foram 17%, 48% e 38%, respectivamente.

### Pacientes com cirrose Child-Pugh B e C:

Nos 12 pacientes com cirrose Child-Pugh B ou C houve diminuição da atividade de uma ou mais proteínas. Em 11 pacientes (91,7%) houve diminuição da atividade da PC. Cinco (41,7%) mostraram diminuição da atividade da PS e 9 (75%), da AT. A média e o desvio-padrão da atividade das proteínas C, S e AT dos pacientes com cirrose Child-Pugh B e C foram de  $27,92 \pm 14,69$ ;  $51,42 \pm 19,75$  e de  $54,67 \pm 25,58$ , respectivamente. Os valores mínimos da atividade das proteínas C, S e AT desse grupo foram 3%, 17% e 7%, respectivamente.

Comparação entre os pacientes e os controles sem hepatopatia (Figuras 1, 2 e 3):

Nenhum dos controles sem hepatopatia apresentou deficiência das PIC. A média e o desvio-padrão da atividade da PC, PS e AT dos controles foi de  $81,82 \pm 15,21$ ,  $95,46 \pm 21,02$  e  $102,00 \pm 12,89$ . Na comparação entre os pacientes com cirrose e controles, observamos deficiência significativa de PC ( $p = 0,01$ ), PS ( $p = 0,018$ ) e AT ( $p = 0,001$ ) nos pacientes cirróticos. Porém, com a divisão de acordo com a intensidade da doença em subgrupos Child-Pugh A e Child-Pugh B ou C, só foi constatada deficiência significativa de PC ( $p = 0,001$ ), PS ( $p = 0,01$ ) e AT ( $p = 0,001$ ) no subgrupo Child-Pugh B ou C em relação aos controles sem hepatopatia.

## DISCUSSÃO

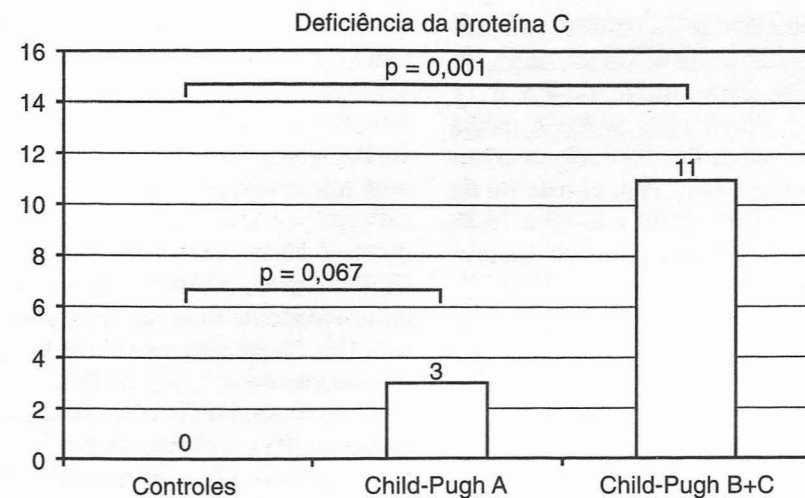
O fígado apresenta um papel central na hemostasia, sendo responsável pela síntese da maioria dos elementos envolvidos na coagulação, como as proteínas dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X), proteínas inibidoras da coagulação e outros inibidores e, ainda, proteínas do sistema fi-

**Tabela 2** – Atividade (%) das proteínas C, S e antitrombina em 24 crianças e adolescentes com cirrose

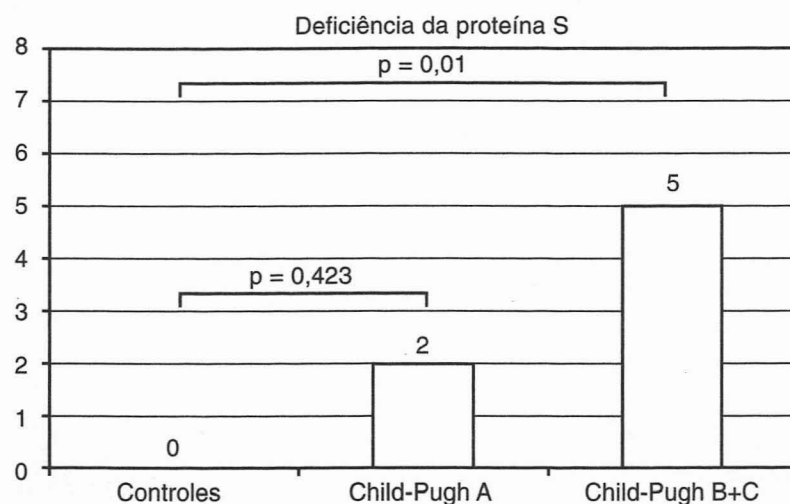
Caso	Proteína C (> 51%)	Proteína S (> 53%)	Antitrombina (> 76%)
1	68	95	135
2	15*	69	22*
3	22*	56	32*
4	67	51*	92
5	32*	84	55*
6	31*	61	69*
7	59	26*	97
8	27*	57	78
9	92	120	153
10	120	101	157
11	20*	33*	48*
12	23*	75	48*
13	80	106	120
14	30*	41*	61*
15	48*	55	77
16	57	59	81
17	61	65	85
18	3*	55	7*
19	17*	120	38*
20	120	110	110
21	22*	17*	57*
22	34*	49*	74*
23	97	105	104
24	41*	48*	81
Média ( $\pm$ DP)	49,42 $\pm$ 33,10	69,08 $\pm$ 29,63	78,38 $\pm$ 38,59

\*: Valores alterados.

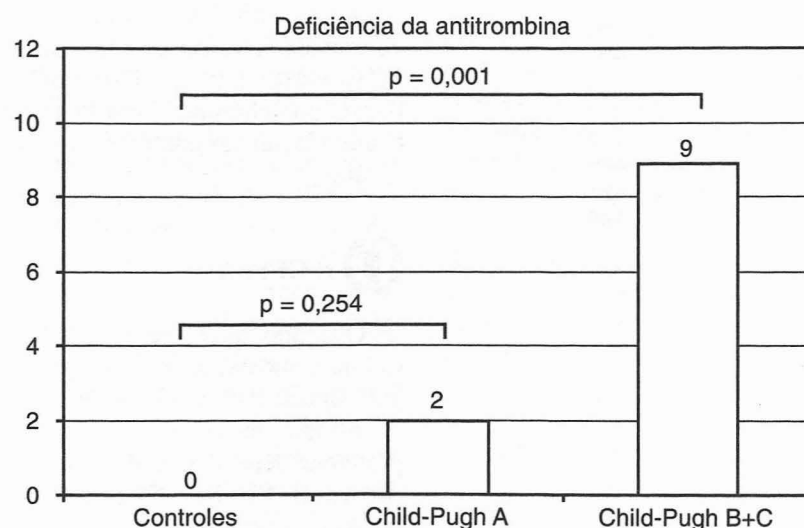




**Figura 1** – Número de pacientes com deficiência da proteína C de acordo com a classificação de Child-Pugh.



**Figura 2** – Número de pacientes com deficiência da proteína S de acordo com a classificação de Child-Pugh.



**Figura 3** – Número de pacientes com deficiência da antitrombina de acordo com a classificação de Child-Pugh.

brinolítico. A carboxilação dos fatores vitamina K-dependentes ocorre no retículo endoplasmático rugoso do hepatócito e é essencial para tornar a proteína funcionalmente ativa (8). O sistema reticuloendotelial do fígado é responsável pela depuração dos fatores da coagulação ativados, proteínas do sistema fibrinolítico e produtos finais da degradação da fibrina. Os pacientes com cirrose exibem alterações complexas no sistema da coagulação que incluem, além da diminuição da síntese hepática de proteínas, produção de fatores de coagulação com função anormal, maior consumo desses fatores e depuração alterada de componentes do sistema de coagulação (9). As alterações podem resultar em uma excessiva ativação da coagulação ou CIVD, aumento da fibrinólise e/ou estado de hipercoagulabilidade (10).

Nos pacientes com cirrose do nosso estudo, houve uma maior frequência de deficiência das proteínas inibidoras da coagulação em relação ao grupo-controle sem hepatopatia. Resultados similares foram registrados em estudos que avaliaram adultos cirróticos e observaram baixos níveis das proteínas inibidoras da coagulação (11, 12). As alterações mais frequentes no nosso estudo foram deficiência de PC, seguida pela de AT. De acordo com OLIVIER, GRUEL & BACQ (1991), a deficiência da PC e AT na cirrose descompensada parece estar associada à produção de uma proteína alterada em razão de um distúrbio na carboxilação dessa proteína (10). A menor frequência da deficiência de PS, nos pacientes com cirrose, pode ser justificada pela produção extra-hepática dessa proteína pelo megacariócito (13) e pelas células endoteliais (14).

A deficiência das proteínas inibidoras da coagulação foi mais evidente nos casos com doença de maior intensidade, que foram os pacientes Child-Pugh B ou C do nosso estudo. Achados superponíveis aos nossos foram observados em estudos realizados em adultos em que foi identificada uma correlação da deficiência das proteínas inibidoras da coagulação em adultos cirróticos conforme o grau de disfunção hepática avaliado pela classificação de

Child-Pugh (11,15). Na maioria dos nossos pacientes, ocorreu deficiência simultânea de 2 ou 3 proteínas, diferentemente do que ocorre nos casos de deficiência congênita das PIC (16).

Entre os pacientes estudados, os níveis mais baixos da PC e da AT foram identificados no único paciente com cirrose que apresentou trombose da veia porta (caso 18). Entretanto, a deficiência adquirida das PIC secundária à insuficiência hepatocelular não parece aumentar o risco de trombose venosa mesentérica ou portal, possivelmente porque nessa situação também ocorrem alterações nas proteínas pró-coagulantes (12).

Alterações semelhantes às que ocorrem na cirrose relacionadas à coagulação e fibrinólise também foram observadas em pacientes com trombose da veia porta (17). Em estudo com 14 crianças com trombose da veia porta sem doença hepática, observamos deficiência de uma ou mais proteínas inibidoras da coagulação, especialmente da PC, em metade dos pacientes (18). De acordo com FISCHER *et al.* (2000), é possível que, de maneira similar à cirrose, na trombose da veia porta ocorram alterações que causem um certo desequilíbrio entre os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, talvez vinculado à formação das derivações portossistêmicas (19).

Em síntese, a maioria das crianças e adolescentes com cirrose estudadas apresentaram diminuição da atividade das PIC, que ocorreu proporcionalmente à intensidade da doença hepática. Essas alterações podem estar relacionadas à menor síntese hepática e à presença de derivações portossistêmicas secundárias à hipertensão porta. A diminuição das proteínas inibidoras da coagulação nos pacientes com cirrose deste estudo demonstrou a importân-

cia de verificar a atividade dessas proteínas para avaliar as alterações na síntese proteica de acordo com a progressão da doença. A maior frequência de diminuição da PC sugere ser ela um indicador sensível e precoce de disfunção da célula hepática.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxílio recebido do FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Um especial agradecimento à Vânia Hirakata e ao Dr. Mário Wagner pelo auxílio na análise estatística.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESMON CT, GU J-M, XU J *et al.* Regulation of the protein C anticoagulant pathway. *Hematologica*, 1999; 84:363-368.
- ANDREW M. Development hemostasis: relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Haemost* 1995; 21(4):341-356.
- AMITRANO L, GUARDASCIONE MA, BRANCACCIO V *et al.* Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis* 2002; 22(1):83-96.
- PUGH NH, MURRAY-LYON IM, DAWSON JL *et al.* Transection of the oesophagus for bleeding varices. *Brit J Surg* 1973; 60(8):646-649.
- MARTINOLI JL, STOCKER K. Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. *Thromb Res* 1986; 43:253-64.
- WOLF M, BOYER-NEUMANN C, MARTINOLI J-L *et al.* A new functional assay for human protein S activity using factor V as substrate. *Thromb Haemost* 1989; 62:1144-1145.
- TOLLEFSON DM. Laboratory diagnosis of antithrombin and heparin cofactor II deficiency. *Semin Thromb Haemost* 1990; 16:162-8.
- WALKER FJ. Protein C in liver disease. *An Clin Lab Sci* 1990; 20(2):106-112.
- CASTELINO DJ, SALEM HH. Natural anticoagulants and the liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12:77-83.
- OLIVIER J-M, GRUEL Y, BACQ Y. Anomalies de l'hémostase au cours des hépatopathies. *Gastroenterol Clin Biol* 1991; 15:679-688.
- RAYA-SÁNCHEZ JM, GONZÁLEZ-REIMERS E, RODRÍGUEZ-MARTÍN JM *et al.* Coagulation inhibitors in alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol* 1998; 15(1):19-23.
- AMITRANO L, BRANCACCIO V, GUARDASCIONE MA *et al.* Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology* 2000; 31:345-348.
- DUMONTIER I, ALHENC-GELAS M, CHATELLIER G, BRENET P. Modifications des taux des inhibiteurs plasmatiques de la coagulation au cours de la cirrhose. Étude prospective chez 33 malades. *Gastroenterol Clin Biol* 1992; 16:120-125.
- FAIR DS, MARLAR RA, LEVINE E. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 1986; 67(4):1168-1171.
- DE CATERINA M, TARANTINO G, FARINA C *et al.* Haemostasis imbalance in Pugh-scored liver cirrhosis: characteristic changes of plasma levels of protein C versus protein S. *Haemostasis* 1993; 23:229-235.
- FEDERMAN DG, KIRSNER RS. An Update on Hypercoagulable Disorders. *Arch Intern Med*. 2001; 161:1051-1056.
- ROBSON SC, KRUSKAL J, BIRD AR *et al.* Disordered hemostasis in extrahepatic portal hypertension. *Hepatology* 1993; 18(4):853-856.
- PINTO RB, SILVEIRA TR, ROSLING L *et al.* Portal vein thrombosis in children and adolescents: the low prevalence of thrombophilic disorders. *J Pediatr Surg* 2004; 39(9):1356-61.
- FISCHER NC, WILDE JT, ROPER J *et al.* Deficiency of natural anticoagulant proteins C, S, and antithrombin in portal vein thrombosis: a secondary phenomenon? *Gut* 2000; 46:534-9.