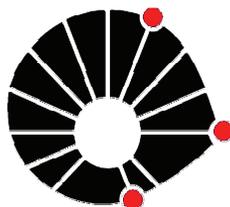


**Susan Kelly Picoli Quaino**

**AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE TROMBINA NAS FASES INICIAIS DA SEPSE  
EM PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E NEUTROPENIA  
FEBRIL**



**UNICAMP**

**CAMPINAS  
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE TROMBINA NAS FASES INICIAIS DA SEPSE  
EM PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E NEUTROPENIA  
FEBRIL**

Susan Kelly Picoli Quaino

Tese de Mestrado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas. Sob orientação do Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula



**UNICAMP**

**CAMPINAS**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Q23a Quaino, Susan Kelly Picoli, 1980 -  
Avaliação da geração de trombina nas fases iniciais  
da sepse em pacientes com neoplasias hematológicas e  
neutropenia febril. / Susan Kelly Picoli Quaino. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Erich Vinícius de Paula  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Coagulação sanguínea. 2. Testes laboratoriais.  
3. Coagulação intravascular disseminada. 4.  
Diagnóstico. I. Paula, Erich Vinicius de Paula. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of thrombin generation in the early stages of sepsis in patients with hematological malignancies and febrile neutropenia

**Palavras-chave em inglês:**

Blood coagulation

Blood coagulation tests

Disseminated intravascular coagulation

Diagnostic

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Erich Vinicius de Paula [Orientador]

Paula Ribeiro Villaça

Margareth Castro Ozelo

**Data da defesa:** 29-08-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Susan Kelly Picoli-Quaino

---

---

Orientador: Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula

---

---

## Membros:

---

1. Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula



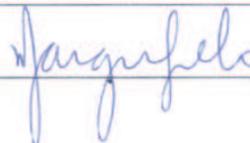
---

2. Profª. Drª. Paula Ribeiro Villaça



---

3. Profª. Drª. Margareth Castro Ozelo



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 29/08/2011

---

A toda a minha família  
Em especial ao Danilson

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Erich Vinicius de Paula, por me orientar e partilhar seu conhecimento.

A Prof.a Dra Joyce M. Annichino Bizzachi, docente responsável pelo laboratório de Hemostasia e Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP .

A Dra Brunna Eulálio, por viabilisar todo o projeto e por toda a sua dedicação.

A Dra Suley por também compartilhar seu conhecimento e amizade.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Hemostasia, Dra Margareth, Dra Fernanda Orsi, Dra Marina, Rafael, Larissa, Gleice, Vanessa, Gabriela, João Ricardo, Ucha, Cristina e Tânia por partilharem e acompanharem trajetória do meu trabalho. Em especial, a Devanira, Silmara e Maiara pela amizade e conhecimento compartilhado. As alunas, Mariane e Fernanda Dutra por toda a ajuda e amizade dedicada.

A todos os voluntários que aceitaram participar do projeto.

A Silvia Vicente e ao Paulo, funcionários do Hemocentro, pelo empenho em me ajudar, sempre.

A secretaria da pós-graduação do departamento de Clínica Médica.

A todas as pessoas que participaram de forma direta e indireta na realização e concretização desta etapa tão importante em minha vida: a família Venciguerra e família Quaino, assim como os minhas amigas: Roberta e Nelma e aos meus amigos, Adriano, Edmo e Lincoln.

Agradeço a Deus todos os dias por cada conquista e por me mostrar de diferentes maneiras como perseverar.

“Ando devagar, porque já tive pressa  
E levo este sorriso, porque já chorei demais  
Cada um de nós compõe a sua história  
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz...”

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP (projeto 2008/50729-9) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue/CNPq

## RESUMO

---

Pacientes com neutropenia febril apresentam risco aumentado de infecções severas e complicações da sepse. A ativação descontrolada da coagulação é uma das características mais marcantes da sepse. O quadro clínico e laboratorial mais característico desta ativação é chamado de coagulação intra-vascular disseminada. Do ponto de vista da fisiopatologia, a coagulação intravascular disseminada é caracterizada por ativação da coagulação pela expressão anômala intravascular de fator tissular, pelo consumo de inibidores naturais da coagulação e pela liberação excessiva de PAI-1, levando a hipofibrinólise. O quadro resultante destes processos é a hipercoagulabilidade.

Acredita-se que parte das complicações da sepse, entre elas a chamada falência de múltiplos órgãos, seja decorrente de trombose de microvasos e isquemia tecidual. Assim, o estudo da coagulação intravascular disseminada tem grande relevância clínica.

A avaliação laboratorial da hemostasia em pacientes com sepse e coagulação intravascular disseminada é limitada pelo fato de os testes disponíveis não ilustrarem de forma global e completa o resultado de todos estes processos na hemostasia. Além disso, é reconhecido que esta avaliação só é relevante se feita em mais de um momento ao longo da evolução do quadro na medida em que mais importante do que medidas isoladas é a tendência de mudança de variáveis como tempo de protrombina, dímeros D e fibrinogênio.

Por este motivo, os chamados testes globais da hemostasia, capazes de avaliar de forma mais completa a interação de todos os processos citados acima, vêm ganhando importância nos últimos anos.

Em pacientes com sepse, o teste de geração de trombina já foi avaliado em medidas isoladas, mostrando resultados que indicam lentificação do processo de ativação da coagulação. Estes resultados são distintos daqueles classicamente aceitos de hipercoagulabilidade durante as fases iniciais da sepse. No entanto, o número de estudos realizados nestes pacientes é escasso, sendo que em nenhum deles foi avaliada a variação temporal deste parâmetro.

Em nosso estudo avaliamos parâmetros do teste da geração de trombina em pacientes com sepse e neutropenia febril. A avaliação foi feita no tempo basal, no momento da febre e após 48 horas. Além disso, avaliamos os parâmetros clássicos da hemostasia..

Nossos resultados contrariam a hipótese de presença de hipercoagulabilidade nas fases iniciais da sepse. Nenhum parâmetro do teste de geração de trombina mostrou-se capaz de segregar pacientes com maior risco de evolução para choque séptico.

## ABSTRACT

---

Patients with febrile neutropenia are at increased risk of severe infections and complications of sepsis. The uncontrolled activation of coagulation is one of the most striking features of sepsis. The clinical and laboratory most characteristic of this activation is called disseminated intravascular coagulation. The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation is characterized by activation of coagulation by anomalous intravascular expression of tissue factor, the consumption of natural inhibitors of coagulation and excessive release of PAI-1, leading to hypofibrinolysis. The net resulting picture of these processes is the hypercoagulability. It is believed that some of the complications of sepsis, including the so-called multiple organ failure, is due to thrombosis of microvasculature and tissue ischemia. Thus, the study of disseminated intravascular coagulation has great clinical relevance.

Laboratory evaluation of hemostasis in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation is limited because the available tests do not depict in a comprehensive and completely way the results of all these processes in hemostasis.

Moreover, it is recognized that this assessment is only relevant if done in more than one time-point along during disease progression to capture the trends of variables such as prothrombin time, D dimers and fibrinogen. For this reason, the so-called global tests of hemostasis, able to assess more fully the interaction of all the above processes are gaining importance in recent years.

In patients with sepsis, thrombin generation test has been evaluated on single measures, showing results that show slowing the process of coagulation activation. These results are distinct from those classically accepted which assume that hypercoagulability would be present in early phases of sepsis. However, the number of patients in these studies is scarce, and none of them evaluated the temporal variation of this parameter.

In our study we evaluated the test parameters of thrombin generation in patients with sepsis and febrile neutropenia. The evaluation was performed at baseline, at the time of fever and 48 hours thereafter. In addition, we evaluated classical parameters of hemostasis. Our results contradict the hypothesis of the presence of hypercoagulability in the early stages of sepsis and deserve further evaluation in larger studies. No parameter of

thrombin generation was able to segregate patients with higher risk to progress to septic shock.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>TP</b>	Tempo de Protombina
<b>TTP</b>	Tempo de Tromboplastina parcialmente ativada
<b>FT</b>	Fator Tissular
<b>FVII</b>	Fator FVII
<b>FVIIa</b>	Fator FVII ativado
<b>FX</b>	Fator X
<b>FXa</b>	Fator X ativado
<b>FV</b>	Fator V
<b>FVa</b>	Fator V ativado
<b>FII</b>	Fator II
<b>FIIa</b>	FII ativado
<b>FIX</b>	Fator FIX
<b>FIXa</b>	Fator FIX ativado
<b>SMDO</b>	Syndrome multiple dysfunction organ
<b>PC</b>	Proteína C
<b>PCa</b>	Proteína C ativada
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>PS</b>	Proteína S
<b>TFPI</b>	Tissue Factor Pathway inhibitor
<b>SRIS</b>	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>tPA</b>	Tissue plasminogen activator
<b>uPA</b>	Uroquinase-type plasminogem activator
<b>SOFA</b>	“Sequential Organ Failure Assessment”
<b>FvW</b>	Fator de Von Willebrand
<b>NF</b>	Neutropenia febril
<b>TGA</b>	Thrombin Generation Assay
<b>PPP</b>	Platelet Poor Plasma
<b>PRP</b>	Platelet Rich Plasma
<b>SDMO</b>	Syndrome Dysfunctiom Multiple organs

<b>TLR</b>	Tool-Like Receptors
<b>C4BP</b>	C4 Binding protein

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Condições clínicas associadas à CIVD .....	28
Tabela 2 - Critérios ISTH para CIVD descompensada .....	37
Tabela 3 - Escore de disfunção orgânica SOFA (Vincent, Moreno <i>et al.</i> , 1996).....	47
Tabela 4 - Características dos pacientes (n=24).....	52
Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Spearman (Rs) entre teste de geração de trombina e escores de gravidade na sepse.....	59
Tabela 6 - Associação entre parâmetros do teste de geração de trombina com a evolução para choque séptico .....	61

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 - Primeira fase da ativação da coagulação: iniciação. A coagulação é ativada quando o FT se liga ao FVIIa formando o chamado complexo de iniciação da hemostasia, que ativa o FX em FXa, levando à geração de concentrações muito pequenas de trombina, ainda incapazes de levarem à formação de fibrina..... 25
- Figura 2 - Segunda fase da ativação da coagulação: amplificação. Nesta fase a trombina medeia uma série de reações que tem como objetivo aumentar sua própria geração, de modo que sua concentração final permita a formação do trombo..... 26
- Figura 3 - Terceira fase da ativação da coagulação: propagação. Nesta fase, o trombo formado rico em plaquetas e fibrina se propaga pela região onde a hemostasia foi iniciada pela expressão do fator tissular..... 26
- Figura 4 - Os principais parâmetros obtidos no trombograma são mostrados na figura. (a) Intervalo ou “lag”: corresponde à fase de iniciação da coagulação, em que as concentrações de trombina são ainda indetectáveis. (b) Pico: corresponde ao pico de geração de trombina que ocorre durante a fase de amplificação. (c) Tempo para pico: é o tempo para obtenção do pico. (d) Área sob a curva (AUC) ou “Endogenous thrombin potential (ETP): expressa toda a fase pró coagulante da reação (iniciação, amplificação e propagação). É a área sob a curva de geração de trombina. (Figura adaptada Hemker et al 1993)..... 40
- Figura 5 - Os gráficos mostram os valores do tempo de protrombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis..... 54
- Figura 6 - Os gráficos mostram os valores de fibrinogênio dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis..... 54
- Figura 7 - Os gráficos mostram os valores de dímeros D dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do

primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis.....	55
Figura 8 - Os gráficos mostram os valores de contagem de plaquetas dos pacientes do estudo no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Mann-Whitney .....	55
Figura 9 - Os gráficos mostram os valores do intervalo (ou <i>lag</i> ) para geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais: 19,0 ± 6,7 segundos. ....	56
Figura 10 - Os gráficos mostram os valores do pico de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais: 241,1 ± 78,1 nM. ....	57
Figura 11 - Os gráficos mostram os valores do tempo para geração do pico de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais: 34,8 ± 8,7 segundos. ....	57
Figura 12 - Os gráficos mostram os valores do índice de velocidade para geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais: 16,3 ± 7,4. ....	58
Figura 13 - Os gráficos mostram os valores da área sob a curva de geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais: 6105,4 ± 1684,0 nM. ....	58

Figura 14 - Associação entre escore de gravidade SOFA e evolução para choque séptico, mostrando que apenas o SOFA após 48 horas da febre apresenta associação estatística com este desfecho clínico (Teste de Mann-Whitney). ..... 60

## SUMÁRIO

---

1.1 - A sepse .....	21
1.1.1 – Aspectos gerais .....	21
1.1.2 – Epidemiologia e fatores de risco .....	22
1.1.3 – Fisiopatologia geral da sepse .....	22
1.2 - O mecanismo básico da coagulação .....	23
1.3 - Coagulação Intravascular Disseminada .....	27
1.3.1 – Aspectos gerais .....	27
1.3.2 – Etiologia da CIVD .....	28
1.3.3 – Fisiopatologia da CIVD .....	29
1.3.4. Conseqüências da CIVD no contexto da sepse .....	31
1.4. Avaliação laboratorial na CIVD .....	32
1.4.1 - Testes de triagem - TP e TTPA .....	32
1.4.2 - Dosagem do Fibrinogênio .....	33
1.4.3- Contagem de plaquetas .....	34
1.4.4 - Dosagem de fatores da coagulação .....	34
1.4.5 - Dosagem de produtos de degradação de fibrina ou dímeros D .....	34
1.4.6 - Dosagem de inibidores naturais da coagulação .....	35
1.4.7 – Critérios diagnósticos .....	35
1.5. Testes globais da hemostasia .....	37
1.5.1. Trombolastografia .....	38
1.5.2. Teste de geração de trombina .....	38
1.6 – Neutropenia febril em pacientes onco-hematológicos e sepse .....	40
2 OBJETIVOS .....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1 – População e desenho do estudo .....	45
3.2 – Dados clínicos e escore de gravidade na sepse .....	46
3.3 – Coleta e processamento das amostras .....	48
3.4 – Avaliações laboratoriais de parâmetros clássicos da hemostasia em pacientes com CIVD .....	48

3.5. Avaliação da geração de trombina.....	49
3.6. Cálculo dos escores de CIVD.....	50
3.7. Análise estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	52
4.1. Características dos pacientes.....	52
4.2. Parâmetros da coagulação clássicos nos pacientes com sepse.....	53
4.3. Avaliação da geração de trombina em pacientes com sepse.....	56
4.4. Avaliação da correlação entre parâmetros do teste de geração de trombina e escores de gravidade e CIVD.....	59
4.5. Análise exploratória do valor prognóstico dos parâmetros do teste de geração de trombina para evolução para choque séptico.....	60
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

# *Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 - A sepse

### 1.1.1 – Aspectos gerais

A sepse é uma síndrome clínica caracterizada por resposta inflamatória sistêmica grave secundária a uma infecção (Bone, Balk et al., 1992). A sepse e suas complicações representam atualmente um dos grandes desafios da medicina, afetando milhares de pessoas em todo mundo e, sendo a principal causa de morte entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva não coronariana. O termo sepse foi originalmente utilizado na prática clínica para indicar a presença de bactérias na corrente sanguínea (bacteremia). Em 1989, Bone et al. estabeleceram uma definição para sepse baseada na presença de critérios clínicos específicos, associados a evidências (clínicas ou microbiológicas) da presença de uma infecção (Balk and Bone 1989). Pouco depois, a observação de que os sinais clínicos que definiam a sepse também estavam presentes em pacientes sem evidência de infecção, mas que apresentavam condições caracterizadas pela presença de respostas inflamatórias sistêmicas (ex: vítimas de trauma grave, queimaduras, entre outro), levou à introdução, pela “Society of Critical Care Medicine” e pelo “American College of Chest Physicians”, do termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) (Bone, Balk et al., 1992). Esta resposta inflamatória sistêmica foi definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos: (a) hipotermia (temperatura < 36°C) ou febre (temperatura  $\geq$  38°C); (b) taquicardia (frequência cardíaca > 90 batimentos/minuto); (c) taquipnéia (frequência respiratória > 20 incursões respiratórias/ minuto) ou PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg; e (d) leucocitose (> 12 mil leucócitos/ mm<sup>3</sup>) ou leucopenia (< 4 mil leucócitos/ mm<sup>3</sup>). Desta forma, a sepse pode ser definida pela SRIS secundária a uma infecção (Bone, Balk et al., 1992). Apesar desta definição, o diagnóstico microbiológico definitivo não pode ser estabelecido em cerca de um terço ou mais dos pacientes com manifestações clínicas de sepse (Marshall e Reinhart, 2009), sendo suficiente para seu diagnóstico a evidência clínica da presença de uma infecção. Quando associada à disfunção orgânica ou hipotensão arterial (pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg ou pressão arterial média menor que 70 mmHg), a sepse é denominada sepse grave. Quando esta

hipotensão é refratária à reposição volêmica adequada, o quadro é denominado de choque séptico (Bone, Balk et al., 1992) (Brun-Buisson, 2000)

### **1.1.2 – Epidemiologia e fatores de risco**

A incidência da sepse vem aumentando, de 1,5% a 8% ao ano, e a taxa de mortalidade permanece alta, variando de 50% a mais de 75%, a despeito do conhecimento crescente sobre sua fisiopatologia e dos avanços tecnológicos e em cuidados de suporte destinados a estes pacientes. Nos Estados Unidos, por exemplo, ocorrem mais de 750 mil casos de sepse por ano, com cerca de 220 mil mortes (Angus, Birmingham et al., 2000; Angus, Linde-Zwirble et al., 2001).

No Brasil, embora os dados sejam escassos, um estudo mostra que os casos de sepse foram responsáveis por 27,3 % das internações em Unidades de Terapia Intensiva, com mortalidade de até 52,2 % (Silva, Pedro Mde et al., 2004). Além disso, o aumento da idade média da população e o uso crescente de drogas imunossupressoras têm contribuído ainda mais para o aumento do número de mortes por sepse (Williams, Braun et al., 2004; O'brien, Ali et al., 2007). Apesar de mais de 20 anos de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, o número de mortes atribuídas à sepse continua crescendo, fazendo com que a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na evolução clínica da sepse permaneça há décadas como área prioritária da pesquisa biomédica.

### **1.1.3 – Fisiopatologia geral da sepse**

Conforme detalhado acima, o termo sepse pressupõe o envolvimento de um agente infeccioso como desencadeante do processo fisiopatológico que a caracteriza. No entanto, um dos aspectos mais importantes da fisiopatologia da sepse é que o efeito direto deste microorganismo sobre células ou tecidos não é em geral o maior responsável pelo dano celular e tecidual observado. Na sepse, é a resposta inflamatória do hospedeiro à presença deste microorganismo que determina o curso clínico em cada indivíduo. Esta resposta pode variar desde uma resposta inflamatória auto-limitada, que permite a neutralização do microorganismo invasor (condição ideal), até uma resposta inflamatória devastadora e sem controle, que pode levar à morte. Os motivos exatos pelos quais um

indivíduo responde de uma forma controlada e outro de forma descontrolada muitas vezes a um mesmo agente é objeto de intensa investigação (Remick, 2007).

A definição precisa de todos os elementos da resposta inflamatória do hospedeiro durante a sepse ainda não é possível. Em linhas gerais, podemos afirmar que o processo passa necessariamente por algum grau de lesão endotelial – seja pela ativação de neutrófilos, monócitos e das próprias células endoteliais, seja pela ação direta de alguns microorganismos. Esta lesão endotelial gera uma série de processos que coexistem durante a sepse tais como: (1) liberação de mediadores inflamatórios (citocinas pró e anti-inflamatórias e outros agentes vasoativos); ebra da integridade da barreira endotelial; e (3) ativação da coagulação (Cohen, 2002; Aird, 2003). Este último mecanismo é o objeto de estudo desta dissertação.

## **1.2 - O mecanismo básico da coagulação**

Durante muitos anos, o processo de formação de um coágulo de fibrina foi visto como uma cascata de reações enzimáticas desencadeadas por duas vias redundantes chamadas via intrínseca e via extrínseca. Estas vias seriam desencadeadas por qualquer lesão endotelial que levasse ao contato do plasma com: (1) fator tissular (FT) (via extrínseca), ou (2) fosfolípídeos de carga negativa presentes no subendotélio (via intrínseca). A ativação das duas vias (que seriam redundantes a fim de garantir a segurança do processo) resultaria na ativação do FX em FXa, com a participação dos fatores XII, XI, VIII e IX (via intrínseca) e fator VII (via extrínseca). A partir daí, o FX ativado, tendo o FVa como co-fator ativa o FII (protrombina) levando à formação de trombina. A trombina por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina, levando à formação do coágulo no local da lesão. A grande quantidade de trombina necessária para a conversão de quantidades suficientes de fibrinogênio em fibrina seria garantida pela amplificação do sinal inicial ao longo desta cascata, em que o componente enzimático anterior pode ativar um número progressivamente maior de moléculas de seu substrato.

Este modelo apresentava como atrativo a relativa simplicidade, a correlação clínica entre a deficiência de cada um dos fatores da cascata e o quadro clínico de

hemorragia (com a exceção do FXII, por razões não explicadas pelo modelo), além da possibilidade de simulação *in vitro* destas duas vias: através do tempo de protrombina (TP) para a via extrínseca com adição FT ao plasma-teste; e através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) para a via intrínseca, com adição de fosfolipídeos ao plasma-teste.

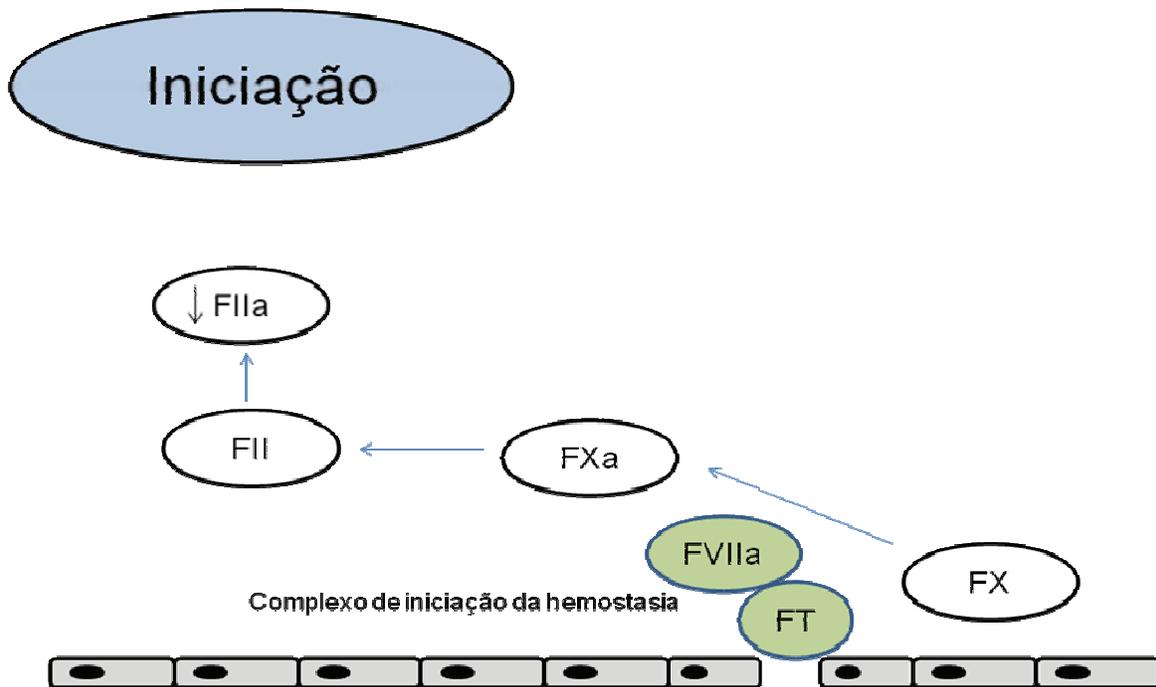
Há cerca de duas décadas foi proposto um outro modelo para explicação da hemostasia, conhecido como modelo celular da hemostasia, capaz de explicar de forma mais adequada os fenômenos que ocorrem *in vivo* quando a coagulação é ativada. (Hoffman e Monroe, 2001) De acordo com este modelo o FT exerce papel central na ativação da coagulação por ser a proteína responsável por sua iniciação, e a ativação da coagulação é dividida em 3 fases: iniciação, amplificação e propagação. Na fase de iniciação (figura 1), a coagulação é ativada quando o FT, uma proteína transmembrana expressa por praticamente todas as células do organismo, mas nunca por células em contato com a luz dos vasos, entra em contato com o plasma. Isto ocorre, por exemplo, quando há ruptura da integridade endotelial em um trauma. O FT se liga ao FVIIa formando o chamado complexo de iniciação da hemostasia, que ativa o FX em FXa, levando à geração de concentrações muito pequenas de trombina, ainda incapazes de levarem a formação de fibrina.

Na fase seguinte da coagulação, chamada de amplificação (figura 2), a trombina medeia uma série de reações que têm como objetivo aumentar sua própria geração, de modo que a concentração final de trombina atinja valores que permitam a formação do trombo. Estas reações incluem: (1) ativação das plaquetas, onde ocorrerão todas estas reações; (2) ativação do fator XI, iniciando a ação da chamada via intrínseca da coagulação para também cooperar com a geração de fator X ativado e de trombina; (3) ativação dos cofatores da cascata da coagulação, que são os fatores V e VIII e (4) ativação do fator XIII.

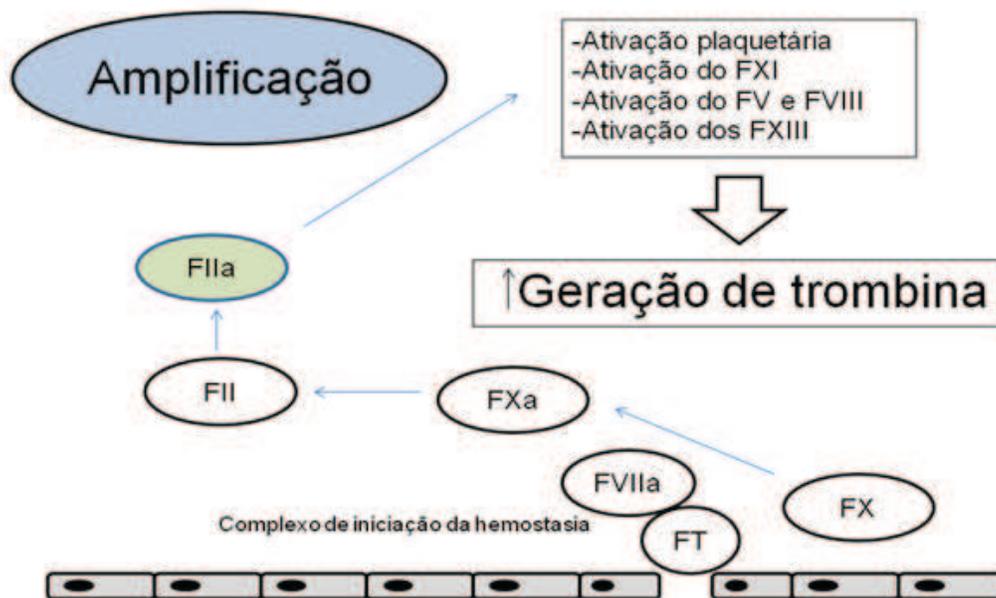
A concentração de trombina atinge então quantidades necessárias para a formação de fibrina, dando início a fase final da coagulação, conhecida como propagação, quando um coágulo rico em plaquetas e fibrina propaga-se pela região onde a hemostasia foi iniciada pela expressão de FT (figura 3).

Todos estes passos possuem inibidores naturais, cuja ação fundamental para manter o sistema em equilíbrio, sem tendências a sangramentos ou a trombooses. Os inibidores conhecidos são: (1) o TFPI, que inibe o complexo FT/FVII ativado; (2) a AT, que inibe as serina proteases da cascata como o fator X ativado e a trombina, entre outras e

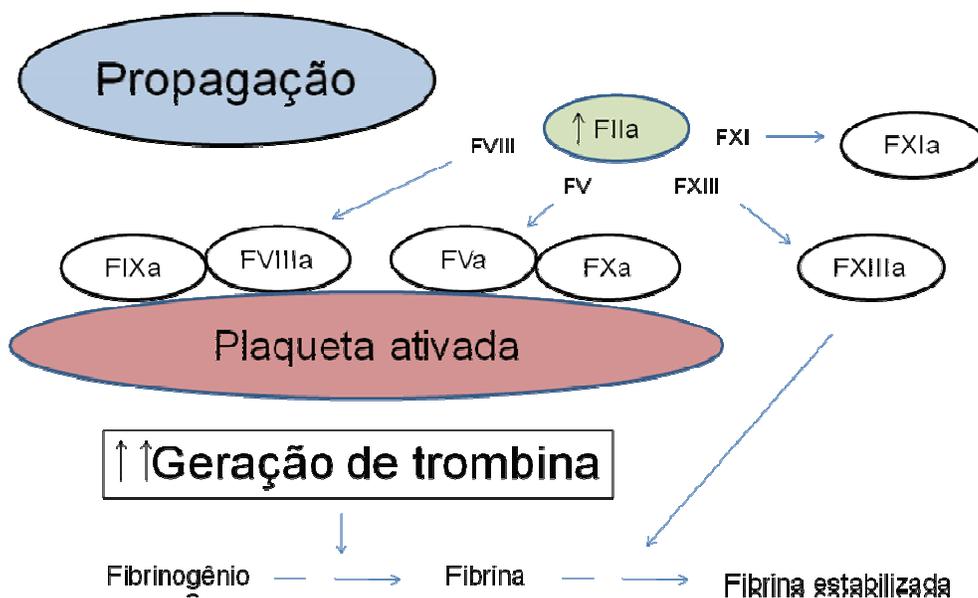
(3) a proteína C ativada (PCa), que inibe os fatores V e VIII ativados. A diminuição destes inibidores aumenta o risco de trombozes venosas (Levi, 2010).



**Figura 1** - Primeira fase da ativação da coagulação: iniciação. A coagulação é ativada quando o FT se liga ao FVIIa formando o chamado complexo de iniciação da hemostasia, que ativa o FX em FXa, levando à geração de concentrações muito pequenas de trombina, ainda incapazes de levarem à formação de fibrina.



**Figura 2** - Segunda fase da ativação da coagulação: amplificação. Nesta fase a trombina medeia uma série de reações que tem como objetivo aumentar sua própria geração, de modo que sua concentração final permita a formação do trombo.



**Figura 3** - Terceira fase da ativação da coagulação: propagação. Nesta fase, o trombo formado rico em plaquetas e fibrina se propaga pela região onde a hemostasia foi iniciada pela expressão do fator tissular.

A partir do melhor entendimento da fisiologia da coagulação através deste modelo, limitações importantes do TP e do TTPa ficaram mais claras. Em primeiro lugar, embora estes dois testes sejam de fato ensaios robustos capazes de simular as reações das vias extrínseca e intrínseca respectivamente, eles capturam somente as fases iniciais da coagulação, na medida em que a rápida formação do coágulo de fibrina interrompe o processo poucos segundos após seu início. Além disso, estes testes são ativados por reagentes que não recapitulam adequadamente o que ocorre no organismo durante a ativação da coagulação tais como o kaolin/ácido elágico (TTPa), ou doses muito elevadas de FT (TP). Finalmente, embora estes testes sejam sensíveis para a detecção de deficiências graves de fatores pró-coagulantes, várias outras situações clinicamente relevantes não são detectáveis por eles tais como (1) fenômenos que ocorrem após a formação da fibrina (fibrinólise e ação do fator XIII); (2) variações nas concentrações de inibidores naturais da coagulação, redundando em geral em risco aumentado de trombose; e (3) interações nas concentrações plasmáticas de múltiplos fatores da coagulação, levando potencialmente a um maior risco de trombose ou sangramento.

### **1.3 - Coagulação Intravascular Disseminada**

#### **1.3.1 – Aspectos gerais**

A coagulação intravascular disseminada (CIVD) pode ser definida como síndrome adquirida, caracterizada pela ativação difusa da coagulação levando à formação e deposição de fibrina em capilares e vasos de pequeno calibre (Levi e Ten Cate, 1999). A CIVD é uma condição dinâmica e suas características clínicas e laboratoriais mudam conforme o tempo de evolução em cada paciente. Em fases iniciais, observa-se apenas a ativação sistêmica da coagulação sem qualquer manifestação clínica. À medida que o estímulo para esta ativação não é controlado, pode ocorrer a deposição de fibrina na microcirculação e trombozes. Nas fases mais tardias, quando o quadro encontra-se descompensado e há falência de todos os mecanismos reguladores do equilíbrio hemostático, ocorre consumo e depleção de fatores da coagulação e plaquetas, podendo ocorrer sangramentos. Um aspecto importante da fisiopatologia da CIVD, é que ela é

sempre uma condição secundária a outras patologias capazes de estimular a ativação da coagulação, entre as quais destaca-se a sepse.

### 1.3.2 – Etiologia da CIVD

Conforme descrito anteriormente, a CIVD sempre ocorre como resposta a uma doença de base (tabela 1). Em linhas gerais, podemos afirmar que estas condições dividem-se em dois grandes grupos: (1) doenças associadas a resposta inflamatória sistêmica severa, levando a liberação maciça de citocinas e ativação da coagulação (como na sepse ou trauma); e (2) doenças em que substâncias pró-coagulantes entram em contato com a corrente sanguínea e desencadeiam diretamente a CIVD (o câncer e patologias obstétricas como a embolia de líquido amniótico são exemplos clássicos). A CIVD associada ao trauma apresenta elementos dos dois grupos.

**Tabela 1** - Condições clínicas associadas à CIVD

<b>Dano tecidual maciço</b>	Trauma grave Queimaduras Reação transfusional hemolítica aguda Rejeição aguda a transplantes
<b>Neoplasias</b>	Tumores sólidos Leucemias Quimioterapia Síndrome de Lise Tumoral
<b>Infecção</b>	Bactérias Vírus Fungos
<b>Condições obstétricas</b>	Pré-eclampsia Descolamento de placenta Embolia de líquido amniótico
<b>Miscelânea</b>	Choque Parada cardíaca Embolia gordurosa Hemangiomas e outras patologias vasculares Acidentes ofídicos

### **1.3.3 – Fisiopatologia da CIVD**

A CIVD tem como principal característica a ativação extremada e desregulada da coagulação. Os mecanismos classicamente associados à CIVD incluem (1) expressão anômala do FT na luz vascular; (2) inibição ou diminuição da função dos anticoagulantes naturais; e (3) hipofibrinólise (Levi e Ten Cate, 1999)

O contato do FT com a luz do vaso leva a sua ligação com o fator VIIa e à iniciação da coagulação. Foi demonstrado por vários autores de forma independente que durante a sepse ocorre expressão ectópica de FT em monócitos (Osterud e Flaegstad, 1983; Osterud, 1998) (Levi, 2007). Os mecanismos celulares que resultam na expressão anômala de FT na sepse não estão completamente esclarecidos, mas parecem envolver a ativação da resposta imune inata, através de receptores TLR. Estes receptores são ativados por componentes de microorganismos invasores (Opal e Esmon, 2003). Assim, esta expressão anômala da FT em monócitos e na luz endotelial, resulta em ativação constitutiva da coagulação, colaborando para um estado pró-trombótico. Este mecanismo parece ser o principal responsável pela ativação da coagulação na sepse (Pawlinski e Mackman, 2010). Além disso, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, uma característica marcante da sepse, resulta em aumento da expressão de FT, fechando um círculo estimulatório que resulta em ativação contínua da coagulação durante a sepse (Levi, Ten Cate et al., 1993).

A atividade dos principais sistemas anticoagulantes naturais endógenos está diminuída em pacientes com CIVD, contribuindo para a deposição de fibrina na microvasculatura (Levi e Ten Cate, 1999).

A AT é uma serino protease e principal inibidor da trombina e do FXa. Durante resposta inflamatória severa, níveis de AT estão diminuídos por causa da sua síntese prejudicada, degradação pela elastase de neutrófilos ativados e mais importante, pelo consumo decorrente do aumento da geração de trombina (Levi, Van Der Poll et al., 2004). Citocinas pró-inflamatórias também contribuem para a diminuição da AT ao reduzirem a síntese de glicosaminoglicanos na superfície endotelial, os quais atuam como sítios de ligação e co-fatores da AT (Kobayashi, Shimada et al., 1990).

O sistema da PCa também apresenta papel central na patogênese da sepse e de suas complicações (Levi e Van Der Poll, 2007). Atualmente acredita-se que além de sua atividade anticoagulante, a PCa ative vias de sinalização anti-inflamatórias que são

importantes na resposta à sepse. A ação anticoagulante da PCa ocorre a partir da ligação da forma zimogênio da proteína C (PC) ao seu receptor endotelial (EPCR). Após esta ligação, a PC é ativada na superfície endotelial pela trombomodulina. A PCa atua então em conjunto com seu cofator, a proteína S (PS), para proteoliticamente degradar os co-fatores essenciais da coagulação, o FVa e VIIIa (Esmon, 1987). O EPCR não apenas acelera a ativação da PC, como também serve como um receptor para transdução de sinais celulares anti-inflamatórios da PCa (Esmon, 2001). Em pacientes com inflamação severa, tal como ocorre na sepse, o sistema da PCa encontra-se disfuncional em dois níveis: (1) os níveis plasmáticos da PC estão diminuídos por causa da síntese prejudicada, consumo e degradação por enzimas proteolíticas como a elastase dos neutrófilos; e (2) ocorre diminuição da expressão de trombomodulina, mediada por citocinas pró-inflamatórias como a TNF- $\alpha$  e IL-1 (Nawroth e Stern, 1986) (Faust, Levin et al., 2001). A importância do sistema da PCa na sepse pode ser ilustrada pelo fato de a reposição desta proteína ter sido a única estratégia terapêutica bem sucedida de reposição de fatores anticoagulantes endógenos no tratamento da sepse grave (Bernard, Vincent et al., 2001). A queda dos níveis de PS também pode comprometer a função do sistema da PCa. No plasma, 60% da PS é complexado ao C4bp, um componente do sistema complemento. Níveis plasmáticos elevados deste fator, freqüentemente observados em pacientes com inflamação aguda, resultam em deficiência relativa de PS, contribuindo para o estado pró-coagulante durante a sepse (Garcia De Frutos, Alim et al., 1994).

Um terceiro mecanismo inibitório endógeno da geração de trombina é o TFPI, o principal inibidor do complexo de iniciação da coagulação (completo FT/TFVIIa). No entanto, seu papel no contexto da sepse não é tão claro quanto o da PCa e da AT. Experimentos mostraram que a administração do TFPI recombinante bloqueia a inflamação induzida pela geração de trombina em modelos animais de sepse (Creasey, Chang et al., 1993) e em humanos (De Jonge, Dekkers et al., 2000). No entanto, a reposição do TFPI não foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade na sepse (Abraham, Reinhart et al., 2003).

Além da expressão ectópica do FT e da redução da atividade de sistemas anticoagulantes endógenos, uma redução relativa da capacidade fibrinolítica do plasma também ocorre na CIVD, compreendendo um terceiro mecanismo de ativação da

coagulação. Esta hipofibrinólise ocorre especialmente pela liberação maciça do inibidor de ativação de plasminogênio 1 (PAI-1) pelo endotélio e limita a capacidade do organismo de eliminar a fibrina que se deposita em capilares e vasos de pequeno calibre, agravando ainda mais a CIVD (Vervloet, Thijs et al., 1998).

Em resumo, podemos concluir que a CIVD é o resultado da perda de equilíbrio entre sistemas pró e anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico, que ocorre em resposta à presença de microorganismos e parece ser mediada pela resposta imune inata.

Se levada a níveis extremos, este desequilíbrio resulta em anormalidades laboratoriais e clínicas cujo espectro inclui sangramentos, trombozes, ou ambos simultaneamente (Carrie La Belle, 2007).

#### **1.3.4. Conseqüências da CIVD no contexto da sepse**

De acordo com a visão mais tradicional do papel da CIVD na fisiopatologia da sepse, a deposição de fibrina levaria à oclusão de capilares e vasos de menor calibre, comprometendo assim a irrigação sanguínea de diversos órgãos. Assim, em conjunto com outras alterações inflamatórias, metabólicas e hemodinâmicas característica da sepse, a CIVD contribuiria decisivamente para a chamada síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO). (Carrie La Belle, 2007). Esta visão da CIVD como elemento chave na fisiopatologia das complicações da sepse permeou durante anos a pesquisa sobre a CIVD na sepse, culminando nos anos 90 com grandes estudos clínicos de fase III que avaliaram o efeito terapêutico de três proteínas anticoagulantes naturais em pacientes com sepse, a saber: PCa, antitrombina (AT) e inibidor da via do fator tissular (TFPI). Com exceção da PCa, cujos benefícios foram restritos a grupos limitados de pacientes (aqueles mais graves), e possivelmente associado ao seu efeito anti-inflamatório (em oposição ao seu efeito anticoagulante) (Bernard, Vincent et al., 2001), o uso do TFPI e da AT não resultou em qualquer ganho, contrariando a hipótese de que a ativação da coagulação seria o único mecanismo de lesão tecidual crítico na sepse (Abraham E et al 2003). Recentemente, outros elementos da SRIS presente na sepse além da ativação da coagulação, tais como a ruptura da barreira endotelial, passaram a receber mais atenção como elementos relevantes para a fisiopatologia da sepse (Alves, Montalvao et al.).

## **1.4. Avaliação laboratorial na CIVD**

Do ponto de vista clínico, o diagnóstico da CIVD tem como premissa a presença de uma condição desencadeante. Na grande maioria das vezes esta condição representa o principal problema do paciente, sendo a CIVD apenas uma complicação desta doença de base. Isto ocorre, por exemplo, em pacientes com sepse, grandes queimaduras ou grandes traumas, onde a identificação desta condição de base é óbvia. Assim, o papel de testes laboratoriais para diagnóstico da CIVD é mais o de confirmar a presença desta complicação e monitorar sua gravidade, do que o de diagnosticar a doença de base de um paciente. Raramente a CIVD surge como primeiro sinal ou sintoma, antes que a doença de base esteja detectável. Isto ocorre, por exemplo, nos casos de CIVD associada à hemangiomas, em que a turbulência do fluxo sanguíneo leva à ativação da coagulação, ou ainda no caso de alguns tumores ainda ocultos ao diagnóstico, mas já capazes de ativar a coagulação pelos mecanismos descritos anteriormente. No caso da CIVD associada à sepse, o papel dos exames laboratoriais é mais o de monitorar a presença e evolução desta complicação, além de guiar seu tratamento paliativo (ou de suporte) até que a sepse em si seja controlada através do uso de antibióticos e/ou a retirada do foco infeccioso.

Várias estratégias laboratoriais já foram empregadas para o diagnóstico e monitoramento da CIVD. Muitos dos testes já avaliados em estudos pequenos, mas não apresentam benefício de uso prático. A dificuldade para definição da CIVD como uma entidade clínica específica torna complexa a determinação formal da acurácia destes testes. No entanto, podemos afirmar que a avaliação laboratorial do paciente com CIVD apresenta duas peculiaridades. Em primeiro lugar, a avaliação seriada dos resultados é muito mais informativa que a análise isolada de um ou outro parâmetro. Em segundo lugar, a avaliação conjunta de testes sob a forma de escores diagnósticos permite uma melhor caracterização da CIVD do ponto de vista laboratorial. A seguir descreveremos os principais testes avaliados no contexto da CIVD bem como a relevância clínica de cada um deles.

### **1.4.1 - Testes de triagem - TP e TTPA**

O consumo dos fatores da coagulação que ocorre pela ativação da coagulação pode levar a importante redução nos níveis plasmáticos destes fatores em pacientes com

CIVD. Em adição, a sua síntese também está prejudicada devido a alterações no fígado ou a deficiência de vitamina K, além da perda destas proteínas da coagulação durante sangramento maciço (Levi e Opal, 2006) (Bick, 1996). O TP e o TTPa são testes sensíveis a graves depleções destes fatores. Embora estes testes reflitam pobremente a hemostasia in vivo, eles são um método conveniente e rápido para a triagem de deficiências de fatores da coagulação e podem ajudar no monitoramento do paciente com CIVD. A maior limitação do uso destes testes reside na baixa especificidade de seu prolongamento para o diagnóstico da CIVD. Sabemos que estes testes podem estar prolongados por uma série de razões tais como uso de anticoagulantes, hemodiluição, entre outros. Todas estas condições são altamente prevalentes em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). De fato, o prolongamento do TP e TTPA ocorre de 14 a 28% nestes pacientes (Chakraverty, Davidson et al., 1996), (Macleod, Lynn et al., 2003), de modo que sua dosagem isolada não determina a presença de CIVD.

A principal vantagem do TP para o monitoramento de pacientes com CIVD é que ele permite o planejamento da terapia de reposição de fatores da coagulação em pacientes com TP prolongado e sangramentos ativos.

#### **1.4.2 - Dosagem do Fibrinogênio**

A dosagem de fibrinogênio é considerada uma ferramenta útil para o diagnóstico e monitoramento da CIVD. O grau de redução do fibrinogênio (ou de consumo, como geralmente mencionado no contexto da CIVD) é um marcador evolutivo útil da CIVD. No entanto, o fibrinogênio atua como proteína de fase aguda, elevando-se nas fases iniciais da sepse. Desta forma, os níveis plasmáticos de fibrinogênio em pacientes com sepse podem variar muito, encontrando-se elevados, dentro da faixa da normalidade, ou reduzidos, conforme a fase evolutiva da sepse (Bakhtiari, Meijers et al., 2004).

Por este motivo, a avaliação deste parâmetro só tem valor quando feita de forma seriada. Assim como o TP, a dosagem do fibrinogênio também serve como guia para a reposição deste fator nas fases tardias da CIVD.

#### **1.4.3- Contagem de plaquetas**

A contagem de plaquetas é um teste útil no diagnóstico da CIVD. Em geral observa-se consumo de plaquetas durante a CIVD, e os valores correlacionam-se com a gravidade e com outras variáveis relevantes (Vanderschueren, De Weerd et al., 2000).

#### **1.4.4 - Dosagem de fatores da coagulação**

A dosagem isolada de fatores da coagulação já foi realizada em pacientes com sepse, mas não apresenta utilidade clínica no manejo destes pacientes ou no diagnóstico da CIVD. Níveis plasmáticos de FVIII estão aumentados em pacientes com CIVD, provavelmente pela liberação maciça de FVW do endotélio em combinação com o comportamento de fase aguda do FVIII (Lowenberg, Meijers et al.).

Um estudo recente que avaliou múltiplos parâmetros da hemostasia em pacientes com sepse mostrou que os fatores pró-coagulantes FII, FV, FVII, X, XI e XII, assim como os anticoagulantes naturais AT e PC, estavam diminuídos nestes pacientes quando comparados aos controles. Os níveis destes fatores correlacionaram-se com os níveis de albumina sérica, sugerindo participação tanto da disfunção hepática como o consumo destes fatores. Outros fatores da coagulação como o FVIII e fibrinogênio estavam aumentados enquanto o FIX se encontrava estável. O aumento do fibrinogênio correlacionou-se com o aumento de PC reativa, se justificando pela reação de fase aguda (Collins, Macchiavello et al., 2006).

#### **1.4.5 - Dosagem de produtos de degradação de fibrina ou dímeros D**

Teoricamente, a dosagem de fibrina solúvel ou o monômeros de fibrina no plasma seria de grande utilidade clínica para o diagnóstico laboratorial da formação de fibrina intravascular. De fato, estudos clínicos iniciais, indicaram que se a concentração da fibrina solúvel está acima de um valor previamente definido, o diagnóstico de CIVD pode ser feito (Dempfle, 1999) (Mccarron, Marder et al., 1999).

A grande limitação para uso desta informação reside no fato de a maioria dos testes avaliarem também a formação de fibrina extra-vascular, como a que está presente na inflamação ou trauma, cuja presença não seria específica da CIVD. Posteriormente, a dosagem de produtos de degradação de fibrina (PDF) passou a ser utilizada para a

avaliação de degradação intravascular da fibrina em pacientes com CIVD, podendo ser detectados em 42% de pacientes em terapia intensiva, e 99% em pacientes com sepse e CIVD (Shorr, Thomas et al., 2002) (Bernard, Vincent et al., 2001). No entanto, a baixa especificidade destes testes para o diagnóstico da CIVD, especialmente em pacientes com trauma, cirurgia recente, inflamação e tromboembolismo limitam muito seu uso clínico (Boisclair, Ireland et al., 1990). Mais recentemente, um subtipo de PDF, conhecida como dímero D, mostrou-se mais específico para a detecção de formação de fibrina intravascular, sendo incorporada a algoritmos diagnósticos de CIVD e de outras condições como o tromboembolismo venoso (Favaloro, 2010). Níveis normais de dímeros D apresentam alto valor preditivo negativo para a presença de degradação intravascular de fibrina, condição sine qua non para o diagnóstico de CIVD.

#### **1.4.6 - Dosagem de inibidores naturais da coagulação**

Níveis plasmáticos dos inibidores naturais da coagulação como a PC e AT podem ser indicadores úteis para a ativação da coagulação em curso. Há a diminuição destes inibidores de 40 a 60% em pacientes em terapia intensiva e diminuição de até 90% em pacientes que cursam com CIVD, (Bernard, Vincent et al., 2001) e (Gando, Nanzaki et al., 1998). Embora a disponibilidade de técnicas cromogênicas tenha tornando a metodologia para dosagem destes fatores mais disponível e rápida, sua disponibilidade geral ainda é limitada e uma única determinação não é suficientemente sensível ou específica para o diagnóstico de CIVD.

#### **1.4.7 – Critérios diagnósticos**

Para melhor compreensão da fisiopatologia e do tratamento da CIVD, é fundamental a padronização de critérios diagnósticos mínimos para esta síndrome. A adoção destes critérios permite que estudos sobre CIVD sejam comparados, e suas conclusões possam ser consideradas mais universais. Conforme detalhado anteriormente, nenhum teste permite isoladamente o diagnóstico da CIVD. Assim, foram propostos critérios diagnósticos sob a forma de conjuntos de testes avaliados sob a forma de escores, que permitem então o diagnóstico e a classificação da CIVD. Vários escores foram publicados e validados em diferentes populações (Takemitsu, Wada et al., 2011). Além de

permitir o diagnóstico, estes critérios em geral, permitem que se defina a fase evolutiva da CIVD, qual seja a CIVD incipiente (quando a ativação da coagulação ainda não levou a consumo significativo dos fatores da coagulação) e a CIVD descompensada (quando há falência do sistema hemostático com consumo de fatores da coagulação e plaquetas). Qualquer sistema de escore para diagnóstico da CIVD deve incluir necessariamente a premissa de que o paciente apresenta uma condição de base potencialmente associada a sua presença.

Em 2001, o Comitê Científico e de Normalização (SSC) da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) propôs critérios para o diagnóstico da CIVD em suas fases inicial e avançada (Taylor, Toh et al., 2001). Os critérios para CIVD inicial avaliam a evolução de testes da coagulação ao longo do tempo, ao passo que os critérios de CIVD descompensada usam valores obtidos em um único tempo (tabela 2). Estes critérios foram adotados pela maior parte da comunidade científica e são usados até hoje em estudos de CIVD. Os critérios foram validados tanto como marcadores de prognóstico (Lee e Song), quanto para separação de grupos de pacientes que se beneficiariam de terapias alvo-específicas na CIVD tais como o PCa (Dhainaut, Yan et al., 2004) e a AT (Kienast, Juers et al., 2006). Os critérios usam parâmetros simples e de fácil acesso, como TP, fibinogênio, DD e contagem de plaquetas. Embora a utilização de parâmetros como a PC e AT seja prevista para definição de CIVD inicial,

estudos de validação comprovaram que estes parâmetros podem ser omitidos com segurança (Lee e Song).

**Tabela 2 - Critérios ISTH para CIVD descompensada**

<b>Critérios ISTH para CIVD descompensada</b>	
<u>Avaliação de risco:</u> Paciente com doença de base?	<u>Se positivo:</u> <b>Proceder com escore</b>
Realização de testes laboratoriais:	(1) Contagem de plaquetas, (2) TP,  (3) Fibrinogênio, (4) PDF ou monômeros de fibrina solúvel
<b>Score dos resultados</b>	<b>Pontuação</b>
Contagem de plaquetas (*10 <sup>3</sup> /ul):	>100 = 0; <100 e > 50 = 1; <50 = 2
Marcadores de fibrina elevados*:	Sem aumento= 0; moderado= 2; forte= 3
Prolongamento TP (seg em relação a VR)	<3 = 0, >3 e < 6 = 1, > 6 = 2
Nível Fibrinogênio (g/L)	>1g/L = 0, < 1g/L = 1

**Se pontuação  $\geq 5$ , compatível com CIVD descompensada, repetir diariamente**

**Se pontuação  $< 5$ , sugestivo de CIVD inicial, repetir em 1 ou 2 dias.**

\* De acordo com estudo de validação destes critérios, valores de DD entre 0,4-4ug/ml são considerados aumento moderado, e  $> 4$ ug/ml, aumento forte (Bakhtiari, Meijers *et al.*, 2004)

### 1.5. Testes globais da hemostasia

Testes clássicos da hemostasia fornecem informações clínicas importantes em pacientes com coagulopatias como a CIVD, mas infelizmente não são sensíveis para alterações mais sutis da coagulação. Mais especificamente, eles não são adequados para avaliação do resultado final da interação de todas as alterações da hemostasia que ocorrem na CIVD (fatores pró-coagulantes, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico). Nos últimos anos, testes capazes de fornecer informações mais detalhadas sobre a hemostasia, em geral chamados de testes globais da hemostasia, estão ganhando espaço em laboratórios de pesquisa. A CIVD, por todas as características discutidas anteriormente, é um alvo atrativo para o uso destes testes. Sua utilização tem o potencial de revelar novos aspectos sobre a fisiopatogenia da CIVD, bem como guiar o uso mais racional de ferramentas terapêuticas como o uso de plasma fresco congelado ou o crioprecipitado, entre outras. A seguir discutiremos dois dos principais testes globais da hemostasia em uso atualmente.

### **1.5.1. Trombolastografia**

Esta metodologia mede as propriedades visco-elásticas durante a formação do coágulo em sangue total, após a ativação da coagulação *in vitro*. O processo é registrado através de representação gráfica do processo de polimerização da fibrina. Desta maneira, tanto a taxa da polimerização do coágulo como sua firmeza ou estabilidade são avaliados. As vantagens desta metodologia sobre os testes de convencionais é que ela avalia em conjunto, a interação entre fatores da coagulação no plasma, plaquetas e hemácias, que são componentes importantes do trombo (Rugeri, Levrat et al., 2007). Além disso, a metodologia permite uma avaliação do sistema fibrinolítico. Daudel e colaboradores avaliaram a ativação da coagulação em pacientes com CIVD de forma prospectiva e seriada durante as primeiras 72 horas de internação na UTI, bem como no momento da alta. A maioria dos parâmetros encontravam-se dentro da faixa da normalidade, e os autores concluem que o método não é sensível para avaliação mais fina da coagulação nestes pacientes (Daudel, Kessler et al., 2009).

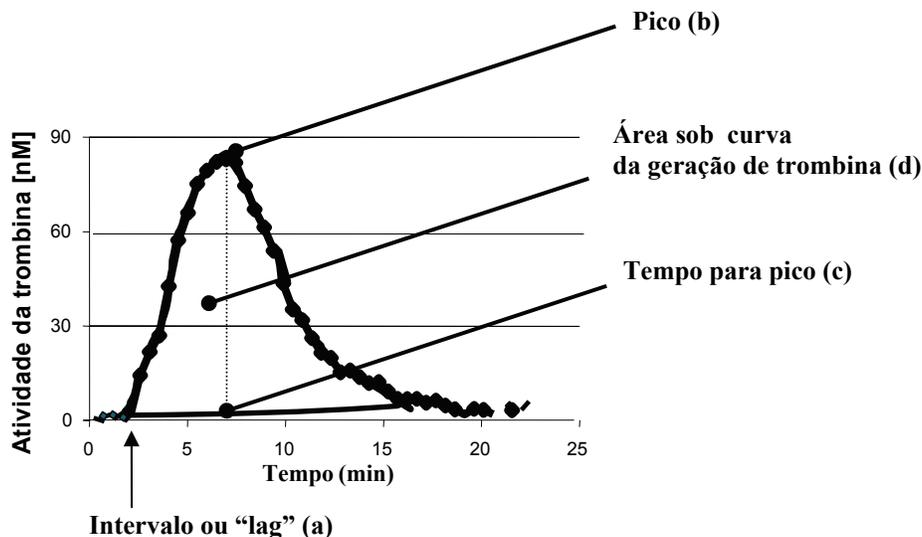
Recentemente foi demonstrado o potencial de uso de um escore baseado em múltiplos parâmetros obtidos pela tromboelastografia para definição de CIVD compensada, com boa correlação com os parâmetros clássicos da ISTH (Sharma e Saxena). É provável que a seleção de pacientes influencie de forma importante os resultados de estudos desta natureza, sendo então fundamental, a definição clara da gravidade do paciente no momento da coleta.

### **1.5.2. Teste de geração de trombina**

Inicialmente proposto por Macfarlane e colaboradores em 1953, a metodologia denominada Tempo de Geração de Tromboplastina estimava a trombina gerada usando o fibrinogênio como substrato. Esta metodologia consistia na adição de ativadores da coagulação ao plasma ou sangue total, e na avaliação dos tempos de coagulação de sub-amostras separadas a cada 60 segundos (Macfarlane e Biggs, 1953). O princípio do ensaio era baseado no fato que a velocidade de conversão do fibrinogênio em fibrina ser dependente na concentração de trombina na amostra. A realização de testes a cada 60 segundos permitia a avaliação da concentração de trombina em cada amostra ao longo do tempo, gerando uma curva semelhante ao trombograma, que será discutido abaixo.

Em 1986, Hemker e colaboradores introduziram o uso de um substrato cromogênico da trombina para avaliação da geração de trombina em amostras defibrinadas (Hemker, Willems et al., 1986). No entanto, o método permaneceu dependente de sub-amostragem manual, o que limitava seu uso a laboratório de pesquisa. Em 1993, o mesmo grupo de pesquisadores introduziu novas modificações importantes no ensaio, que permitiram a mensuração contínua da geração de trombina, ainda com substratos cromogênicos, que, no entanto apresentavam baixa reatividade e maior especificidade para a trombina. Estes autores introduziram o termo “Endogenous Thrombin Potential” ou ETP, que representaria a capacidade total do plasma em formar trombina depois da indução da coagulação. A quantidade de trombina gerada era calculada ao longo do tempo para a construção de uma curva de geração de trombina, conhecida como trombograma. Os autores também desenvolveram um programa de computador que permitiu calcular os parâmetros que caracterizam esta curva (Hemker et al, 1993).

Em 2000, Hemker e colaboradores mais uma vez modificaram o método, com a introdução de um substrato fluorogênico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Isto permitiu que a geração de trombina no plasma pudesse ser monitorada através de mensurações contínuas sem que o sinal fosse prejudicado pela turvação (formação do coágulo na amostra) ou pela presença de plaquetas (possibilitando assim o uso de plasma rico em plaquetas). Desde então o método fluorogênico é considerado mais preciso que o método cromogênico. Neste teste, a geração de trombina é iniciada por uma baixa concentração de FT e a atividade da trombina é medida continuamente. Na figura 4 podemos ver os principais parâmetros obtidos no teste de geração de trombina.



**Figura 4** - Os principais parâmetros obtidos no trombograma são mostrados na figura. (a) Intervalo ou “lag”: corresponde à fase de iniciação da coagulação, em que as concentrações de trombina são ainda indetectáveis. (b) Pico: corresponde ao pico de geração de trombina que ocorre durante a fase de amplificação. (c) Tempo para pico: é o tempo para obtenção do pico. (d) Área sob a curva (AUC) ou “Endogenous thrombin potential (ETP): expressa toda a fase pró coagulante da reação (iniciação, amplificação e propagação). É a área sob a curva de geração de trombina. (Figura adaptada Hemker et al 1993).

### 1.6 – Neutropenia febril em pacientes onco-hematológicos e sepse

O câncer é um dos principais fatores de risco para a sepse. De cada seis pacientes com sepse grave um é portador de doença neoplásica, sendo que a mortalidade pela sepse nestes pacientes chega a ser 30% maior do que a de pacientes sem câncer (Angus, Linde-Zwirble et al., 2001). Willians MD et al observaram uma taxa de sepse grave três a cinco vezes maior em pacientes com câncer, taxa esta que foi significativamente maior entre os portadores de neoplasia hematológica do que entre os portadores de tumores sólidos (Williams, Braun et al., 2004).

A neutropenia grave resultante de toxicidade hematológica dos quimioterápicos e/ou da substituição da medula óssea por células neoplásicas é definida como contagem de

neutrófilos menor ou igual a 500/ $\mu$ l e representa o mais importante fator de risco de infecção nestes pacientes. Este risco é determinado pela intensidade da neutropenia (mais pronunciado quando as contagens de neutrófilos são inferiores a 100/ $\mu$ l) e pela sua duração. (Bodey, Buckley et al., 1966). A sepse e suas complicações representam uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes portadores de neoplasia hematológica com neutropenia febril. (Morrison, 2005).

Freqüentemente os sinais e sintomas indicativos de infecção estão ausentes em pacientes com neutropenia. No entanto, a febre permanece uma manifestação precoce (Pizzo, 1993), de modo que mais de 60% dos pacientes com neutropenia febril apresentam infecção que se não tratada rapidamente pode evoluir para choque séptico e óbito. Nestes pacientes as taxas de mortalidade podem chegar a até 50% nas primeiras 48 horas, principalmente naqueles pacientes com evidência microbiológica de infecção (aproximadamente 12-30% dos pacientes neutropênicos febris) (Klastersky, Ameye et al., 2007).

Pacientes com neutropenia febril e neoplasias hematológicas representam um grupo de interesse para o estudo de características clínicas e laboratoriais da sepse e da CIVD, pela elevada freqüência de complicações como o choque séptico e pela homogeneidade relativa deste grupo de pacientes em comparação a outros grupos de pacientes com risco elevado de sepse tais como pacientes de unidades de terapia intensiva ou de unidades de emergência.

# ***Objetivos***

## 2 OBJETIVOS

---

- Avaliar o grau de ativação da hemostasia em pacientes onco-hematológicos com neutropenia febril durante as primeiras 48 horas de evolução da sepse através do testes de geração de trombina.
- Avaliar a correlação entre os parâmetros do teste de geração de trombina com escores de gravidade da sepse e com o escore de CIVD da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia
- Explorar o papel de parâmetros do teste de geração de trombina como marcadores prognósticos quando à presença de choque séptico e óbito.

# ***Materiais e Métodos***

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 – População e desenho do estudo

Foram incluídos neste estudo pacientes com o diagnóstico de neoplasias hematológicas admitidos para tratamento quimioterápico ou transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) nas enfermarias de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de março de 2008 a março de 2009.

Apenas pacientes que realizaram quimioterapia em altas doses (terapia de indução ou reindução para Leucemias Agudas e terapia de resgate para Linfomas), e que por este motivo apresentaram indicação de permanecerem internados durante todo o período da aplasia pós- quimioterapia foram incluídos. Isto foi importante para a padronização das condições de coleta das amostras entre todos os pacientes no que diz respeito ao tempo de coleta após o primeiro pico febril, além da padronização de aspectos técnicos da coleta de processamento das amostras.

No momento da inclusão no estudo, e antes da realização de quimioterapia, foram coletadas amostras de plasma para determinação avaliação de parâmetros da coagulação e geração de trombina na população do estudo. Em seguida, os pacientes foram acompanhados durante a quimioterapia e no período de aplasia após quimioterapia, e apenas aqueles pacientes que apresentaram neutropenia febril prosseguiram no estudo (ie. realizaram coleta de novas amostras). Nestes pacientes, foram coletadas amostras de sangue no momento do primeiro pico febril (em uma janela de no máximo 12 horas após a febre), e após 48 horas desta coleta. O racional para a escolha destes momentos de avaliação foi em primeiro lugar, padronizar o momento exato da avaliação laboratorial em relação ao curso da sepse em nossa população.

Sabemos que embora pacientes com neutropenia febril raramente apresentem outros sinais de infecção, a febre é um sinal precoce. Assim, a coleta inicial neste momento nos permite inferir que a primeira avaliação era feita em uma fase bem precoce do curso da sepse. Analogamente, a realização da segunda coleta após 48 horas da primeira coleta nos permite padronizar o tempo de evolução da sepse em nossos pacientes, ao mesmo tempo

em que corresponde a tempo suficiente para que aqueles pacientes com pior prognóstico apresentem sinais de sepse mais severa. Sabemos que na neutropenia febril o quadro de choque séptico pode ocorrer precocemente, dentro das primeiras 48 horas.

No momento da internação, os pacientes e/ou seus responsáveis legais foram informados dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos necessários (coleta de amostras de sangue e acesso às informações contidas no prontuário médico) para a participação. Todos os pacientes concordaram com os procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **3.2 – Dados clínicos e escore de gravidade na sepse**

Dados clínicos para caracterização da população do estudo foram obtidos diretamente do prontuário médico, e coletados ao longo da internação. Os seguintes dados foram obtidos: nome, sexo, data de nascimento, diagnóstico, tipo de tratamento quimioterápico, status atual da doença, presença de co-morbidades clínicas, duração da neutropenia, temperatura máxima dos picos febris, pressão arterial média (no pico febril e após 48 horas), necessidade de uso de drogas vasoativas, presença de foco infeccioso clinicamente determinado, evolução clínica da neutropenia (recuperação x óbito), ocorrência de eventos tromboembólicos venosos e arteriais, e ocorrência de sangramento maior.

Os pacientes com neutropenia febril foram classificados quanto à presença de sepse, definida pela presença de resposta inflamatória sistêmica + evidência clínica de infecção, conforme critérios previamente estabelecidos (Bone, Balk et al., 1992). A definição de resposta inflamatória sistêmica, foi a presença de pelo menos dois dos seguintes quatro critérios clínicos:

Febre (temperatura  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ); (2) taquicardia (frequência cardíaca  $> 90$  batimentos/ minuto); (3) taquipnéia (frequência respiratória  $> 20$  incursões respiratórias/ minuto) ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg; (4) Leucocitose ( $> 12$  mil leucócitos/  $\text{mm}^3$ ) ou leucopenia ( $< 4$  mil leucócitos/  $\text{mm}^3$ ) ou  $> 10\%$  de leucócitos imaturos no sangue periférico.

A evidência clínica de infecção foi assumida para todos os pacientes com neutropenia febril grave, conforme determinado por protocolo clínico da instituição, e diretrizes internacionais de tratamento de pacientes nestas condições.

Seguindo estes critérios, todos os pacientes que apresentaram neutropenia febril e incluídos neste estudo, preencheram critérios para sepse. Além disso, os pacientes foram avaliados quanto à presença de choque séptico, definido como a presença de sepse associada à hipotensão (pressão arterial sistólica < 90mmHg) refratária à reposição de volume. Finalmente, os pacientes foram classificados quanto à gravidade da sepse usando o escore SOFA (Serial Organ Failure Assessment), classicamente utilizado em pacientes com sepse para avaliação do grau de disfunção orgânica de vários sistemas (Vincent, Moreno et al., 1996). O escore foi calculado no momento da febre e após 48 horas, conforme demonstrado na tabela 2.

**Tabela 3** - Escore de disfunção orgânica SOFA (Vincent, Moreno *et al.*, 1996)

<b>Pontos</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	>400	≤400	≤300	≤200 *	≤100 *
Creatinina (mg/dl) ou débito urinário	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 < 500 ml/d	≥5,0 <200 ml/d
Bilirrubinas (mg/ dl)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	≥12
Hipotensão	Não	PAM<70	Dopa≤5 ou dobuta	Dopa>5 ou nora≤0,1**	Dopa>15 ou nora** >0,1
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	> 150	≤150	≤100	≤50	≤20
Escala de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6

\* com suporte ventilatório; \*\* drogas adrenérgicas administradas por pelo menos 1 hora (dose em µg/Kg/min); PAM: pressão arterial média; Dopa: dopamina; dobuta: dobutamina; nora: noradrenalina

### **3.3 – Coleta e processamento das amostras**

As coletas foram realizadas por punção venosa periférica. No total, cada paciente que incluído no estudo realizou três coletas: basal (antes do início da quimioterapia); febre (no momento do primeiro pico febril) e 48 horas (após 48 horas da coleta da febre). Excepcionalmente, a coleta foi feita através de cateter venoso central e nestes casos, uma amostra inicial de 20ml de sangue foi coletada e descartada antes da coleta da amostra do estudo. Amostras de plasma pobre em plaquetas foram então preparadas através da centrifugação a 1500g, por 15 minutos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento, pelo mesmo indivíduo, no mesmo equipamento, e respeitando o tempo máximo de 30 minutos entre a coleta e o início da centrifugação.

O plasma obtido por centrifugação foram imediatamente separados em alíquotas e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 – Avaliações laboratoriais de parâmetros clássicos da hemostasia em pacientes com CIVD**

Para a realização das análises laboratoriais as amostras foram descongeladas rapidamente em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  a fim de minimizar a interferência das variações interensaios nas comparações dos resultados. Os seguintes testes foram realizados em duplicata:

Tempo de protrombina: realizado em coagulômetro automatizado BCS-XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha) através da adição de tromboplastina cálcica ao plasma pelo método de Quick (Tromborel, Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha).

Dosagem de fibrinogênio: realizado em coagulômetro automatizado BCS-XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha) pelo método modificado de Klauss, onde o plasma citratado foi levado à coagulação com um grande excesso de Trombina. Foi utilizado o reagente Multifibrin U (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha).

Dosagem de dímeros D: realizado em coagulômetro automatizado BCS-XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha) através de análise imunoturbidimétrica potenciada por partículas de polistireno revestidas covalentemente com anticorpo

monoclonal específico para detecção de dímeros D. O resultado foi expresso através do aumento da turvação e expresso em mg/L. Foi utilizado o reagente Innovance DDimer (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha).

### **3.5. Avaliação da geração de trombina**

Todas as avaliações da geração de trombina foram feitas em uma única data, em duplicata, utilizando fluorímetro (Biotek FLx800 Brunner, Áustria). As avaliações foram feitas com kit comercial (Technothrombin TGA, Brunner, Áustria). Neste protocolo, a coagulação é ativada através da adição de 5pM de fator tissular. A metodologia deste teste é baseada no monitoramento da fluorescência gerada pela clivagem de um substrato fluorogênico pela trombina ao longo do tempo de mensuração. A concentração de trombina (em Nm) na amostra é calculada a partir das variações de fluorescência ao longo do tempo, corrigida por uma curva de calibração. A geração de trombina é expressa através dos seguintes parâmetros:

Intervalo ou “Lag” (segundos): tempo para início da clivagem do substrato

Pico (Nm): pico mensurado de geração de trombina

Tempo para pico (segundos): tempo em segundos para obtenção do pico

Índice de velocidade: expressão da velocidade de elevação da curva do momento de seu início até o pico (inclinação)

Área sob a curva: expressa a quantidade de trombina gerada durante todo o processo

A avaliação da geração de trombina foi ainda realizada em amostras de 6 indivíduos normais em duplicata.

### **3.6. Cálculo dos escores de CIVD**

Os pacientes foram classificados quanto à presença de CIVD descompensada através dos critérios da ISTH discutidos anteriormente (tabela 2). Os escores foram calculados no momento da febre e após 48 horas.

Para avaliar o impacto potencial da plaquetopenia induzida pela quimioterapia nos resultados destes escores, os mesmos foram recalculados considerando a ausência de plaquetopenia decorrente de CIVD. Assim, os pontos somados ao escore pela presença de plaquetopenia foram retirados nesta avaliação modificada. A decisão por conferir escore = 0 para a plaquetopenia nesta reavaliação foi arbitrária e baseada na observação que nenhum dos pacientes apresentava consumo significativo de fibrinogênio, o que pode sugerir que a CIVD nos mesmos estaria em fase inicial.

### **3.7. Análise estatística**

As características clínicas dos pacientes são apresentadas de forma descritiva. Os resultados laboratoriais são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, exceto quando especificado de outra forma. As variáveis foram tratadas como não-paramétricas. Comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney (duas variáveis) ou teste de Kruskal-Wallis (três ou mais variáveis), utilizando o pós-teste de Dunn. A avaliação da correlação entre duas variáveis foi feita através do teste de correlação de Spearman. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os testes foram realizados com o software GraphPad A Prism (San Diego, Califórnia, EUA).

# *Resultados*

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1. Características dos pacientes

No total, 24 pacientes com neutropenia febril e sepse foram avaliados. As características demográficas e clínicas destes pacientes são demonstradas na tabela 4.

**Tabela 4** - Características dos pacientes (n=24)

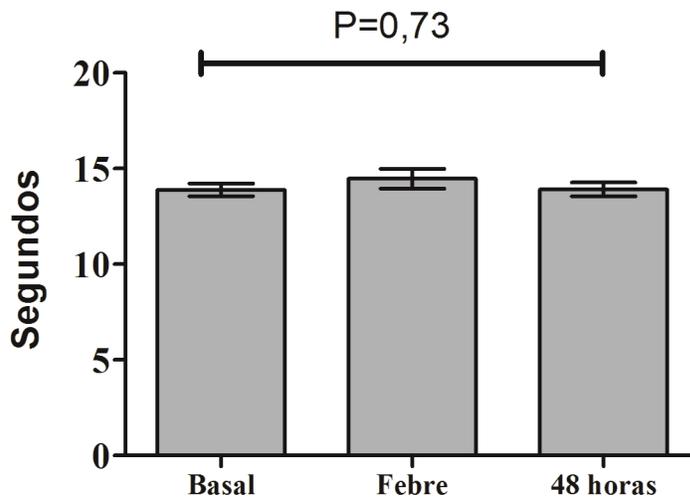
<b>Características</b>	
Sexo (masculino: feminino)	15:9
Idade (mediana, min-max)	42 (16-62)
<b>Diagnóstico</b>	
Leucemia Aguda	14
Outras patologias <sup>€</sup>	10
<b>Tratamento</b>	
QTx intensiva /TCPH autólogo	12
TCPH alogênico	12
<b>Neutrófilos/ µl – na febre</b> (mediana, min-max)	125 (20 - 500)
<b>SOFA – início da febre</b> (mediana, min-max)	3 (0 - 13)
<b>SOFA - 48 horas</b> (mediana, min-max)	4 (1 – 12)
<b>Escore CIVD – febre/48h</b> (mediana, min-max)	4 (0 – 7)
<b>Escore CIVD – 48 horas</b> (mediana, min-max)	4 (2 – 6)
<b>CIVD descompensada - início da febre (%)</b>	7/17 (41,7 %)
<b>CIVD descompensada – 48 horas (%)</b>	9/20 (45,0 %)
<b>Sangramento maior</b> (n)	0/24
<b>Fenômenos tromboembólicos</b> (n)	0/24

€: Linfoma (n=4); Mieloma Múltiplo (n=1), Neoplasia Mieloproliferativa Crônica (n=4); Hemoglobinúria Paroxística (Noturna (n=1); TCPH: transplante de células progenitoras hematopoiéticas; QTx: quimioterapia

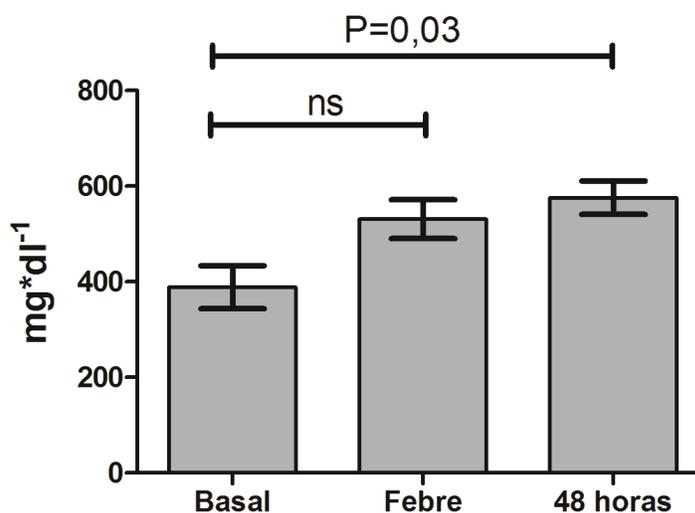
Conforme demonstrado na tabela, a população do estudo apresentava escores de gravidade relativamente baixos, se comparado com outros estudos de avaliação de pacientes com sepse recrutados em UTIs. Quanto à frequência de CIVD descompensada, os achados iniciais mostram frequência elevada na ordem de 40%, já no momento da febre. No entanto, a presença de plaquetopenia grave, com contagem inferior a 50.000/uL em quase todos os pacientes, limita o valor deste escore em nossos pacientes. De fato, quando os pontos relativos à presença de plaquetopenia foram excluídos do escore, apenas 1 paciente em cada momento apresentava CIVD descompensada. Este valor é mais compatível com as características clínicas de nossos pacientes.

#### **4.2. Parâmetros da coagulação clássicos nos pacientes com sepse**

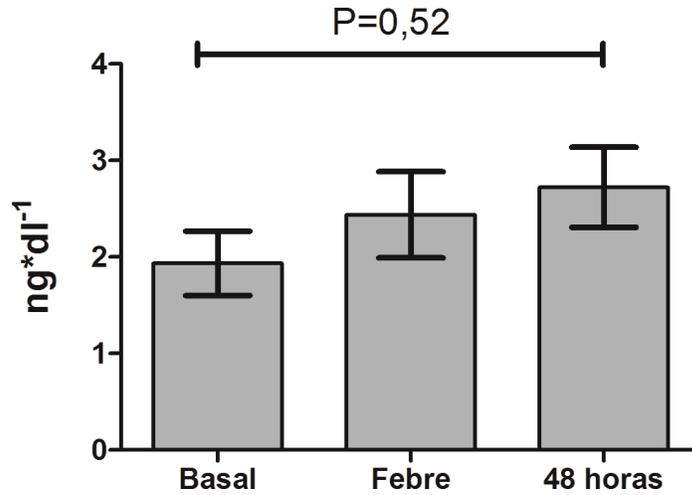
Os valores do tempo de protrombina, dosagem de fibrinogênio, dosagem de dímeros D e contagem de plaquetas dos pacientes são mostrados nas figuras 4 a 7 respectivamente. Observam-se níveis estáveis de tempo de protrombina ao longo das primeiras 48 horas da evolução da sepse. Observamos um aumento dos níveis de fibrinogênio, compatível com seu caráter de proteína de fase aguda, observado nas fases iniciais da sepse. Observa-se ainda um aumento significativo da dosagem de dímeros D ao longo das primeiras 48 horas da sepse. Em relação à contagem de plaquetas, o valor dos achados é limitado na medida em que a plaquetopenia em nossa população decorre do efeito mielotóxico da quimioterapia, e não da ativação da coagulação.



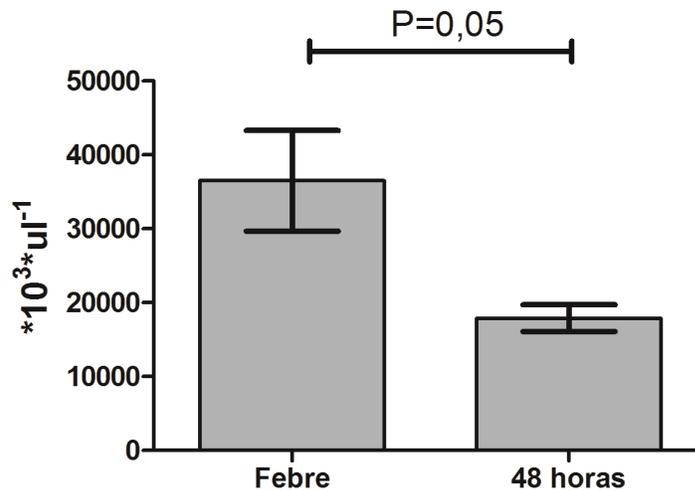
**Figura 5** - Os gráficos mostram os valores do tempo de protrombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Valor de normalidade: 11,2 a 13,3 segundos. Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis.



**Figura 6** - Os gráficos mostram os valores de fibrinogênio dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Valor de normalidade: 200-400 mg/dL Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis.



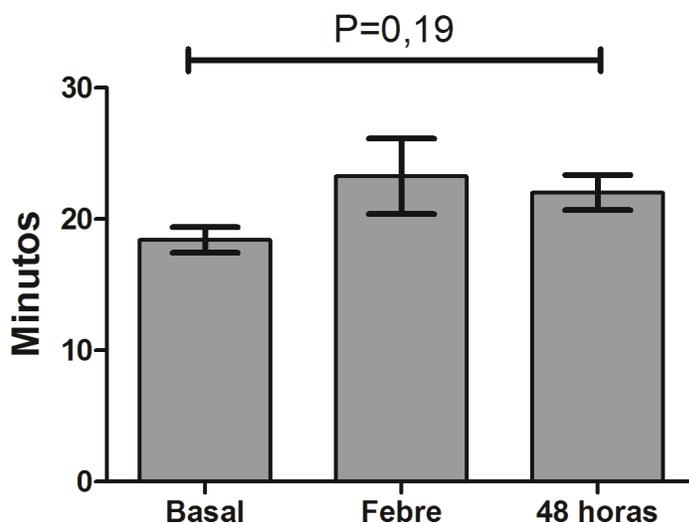
**Figura 7** - Os gráficos mostram os valores de dímeros D dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Valor de normalidade: 100 a 210 ng/dL Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis.



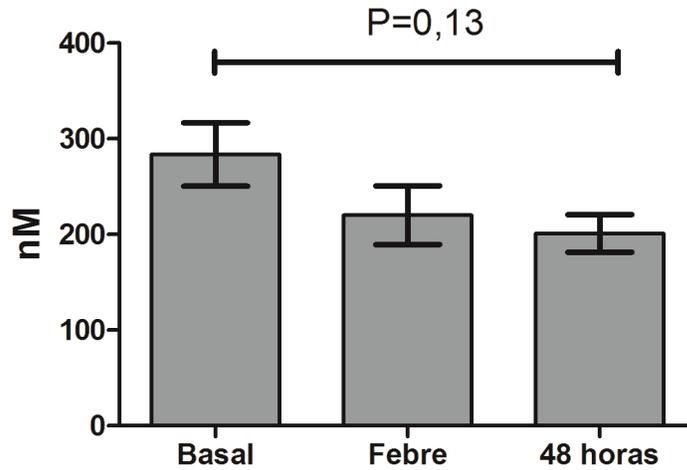
**Figura 8** - Os gráficos mostram os valores de contagem de plaquetas dos pacientes do estudo no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Valor de normalidade: 150 a 450 (x10<sup>3</sup> /mm<sup>3</sup>). Comparação entre médias feita pelo método de Mann-Whitney

### 4.3. Avaliação da geração de trombina em pacientes com sepse

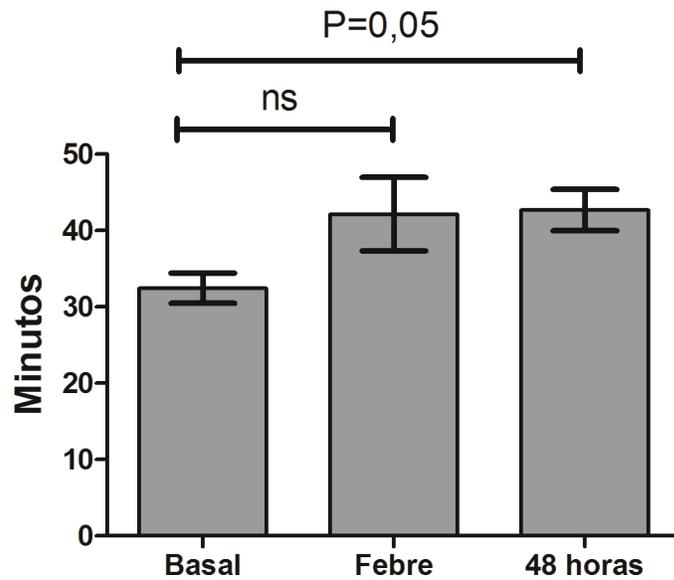
A avaliação da geração de trombina foi feita nos 24 pacientes nos três tempos do estudo. Nas figuras 8 a 12 podemos observar os valores obtidos para os pacientes do estudo. Os valores obtidos no momento da febre e após 48 horas devem ser analisados em comparação aos valores obtidos antes da quimioterapia, já que é possível haver variações nos níveis basais destes parâmetros conforme o diagnóstico ou o status atual da doença. Os valores de referência para os parâmetros testados obtidos em 6 amostras de indivíduos normais são apresentados nas legendas de cada figura. Todos os valores observados no tempo basal (exceto índice de velocidade) encontravam-se dentro da faixa de normalidade, se calculada a partir destas amostras.



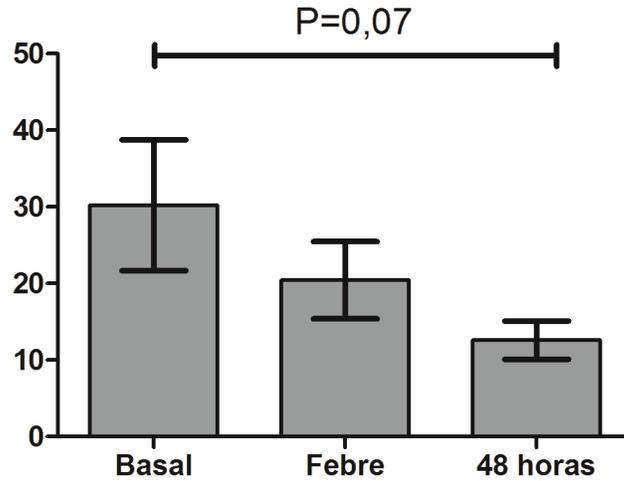
**Figura 9** - Os gráficos mostram os valores do intervalo (ou *lag*) para geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais:  $19,0 \pm 6,7$  segundos.



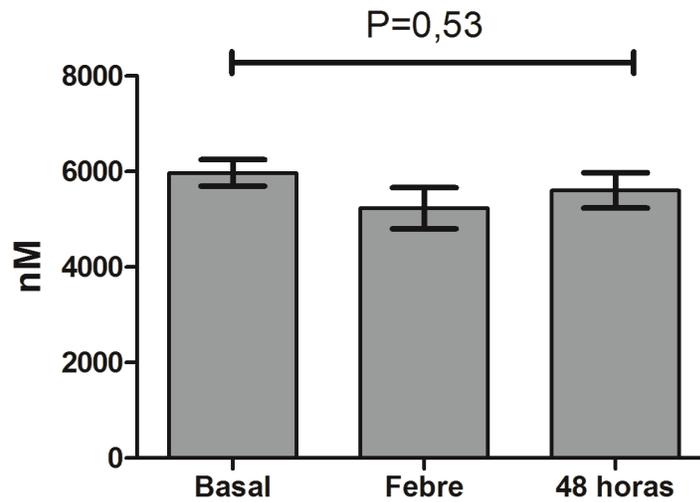
**Figura 10** - Os gráficos mostram os valores do pico de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais:  $241,1 \pm 78,1$  nM.



**Figura 11** - Os gráficos mostram os valores do tempo para geração do pico de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais:  $34,8 \pm 8,7$  segundos.



**Figura 12** - Os gráficos mostram os valores do índice de velocidade para geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais:  $16,3 \pm 7,4$ .



**Figura 13** - Os gráficos mostram os valores da área sob a curva de geração de trombina dos pacientes do estudo antes do início da quimioterapia (basal), no momento da febre (febre) e após 48 horas do primeiro pico febril (48 horas). Comparação entre médias feita pelo método de Kruskal-Wallis. Valores obtidos em 6 indivíduos normais:  $6105,4 \pm 1684,0$  nM.

#### 4.4. Avaliação da correlação entre parâmetros do teste de geração de trombina e escores de gravidade e CIVD

A fim de avaliar a associação entre os parâmetros do teste de geração de trombina com variáveis clínicas e laboratoriais relevantes no contexto da sepse, realizamos uma análise de correlação entre os valores obtidos neste teste, com um escore clássico de gravidade da sepse normalmente avaliado de forma seriada em pacientes internados em UTI. Os escores foram calculados no momento da febre e após 48 horas a fim de sensibilizar a análise para a detecção da evolução clínica dos pacientes após 48 horas do início da neutropenia febril. Os resultados são demonstrados na tabela 6. Houve correlação estatisticamente significativa entre o escore SOFA de gravidade da sepse com os seguintes parâmetros: intervalo para geração de trombina no momento da febre e após 48 horas, pico de trombina em 48 horas e área sob a curva no momento da febre e após 48 horas. Diante das limitações da avaliação do escore de CIVD em nossa população, os coeficientes de correlação não são apresentados.

**Tabela 5** - Coeficientes de correlação de Spearman (Rs) entre teste de geração de trombina e escores de gravidade na sepse

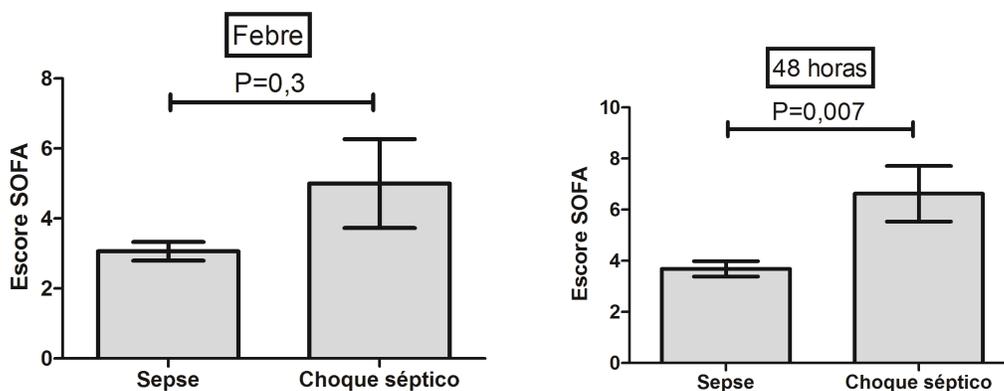
Parâmetros	SOFA (febre)	SOFA (48h)
<b>Intervalo</b> (febre)	<b>0,54</b> (P=0,02)	<b>0,47</b> (P=0,05)
<b>Intervalo</b> (48 horas)	-0,23	0,12
<b>Pico trombina</b> (febre)	-0,44	<b>-0,48</b> (P=0,04)
<b>Pico trombina</b> (48 h)	-0,15	0,01
<b>Tempo pico</b> (febre)	0,44	0,43
<b>Tempo pico</b> (48 h)	-0,04	0,10
<b>Índice vel</b> (febre)	-0,36	-0,45
<b>Índice vel</b> (48 h)	-0,08	-0,01
<b>AUC</b> (febre)	<b>-0,62</b> (P=0,006)	<b>-0,54</b> (P=0,02)
<b>AUC</b> (48 horas)	-0,21	-0,19

AUC: área sob a curva de geração de trombina. Correlações estatisticamente significativas destacadas em negrito. Demais correlações sem significância estatística.

#### 4.5. Análise exploratória do valor prognóstico dos parâmetros do teste de geração de trombina para evolução para choque séptico

Dos 24 pacientes avaliados com o teste de geração de trombina, 8 evoluíram com choque séptico. A evolução para choque séptico foi tardia, ocorrendo em uma mediana de 4 dias (1 – 4) em relação ao início da neutropenia febril. O escore SOFA em pacientes com ou sem choque séptico é mostrado na figura 14, mostrando que quando medido 48 horas após a febre, seu valor está estatisticamente associado à ocorrência de choque séptico.

Apesar do número reduzido de pacientes, realizamos uma análise exploratória da associação entre valores obtidos no teste de geração de trombina 48 horas após a febre (momento em que o escore SOFA mostrou-se capaz de segregar pacientes com evolução para choque séptico). Os resultados são mostrados na tabela 6. Um aspecto importante da análise é que não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos parâmetros do teste de geração de trombina antes da neutropenia febril (basal). Nenhum dos parâmetros foi capaz de prever a ocorrência de choque séptico em nossa população.



**Figura 14** - Associação entre escore de gravidade SOFA e evolução para choque séptico, mostrando que apenas o SOFA após 48 horas da febre apresenta associação estatística com este desfecho clínico (Teste de Mann-Whitney).

**Tabela 6** - Associação entre parâmetros do teste de geração de trombina com a evolução para choque séptico

<b>Teste de Geração de Trombina</b>			
<b>Parâmetro</b>	<b>Sepse</b>	<b>Choque séptico</b>	<b>P *</b>
<b>Intervalo (basal)</b>	19,35 (8,1-23,1)	18,6 (16,1-26,6)	0,93
<b>Intervalo (48h)</b>	22,1 (10,1-31,1)	24,1 (18,1-29,1)	0,61
<b>Pico trombina (basal)</b>	325,7 (0-707,4)	282,3 (140,8-306,7)	0,13
<b>Pico trombina (48h)</b>	221,2 (63,6-362,8)	150,2 (93,4-300,2)	0,29
<b>Tempo p/ pico (basal)</b>	32,6 (12,1-49,1)	33,1 (27,6-44,6)	0,58
<b>Tempo p/ pico (48h)</b>	42,35 (18,6-62,1)	46,6 (35,1-59,6)	0,29
<b>Índice velocidade (basal)</b>	25,3 (0-176,9)	18,2 (7,1-26,9)	0,30
<b>Índice velocidade (48h)</b>	11,8 (1,4-39,4)	5,7 (3,1-21,9)	0,37
<b>AUC (basal)</b>	6123 (4806-7829)	6287 (3764-6783)	0,37
<b>AUC (48h)</b>	6430 (1675-7042)	5228 (2496-6613)	0,16

SOFA: escore de gravidade de pacientes com sepse; ISTH: escore de CIVD da ISTH; AUC: área sob a curva de geração de trombina; \* teste de Mann-Whitney; dados expressos como mediana (min-max).

*Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

---

A despeito dos avanços na terapia de suporte, a sepse e suas complicações permanecem como um dos principais desafios da medicina.

A ativação da coagulação e a disfunção dos mecanismos reguladores do equilíbrio hemostático são características marcantes da sepse. A expressão clínica deste fenômeno é a CIVD. A CIVD é uma das mais graves complicações da sepse, podendo levar ao óbito tanto por sangramentos - decorrentes do consumo de fatores e plaquetas, quanto por trombozes, decorrentes entre outras causas da disfunção dos mecanismos reguladores do equilíbrio hemostático. Frente à gravidade do quadro de CIVD é importante o estudo da sua fisiopatologia em pacientes com sepse. Até o momento não há tratamentos específicos para a CIVD que sejam amplamente aceitos na prática médica, e os pacientes são manejados através do tratamento das condições de base que desencadearam a CIVD e da reposição de fatores da coagulação e plaquetas consumidos nas fases tardias da CIVD. O melhor entendimento da CIVD em pacientes com sepse pode revelar novas estratégias terapêuticas ou reorientar condutas clássicas no manejo destes pacientes.

Durante muitos anos as alterações da hemostasia na sepse foram descritas como apresentado uma fase inicial caracterizada por hipercoagulabilidade, e uma fase tardia, ou descompensada, marcada por hipocoagulabilidade. Segundo este modelo, a hipercoagulabilidade das fases iniciais (ou compensada) da CIVD – hipercoagulabilidade esta que seria resultado da expressão anômala de FT, da hipofunção das vias da PCa, AT e TFPI, e da liberação maciça de PAI-1 – levaria a trombozes em capilares e vasos de menor calibre. A deposição de fibrina intravascular levaria a consumo de outros fatores da coagulação e plaquetas. Assim, o processo inicialmente marcado por hipercoagulabilidade evoluiria para um quadro de hipocoagulabilidade caso não fosse interrompido pelo tratamento da doença de base.

Ainda de acordo com este modelo, as trombozes de capilares e vasos de menor calibre seriam responsáveis por isquemia de tecidos, como pulmões, fígado, rins, etc, levando ao quadro de falência de múltiplos órgãos e óbito pela sepse.

Este modelo foi amplamente testado em modelos animais e ensaios in vitro, com resultados fortemente sugestivos de sua relevância clínica. A partir destes resultados,

várias estratégias para o tratamento da sepse baseadas no uso de anticoagulantes como a heparina ou de proteínas anticoagulantes naturais como a PCa. AT e TFPI foram desenvolvidas. A partir de resultados encorajadores nas fases pré-clínica e clínica inicial (fases I e II), grandes estudos de fase III foram realizados com o racional de interromper a ativação da coagulação na sepse, e desta forma reduzir as conseqüências deletérias das trombooses teciduais e dos sangramentos por consumo de fatores da coagulação e plaquetas. Infelizmente, apenas a PCa mostrou-se eficaz no tratamento da sepse. E mesmo esta proteína teve seu efeito benéfico mais atribuído a mecanismos celulares independentes da coagulação, em oposição a sua ação sobre os fatores VIIIa e Va. Desta forma, podemos concluir que apesar das evidências indicando a ativação da coagulação durante a sepse, a relevância clínica deste achado permanece incerta.

Um dos motivos pelo qual os resultados de estudos iniciais podem ter levado a conclusões inadequadas no estudo da hemostasia na sepse diz respeito aos testes usados para caracterização das alterações da hemostasia neste contexto. De fato, a avaliação da hemostasia por testes clássicos é limitada pela incapacidade dos mesmos em capturar a interação entre os vários processos que levam à CIVD. Em geral, testes clássicos da hemostasia apresentam desfecho laboratorial (*in vitro*) precoce em relação a todo o processo da hemostasia (*in vivo*). Em outras palavras, o tempo em segundos para a formação da fibrina em um TP ou TTPa é muito inferior ao tempo fisiológico necessário para iniciação, amplificação e propagação da hemostasia. Além disso, as concentrações de ativadores usadas nestes ensaios são muitas vezes acima dos valores fisiológicos, o que limita sua utilização para a detecção de deficiências muito importantes destes fatores. O TP e o TTPa não detectam a redução menos significativa de fatores da coagulação, nem são capazes de medir estados de hipercoagulabilidade.

Neste contexto, a avaliação da hemostasia em pacientes com sepse através de testes globais é uma estratégia atraente, com o potencial de revelar novos aspectos sobre a fisiopatogenia da CIVD.

Dentre os testes de globais da hemostasia mais usados atualmente, destacam-se a tromboelastografia e o teste de geração de trombina. Ambos são testes muito antigos, que foram recentemente “descobertos” e aprimorados. A tromboelastografia usa como “endpoint” a medida das propriedades visco-elásticas do sangue, e apresenta como

vantagem teórica o fato de avaliar a hemostasia em amostras de sangue total. Isto permite a avaliação da participação dos glóbulos vermelhos e plaquetas, o que em tese é uma vantagem em relação a testes que utilizam plasma. No entanto, a tromboelastografia tem como resultado, parâmetros que se correlacionam pouco com pontos específicos há processo de coagulação. Isto confere a esta metodologia muito mais utilidade do ponto de vista prático, isto é, na definição da assistência a pacientes com distúrbios da coagulação, do que exploratório de mecanismos específicos envolvidos na fisiopatogenia de coagulopatias. De fato, algumas tentativas de incorporação desta metodologia na investigação de pacientes com sepse acrescentaram informações limitadas no que diz respeito à fisiopatogenia da CIVD, embora tenham se mostrado capazes de auxiliar no diagnóstico da presença desta condição (Sharma e Saxena, 2010). Conforme esperado, a tromboelastografia foi capaz de demonstrar a presença de hiperfibrinólise em pacientes com CIVD por trauma (Levrat, Gros et al., 2008) e sinais de coagulopatia grave em pacientes com CIVD por complicações obstétricas graves (Moopanar, Naidu et al., 1997). Na CIVD decorrente da sepse, dois trabalhos merecem destaque. Daudel e colaboradores, avaliando 30 pacientes internados em UTI, mostraram que a tromboelastografia, realizada de forma seriada a cada 12 horas durante as 48 horas iniciais de internação, encontrava-se dentro da faixa da normalidade na maioria dos pacientes. Este achado negativo indica que pelo menos através deste método, não é possível demonstrar a presença da fase inicial de hipercoagulabilidade sugerida em estudos experimentais (Daudel, Kessler et al., 2009). Já Collins e colaboradores, em sua avaliação de pacientes com sepse através de tromboelastografia em um único momento, encontraram indícios de lentificação no processo de início da coagulação (expresso pelo tempo de coagulação ou reação), que uma vez iniciado apresentava sinais de exacerbação discreta (expressa pelo velocidade máxima de formação do coágulo e área sob a curva de elasticidade). Como destacado anteriormente, este estudo não deixa claro o momento em que pacientes de UTI foram avaliados, de modo que as conclusões ficam limitadas (Collins, Macchiavello et al., 2006). Um outro aspecto comum a estes estudos que também pode ter limitado o potencial da tromboelastografia para demonstração de alterações relevantes em pacientes com sepse diz respeito à forma de ativação usada nos estudos. Atualmente a tromboelastografia vem sendo usada com o uso

de FT em concentrações fisiológicas, muito inferiores àquelas presentes nos reagentes comerciais usados nos estudos acima (Sorensen, Johansen et al., 2003).

A trombina é um dos componentes mais críticos do processo de coagulação devido a sua ação heterogênea, que consiste na ativação de outros fatores durante a fase de amplificação, ativação de vias anticoagulantes críticas como a via da PCa, ativação de inibidores da fibrinólise como o TAFI, além de suas ações celulares independentes da hemostasia mediadas por receptores ativadas por proteases (PAR) (Coughlin, 2000). A importância da trombina é ilustrada pelo fato de camundongos knockout para o gene da protrombina apresentarem letalidade embrionária, fato incomum para outros fatores da coagulação (Sun, Witte et al., 1998). Por este motivo, a avaliação laboratorial da geração de trombina vem ganhando importância nas últimas décadas como forma alternativa de avaliação da coagulação. De uma perspectiva clínica, seria extremamente útil existir um teste laboratorial que determinasse com mais precisão do que o TP e o TTPa o potencial de coagulação individual.

Atualmente os testes de geração de trombina estão bem desenvolvidos, e utilizam substratos específicos da trombina e equipamentos automatizados que medem a ação da trombina no plasma sobre estes substratos de forma contínua. O resultado é lançado em curvas gerando um trombograma (figura 4). Parâmetros como a área sob a curva, que indica o potencial de geração de trombina de um indivíduo, o pico máximo e o tempo para este pico são considerados críticos nesta avaliação.

O teste de geração de trombina vem sendo aos poucos incorporado ao arsenal de pesquisa na área de hemostasia, embora do ponto de vista clínico ainda não tenha sido validado em nenhuma indicação. Condições clínicas como monitoramento da terapia com agentes de bypass em pacientes com hemofilia e inibidores (Dargaud, Beguin et al., 2005), monitoramento terapia anticoagulante como inibidores diretos de trombina ou antagonistas de atividade de fator Xa (Seo, Kim et al., 2009) ou avaliação de risco de tromboembolismo venoso recorrente em pacientes após a anticoagulação oral (Eichinger, Hron et al., 2008) estão entre as mais estudadas do ponto de vista clínico, e com maior potencial de incorporação futura do teste à prática clínica (Van Veen, Gatt et al., 2008). No entanto, esta incorporação ainda carece do cumprimento de etapas importantes de validação de um teste

diagnóstico, bem descritas por Sackett e Haynes em artigo clássico sobre a incorporação de novos biomarcadores à prática médica (Sackett e Haynes, 2002).

Em nosso estudo avaliamos parâmetros do teste da geração de trombina em pacientes com sepse e neutropenia febril. Na medida em que as alterações da hemostasia na sepse e a CIVD são condições altamente dinâmicas ao longo do tempo, nosso estudo realizou esta avaliação antes da ocorrência da sepse (tempo basal), no momento da febre e após 48 horas. Todas as comparações foram feitas em relação ao tempo basal dos próprios pacientes, e não em relação a uma população controle. Em nossa opinião isto é um ponto forte de nosso estudo. A realização desta avaliação basal não seria factível em estudos de sepse na população geral, pois estes pacientes são em geral admitidos em UTIs aleatoriamente. No estudo de pacientes onco-hematológicos, isto é possível na medida em que durante a neutropenia febril antecipa-se um risco extremamente elevado de sepse. Este aspecto dos pacientes com neutropenia febril, de apresentarem um risco extremamente elevado de sepse, foi o motivo pelo qual esta população foi selecionada para o estudo de biomarcadores de gravidade na sepse, do qual este estudo faz parte (Alves, Montalva et al.). Assim, o motivo pelo qual pacientes com neutropenia febril foram usados neste estudo tem relação ao risco de evolução para sepse e suas complicações, e não a aspectos específicos da CIVD nesta população. De fato, a presença de plaquetopenia induzida pela quimioterapia, outra característica desta população, atua como fator de confusão em nosso estudo, como discutiremos adiante. Finalmente, é factível imaginar que o parâmetro avaliado em nosso estudo, a geração de trombina, possa apresentar diferenças significativas em pacientes com diferentes doenças onco-hematológicas ou mesmo pacientes em diferentes estágios evolutivos de sua doença (remissão x progressão). Neste contexto, a avaliação basal torna-se ainda mais importante.

Além da avaliação seriada da geração de trombina, também avaliamos outros parâmetros clássicos da hemostasia. Optamos pelos parâmetros usados para classificação de pacientes quanto à presença de CIVD, que incluem contagem de plaquetas, dosagem de fibrinogênio, TP e dosagem de dímeros D. Vários estudos já descreveram o comportamento de parâmetros clássicos da hemostasia em pacientes com CIVD e sepse, de modo que optamos por esta avaliação mais restrita. Com ela pretendíamos classificar nossos pacientes

quanto á presença de CIVD descompensada, e posteriormente avaliar estes resultados em relação aos achados do teste de geração de trombina.

A principal característica que difere nossa população de outros estudos de sepse é o momento da coleta das amostras. Este momento é relativamente inicial em relação ao desenvolvimento da sepse, na medida em que no momento do primeiro pico febril a maioria dos pacientes ainda não apresenta sinais de sepse grave. Ao contrário, em estudos realizados em pacientes em UTI, as amostras iniciais são coletadas de pacientes graves (que caso contrário não estariam na UTI). Esta característica de nossa população tem duas conseqüências para nosso estudo: (1) como aspecto negativo, nossa avaliação seja talvez muito precoce em relação ao desenvolvimento da CIVD para permitir que conclusões relevantes sejam obtidas. Isto é minimizado pela análise posterior em 48 horas. Ainda assim, a mediana para desenvolvimento de choque séptico em nossa população foi de 4 dias, de modo que mesmo após 48 horas, grande parte dos pacientes ainda não apresentava complicações graves da sepse (cabe destacar que todos já apresentavam critérios de sepse, desde o momento da febre). De fato, a ausência de uma avaliação mais tardia da CIVD em nossos pacientes (por exemplo, após 5 a 7 dias) é a principal limitação deste estudo. (2) A segunda conseqüência do desenho de nosso estudo é positiva, e consiste no caráter homogêneo do momento da coleta das amostras em nosso estudo. Em uma condição dinâmica como a chamada “coagulopatia da sepse”, grandes heterogeneidades no momento da coleta de amostras podem invalidar os resultados gerais de um estudo. O ponto forte de nosso estudo é justamente o fato de a amostra inicial ter sido coletada em no máximo 12 horas após o primeiro pico febril (em mais de 90% dos pacientes, em até 3 horas), o que padroniza o momento do início de nossa avaliação.

Em relação aos parâmetros clássicos da hemostasia, observamos estabilidade do TP, e aumento do fibrinogênio e dímeros D ao longo das primeiras 48 horas da sepse.

O TP é um teste que só mostra alteração quando há deficiências graves da hemostasia. Como nossos pacientes foram avaliados em fases iniciais da sepse, a estabilidade do TP é um achado esperado. Por outro lado, o aumento do fibrinogênio (com significância estatística) e de dímeros D (tendência clara observada no gráfico), estão de acordo com o que se espera nas fases iniciais da CIVD e de certa forma validam nossa população de estudo. Infelizmente a contagem de plaquetas não é um parâmetro válido em

nosso estudo para avaliação da CIVD, na medida em que decorre do efeito mielotóxico da quimioterapia. Por este motivo, a aplicação do escore de CIVD da ISTH não se mostrou interessante em nossa população, resultando em frequência claramente superestimada de CIVD descompensada (todos os pacientes receberam escore máximo por plaquetopenia grave). Um exercício de modificação do teste, cortando arbitrariamente os pontos atribuídos à plaquetopenia, reduziram a porcentagem de pacientes com CIVD descompensada para valores inferiores a 5%. De fato, não há na literatura validação de escores de CIVD em pacientes com plaquetopenia induzida pela quimioterapia. Nosso estudo tampouco tem objetivo nem condição de realizar qualquer proposta neste sentido.

A avaliação do teste de geração de trombina revelou um aumento do tempo para pico de trombina 48 horas após a febre e uma redução do índice de velocidade. Estes parâmetros estão mais relacionados às fases iniciais da coagulação. A lentificação das etapas de iniciação da coagulação foi um achado também descrito no estudo de tromboelastografia em pacientes com CIVD, e está de acordo com o único estudo já publicado sobre geração de trombina nestes pacientes, que será discutido a seguir. Por outro lado, a área sob a curva, que expressa o potencial de geração de trombina no plasma, não mostrou qualquer elevação nas primeiras 48 horas da sepse. Este achado contraria a premissa clássica que pacientes com CIVD apresentariam hipercoagulabilidade nestas fases. O achado de lentificação nas fases iniciais de ativação da coagulação na sepse, sem impacto na capacidade total de geração de trombina, é corroborado em nossa população pela correlação positiva entre os valores de escores de gravidade da sepse com o intervalo (lag) para início da geração de trombina, tanto no momento da febre quanto após 48 horas. O achado consistente desta correlação sugere que haja relevância biológica do aumento do tempo para pico de trombina e da redução do índice de velocidade observada ao longo das primeiras 48 horas da sepse em nosso estudo. Observamos ainda uma correlação negativa entre o SOFA após 48 horas e o pico de trombina na febre, contrariando indiretamente a hipótese da hipercoagulabilidade como aspecto fundamental da fisiopatogenia das complicações da sepse. A correlação negativa entre a área sob a curva de geração de trombina no momento da febre com os escores SOFA na febre e após 48 horas também contraria a hipótese da hipercoagulabilidade como elemento relevante da gravidade da sepse.

Curiosamente, a experiência com testes de geração de trombina na sepse é bem mais limitada do que com a tromboelastografia, restringindo-se conforme busca via Pubmed, na avaliação de Collins e colaboradores citada anteriormente. Estes autores avaliaram 38 pacientes com sepse comparando-os com 32 controles. Os pacientes foram avaliados quando já se encontravam internados em uma UTI. O principal achado do estudo foi a não identificação de sinais de hipercoagulabilidade nos pacientes.

O ETP, equivalente à área sob a curva de nosso estudo, foi semelhante entre pacientes e controles. O intervalo para início da geração de trombina encontrava-se prolongado, e o pico de trombina reduzido em pacientes com sepse. Uma limitação deste estudo é que as amostras foram coletadas em um único momento da evolução da sepse, o qual não é definido pelos autores. Considerando o caráter dinâmico da sepse, a avaliação conjunta de pacientes em momentos evolutivos distintos limita sobremaneira a validade das conclusões (Collins, Macchiavello et al., 2006).

A avaliação de parâmetros clássicos da hemostasia neste grupo de pacientes sugere que os mesmos encontravam-se em fase mais tardia da CIVD, na medida em que havia redução de fatores II, V, VII, X, XI, XII, PC e AT em relação aos controles. Não obstante, os resultados deste estudo são semelhantes aos apresentados por nós, na medida em que não demonstram a presença de hipercoagulabilidade como principal característica da hemostasia em pacientes com sepse. Nos últimos anos, a metodologia de análise da hemostasia pelo teste de geração de trombina vem sendo usada para refutar a presença de hipocoagulabilidade em pacientes com cirrose, e questionar o benefício do uso de plasma fresco congelado nestes pacientes (Tripodi, Chantarangkul et al.). Os resultados obtidos em pacientes com sepse até o momento sugerem que uma abordagem semelhante possa ser útil.

Do ponto de vista metodológico, o teste de geração de trombina ainda passa por uma fase de padronização e consolidação metodológica. É possível que só após esta padronização o teste seja incorporado definitivamente à prática clínica.

Muitas variáveis pré-analíticas e analíticas se mostraram críticas para os resultados do teste de geração de trombina. Há trabalhos que mostraram uma reprodutibilidade intra e inter-ensaio aceitável, com um coeficiente de variação inferior a 10% em amostras de plasma pobre em plaquetas (Hemker, Giesen et al., 2003). As principais variáveis pré-analíticas são a forma de coleta e o processamento da amostra.

Entre as variáveis analíticas destaca-se o tipo de ativador. Em relação à coleta, todos os cuidados normalmente observados na coleta de testes da hemostasia devem ser redobrados, na medida em que em testes potencialmente mais sensíveis, o impacto de problemas como coleta traumática pode ser ainda maior. De forma empírica, recomenda-se que não sejam usadas agulhas do tipo borboletas para a coleta. Outra discussão relevante diz respeito ao uso de corn trypsin inhibitor (CTI) no tubo de coleta.

O CTI inibe a ativação da fase de contato da coagulação. Sabe-se hoje que uma das maiores limitações do teste de geração de trombina é justamente a interferência pela ativação por contato, especialmente quando são utilizadas concentrações muito baixas de FT para a ativação do teste. Neste caso, a ativação pela via de contato pode superestimar os resultados, o que exigiria o uso do CTI nos tubos primários de coleta (Luddington e Baglin, 2004). A necessidade do uso deste reagente aumenta muito o custo do teste, e ainda não é aceita de forma consensual. O principal fabricante de reagentes para teste de geração de trombina (Thrombinoscope, Holanda) não recomenda seu uso, desde que a amostra não seja coletada por agulhas do tipo borboleta (Peter Giesen, comunicação pessoal). Em um futuro próximo, a ISTH deve publicar recomendações que padronizarão este uso. Em nosso estudo, o CTI não foi usado. É possível que isto influencie nossos resultados, embora as amostras não tenham sido coletadas de forma traumática. Por outro lado, o fato de todas as amostras terem sido processadas de forma homogênea, e de os resultados terem sido avaliados em relação ao tempo basal de cada paciente, limita o impacto desta variável.

Outra variável pré-analítica importante é o processamento da amostra. Uma das vantagens do uso da técnica fluorogênica do teste de geração de trombina é a possibilidade de uso de amostras de plasma pobre em plaquetas ou plasma rico em plaquetas. O substrato fluorogênico não sofre influência da turbidez do meio, a qual impede o uso de plasma rico em plaquetas em ensaios de geração de trombina com substratos cromogênicos. Além disso, os substratos mais modernos apresentam reatividade mesmo em baixas concentrações, o que elimina a necessidade de uso de altas doses de ativadores e de substrato. Isto torna o método menos artificial, ao menos do ponto de vista teórico. Quando plasma rico em plaquetas for usado, o processamento e a análise da amostra devem ser imediatos, na medida em que o congelamento destas amostras ser inviável. Em nosso estudo usamos o plasma pobre em plaquetas. Nossa decisão na verdade decorreu de

aspectos logísticos, já que necessitávamos realizar todos os testes em conjunto. Mas ela também se justifica do ponto de vista teórico, na medida em que em nossa população, a plaquetopenia é muito variável, e decorre de um elemento totalmente independente da CIVD que é a quimioterapia. Assim, o uso de amostras de PPP nos permite eliminar esta variável de confusão. O processamento ideal para amostras de PPP para testes de geração de trombina também é objeto de discussão, que deve ser padronizada com a publicação em breve das diretrizes da ISTH.

No momento do planejamento deste estudo, a necessidade de dupla centrifugação ainda não era consensual. Atualmente, isto é recomendado pela maioria dos autores, com o objetivo de reduzir a influência das plaquetas nas amostras congeladas e descongeladas.

Em tese, o processamento usado em nosso estudo poderia, pois, superestimar a geração de trombina, na medida em que plaquetas residuais podem ter permanecido em nossas amostras. Mais uma vez, acreditamos que o processamento homogêneo das amostras, e especialmente a análise dos resultados em comparação com os níveis basais da mesma população (cujas amostras foram processadas da mesma forma), limite o impacto desta variável em nossos resultados.

Em relação a variáveis analíticas, a forma de ativador e o método de leitura são os mais relevantes. Atualmente, há dois testes comerciais fluorogênicos validados em uso comercial: o CAT (Calibrated Automated Thrombin Generation, Thrombinoscope. B.V, Maastrich, Holanda) e o Tecnothrombin® TGA Assay (Technoclone, Viena, Áustria), este último usado em nosso estudo. Além disso, há um método cromogênico realizado na plataforma BCS XP (Siemens Healthcare, Marburg, Alemanha). Conforme já mencionado, o uso de substratos fluorogênicos de reatividade com baixas doses permite a mensuração contínua do sinal, não sofre influência da turbidez do meio (o que permite o uso de PRP) e permite a realização do teste com baixas doses de ativador e baixas concentrações de substrato.

Um estudo recente comparou o método cromogênico com o fluorogênico e mostrou que o primeiro apresentava coeficientes de variação inferiores ao segundo, com performance semelhante (Devreese, Wijns et al., 2007). No entanto, o método cromogênico exige concentrações muito elevadas de ativadores, o que pode comprometer, pelo menos

em teoria, a validade de seus resultados. Aliás, a concentração de ativador usada é outro fator crítico para os resultados. O teste de geração de trombina pode ser ativado por fosfolípidos ou por fator tissular. Além disso, a adição de proteínas como a trombomodulina ou ativadores da fibrinólise, permite a avaliação específica de outros aspectos da hemostasia. A concentração de FT utilizado como gatilho na reação influencia sua sensibilidade do teste para deficiência de fatores da coagulação individuais, sendo uma importante fonte de variação inter-laboratorial (Van Veen et al 2008). Em geral, se aceita que o uso de doses supra-fisiológicas de FT possa reduzir a sensibilidade dos testes. Em nosso estudo, o teste foi ativado com concentrações consideradas fisiológicas deste reagente.

Em conclusão, nossos resultados mostram que o potencial de geração de trombina está inalterado em pacientes com neutropenia febril e sepse, quando analisados no momento do primeiro pico febril e após 48 horas. A avaliação da geração de trombina nestes pacientes não confirma a presença de hipercoagulabilidade esperada a partir de ensaios in vitro e modelos teóricos da hemostasia na sepse. Estes dados preliminares estão de acordo com outros estudos que avaliaram a geração de trombina ou outros testes globais da hemostasia em pacientes com sepse. Além disso, parâmetros da geração de trombina não foram capazes de segregar pacientes quanto ao risco de evolução para choque séptico em nossa população. A presença de hipercoagulabilidade na sepse é tida como fator patogênico crítico e vem guiando uma série de estratégias terapêuticas, que até agora não se mostraram eficazes do ponto de vista clínico. A avaliação cuidadosa deste parâmetro em estudos maiores, com avaliação mais prolongada é importante para aprofundar o conhecimento sobre a relevância clínica há hemostasia na sepse.

***Conclusões***

## 6 CONCLUSÕES

---

- A avaliação de parâmetros clássicos da hemostasia nas primeiras 48 horas da sepse em pacientes onco-hematológicos com neutropenia febril mostra resultados compatíveis com a ativação da coagulação compensada, com aumento do fibrinogênio e dímeros D, e com baixa frequência de CIVD descompensada.
- A aplicação do escore de CIVD da ISTH em pacientes onco-hematológicos com neutropenia febril é limitada pela presença de plaquetopenia grave secundária à mielotoxicidade da quimioterapia.
- A avaliação da geração de trombina durante as primeiras 48 horas da sepse mostra potencial de geração de trombina inalterado em relação ao estado basal, sem sinais de hipercoagulabilidade. Além disso, observa-se redução na velocidade de início de geração de trombina.
- As correlações observadas em nosso estudo corroboram a ausência de hipercoagulabilidade mensurada através do teste de geração de trombina normal em pacientes com sepse.
- Nenhum dos parâmetros do teste de geração de trombina foi capaz de segregar pacientes com maior risco de evolução para choque séptico em nosso estudo. No entanto, o tamanho amostral em nosso estudo exige cautela na interpretação deste achado.
- Em conjunto, nossos resultados sugerem que novos estudos devem ser conduzidos a fim de confirmar a ausência de hipercoagulabilidade nas fases iniciais da sepse, a fim de propiciar um melhor entendimento da relevância da hemostasia na fisiopatogenia da sepse e de suas complicações.

*Referências  
Bibliográficas*

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abraham, E., K. Reinhart, *et al.* Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. Jama, v.290, n.2, Jul 9, p.238-47. 2003.

Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. Blood, v.101, n.10, May 15, p.3765-77. 2003.

Alves, B. E., S. A. Montalvao, *et al.* Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study. J Transl Med, v.9, p.23.

Angus, D. C., M. C. Birmingham, *et al.* E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. Jama, v.283, n.13, Apr 5, p.1723-30. 2000.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med, v.29, n.7, Jul, p.1303-10. 2001.

Bakhtiari, K., J. C. Meijers, *et al.* Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. Crit Care Med, v.32, n.12, Dec, p.2416-21. 2004.

Bernard, G. R., J. L. Vincent, *et al.* Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med, v.344, n.10, Mar 8, p.699-709. 2001.

Bick, R. L. Disseminated intravascular coagulation: objective clinical and laboratory diagnosis, treatment, and assessment of therapeutic response. Semin Thromb Hemost, v.22, n.1, p.69-88. 1996.

Bodey, G. P., M. Buckley, *et al.* Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. Ann Intern Med, v.64, n.2, Feb, p.328-40. 1966.

Boisclair, M. D., H. Ireland, *et al.* Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. Blood Rev, v.4, n.1, Mar, p.25-40. 1990.

Bone, R. C., R. A. Balk, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.

Brun-Buisson, C., Ed. The epidemiology of the systemic inflammatory response. Intensive Care Med, v.26 Suppl 1, p.S64-74, Intensive Care Med. 2000.

Carrie La Belle, C. S. K. Disseminated Intravascular Coagulation. In: Elsevier (Ed.). Consultative Hemostasis and Thrombosis, 2007. Disseminated Intravascular Coagulation, p.183-196

Chakraverty, R., S. Davidson, *et al.* The incidence and cause of coagulopathies in an intensive care population. Br J Haematol, v.93, n.2, May, p.460-3. 1996.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.885-91. 2002.

Collins, P. W., L. I. Macchiavello, *et al.* Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. Br J Haematol, v.135, n.2, Oct, p.220-7. 2006.

Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature, v.407, n.6801, Sep 14, p.258-64. 2000.

Creasey, A. A., A. C. Chang, *et al.* Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. J Clin Invest, v.91, n.6, Jun, p.2850-60. 1993.

Dargaud, Y., S. Beguin, *et al.* Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. Thromb Haemost, v.93, n.3, Mar, p.475-80. 2005.

Daudel, F., U. Kessler, *et al.* Thromboelastometry for the assessment of coagulation abnormalities in early and established adult sepsis: a prospective cohort study. Crit Care, v.13, n.2, p.R42. 2009.

De Jonge, E., P. E. Dekkers, *et al.* Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. Blood, v.95, n.4, Feb 15, p.1124-9. 2000.

Dempfle, C. E. The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state. Thromb Haemost, v.82, n.2, Aug, p.673-83. 1999.

Devreese, K., W. Wijns, *et al.* Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. Thromb Haemost, v.98, n.3, Sep, p.600-13. 2007.

Dhainaut, J. F., S. B. Yan, *et al.* Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. J Thromb Haemost, v.2, n.11, Nov, p.1924-33. 2004.

Eichinger, S., G. Hron, *et al.* Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. Clin Chem, v.54, n.12, Dec, p.2042-8. 2008.

Esmon, C. T. The regulation of natural anticoagulant pathways. Science, v.235, n.4794, Mar 13, p.1348-52. 1987.

Esmon C.T Role of coagulation inhibitors in inflammation. Thromb Haemost, v.86, n.1, Jul, p.51-6. 2001.

Faust, S. N., M. Levin, *et al.* Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. N Engl J Med, v.345, n.6, Aug 9, p.408-16. 2001.

Favaloro, E. J. Laboratory testing in disseminated intravascular coagulation. Semin Thromb Hemost, v.36, n.4, Jun, p.458-67. 2010.

Gando, S., S. Nanzaki, *et al.* Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost, v.79, n.6, Jun, p.1111-5. 1998.

Garcia De Frutos, P., R. I. Alim, *et al.* Differential regulation of alpha and beta chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. Blood, v.84, n.3, Aug 1, p.815-22. 1994.

Hemker, H. C., P. Giesen, *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb, v.33, n.1, p.4-15. 2003.

Hemker, H. C., G. M. Willems, *et al.* A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. Thromb Haemost, v.56, n.1, Aug 20, p.9-17. 1986.

Hoffman, M. e D. M. Monroe, 3rd. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost, v.85, n.6, Jun, p.958-65. 2001.

Kienast, J., M. Juers, *et al.* Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation. J Thromb Haemost, v.4, n.1, Jan, p.90-7. 2006.

Klastersky, J., L. Ameye, *et al.* Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. Int J Antimicrob Agents, v.30 Suppl 1, Nov, p.S51-9. 2007.

Kobayashi, M., K. Shimada, *et al.* Human recombinant interleukin-1 beta- and tumor necrosis factor alpha-mediated suppression of heparin-like compounds on cultured porcine aortic endothelial cells. J Cell Physiol, v.144, n.3, Sep, p.383-90. 1990.

Lee, J. H. e J. Song. Diagnosis of non-overt disseminated intravascular coagulation made according to the International Society on Thrombosis and Hemostasis criteria with some modifications. Korean J Hematol, v.45, n.4, Dec, p.260-3.

Levi, M. Disseminated intravascular coagulation. Crit Care Med, v.35, n.9, Sep, p.2191-5. 2007.

The coagulant response in sepsis and inflammation. Hamostaseologie, v.30, n.1, Jan, p.10-2, 14-6. 2010.

Levi, M. e S. M. Opal. Coagulation abnormalities in critically ill patients. Crit Care, v.10, n.4, p.222. 2006.

Levi, M. e H. Ten Cate. Disseminated intravascular coagulation. N Engl J Med, v.341, n.8, Aug 19, p.586-92. 1999.

Levi, M., H. Ten Cate, *et al.* Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. Jama, v.270, n.8, Aug 25, p.975-9. 1993.

Levi, M. e T. Van Der Poll. Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. Crit Care, v.11 Suppl 5, p.S3. 2007.

Levi, M., T. Van Der Poll, *et al.* Bidirectional relation between inflammation and coagulation. Circulation, v.109, n.22, Jun 8, p.2698-704. 2004.

Levrat, A., A. Gros, *et al.* Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. Br J Anaesth, v.100, n.6, Jun, p.792-7. 2008.

Lowenberg, E. C., J. C. Meijers, *et al.* Platelet-vessel wall interaction in health and disease. Neth J Med, v.68, n.6, Jun, p.242-51.

Luddington, R. e T. Baglin. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. J Thromb Haemost, v.2, n.11, Nov, p.1954-9. 2004.

Macfarlane, R. G. e R. Biggs. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. J Clin Pathol, v.6, n.1, Feb, p.3-8. 1953.

Macleod, J. B., M. Lynn, *et al.* Early coagulopathy predicts mortality in trauma. J Trauma, v.55, n.1, Jul, p.39-44. 2003.

Marshall, J. C. e K. Reinhart. Biomarkers of sepsis. Crit Care Med, v.37, n.7, Jul, p.2290-8. 2009.

Mccarron, B. I., V. J. Marder, *et al.* A soluble fibrin standard: comparable dose-response with immunologic and functional assays. Thromb Haemost, v.82, n.1, Jul, p.145-8. 1999.

Moopanar, D., S. Naidu, *et al.* Thromboelastography in abruptio placentae. J Obstet Gynaecol, v.17, n.3, May, p.229-33. 1997.

Morrison, V. A. An overview of the management of infection and febrile neutropenia in patients with cancer. Support Cancer Ther, v.2, n.2, Jan 1, p.88-94. 2005.

Nawroth, P. P. e D. M. Stern. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med, v.163, n.3, Mar 1, p.740-5. 1986.

O'brien, J. M., Jr., N. A. Ali, *et al.* Sepsis. Am J Med, v.120, n.12, Dec, p.1012-22. 2007.

Opal, S. M. e C. T. Esmon. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. Crit Care, v.7, n.1, Feb, p.23-38. 2003.

Osterud, B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. Blood Coagul Fibrinolysis, v.9 Suppl 1, Mar, p.S9-14. 1998.

Osterud, B. e T. Flaegstad. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. Thromb Haemost, v.49, n.1, Feb 28, p.5-7. 1983.

Pawlinski, R. e N. Mackman. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. Thromb Res, v.125 Suppl 1, Apr, p.S70-3. 2010.

Pizzo, P. A. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. N Engl J Med, v.328, n.18, May 6, p.1323-32. 1993.

Remick, D. G. Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol, v.170, n.5, May, p.1435-44. 2007.

Rugeri, L., A. Levrat, *et al.* Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. J Thromb Haemost, v.5, n.2, Feb, p.289-95. 2007.

Sackett, D. L. e R. B. Haynes. The architecture of diagnostic research. Bmj, v.324, n.7336, Mar 2, p.539-41. 2002.

Seo, J. W., H. K. Kim, *et al.* Prognostic values of the factor Xa-activated clotting time and endogenous thrombin potential in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. Thromb Res, v.123, n.4, Feb, p.565-72. 2009.

Sharma, P. e R. Saxena. A novel thromboelastographic score to identify overt disseminated intravascular coagulation resulting in a hypocoagulable state. Am J Clin Pathol, v.134, n.1, Jul, p.97-102.

\_\_\_\_\_. A novel thromboelastographic score to identify overt disseminated intravascular coagulation resulting in a hypocoagulable state. Am J Clin Pathol, v.134, n.1, Jul, p.97-102. 2010.

Shorr, A. F., S. J. Thomas, *et al.* D-dimer correlates with proinflammatory cytokine levels and outcomes in critically ill patients. Chest, v.121, n.4, Apr, p.1262-8. 2002.

Silva, E., A. Pedro Mde, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.

Sorensen, B., P. Johansen, *et al.* Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. J Thromb Haemost, v.1, n.3, Mar, p.551-8. 2003.

Sun, W. Y., D. P. Witte, *et al.* Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.13, Jun 23, p.7597-602. 1998.

Takemitsu, T., H. Wada, *et al.* Prospective evaluation of three different diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost, v.105, n.1, Jan, p.40-4. 2011.

Taylor, F. B., Jr., C. H. Toh, *et al.* Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost, v.86, n.5, Nov, p.1327-30. 2001.

Tripodi, A., V. Chantarangkul, *et al.* Thrombin generation in plasma from patients with cirrhosis supplemented with normal plasma: considerations on the efficacy of treatment with fresh-frozen plasma. Intern Emerg Med, Feb 5.

Van Veen, J. J., A. Gatt, *et al.* Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? Br J Haematol, v.142, n.6, Sep, p.889-903. 2008.

Vanderschueren, S., A. De Weerd, *et al.* Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. Crit Care Med, v.28, n.6, Jun, p.1871-6. 2000.

Vervloet, M. G., L. G. Thijs, *et al.* Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. Semin Thromb Hemost, v.24, n.1, p.33-44. 1998.

Vincent, J. L., R. Moreno, *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med, v.22, n.7, Jul, p.707-10. 1996.

Williams, M. D., L. A. Braun, *et al.* Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. Crit Care, v.8, n.5, Oct, p.R291-8. 2004.

