



FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

**“AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA PRIMÁRIA, COAGULAÇÃO
E FIBRINÓLISE EM PACIENTES COM COMPLICAÇÕES
HEMORRÁGICAS DA DENGUE”**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

**“AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA PRIMÁRIA, COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE
EM PACIENTES COM COMPLICAÇÕES HEMORRÁGICAS DA DENGUE”**

Orientadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Dissertação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI E ORIENTADA PELA PROF^ª. DR^ª. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Or81a Orsi, Fernanda Loureiro de Andrade, 1975-
Avaliação da hemostasia primária, coagulação e fibrinólise em pacientes com complicações hemorrágicas da dengue / Fernanda Loureiro de Andrade Orsi. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Coorientador: Rodrigo Nogueira Angerami.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dengue. 2. Infecção. 3. Hemorragia. 4. Fibrinólise. 5. Transtornos da coagulação sanguínea. I. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. II. Angerami, Rodrigo Nogueira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evalution of primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis in patients with dengue and bleeding complications

Palavras-chave em inglês:

Dengue
Infections
Hemorrhage
Fibrinolysis
Blood coagulation disorders

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino-Bizzacchi [Orientador]
Raquel Silveira Bello Stucchi
Fabíola Traina
Daniel Dias Ribeiro
Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Data de defesa: 26-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

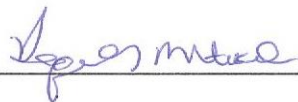
Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

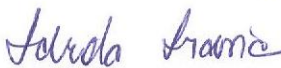
1. PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI



2. PROF(A). DR(A). RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI



3. PROF(A). DR(A). FABÍOLA TRAINA



4. PROF(A).DR(A). DANIEL DIAS RIBEIRO



5. PROF(A).DR(A). BENEDITO ANTÔNIO LOPES DA FONSECA



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

Data: 26 de julho de 2013

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, através do
processo 2008/11518-2 de auxílio à pesquisa.

Responsável: Profa. Dra. Joyce Annichino-Bizzacchi

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer imensamente a Dra. Joyce Annichino-Bizzacchi por ter proporcionado suporte irrestrito para o desenvolvimento deste trabalho, por ter me aceitado como aluna e ter me orientado na vida acadêmica, dando-me condições de aprender e desenvolver o raciocínio científico. Por ter ficado feliz por mim nos bons momentos e por ter me dado apoio em momentos difíceis. Por permitir que eu trabalhe ao seu lado e que siga seus exemplos invejáveis de conduta pessoal e profissional, e por fim por me estimular a seguir meu próprio caminho. Muito obrigada.

Obrigada também ao Prof. Dr. Rodrigo Angerami, meu colega de turma, pelas orientações durante todo o decorrer do trabalho e pelos ensinamentos a respeito da dengue.

Ao Prof. Dr. Erich de Paula, também meu colega, por toda ajuda, principalmente na análise dos resultados e correção dos artigos.

Aos Prof.(s) Dr.(s) Benedito Antônio L. da Fonseca, Daniel Dias Ribeiro, Fabíola Traina, Raquel Silveira B. Stucchi e Simone Gilli pelas importantes considerações durante o exame de qualificação e a defesa da tese.

Às alunas Susan Quaino, Bruna Mazzeto e Fernanda Bassora pela ajuda no recrutamento dos pacientes e realização de alguns testes laboratoriais. Principalmente à Bruna, pela ajuda imensa principalmente nos períodos críticos.

Ao Dr. André Ribas Freitas, coordenador do Programa de Dengue da Prefeitura de Campinas à época do estudo, que me pôs em contato com as equipes de saúde dos hospitais e UBS participantes.

À equipe profissional do Hospital das Clínicas da UNICAMP, do Hospital Geral de Ipanema, do Hospital Madre Teodora de Campinas, das UBS Jardim Conceição e Jardim Boa Esperança pelo auxílio no recrutamento dos participantes do estudo. Sem a participação destas equipes, a inclusão dos pacientes não teria sido possível.

Ao Dr. Vagner de Castro pela ajuda na seleção dos pacientes.

À bióloga Mônica, responsável pelo laboratório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP e à bióloga Fernanda do laboratório de Imunohematologia do Hemocentro pelos hemogramas e tipagens sanguíneas.

Aos funcionários do laboratório de Hemostasia pelo apoio diário: Devanira, Ucha, Cristina, Ricardo, Silmara e Tânia.

Aos funcionários do setor de estatística da FCM/UNICAMP pelas análises e pelos ensinamentos.

Às pessoas que participaram como pacientes ou controles deste estudo, minha sincera gratidão.

Gostaria de agradecer também a FAPESP pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a minha família. Pai, mãe e irmãos pelo carinho ímpar. Artur, meu marido, Tutu e Rafaela, meus filhos, obrigada pelo amor que despertam em mim e que me faz diariamente uma pessoa melhor. Vocês fazem tudo ter sentido.



Retrato de Manuel Godoy, Duque de Alcudia, Príncipe da Paz”, 1801 – Francisco de Goya
Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, Madrid, Espanha

“Yo estoy mejor, pues ha sido el resfriado de moda, que llaman dengue, y desde ayer tengo algo de sangre, que es lo que me trae asi incomodada...”

“Estou melhor, trata-se do resfriado da moda, que chamam de dengue, e desde ontem tive algum sangue, que é o que está me incomodando...”

Carta da Rainha Maria Luísa de Espanha para o Duque Manuel Godoy
12 de junho de 1801

RESUMO

Os casos de dengue são classificados em dengue clássica (DC) e febre hemorrágica da dengue (FHD). Embora a DC seja considerada uma manifestação não grave da dengue, algumas complicações clínicas podem ser encontradas neste grupo, em particular as complicações hemorrágicas. Entretanto, as causas de sangramentos na DC não estão esclarecidas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação abrangente dos possíveis mecanismos fisiopatológicos que podem contribuir para a tendência hemorrágica da dengue. Este é um estudo de caso-controle que incluiu adultos com dengue durante o período de defervescência da doença e controles saudáveis. Foram avaliadas as células do sangue periférico, os marcadores da resposta inflamatória, da permeabilidade microvascular, da ativação de células endoteliais e da fibrinólise e a geração de trombina nos pacientes e controles. Foram incluídos 26 adultos com DC e sangramento, 33 adultos com DC sem complicações, 8 adultos com FHD e 67 controles saudáveis. A gravidade e extensão dos sangramentos foram semelhantes entre os pacientes classificados como DC e os classificados como FHD. Pacientes com DC com sangramento e FHD tinham menor contagem de plaquetas em comparação aos com DC sem sangramento. Fator de necrose tumoral (TNF- α), trombomodulina (TM) e fator de von Willebrand (FVW) estavam aumentados nos grupos de dengue em relação aos controles. A atividade e antígeno da ADAMTS 13 estavam diminuídos, em particular nos pacientes com DC não complicada. Houve tendência ao aumento do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A) apenas nos pacientes com FHD, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Houve, porém, alterações significativas dos receptores solúveis do VEGF-A (sVEGF-R1 e sVEGF-R2). Os níveis plasmáticos do sVEGF-R1 estavam aumentados e de sVEGF-R2 estavam diminuídos nos pacientes, principalmente nos com FHD. A relação VEGF-A/VEGF-R2 estava significativamente elevada nos casos de FHD em relação aos controles e aos outros grupos de dengue. Os níveis plasmáticos do ativador tecidual do plasminogênio (tPA) e dímero-D (DD) estavam significativamente elevados em

pacientes com DC e sangramento e nos com FHD; sendo que os níveis séricos de PAI-1 não diferiram entre os grupos. Os pacientes com DC com sangramento e FHD apresentaram também menor geração de trombina. Estes resultados permitem concluir que a DC pode manifestar-se com hemorragias espontâneas associadas a diversos distúrbios da hemostasia, na ausência de sinais clínicos ou laboratoriais de aumento da permeabilidade vascular. Os principais distúrbios da hemostasia encontrados foram trombocitopenia, hiperfibrinólise e hipocoagulabilidade. Desta forma, a DC compreende um grupo heterogêneo de doentes que podem apresentar uma coagulopatia complexa e potencialmente grave.

ABSTRACT

Dengue has been classified according to disease severity into dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). Although DF is considered a non-severe manifestation of dengue, it represents a heterogeneous group of patients with varied clinical complications, particularly, bleeding complications. However, the causes of bleedings in DF have not been fully addressed. Thus, the aim of this study was to perform a comprehensive evaluation of possible pathophysiological mechanisms that could contribute to the bleeding tendency in DF and DHF. This is a case-control study that enrolled adults with DF without bleeding, DF and bleeding complications and DHF during the defervescence period. Healthy controls were also included. Peripheral blood counts, inflammatory, microvascular permeability, fibrinolysis, endothelial cell activation markers, and thrombin generation were evaluated in patients and controls. We included 26 adults with DF and bleeding, 33 adults with DF without complications, 8 adults with DHF and 67 healthy controls. The severities of the bleeding episodes were similar between patients with DC and DHF. Patients with DF with bleedings and DHF had lower platelet counts than DF without bleeding. Levels of the tumoral necrosis factor (TNF)- α , thrombomodulin (TM) and von Willebrand factor (VWF) were significantly increased in dengue groups than in healthy controls, but similar among patients. Plasma levels of the soluble receptor 1 of the vascular endothelial growth factor (sVEGR-R1) were increased and plasma levels of sVEGF-R2 were decreased in patients with DF and bleedings and in patients with DHF. In DHF patients presented a non-significant increased in vascular endothelial growth factor (VEGF-A) serum levels and a significantly higher VEGF/sVEGF-R2 ratio. Plasma levels of tissue plasminogen activator (tPA) and D-dimer (DD) were significantly increased in patients with bleedings, regardless of the dengue classification, while PAI-1 was similar between groups. Patients with DHF and DF with bleeding complications had reduced thrombin formation. In conclusion, DF can manifest with spontaneous bleedings without clinical and laboratory signs of increased vascular permeability. Spontaneous bleeding were associated with thrombocytopenia, excessive

fibrinolysis and reduced thrombin in both DF with bleeding and DHF groups. These coagulopathies were not significantly present in DF without bleeding. DF is a heterogeneous group of patients that may present with a complex and potentially severe coagulation disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

α AP= α 2–antiplasmina

ADAMTS 13= *A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats*

DC=dengue clássica

DD= dímeros D

DENV=dengue vírus

DF= *dengue fever*

DHF= *dengue hemorrhagic fever*

ELISA= *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio enzimático de imunoabsorbância)

EPCR= *endothelial protein C receptor* (*receptor endotelial da proteína C*)

FHD= febre hemorrágica da dengue

FT= fator tecidual

FVW= fator de von Willebrand

GB= glóbulo branco

HB= hemoglobina

HT= hematócrito

IFN = interferon

IFN- γ = interferon-gama

IgG= imunoglobulina G

IgM= imunoglobulina M

IL = interleucina

mL=mililitros

mm³=milímetros cúbicos

mmHg= milímetros de mercúrio

ng=nanogramas

OMS= Organização Mundial da Saúde

PAI-1= *plasminogen activator inhibitor* (inibidor do ativador do plasminogênio)

PCA= proteína C ativada

PCR= *polimerase chain reaction* (reação de cadeia de polimerase)

pg=picogramas

PTT= púrpura trombocitopênica trombótica

RJ= Rio de Janeiro

s=segundos

SINAN= Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP = São Paulo

sVEGF-R1= *soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*(receptor solúvel 1 do fator de crescimento do endotélio vascular)

sVEGF-R2= *soluble vascular endothelial growth factor receptor 2* (receptor solúvel 2 do fator de crescimento do endotélio vascular)

TAFI = *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina)

TGT= teste de geração de trombina

TM= trombomodulina

TNF = *tumoral necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TP= tempo de protrombina

tPA= *tissue plasminogen activator* (ativador do plasminogênio tecidual)

TTPa= tempo de tromboplastina parcial ativado

uL= microlitros

VEGF= *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento do endotélio vascular)

VWF= *von Willebrand factor*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos dos pacientes e controles. Esta tabela mostra a distribuição de gênero, idade, etnia e tipagem ABO dos pacientes e controles saudáveis.	83
Tabela 2: Apresentação clínica dos pacientes. Abaixo nesta tabela segue a relação de dias de doença e sintomas apresentados pelos pacientes à época da inclusão no estudo.	84
Tabela 3: Valores do hemograma dos pacientes. Esta tabela apresenta as contagens sanguíneas dos pacientes. Como foram coletados hemogramas seriados, os valores aqui representados são do maior hematócrito e da menor plaqueta obtida durante a fase de defervescência.	85
Tabela 4: Resumos das variáveis estudadas, os resultados estão expressos em mediana e percentis 25 e 75. No destaque em negrito estão as variáveis cujos resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey.	93
Tabela 5: Resumos dos valores obtidos com o TGT, os resultados estão expressos em mediana e percentis 25 e 75. No destaque em negrito estão as variáveis cujos resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey.	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição mundial da dengue e distribuição das áreas de risco. A figura destaca em vermelho as regiões onde a dengue é endêmica, nota-se que as regiões tropicais e subtropicais do planeta são as mais atingidas pela doença. Ilustração retirada da publicação: Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *World Health Organization*; Geneve; 2009..... 46
- Figura 2:** Casos de dengue oficialmente notificados no Brasil entre os anos de 2001 e 2011. Esta figura ilustra os casos notificados e a porcentagem de casos complicados de dengue no Brasil entre 2001-2011. Observa-se que houve tendência ao aumento de casos graves nas epidemias que ocorreram entre 2002 e 2008, com um pico histórico de ocorrência de casos graves em 2008. Esta tendência porém não se confirmou nas epidemias subsequentes. Os sorotipos virais circulantes mais frequentes foram o DENV-3 em 2002, o DENV-2 em 2008 e o DENV-1 em 2010. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, Ministério da Saúde; 2012..... 47
- Figura 3:** Evolução clínica clássica da dengue clássica e da febre hemorrágica da dengue. Observa-se que a dengue inicia-se como uma doença febril cuja febre durante em torno de 5 dias. Quando começa haver diminuição da amplitude da febre, chamada fase de defervescência, a maioria dos pacientes evolui para remissão clínica da doença, esta evolução clínica caracteriza a dengue clássica. Uma parcela dos pacientes apresenta porém piora clínica após a defervescência, apresentando quadro compatível com aumento da permeabilidade vascular e tendência hemorrágica, caracterizando assim a febre hemorrágica da dengue. O período de defervescência também é denominado período crítico e dura em torno de 48 horas. 49
- Figura 4:** Modelo da fisiopatologia da FHD. Esta figura ilustra o fenômeno da intensificação da resposta imunológica mediada pelo anticorpo..... 52

Figura 5: Modelo celular da cascata da coagulação. O FT expresso pelas células endoteliais promove a ativação de pequenas quantidades de trombina (FIIa). A trombina gerada induz a ativação de fatores de coagulação (FXI, FVIII e FV) que então promovem, na superfície das plaquetas, a ativação em cascata dos FIX, FX e de quantidades maiores de trombina. Grandes quantidades de trombina fazem a conversão do fibrinogênio em fibrina e a consolidação do coágulo plaquetário.... 56

Figura 6: Inativação dos fatores V e VIII pelos dos anticoagulantes naturais (proteína C e S). A trombina gerada também auxilia no processo de controle da formação do coágulo através a ativação dos anticoagulantes naturais. A ligação da trombina com a TM, promove a ativação da PC da coagulação. A PCA e a PS causam a inativação dos FV e FVIII, e assim interrompem o processo de geração da trombina. 57

Figura 7: Mecanismos da fibrinólise. As células endoteliais secretam o tPA que promove a conversão do plasminogênio em plasmina. A plasmina degrada a fibrina em PDF e DD. Participam da inibição da fibrinólise o PAI-1 e a alpha-2 antiplasmina. 58

Figura 8: Padrão de curva representativa dos resultados gerados pelo TGT. *Lag phase* (LP) é o tempo até o início da formação da trombina; pico de trombina é a concentração máxima de trombina gerada, e a área abaixo da curva (AUC- *area under curve*) que traduz a concentração total de trombina gerada. 77

Figura 9: Fluxograma de seleção e inclusão dos pacientes. Figura 8a ilustra a seleção dos pacientes com DC e a Figura 8b ilustra a seleção dos pacientes hospitalizados por complicações da dengue. 82

Figura 10: Inflamação e ativação das células endoteliais: Esta figura ilustra a ativação da resposta inflamatória e das células endoteliais nos pacientes com dengue. Os níveis circulantes dos marcadores inflamatórios e da ativação endotelial foram similares entre os 3 grupos da dengue. a. TNF- α , b. TM plasmática. c. FWV antígeno. CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey. 87

Figura 11: Balanço entre as atividades do FVW e da ADAMTS 13, avaliadas pela ligação ao colágeno (CBA). A figura ilustra o aumento da atividade do FVW acompanhada da queda da atividade da ADAMTS 13 nos pacientes em relação aos controles. Embora estatisticamente houvesse diferença de atividade da ADAMTS 13 entre os grupos, o teste de Tukey evidenciou que estas diferenças estavam significativas principalmente no grupo de DC.	88
Figura 12: Marcadores da permeabilidade microvascular. A Figura 12a ilustra o aumento dos níveis circulantes de sVEGF-R1 na dengue, estatisticamente a diferença dos níveis de sVEGF-R1 estava presente nos 3 grupos de dengue em relação aos controles saudáveis. A Figura 12b ilustra a diminuição dos níveis circulantes de sVEGF-R2 nos pacientes com complicações hemorrágicas (DC e FHD) em relação aos pacientes sem sangramentos e aos controles saudáveis. Ambas as Figuras (12a e 12b) ilustram a tendência ao aumento dos valores de VEGF-A plasmáticos e sua relação com os receptores solúveis. A Figura 12 c ilustra a razão VEGF-A/sVEGF-R2, que está significativamente aumentada no grupo com FHD. * Locais de diferença pelo teste de Tukey.....	89
Figura 13: Resultados do teste de geração de trombina. A figura ilustra os resultados da geração de trombina nos pacientes com dengue e controles. Observa-se que os parâmetros referentes a concentração de trombina gerada estão significativamente diminuídos nos grupos de DC com sangramentos e FHD, em relação aos controles.a. Lag-phase; b. índice de velocidade; c. Pico máximo de trombina gerada; d. área sobre a curva. CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey.....	90
Figura 14: Marcadores de fibrinólise. Esta figura ilustra a tendência a fibrinólise nos grupos de DC com sangramento e FHD. a. tPA b. DD CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey.	91
Figura 15: Esta figura ilustra os resultados encontrados pela análise laboratorial de inflamação, hemostasia e permeabilidade vascular dos pacientes com dengue.	94

Figura 16: Correlação entre a contagem plaquetária e os marcadores de ativação endotelial, permeabilidade microvascular e fibrinólise. a. Correlação inversa com níveis de TM; b. correlação inversa com FVW; c. correlação inversa com sVEGF-R1; d. correlação inversa com sVEGF-R2; e. correlação inversa com tPA plasmático; f. Correlação inversa com DD plasmático. 96

SUMÁRIO

1. Introdução	43
1.1. Aspectos gerais da dengue.....	45
1.2. Curso clínico da dengue	47
1.3. Classificação tradicional da dengue.....	49
1.4. Fisiopatologia da dengue e da febre hemorrágica	50
1.5. Marcadores da ativação das células endoteliais	52
1.6. Permeabilidade microvascular	53
1.7. Mecanismos de coagulação e fibrinólise.....	55
2. Justificativas.....	61
3. Objetivos	65
4. Materiais e métodos	69
4.1. Desenho do estudo e seleção dos pacientes.....	71
4.2. Procedimentos laboratoriais.....	74
4.3. Análise estatística	77
5. Resultados	79
5.1. Obtenção dos sujeitos do estudo	81
5.2. Dados demográficos e clínicos	82
5.4. Resultados dos marcadores inflamatórios e da ativação endotelial.....	86
5.5. Resultados dos marcadores de permeabilidade microvascular	88
5.6. Resultados do teste de geração de trombina (TGT)	89
5.7. Resultados dos marcadores de fibrinólise	91
5.8. Resumo dos resultados das variáveis analisadas	91
5.9. Análise de correlação, regressão logística e curva ROC	95
6. Discussão.....	97
7. Considerações finais.....	107
8. Conclusões	111
9. Referências.....	115
10. Anexos.....	125
10.1. Anexo I – Termos de consentimento.....	127
10.2. Anexo II – Questionário padrão dos pacientes	130

10.3. Anexo III – Publicações e apresentações em congressos	131
10.4. Anexo IV – Artigo publicado no BMC Infectious Diseases	93

1.Introdução

1.1. Aspectos gerais da dengue

A dengue é uma arbovirose transmitida por uma espécie tropical e subtropical de mosquito, do gênero *Aedes*, especialmente pelo *Aedes aegypti*. O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, sendo descritos quatro sorotipos distintos: dengue vírus (DENV)-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 [1].

As epidemias de dengue têm enorme impacto epidemiológico e econômico principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, como América Latina, África, Índia e Sudeste Asiático. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 2,5 bilhões de indivíduos vivam em áreas endêmicas. São reportados aproximadamente 50 milhões de casos anualmente, sendo 1% de casos complicados e 0,4% de casos fatais (Figura 1). As complicações mais importantes da dengue são sangramento, aumento da permeabilidade vascular e choque [2].

No Brasil, a dengue é um problema de saúde pública com registros anuais de epidemias. Entre 2001 e 2011, foram 5 milhões de casos confirmados e notificados da doença e em média 1,2% de casos complicados ao ano [3]. Particularmente, o surto ocorrido no ano de 2008 foi atípico, por apresentar um número acima da média histórica de casos complicados e graves (Figura 2): 3,5% de casos complicados e 0,7% de casos de febre hemorrágica da dengue (FHD). Porém a tendência para o aumento da gravidade da doença, observada em 2008, não se confirmou nos anos seguintes [3].



Figura 1: Distribuição mundial da dengue e distribuição das áreas de risco. A figura destaca em vermelho as regiões onde a dengue é endêmica, nota-se que as regiões tropicais e subtropicais do planeta são as mais atingidas pela doença. Ilustração retirada da publicação: Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *World Health Organization*; Geneve; 2009

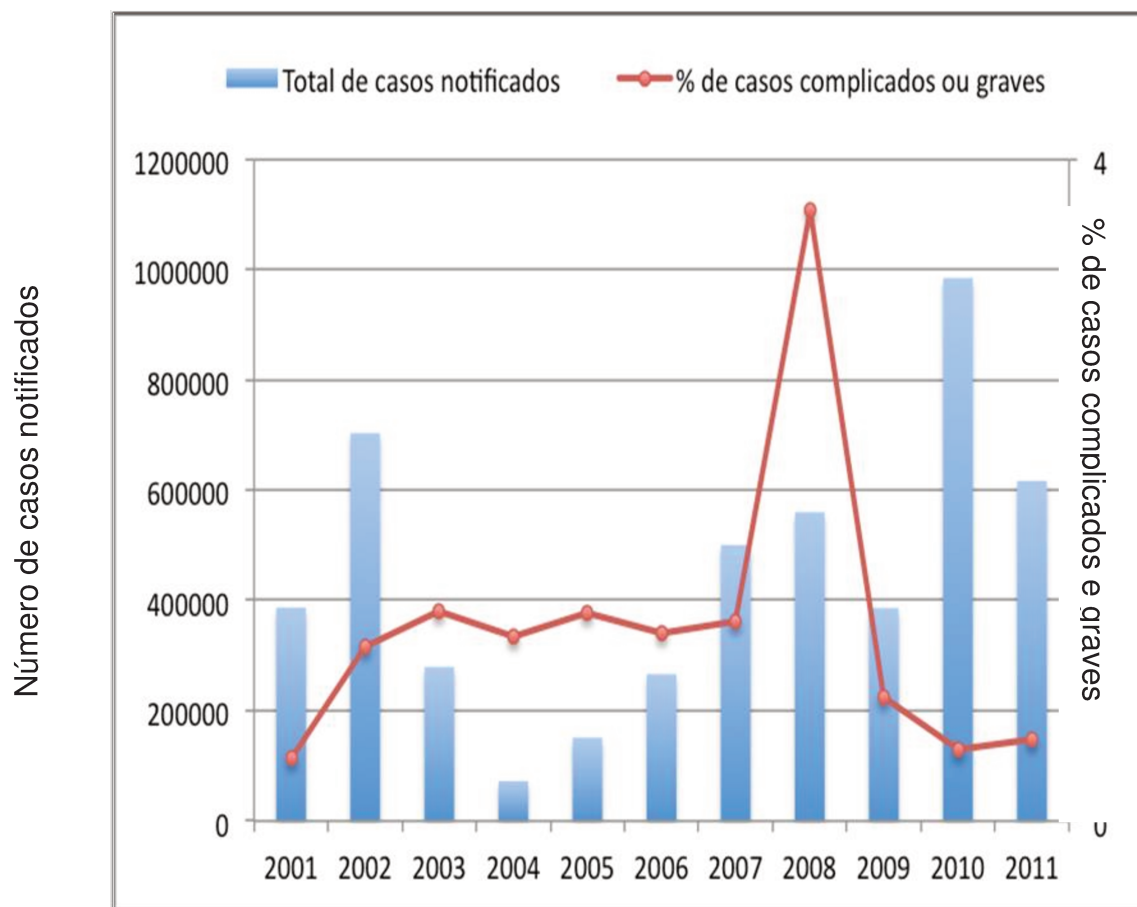


Figura 2: Casos de dengue oficialmente notificados no Brasil entre os anos de 2001 e 2011. Esta figura ilustra os casos notificados e a porcentagem de casos complicados de dengue no Brasil entre 2001-2011. Observa-se que houve tendência ao aumento de casos graves nas epidemias que ocorreram entre 2002 e 2008, com um pico histórico de ocorrência de casos graves em 2008. Esta tendência porém não se confirmou nas epidemias subsequentes. Os sorotipos virais circulantes mais frequentes foram o DENV-3 em 2002, o DENV-2 em 2008 e o DENV-1 em 2010. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, Ministério da Saúde; 2012

1.2. Curso clínico da dengue

Na maioria dos casos, a dengue se apresenta como uma doença febril auto-limitada e com evolução clínica benigna, cujos sintomas perduram em média

por 7 dias [4]. Entretanto, um número pequeno de pacientes infectados pode desenvolver formas graves e potencialmente fatais da dengue [5].

Clinicamente, a dengue manifesta-se nos primeiros dias por febre alta e persistente, acompanhada de outros sintomas como cefaléia, mialgia, dor retroorbitária, exantema cutâneo, náuseas, vômitos e dores abdominais. Essa fase febril dura em torno de cinco dias e é sucedida por um período de defervescência. A defervescência também é conhecida como período crítico da dengue porque é a fase da doença em que há maior probabilidade de ocorrer complicações graves. Durante a fase de defervescência, ou período crítico, a maioria dos pacientes inicia o processo de recuperação da doença, com melhora progressiva do quadro clínico. Porém, alguns pacientes podem, ao contrário, desenvolver sinais de piora clínica. Essa piora ocorre principalmente pelo aumento transitório da permeabilidade vascular, resultando em extravasamento de proteínas plasmáticas para a pleura ou cavidade abdominal, hemoconcentração e sangramentos. Alguns casos graves de extravasamento plasmático podem evoluir para choque hemodinâmico e óbito. Esta fase crítica da dengue dura em torno de 48 horas e é seguida pelo período de convalescença [6].

Laboratorialmente, o declínio no número de plaquetas é uma alteração comum no hemograma dos pacientes com dengue. Observa-se o declínio progressivo da contagem plaquetária já na fase febril, sendo o nadir na época da defervescência. Pacientes que evoluem sem complicações, terão as contagens plaquetárias normalizadas e não sofrerão alterações do hematócrito (HT). Por outro lado, pacientes que evoluem com aumento da permeabilidade vascular poderão apresentar tendência a queda abrupta das plaquetas e aumento do HT. As contagens leucocitárias, durante toda a infecção pela dengue, poderão estar discretamente diminuídas [6, 7]. A Figura 3 ilustra a evolução clínica da dengue clássica e da FHD.

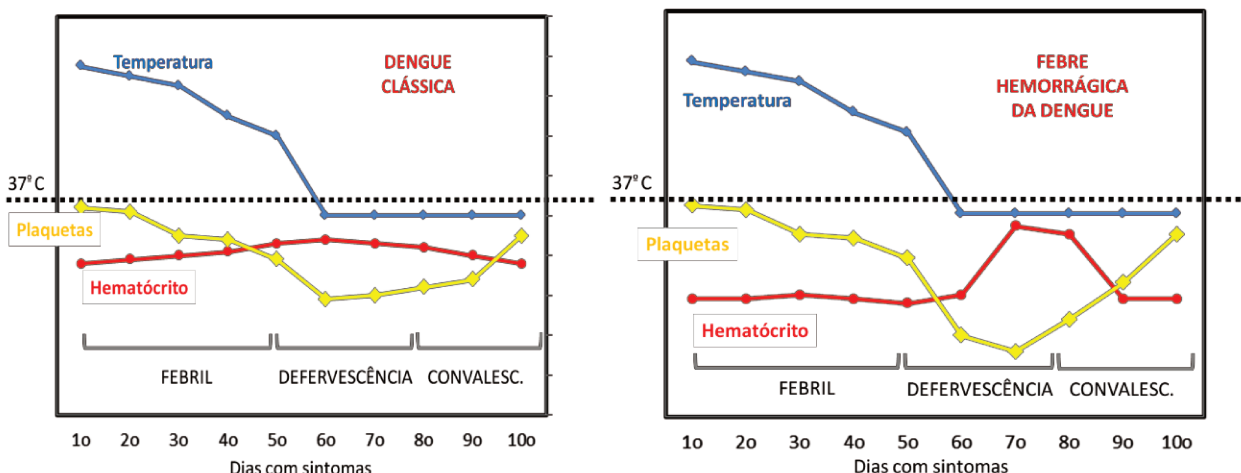


Figura 3: Evolução clínica clássica da dengue clássica e da febre hemorrágica da dengue. Observa-se que a dengue inicia-se como uma doença febril cuja febre durante em torno de 5 dias. Quando começa haver diminuição da amplitude da febre, chamada fase de defervescência, a maioria dos pacientes evolui para remissão clínica da doença, esta evolução clínica caracteriza a dengue clássica. Uma parcela dos pacientes apresenta porém piora clínica após a defervescência, apresentando quadro compatível com aumento da permeabilidade vascular e tendência hemorrágica, caracterizando assim a febre hemorrágica da dengue. O período de defervescência também é denominado período crítico e dura em torno de 48 horas.

1.3. Classificação tradicional da dengue

Os fundamentos da classificação tradicional da dengue foram estabelecidos em 1975 e baseiam-se principalmente no curso clínico da doença observado em uma grande coorte de crianças do sudeste asiático [8]. Com base nesta experiência, a dengue foi classificada em 2 grandes grupos: dengue clássica (DC) e febre hemorrágica da dengue (FHD). A classificação de DC compreende os pacientes que apresentam melhora clínica da doença durante a fase de defervescência, enquanto que a FHD compreende os pacientes que apresentam sinais de extravasamento plasmático e tendência hemorrágica. Os pacientes com DC podem ainda ser subclassificados em DC sem sangramentos e DC com

sangramento não usual. A FHD é subclassificada como FHD sem hipotensão ou choque (grau 1 e grau 2), grau 3 (com presença de hipotensão) e síndrome do choque da dengue (SCD) (grau 4) [1].

Os critérios clínicos da DC são: febre, cefaléia, dor retroorbitária, mialgia, náusea ou vômitos, e *rash* cutâneo. Porém, não é necessário que todos os sintomas estejam presentes. Os sangramentos descritos na DC são sangramentos cutâneo-mucosos como: equimose, epistaxe, gengivorragia, hematêmese, melena, hematúria e menorragia.

Os critérios para o diagnóstico de FHD são: febre, tendência hemorrágica (teste do torniquete positivo, sangramento cutâneo-mucoso, hematêmese ou melena), plaquetopenia (plaquetas $\leq 100.000/uL$) e extravasamento plasmático por aumento da permeabilidade vascular (variação de 20% do HT acima do basal, ou queda após soroterapia, ou presença de ascite, derrame pleural, ou hipoproteïnemia). Todos os quatro critérios devem estar presentes para a classificação da FHD [1].

Pacientes com FHD que apresentam taquicardia, pulso fino, estreitamento da pressão arterial (PA sistólica – PA diastólica $<20\text{mmHg}$), hipotensão e hipoperfusão são subclassificados como SCD.

1.4. Fisiopatologia da dengue e da febre hemorrágica

A exposição primária ao vírus da dengue induz a resposta imune humoral, mediada por linfócitos B e anticorpos, e a resposta imune celular, mediada por linfócitos T. Quando o vírus da dengue infecta o corpo humano, ele é reconhecido e fagocitado por macrófagos teciduais, que expõem os antígenos virais em sua superfície. Isso ativa diversas células linfocitárias, como células NK, células T efectoras e de memória. As células NK e efectoras iniciarão o processo de destruição celular, combatendo assim a infecção. As células linfocitárias de memória mantém a imunidade completa e permanente contra o sorotipo viral infectante (sorotipo específica), porém apenas parcial e temporária contra os demais sorotipos [9].

Durante uma possível infecção subsequente pela dengue por um sorotipo viral diferente do anterior, as células de memória produzem anticorpos que reconhecem, mas não são capazes de eliminar as partículas virais, chamados anticorpos não neutralizantes. Esses anticorpos não neutralizantes, ao se ligarem aos antígenos virais, potencializam o recrutamento de macrófagos, a exposição destes antígenos e a ativação de linfócitos T, podendo levar ao fenômeno de intensificação da resposta imunológica dependente do anticorpo (Figura 4). A exacerbação da resposta imunológica permanece como o principal mecanismo fisiopatogênico associado à ocorrência da FHD [6, 9].

A FHD é uma síndrome caracterizada, basicamente, pelo aumento da permeabilidade vascular. Não há indícios de lesão da célula endotelial, apenas de “afrouxamento” das junções intercelulares. Este fenômeno é possivelmente mediado pela ação dos imunocomplexos virais e por mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), e interleucina 6 (IL-6) [10]. Laboratorialmente, a exacerbação da resposta inflamatória é demonstrada pelo aumento dos níveis circulantes de TNF- α , em pacientes com FHD [11].

Os mediadores da resposta inflamatória levam também ao aumento da expressão de receptores da superfície da célula endotelial, como a trombosmodulina (TM) [12] e o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-R2) [13]. Concomitantemente, como parte do processo, podem ser observadas trombocitopenia e alterações da coagulação [6].

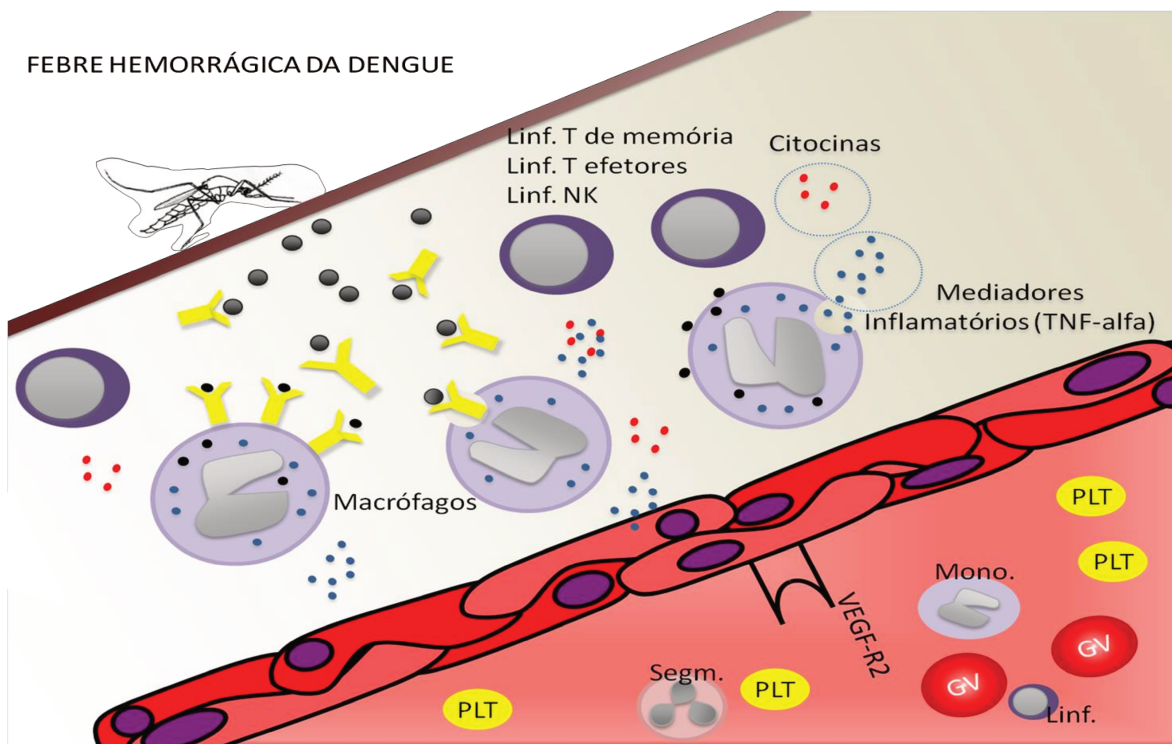


Figura 4. Modelo da fisiopatologia da FHD. Esta figura ilustra o fenômeno da intensificação da resposta imunológica mediada pelo anticorpo.

1.5. Marcadores da ativação das células endoteliais

TM é uma glicoproteína presente na superfície das células endoteliais que estabelece ligação com a trombina e com o receptor endotelial da proteína C (EPCR) para promover a ativação da proteína C, tendo assim atividade anticoagulante. A expressão da TM pode ser alterada na presença de citocinas inflamatórias [14]. Chen *et al.* publicaram um estudo demonstrando hiperexpressão de TM em células endoteliais e células monócíticas infectadas pelo vírus da dengue, *in vitro*. As células endoteliais infectadas tiveram também aumento da expressão do plasminogênio tecidual (tPA) e do EPCR [15]. Laboratorialmente, o aumento de TM plasmática também foi observado em pacientes com FHD [16]. Desta forma, tais estudos sugerem que o vírus da dengue age na célula infectada promovendo a expressão de receptores responsáveis pela ativação da fibrinólise e dos anticoagulantes naturais.

O FVW tem como função primordial a manutenção da hemostasia primária, promovendo a adesão e a agregação das plaquetas [17]. Esse fator é armazenado nos corpos de Weibel Palade das células endoteliais e secretado para o plasma na forma de grandes multímeros. Esses grandes multímeros podem levar à obstrução da microcirculação. No plasma, a enzima ADAMTS 13 (*A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats*) degrada esses multímeros do FVW, controlando seu potencial trombogênico [17-19]. A deficiência grave da ADAMTS 13 pode provocar a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) [20]. Em algumas doenças, em que há proeminente atividade inflamatória, pode ocorrer o desbalanço entre os níveis de FVW e a ADAMTS 13 [21, 22]. Desta forma, níveis aumentados de FVW, geralmente associados à queda dos níveis da ADAMTS 13, podem ser utilizados como marcadores de estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios [23, 24].

No âmbito da dengue, Sosothikul *et al.* [16] demonstraram que o aumento do antígeno do FVW e a queda da atividade da ADAMTS 13 poderiam ser observados em pacientes com FHD. Em 2007, nosso grupo descreveu um caso de PTT atendido no Hospital das Clínicas da UNICAMP induzida pelo vírus da dengue [25]. Estas evidências clínicas sugerem, portanto, que o FVW e a ADAMTS 13 poderiam vir a se comportar como marcadores da ativação endotelial e da inflamação, ou poderiam até estar relacionados à coagulopatia da dengue.

1.6. Permeabilidade microvascular

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A) é uma molécula envolvida na angiogênese e um potente modulador da permeabilidade microvascular, provavelmente promovendo a desestabilização das junções intercelulares das células endoteliais [26]. Clinicamente, o VEGF-A tem associação com a sepse grave em humanos [27, 28]. São reconhecidos pelo menos dois receptores do VEGF-A expressos nas células endoteliais, o VEGF-R1 e o VEGF-R2. Além da forma expressa nas membranas, ambos possuem também a forma solúvel. O VEGF-R1 também é expresso em monócitos. A ligação do

VEGF-A com o VEGF-R2 da membrana celular induz aumento da permeabilidade vascular [29]. Estudos *in vitro* mostraram que o receptor solúvel sVEGF-R1 pode ligar-se ao VEGF-A e bloquear sua interação com as superfícies celulares [30], equilibrando seus efeitos deletérios [31]. A função do receptor solúvel sVEGF-R2, entretanto, é menos conhecida, mas é possível que ele possa, de forma similar, regular as ações do VEGF-A nas células endoteliais[32].

1.6.1. VEGF e seus receptores solúveis na patogênese da febre hemorrágica da dengue

Recentemente, a modulação da permeabilidade microvascular pelo VEGF-A e seu receptor VEGF-R2 vem sendo estudada como possível mecanismo fisiopatológico envolvido na patogênese da FHD [6].

Srikiatkachorn *et al.* [13] avaliaram a expressão celular do VEGF-R2 em células infectadas com o DENV-2. Apesar das células mostrarem hiperexpressão do VEGF-R2 em suas membranas, a secreção do receptor solúvel sVEGR-R2 para o meio estava diminuída.

Em 2005, um estudo caso-controle com 56 pacientes na fase febril da dengue, demonstrou haver níveis circulantes quatro vezes maiores de VEGF-A nos pacientes com FHD em relação aos com DC [33]. Os níveis circulantes de VEGF-A e seus receptores solúveis, sVEGF-R1 e sVEGF-R2 foram avaliados em dois estudos clínicos subsequentes, um prospectivo, com 60 pacientes [13] e outro caso-controle, com 45 pacientes [34], com infecção confirmada pela dengue. Estes estudos não confirmaram o aumento do VEGF-A circulante na FHD, mas demonstraram haver diminuição significativa dos níveis circulantes do sVEGF-R2 durante a fase crítica da doença, nos pacientes com FHD. Por sua vez, os níveis de sVEGF-R1 estavam aumentados nos casos de FHD. Portanto, esses estudos apontam para a hipótese de que o aumento sérico do VEGF-A e a queda do sVEGF-R2 poderiam se comportar como marcadores do aumento da permeabilidade vascular nos pacientes com dengue.

1.7. Mecanismos de coagulação e fibrinólise

As cascatas de coagulação e fibrinólise exercem funções antagônicas, cujo balanço é essencial para prevenir a formação excessiva de coágulos ou sua remoção inapropriada. Os processos de coagulação e fibrinólise iniciam-se concomitantemente, a partir do estímulo endotelial. Quando ocorre lesão ou ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais, há expressão do fator tecidual (FT) e ativação concomitante de plaquetas e do tPA.

As plaquetas são responsáveis pela formação do coágulo primário, cuja estabilidade depende da consolidação das ligações entre as plaquetas pela fibrina. A formação da fibrina é o produto final da ativação em cascata de vários fatores da coagulação e regulada principalmente pela trombina (FIIa).

O FT é responsável pelo início da cascata da coagulação. Quando exposto pelas células subendoteliais, o FT se liga ao fator (F) VII circulante e o ativa. O complexo FT-FVIIa será responsável pela ativação dos FIX e FX, e este último levará à geração de pequenas quantidades de trombina. A trombina gerada é capaz de ativar, na superfície das plaquetas, os fatores XI, VIII e V, que por sua vez irão levar à ativação do FX e de quantidades maiores de trombina. A trombina, em quantidades maiores, converte o fibrinogênio em fibrina (Figura 5). A trombina também dá início à ativação de inibidores da coagulação: TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) e proteína C (PC). Nas células do endotélio, a trombina liga-se à TM e ao EPCR, e esse complexo promove a conversão da PC em PC ativada (PCA). A PCA, em conjunto com a proteína S, inativa os fatores Va e VIIIa [35] (Figura 6).

A principal proteína envolvida no início do processo fibrinolítico é o tPA. O tPA secretado pelo endotélio cliva o plaminogênio em plasmina. A plasmina é a enzima responsável pela degradação da fibrina, em produtos da degradação da fibrina e DD, e dissolução do coágulo. O sistema fibrinolítico é controlado principalmente pelo inibidor do ativador do plasminogênio - 1 (PAI-1), pela alfa2-antiplasmina (α AP) e pelo TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) [36] (Figura 7).

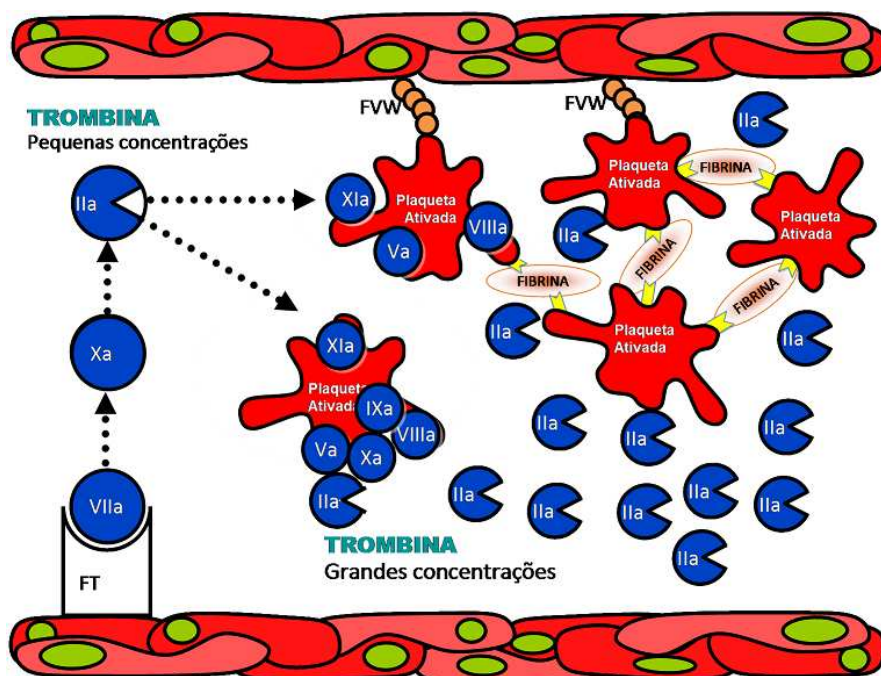


Figura 5: Modelo celular da cascata da coagulação. O FT expresso pelas células endoteliais promove a ativação de pequenas quantidades de trombina (FIIa). A trombina gerada induz a ativação de fatores de coagulação (FXI, FVIII e FV) que então promovem, na superfície das plaquetas, a ativação em cascata dos FIX, FX e de quantidades maiores de trombina. Grandes quantidades de trombina fazem a conversão do fibrinogênio em fibrina e a consolidação do coágulo plaquetário.

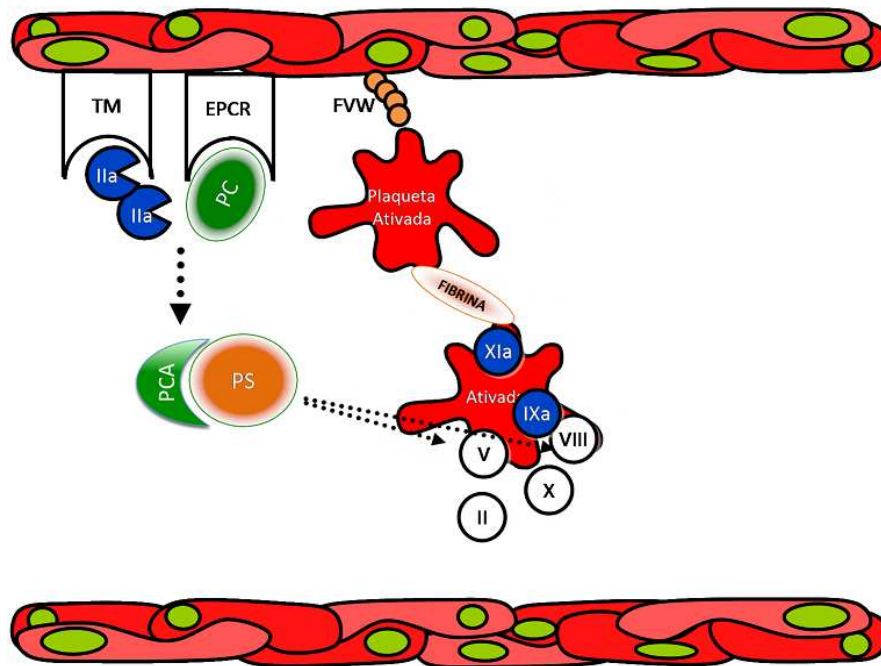


Figura 6: Inativação dos fatores V e VIII pelos dos anticoagulantes naturais (proteína C e S). A trombina gerada também auxilia no processo de controle da formação do coágulo através a ativação dos anticoagulantes naturais. A ligação da trombina com a TM, promove a ativação da PC da coagulação. A PCA e a PS causam a inativação dos FV e FVIII, e assim interrompem o processo de geração da trombina.

[10]. Estas alterações laboratoriais foram: o prolongamento do TTPa e o aumento do complexo trombina-antitrombina, que sugerem ativação da coagulação e o aumento do tPA, dos níveis de DD e a diminuição de PAI-1, que sugerem ativação da fibrinólise [11, 12]. Essas alterações da hemostasia estariam ainda diretamente relacionadas à gravidade da FHD, normalizando no período de convalescença [16, 40].

Porém os sangramentos não ocorrem apenas nos casos de FHD, e até 50% dos pacientes com DC podem ter complicações hemorrágicas. Krishnamurti C *et al.* [41] observaram que as complicações hemorrágicas podem não estar relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular. Foi publicado em 2010 [42] um estudo que descreveu a infecção pelo DENV-2 em primatas. Estes animais apresentaram hemorragia cutânea e coagulopatia, sem evidência de aumento da permeabilidade vascular. Exames laboratoriais mostraram que a coagulopatia ocorria por ativação da coagulação (aumento do complexo trombina-antitrombina), dos anticoagulantes naturais (antitrombina e proteína S), e da fibrinólise (aumento do DD).

Portanto, até o momento, o que se conhece em relação aos mecanismos envolvidos na coagulopatia em casos de dengue é baseado em estudos em pacientes com FHD. Nestes pacientes há indícios de ativação da coagulação e fibrinólise, podendo também haver perda dos fatores da coagulação, por causa do extravasamento plasmático. Desta forma, não se pode diferenciar se a coagulopatia ocorreria em decorrência da infecção ou como consequência do aumento da permeabilidade vascular. Por outro lado, apesar da tendência hemorrágica de alguns pacientes com DC ser clinicamente reconhecida, as possíveis alterações da hemostasia responsáveis pelos sangramentos nestes pacientes não estão bem esclarecidas.

2. Justificativas

As alterações da hemostasia atribuídas à dengue (plaquetopenia, alterações da coagulação e fibrinólise) foram detectadas em pacientes com FHD. Nestes pacientes, o extravasamento plasmático é a complicação predominante e pode ser um fator confundidor. Embora as complicações hemorrágicas possam ocorrer em até 50% dos casos de DC, as causas desses sangramentos não estão esclarecidas. Nos estudos clínicos, pacientes classificados como DC em geral são avaliados em conjunto, independentemente de apresentarem complicações hemorrágicas. Isso possivelmente justifica o fato de a importância da coagulopatia nos casos de DC ser subestimada e ainda pouco estudada e compreendida.

A avaliação da hemostasia e fatores envolvidos em sua fisiopatologia nos pacientes com DC e sangramento poderia contribuir para a melhor compreensão das complicações hemorrágicas na dengue e para a melhor caracterização desse subgrupo de doentes.

3. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi Identificar laboratorialmente parâmetros de inflamação, permeabilidade microvascular e hemostasia que diferissem pacientes com complicações hemorrágicas, comparando-os com controles saudáveis, pacientes com DC sem complicações.

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram definidos para avaliação nos pacientes e controles:

- Avaliar o marcador inflamatório $\text{TNF-}\alpha$ e os marcadores de ativação endotelial FVW e TM;
- Avaliar o balanço FVW-ADAMTS 13 como marcador pró-coagulante e pró-inflamatório;
- Avaliar os marcadores da permeabilidade microvascular VEGF-A, sVEGFR1 e sVEGFR2;
- Avaliar o processo de coagulação, através do teste de geração da trombina, e de fibrinólise, através da quantificação do tPA, PAI-1 e DD;
- Correlacionar os marcadores acima descritos com grau de plaquetopenia e extensão dos sangramentos

4. Materiais e métodos

4.1. Desenho do estudo e seleção dos pacientes

Trata-se de um estudo clínico observacional do tipo caso-controle, retrospectivo, cujos sujeitos de interesse (casos) eram pacientes com complicações hemorrágicas da dengue. Pacientes com dengue sem complicações hemorrágicas e indivíduos saudáveis foram usados como controles.

A duração do estudo foi de janeiro de 2008 até maio de 2011, porém os pacientes foram incluídos predominantemente nos anos de 2008 e 2010 quando ocorreram surtos importantes da doença no Rio de Janeiro/RJ e em Campinas/SP. Em 2008, os pacientes foram selecionados durante duas semanas no Hospital Geral de Ipanema, Rio de Janeiro. De 2009 a 2011 os pacientes foram selecionados em Campinas, no Hospital das Clínicas da UNICAMP, no Pronto Atendimento do Hospital Madre Theodora e nas Unidades Básicas de Saúde do Jardim Boa Esperança e do Jardim Conceição. Pacientes com complicações da dengue foram recrutados nos hospitais de Ipanema e no Hospital das Clínicas da UNICAMP; os casos sem complicações foram recrutados no Pronto Atendimento do Hospital Madre Theodora e nas Unidades Básicas de Saúde.

4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para os pacientes foram: suspeita de infecção pela dengue, idade maior que 17 anos e estar no período de defervescência da doença, em que havia maior risco de complicações hemorrágicas. Pacientes que preenchessem os critérios de inclusão e apresentassem sangramentos espontâneos eram alocados no grupo de dengue com complicações hemorrágicas; pacientes que preenchessem os critérios, mas não tivessem sangramentos espontâneos eram alocados no grupo de dengue clássica sem complicações hemorrágicas. Sangramentos espontâneos foram definidos como sangramentos cutâneos ou mucosos, exceto os provocados pelo teste do torniquete. O período de defervescência foi caracterizado como o dia em que os pacientes começavam a ter queda da amplitude da febre e detectado de acordo

com o acompanhamento médico nos serviços de origem; em geral os pacientes eram recrutados para o estudo no dia em que fossem coletar a sorologia para a dengue, após o quinto dia de febre, ou na data da internação.

Os critérios de exclusão foram: doenças renais, hepáticas, infecciosas, autoimunes, hematológicas e neoplasias. Mulheres gestantes também foram excluídas. Pacientes que posteriormente perderam o seguimento, ou que a sorologia anti-IgM foi negativa, também foram excluídos.

Funcionários do Hemocentro de Campinas, doadores de sangue e membros da comunidade foram recrutados como controles saudáveis, sendo pareados com os pacientes por idade, gênero, etnia e tipagem sanguínea ABO (pela correlação com níveis de FVW). Os critérios de exclusão utilizados para os controles saudáveis foram os mesmos dos pacientes.

O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e foi registrado no Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE=0170.0.146.000-08). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, anexo I).

4.1.2. Avaliação médica e seguimento dos pacientes

O recrutamento foi realizado inicialmente pelo médico ou enfermeiro assistente, nos hospitais ou centros de saúde. Os casos eram reportados para os responsáveis pelo estudo que avaliavam se os pacientes preenchiam os critérios de inclusão. As evoluções clínicas prévias, contendo o relato dos sintomas, aferição da temperatura corpórea, terapêutica instituída e os resultados do hemograma durante a fase febril da doença foram coletadas retrospectivamente na data da inclusão dos pacientes. Estas informações foram utilizadas como parâmetros para detecção da fase da doença e classificação da gravidade.

Após a inclusão, os pacientes foram seguidos prospectivamente até a fase de convalescença. O hemograma foi realizado diariamente nos pacientes hospitalizados, e periodicamente nos pacientes ambulatoriais, dependendo da evolução clínica. Radiografia de tórax, ultrassom de abdômen, dosagem de

albumina e coagulograma foram realizados pelo menos uma vez durante a internação nos pacientes hospitalizados.

Foram coletados os seguintes dados em formulário padronizado (anexo II):

- Dados da anamnese: nome, sexo, data de nascimento, descrição incluindo início e duração dos sintomas;
- Dados do exame físico: sinais vitais, sinais de sangramento, de derrame pleural ou ascite, presença de visceromegalias;
- Dados laboratoriais (monitorados ao longo da avaliação clínica): hemograma completo em todos os pacientes, albumina, enzimas hepáticas, função renal, radiografia de tórax, ultrassom de abdômen nos pacientes internados. Prova do laço quando realizada.

4.1.3. Classificação da gravidade da doença

Os casos foram classificados como DC ou FHD conforme recomendações da OMS [1]. Os exames realizados para a determinação da FHD foram: hematócrito, radiografia de tórax, ultrassom de abdome e albumina sérica.

Casos de DC foram ainda subclassificados como DC com sangramento e DC sem sangramento. Foram considerados apenas os sangramentos espontâneos. As complicações hemorrágicas foram classificadas em discreta, moderada e grave, segundo classificação adaptada do último *guideline* sobre dengue proposto pela OMS em 2009 [2]. Petéquias, equimoses e gengivorragias foram considerados sangramentos discretos. Sangramentos gastrointestinais e geniturinários foram considerados moderados. Hemorragias que causavam instabilidade hemodinâmica foram consideradas sangramentos graves. Manifestações hemorrágicas em mais de um sítio foram também avaliadas e classificadas como sangramentos múltiplos.

4.1.4. Confirmação do diagnóstico da dengue

O testes sorológico para detecção do anticorpo IgM contra o vírus da dengue foi usado como exame confirmatório da doença, e foram realizados pela Fundação Osvaldo Cruz, no Rio de Janeiro, ou pelo Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. O teste sorológico foi escolhido para confirmação diagnóstica por dois motivos. Primeiramente por se tratar de teste laboratorial de rotina, amplamente realizado e cujos resultados subsidiam a confirmação ou descarte de casos suspeitos de dengue pelo sistema de vigilância. Segundo, porque é um teste que tem alta sensibilidade, acima de 80% [2], após o quinto dia de doença. A especificidade do teste sorológico pode ser menor em áreas endêmicas para outras flavivirose, como febre amarela, encefalite viral por flavivírus, como a encefalite viral japonesa, e febre do Oeste do Nilo, ou em áreas em que a população foi imunizada contra febre amarela. Porém, o sudeste brasileiro não é área endêmica para essas doenças e tampouco a população é imunizada rotineiramente no caso da febre amarela. Portanto, estima-se que a especificidade da sorologia seja apropriada para fins de diagnóstico.

4.2. Procedimentos laboratoriais

Imediatamente após a assinatura do TCLE, foram coletadas as amostras de sangue dos pacientes e controles. As coletas foram feitas por punção venosa periférica, e o sangue distribuído em 4 tubos (1 tubo seco, 1 tubo com EDTA e 2 tubos com citrato de sódio 3,2 %). As amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada, à temperatura ambiente, por 20 minutos a 2500xg. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento, respeitando o tempo máximo de 2 horas entre a coleta e o início da centrifugação. O soro e o plasma obtidos por centrifugação foram imediatamente separados em alíquotas, de 100 a 500 µl. Amostras coletadas no Rio de Janeiro foram centrifugadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Geral de Ipanema, acondicionadas em gelo seco e armazenadas no freezer a - 20°C. Amostras coletadas em Campinas foram centrifugadas no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, e

armazenadas no freezer a - 80°C. Amostras de sangue coletadas em EDTA foram utilizadas a fresco para a tipagem sanguínea e hemograma; estes exames foram realizados no Hospital Geral de Ipanema e no Hemocentro da UNICAMP, conforme a origem dos casos.

4.2.1. Dosagem dos níveis circulante de TNF- α e TM

Kits comerciais de ELISA foram utilizados para a determinação dos níveis séricos de TNF- α (Quantikine HS, R&DSystems, Minneapolis, USA), e dos níveis plasmáticos de TM (IMUBIND® Trombomodulin ELISA kit, American Diagnostica INC, Stamford, USA). Os resultados foram lidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620 nm.

4.2.2. Dosagem do antígeno de FVW e determinação da atividade do FVW

Os níveis de antígeno de FVW (FVWAg) no plasma foram mensurados usando-se a técnica de ELISA *in house*. Nesta técnica, placas de ELISA de alta aderência (MaxiSorb^R, Nunc, Rochester, NY, USA) foram cobertas com anti-FVW humano (A0082; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), e as amostras de plasma diluído foram transferidas para a placa. Após incubação, adicionou-se o anticorpo anti-FVW peroxidase conjugado (P0226; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). A reação colorimétrica foi obtida após adição de OPD. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620 nm.

A atividade do FVW foi determinada pela técnica de ligação ao colágeno (FVW/CBA), realizada *in house*. Basicamente, placas de ELISA de alta aderência (MaxiSorb^R, Nunc, Rochester, NY, USA) foram cobertas com colágeno humano tipo III (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), e incubadas com plasma diluído. Após a adição do anticorpo anti-FVW peroxidase conjugado (P0226; DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), a reação colorimétrica foi obtida após adição de OPD e a absorbância lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620 nm.

4.2.3. Dosagem do antígeno e determinação da atividade da ADAMTS 13

Os níveis plasmáticos do antígeno da ADAMTS 13 foram determinados por kit comercial ELISA (IMUBIND® ADAMTS 13 ELISA kit, American Diagnostica INC, Stamford, USA). Os resultados foram lidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620nm.

A atividade da ADAMTS 13 foi determinada pela técnica de ligação do FVW residual ao colágeno (AD13/CBA). A técnica AD13/CBA baseia-se na proteólise de uma quantidade constante de FVW purificado, por diluições seriadas da amostra de plasma testado, usada como fonte de ADAMTS 13. Resumidamente, a mistura de plasma diluído e FVW purificado foi incubada por 24 horas e a atividade do FVW residual presente na amostra foi determinada pela técnica de FVW/CBA

4.2.4. Avaliação da fibrinólise

Kits comerciais de ELISA foram utilizados para a quantificação dos níveis plasmáticos de tPA (IMUBIND® tPA, American Diagnostica INC, Stamford, USA), DD (IMUCLONE™ D-dimer, American Diagnostica INC, Stamford, USA) e PAI-1 (PAI-1, American Diagnostica INC, Stamford, USA). Os resultados foram lidos em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 492/620 nm.

4.2.5. Teste de geração de trombina (TGT)

A coagulação sanguínea foi avaliada pelo TGT no plasma pobre em plaquetas dos pacientes e controles. O TGT mimetiza o processo fisiológico da coagulação. Trata-se de um teste fluorogênico, realizado através de ensaio comercial (Technothrombin® TGA, Technoclone GmbH, Vienna, Austria). A fluorescência foi lida a cada cinco minutos em fluorímetro (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA), e avaliada em *software* específico que acompanha os reagentes. Quatro parâmetros são gerados pelo teste: *lag phase* (LP), que é o tempo desde o início do experimento até o início da formação da trombina; pico de trombina, que é a concentração máxima de trombina gerada; índice de velocidade, que é a

quantidade de trombina gerada por minuto, e a área abaixo da curva (AUC- área *under curve*) que traduz a concentração total de trombina gerada. A Figura 8 ilustra o resultado gráfico fornecido pelo TGT.

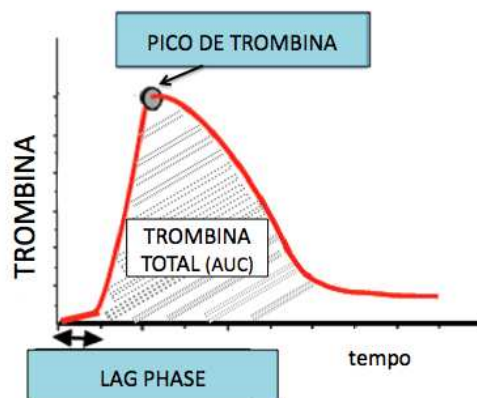


Figura 8: Padrão de curva representativa dos resultados gerados pelo TGT. *Lag phase* (LP) é o tempo até o início da formação da trombina; pico de trombina é a concentração máxima de trombina gerada, e a área abaixo da curva (AUC- *area under curve*) que traduz a concentração total de trombina gerada.

4.3. Análise estatística

Foi feita análise descritiva através de tabelas de freqüências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. Para comparação de proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário. Para comparação dos parâmetros entre três ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA com transformação por postos seguida do teste de Tukey para localização das diferenças, quando necessário. Para verificar associação linear entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman, com valores que variam de -1 a 1. Valores próximos dos extremos indicam correlação negativa ou positiva, respectivamente, e valores próximos de zero não indicam correlação. Para identificar fatores que discriminam a doença foi utilizada a análise de regressão logística múltipla. Para determinação de valores de corte foi utilizada a curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*), que expressa a relação entre a sensibilidade e especificidade de

um determinado teste. As medidas de acurácia consideradas foram sensibilidade, definida como a proporção dos indivíduos com a doença que tem um teste positivo para a mesma, e especificidade, proporção dos indivíduos sem a doença que tem um teste negativo. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5% ($P < 0.05$).

5. Resultados

5.1. Obtenção dos sujeitos do estudo

Trezentos e dezenove pacientes com suspeita de dengue foram atendidos nos hospitais e centros de saúde participantes no período do estudo; 63 pacientes estavam hospitalizados por complicações da dengue e 256 estavam em atendimento ambulatorial.

Dentre os 63 pacientes internados, 3 não tinham complicações hemorrágicas, 6 recusaram-se a participar do estudo e 14 tinham sinais de estar em convalescença, como melhora do sangramento ou ascensão do número de plaquetas. Foram então selecionados 40 pacientes para o estudo, dos quais 6 posteriormente apresentaram sorologia anti-IgM negativa para dengue, e foram excluídos. Ao final, foram incluídos no estudo 34 pacientes com complicações hemorrágicas (26 classificados como DC com sangramento e 8 classificados com FHD).

Dentre os 256 pacientes atendidos ambulatorialmente, a maioria, 178 pacientes, não pôde ser selecionada por perda do seguimento médico, por não ter coletado sorologia para dengue ou por estar na fase febril da doença. Dentre os 78 pacientes restantes, 18 recusaram participar do estudo e 27 foram excluídos. As causas de exclusão foram: diagnóstico de leucemia mielóide crônica (1 paciente), antecedente de púrpura trombocitopênica imune (1 paciente), doença renal crônica (3 pacientes), tempo inadequado para o processamento das amostras (5 pacientes) e sorologia anti-IgM negativa (17 pacientes). Ao final, foram incluídos 33 pacientes com DC, sem complicações (Figura 9).

Noventa controles saudáveis foram inicialmente selecionados para cada paciente incluído no estudo. Posteriormente os controles de pacientes excluídos por sorologia negativa também foram excluídos do estudo. Ao final, incluímos 67 controles pareados com os pacientes.

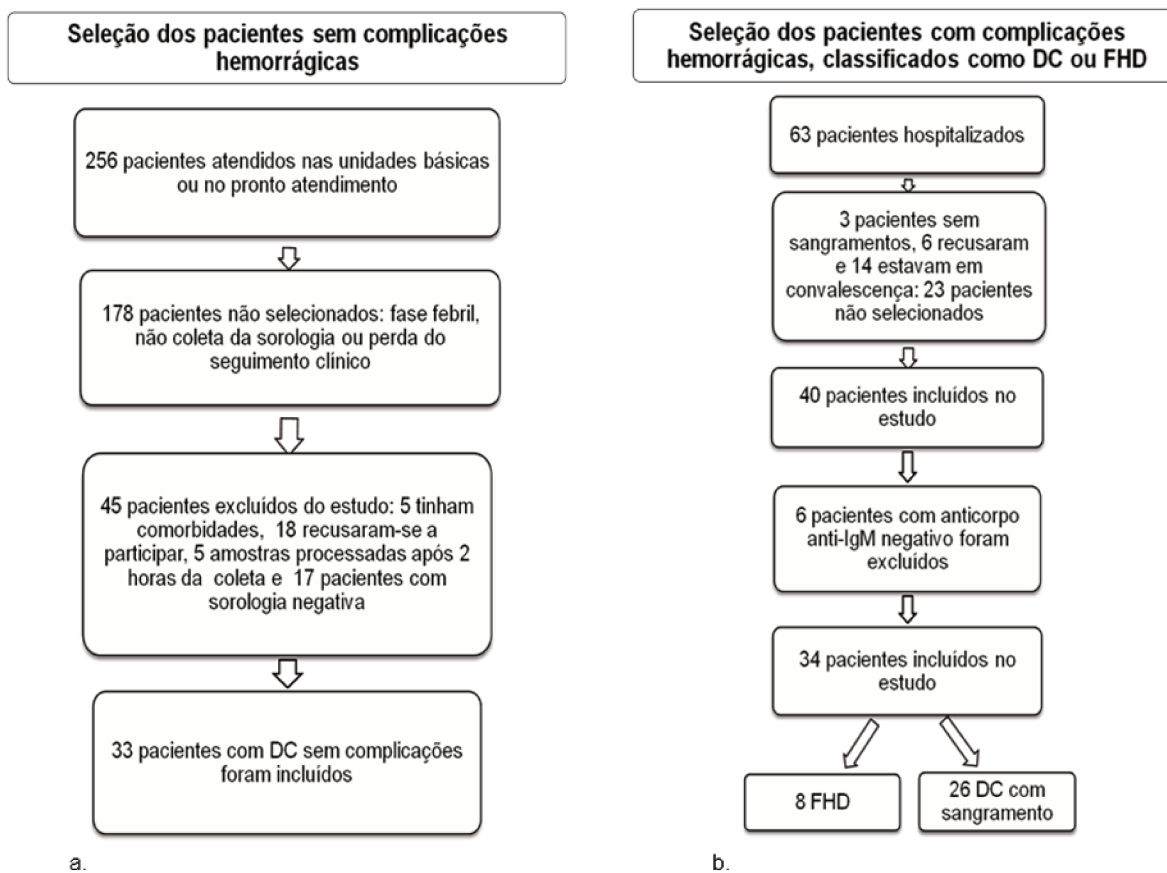


Figura 9. Fluxograma de seleção e inclusão dos pacientes. Figura 8a ilustra a seleção dos pacientes com DC e a Figura 8b ilustra a seleção dos pacientes hospitalizados por complicações da dengue.

5.2. Dados demográficos e clínicos

A Tabela 1 mostra os dados demográficos dos pacientes. Nota-se uma discreta predominância de mulheres nos casos de DC com sangramento e FHD. A Tabela 2 discrimina as características clínicas dos pacientes e destaca que o tempo entre os primeiros sintomas da doença e a data da inclusão foi semelhante entre os grupos, evidenciando que a fase da doença era semelhante entre os grupos no momento da inclusão. Clinicamente, nota-se também que, apesar dos casos de FHD aparentemente terem uma apresentação clínica mais grave, alguns

casos classificados como DC também apresentavam sintomas de gravidade, como vômitos, dor abdominal, hepatomegalia, hipotensão e síncope.

Dentre os pacientes classificados como DC com sangramento (n=26), 15 (57.6%) tinham sangramento discreto e 11 (42.2%) sangramento moderado. Oito pacientes (30.7%) tinham sangramento em múltiplos locais. Dos pacientes classificados como FHD, 4 (50%) tinham sangramento discreto, 4 (50%) sangramento moderado e 4 (50%) apresentaram sangramentos em múltiplos sítios. Nenhum paciente apresentou sangramento grave. A gravidade do sangramento não foi significativamente diferente entre os dois grupos.

Tabela 1: Dados demográficos dos pacientes e controles. Esta tabela mostra a distribuição de gênero, idade, etnia e tipagem ABO dos pacientes e controles saudáveis.

Dados demográficos	Controles (n=67)	DC sem sangramento (n=33)	DC com sangramento (n=26)	FHD (n=8)	P
Feminino/Masculino, n(%)	35(52,2)/32(47,8)	13(39,4)/20(60,6)	15(57,7)/11(42,3)	7(87,5)/1(12,5)	0,09
Idade, mediana (máx-mín), anos	38,5 (19-76)	39 (17 – 71)	41 (20 – 79)	42 (17-58)	0,45
Caucasiano/Afro-descendente, n(%)	38(56,7)/29(43,3)	24(72,7)/9(27,3)	12(46,1)/14(53,8)	5(62,5)/3(37,5)	0,20
ABO não-O / ABO O, n(%)	36(53,7)/31(46,3)	19(57,6)/14(42,4)	10(38,5)/16(61,5)	6(75)/2(25)	0,33

Tabela 2: Apresentação clínica dos pacientes. Abaixo nesta tabela segue a relação de dias de doença e sintomas apresentados pelos pacientes à época da inclusão no estudo.

Apresentação clínica no dia da inclusão	DC sem sangramento (n=33)	DC com sangramento (n=26)	FHD (n=8)	P
Dias de sintomas, mediana (máx-mín)	7 (5 -10)	7 (4-15)	8 (3 – 16)	0.68
Dias desde o início da febre, mediana (máx-mín)	6 (3 -10)	6,5 (1 – 14)	6 (3 – 11)	0.4
Dias de internação, mediana (máx-mín)	0	2 (1 -10)	3 (1 - 5)	N.A.
Febre, n (%)	33 (100)	26 (100)	7 (87,5)	N.A.
Cefaléia, n (%)	17 (51.5)	22 (84,6)	8 (100)	0.003
Prostração, n (%)	20 (60.6)	24 (92,3)	8 (100)	0.004
Náusea ou Vômitos, n (%)	11 (33.3)	13 (50)	7 (87,5)	0.02
Dor abdominal, n (%)	3 (9)	12 (46)	4 (50)	0.002
Hepatomegalia, n (%)	0	2 (7.7)	1 (12,5)	N.A.
Hipoalbuminemia, n (%)	0	0	5 (62,5)	N.A.
Hipotensão, n (%)	0	2 (7.7)	4 (50)	N.A.
Síncope, n (%)	0	2 (7.7)	1 (12,5)	N.A.
Insuficiência renal aguda, n (%)	0	1 (3,8)	0	N.A.
Derrame pleural ou ascite, n (%)	0	0	3 (37,5)	N.A.
Choque, n (%)	0	0	4 (50)	N.A.

5.3. Resultados da contagem das células sanguíneas e coagulograma

Os valores considerados foram obtidos do hemograma em que havia maior valor de hematócrito dentre os hemogramas seriados (Tabela 3). Nota-se que os pacientes classificados como DC com sangramento e como FHD apresentaram predominantemente tendência a monocitose ($P<0.001$) e plaquetopenia ($P<0.001$). Pacientes com DC, sem sangramento, apresentaram tendência a linfopenia ($P=0,04$). Não houve alterações significativas do coagulograma, o TTPa médio dos pacientes com complicações hemorrágicas (DC e FHD) foi 14,4 segundos (13 – 24 segundos), e o RNI médio foi 1.1 (0,9-1,8).

Tabela 3: Valores do hemograma dos pacientes. Esta tabela apresenta as contagens sanguíneas dos pacientes. Como foram coletados hemogramas seriados, os valores aqui representados são do maior hematócrito e da menor plaqueta obtida durante a fase de defervescência.

Contagem sanguínea	DC sem sangramento (n=33)	DC com sangramento (n=26)	FHD (n=8)	P
HB, g/dl	14,7 (13,6-15,6)	13,6 (12,6-14,6)	13,8 (11,8-15,5)	0,12
HT, %	43,3 (40,6-46,3)	43,0 (37,0-45,0)	40,0 (36,0-50,0)	0,42
GB, u/mm ³	4040 (3385-6300)	5600 (4700-7660)	6000 (4075-6540)	0,17
Segmentados/mm ³	1895 (1056-3415)	1692 (1008-2898)	1936 (1259 – 3250)	0,88
Linfócitos/mm ³	1270 (1034-2050)	2113 (1389-2765)	2012 (1231-2853)	0,04
Monócitos/mm ³	497,5(368-602)	1320(760-1817)	1366(1057-1681)	<0,001
Plaquetas x 10 ³ u/mm ³	203 (126-283)	21 (14-36)	17 (11-22)	<0,001

Valores representados pela mediana e percentis 25 e 75.

5.4. Resultados dos marcadores inflamatórios e da ativação endotelial

Notou-se aumento dos níveis circulantes de TNF- α , TM e FVW-Ag nos pacientes com dengue em relação aos controles. O aumento do TNF- α foi estatisticamente significativo nos casos de DC em relação aos controles. TM plasmática esteve aumentada significativamente nos casos de DC com sangramento e nos casos de FHD. O antígeno do FVW esteve aumentado em todos os grupos da dengue em relação aos controles. (Figura 10). A atividade do FVW, avaliada pela ligação ao colágeno, também esteve aumentada nos pacientes com dengue, independentemente da gravidade, e a atividade da ADAMTS 13 esteve diminuída apenas nos pacientes classificados como DC (Figura 11). Os níveis plasmáticos do antígeno da ADAMTS 13 estiveram inalterados nos pacientes em relação aos controles saudáveis ($P=0,38$), sendo que os valores (mediana, mínimo e máximo) foram: 718% (432 - 1218), 685,4% (229 - 1276), 849,9% (411- 1270) e 766,7% (455-1007), para controles, DC, DC com sangramentos e FHD, respectivamente.

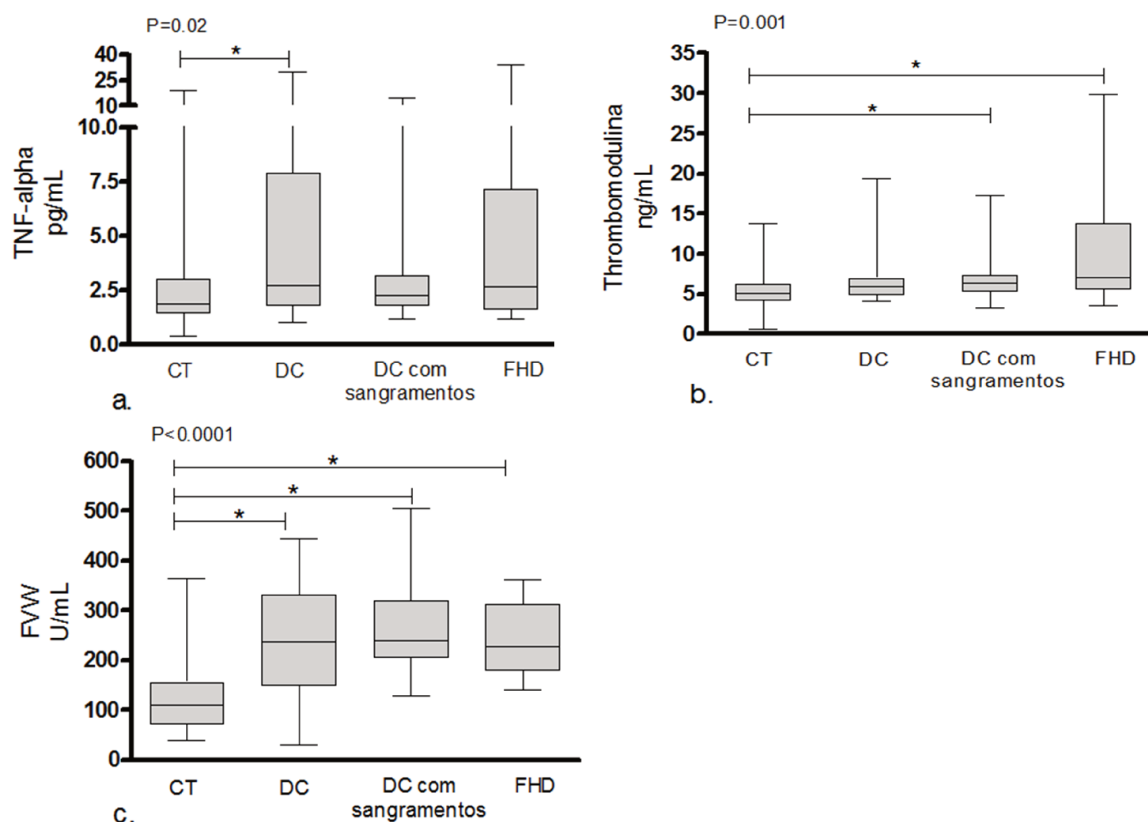


Figura 10: Inflamação e ativação das células endoteliais: Esta figura ilustra a ativação da resposta inflamatória e das células endoteliais nos pacientes com dengue. Os níveis circulantes dos marcadores inflamatórios e da ativação endotelial foram similares entre os 3 grupos da dengue. a. TNF- α , b. TM plasmática. c. FVW antígeno. CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey.

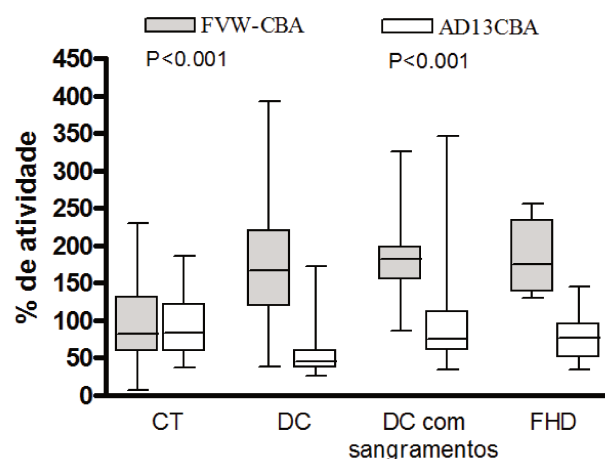


Figura 11: Balanço entre as atividades do FVW e da ADAMTS 13, avaliadas pela ligação ao colágeno (CBA). A figura ilustra o aumento da atividade do FVW acompanhada da queda da atividade da ADAMTS 13 nos pacientes em relação aos controles. Embora estatisticamente houvesse diferença de atividade da ADAMTS 13 entre os grupos, o teste de Tukey evidenciou que estas diferenças estavam significativas principalmente no grupo de DC.

5.5. Resultados dos marcadores de permeabilidade microvascular

Observou-se queda significativa dos níveis circulantes de sVEGR-R2 no grupo de DC com sangramentos e no grupo de FHD. Inversamente, os níveis circulantes de sVEGF-R1 estavam aumentados nestes dois grupos e também na DC. Houve uma tendência ao aumento dos níveis circulantes de VEGF-A nos casos de FHD, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Se for analisada a razão VEGF-A/sVEGF-R2, observa-se que esta razão encontra-se significativamente aumentada apenas nos casos de FHD, sugerindo que a alteração dos marcadores de permeabilidade microvascular é mais evidente neste grupo de pacientes em comparação principalmente com os pacientes com DC e sangramento. Os resultados estão representados na Figura 12.

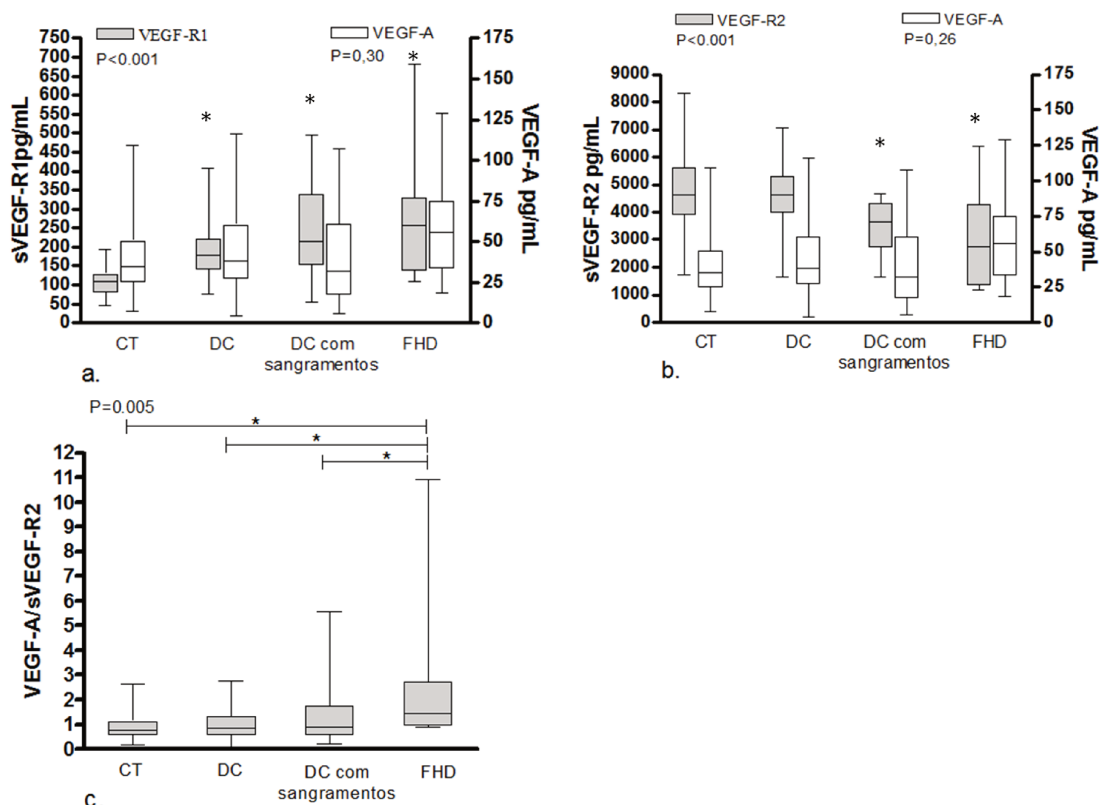


Figura 12: Marcadores da permeabilidade microvascular. A Figura 12a ilustra o aumento dos níveis circulantes de sVEGF-R1 na dengue, estatisticamente a diferença dos níveis de sVEGF-R1 estava presente nos 3 grupos de dengue em relação aos controles saudáveis. A Figura 12b ilustra a diminuição dos níveis circulantes de sVEGF-R2 nos pacientes com complicações hemorrágicas (DC e FHD) em relação aos pacientes sem sangramentos e aos controles saudáveis. Ambas as Figuras (12a e 12b) ilustram a tendência ao aumento dos valores de VEGF-A plasmáticos e sua relação com os receptores solúveis. A Figura 12 c ilustra a razão VEGF-A/sVEGF-R2, que está significativamente aumentada no grupo com FHD. * Locais de diferença pelo teste de Tukey.

5.6. Resultados do teste de geração de trombina (TGT)

O TGT foi realizado em 24 controles, em 9 pacientes com DC sem sangramento, 9 pacientes com DC com sangramento e 7 pacientes com FHD.

Foram selecionados para o teste os primeiros pacientes incluídos em cada grupo e seus respectivos controles.

Dentre os resultados, observou-se que o tempo para o início da produção de trombina (LP) esteve aumentado nos pacientes em relação aos controles saudáveis, independentemente da gravidade da dengue. A velocidade da geração de trombina, expressa em índice de velocidade, e as concentrações máxima e total de trombina gerada foram menores nos grupos de DC com sangramento e FHD (Figura 13).

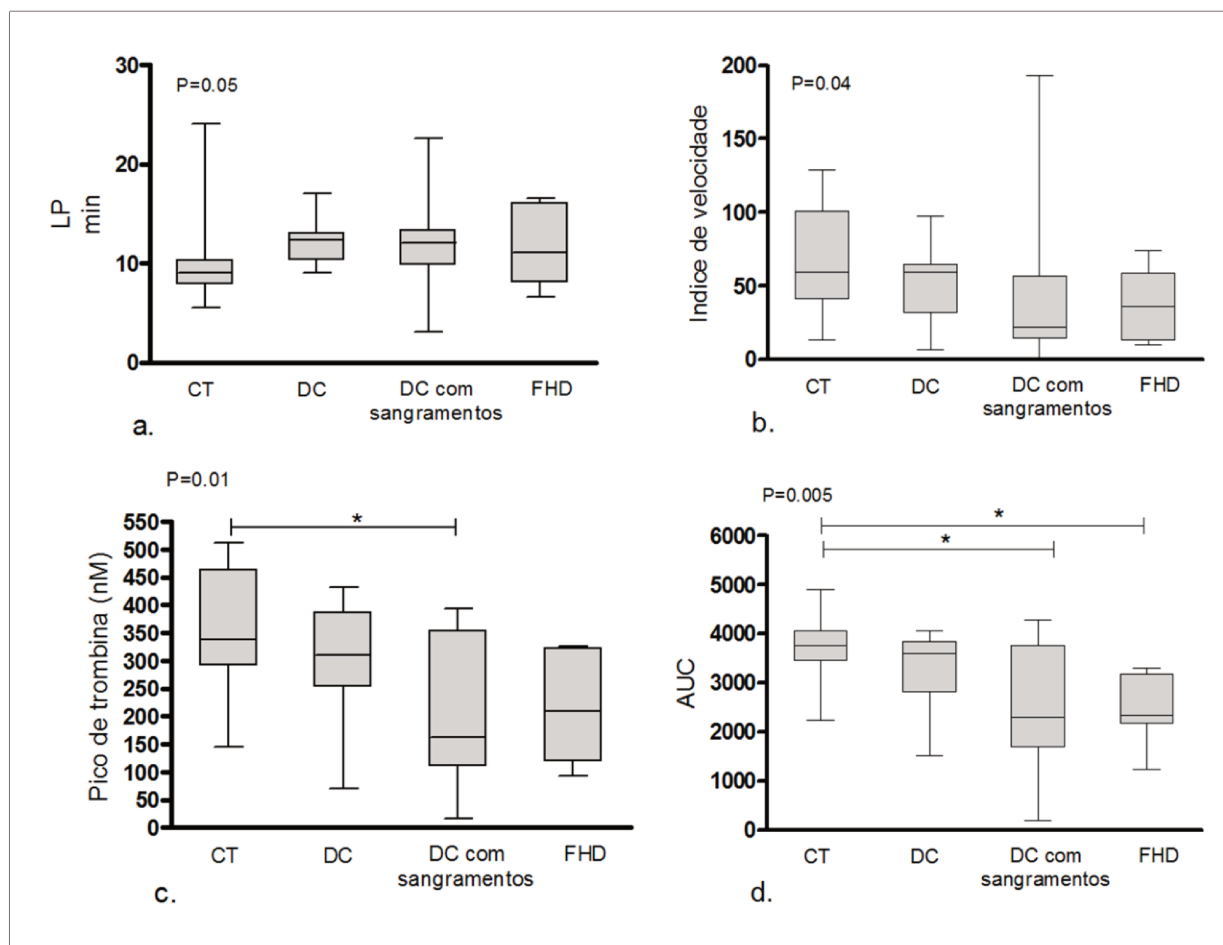


Figura 13: Resultados do teste de geração de trombina. A figura ilustra os resultados da geração de trombina nos pacientes com dengue e controles. Observa-se que os parâmetros referentes a concentração de trombina gerada estão significativamente diminuídos nos grupos de DC com sangramentos e FHD, em relação aos controles. a. Lag-phase; b. índice de velocidade; c. Pico máximo de

trombina gerada; d. área sobre a curva. CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey.

5.7. Resultados dos marcadores de fibrinólise

Observou-se aumento significativo dos níveis plasmáticos de tPA e DD nos grupos de DC com sangramento e FHD, evidenciando que esses paciente apresentam um quadro de hiperfibrinólise (Figura 14). O PAI-1 esteve inalterado nos pacientes em relação aos controles ($P=0,68$), a mediana dos níveis plasmáticos de PAI-1 nos controles saudáveis, na DC, DC com sangramentos e FHD foram: 8,3ng/mL (1-26 ng/mL); 8,1 ng/mL (1-42,7 ng/mL); 7,6 ng/mL (3-41,5 ng/mL); 8,4 ng/mL (1-38 ng/mL), respectivamente.

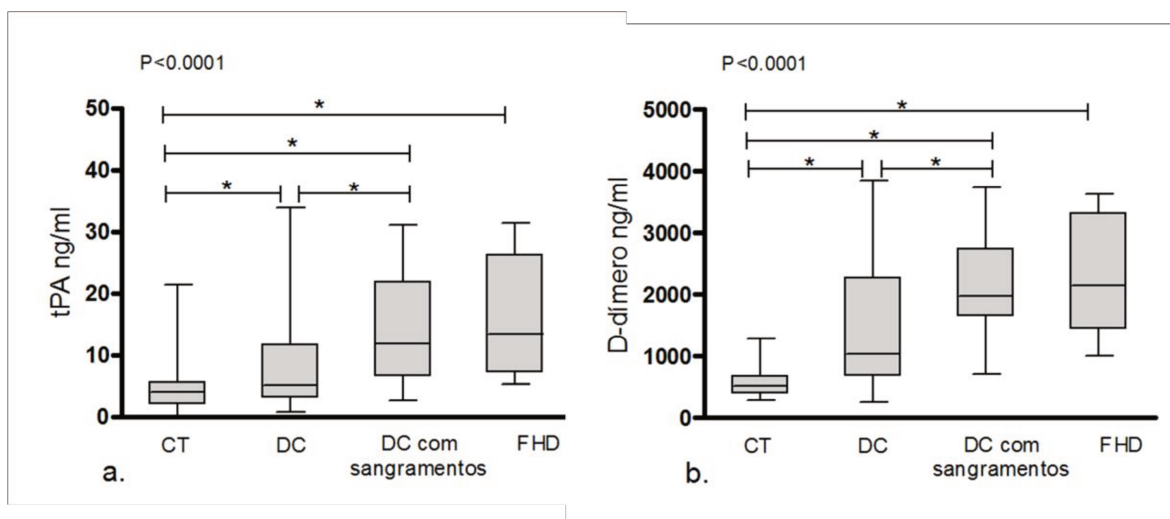


Figura 14: Marcadores de fibrinólise. Esta figura ilustra a tendência a fibrinólise nos grupos de DC com sangramento e FHD. a. tPA b. DD CT= controles . * Locais de diferença pelo teste de Tukey.

5.8. Resumo dos resultados das variáveis analisadas

Os níveis séricos do $\text{TNF-}\alpha$ estavam aumentados nos três grupos da dengue, porém a diferença foi estatisticamente significativa principalmente nos pacientes com DC sem sangramento. A TM plasmática estava aumentada

principalmente nos pacientes com sangramentos, tanto nos classificados como DC como nos classificados como FHD. O antígeno do FVW esteve estatisticamente aumentado nos três grupos de dengue estudados.

Pacientes com complicações hemorrágicas (tanto DC com sangramento quanto FHD) apresentaram diminuição significativa da geração de trombina, particularmente o pico de trombina e a AUC estavam significativamente diminuídos nesses pacientes. Observou-se também elevação significativa dos níveis plasmáticos dos marcadores de fibrinólise, tPA e DD nos pacientes com complicações hemorrágicas. Particularmente, os pacientes com FHD apresentaram alterações mais significativas dos marcadores do aumento da permeabilidade microvascular em relação aos pacientes com DC. A diferença dos marcadores da permeabilidade vascular entre os pacientes com FHD e DC (com ou sem sangramento) foi mais evidente quando avaliada a razão entre VEGF-A/sVEGF-R2. As Tabelas 4 e 5 trazem os valores em mediana e percentis 25/75 das variáveis estudadas. As tabelas também destacam, em **negrito**, os valores de P que foram significativamente diferentes entre os grupos estudados. A Figura 15 ilustra os achados encontrados.

Tabela 4: Resumos das variáveis estudadas, os resultados estão expressos em mediana e percentis 25 e 75. No destaque em negrito estão as variáveis cujos resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey.

Variável estudada	Controles (n=67)	DC sem sangramento (n=33)	DC com sangramento (n=26)	FHD (n=8)	P
TNF-α (pg/mL)	1,8 (1,4- 3,0)	2,7 (1,8-7,8)	2,2 (1,7-3,2)	2,6 (1,6-7,1)	0,02
TM (ng/mL)	5,1 (4,2-6,2)	5,9 (4,9-7,0)	6,35 (5,3-7,3)	6,99 (5,5-13,8)	0,001
FVW-Ag(U/mL)	111,1 (71,8-156,1)	237,1 (149,3-330,5)	240,5 (203,6-319,2)	227 (179,3-313,5)	<0,001
FVW/CBA (%)	81,84 (57,8-131,3)	167 (119,0-220,0)	182 (154,2-198,1)	174,5 (137,6-234,0)	<0,001
AD13-Ag (%)	718,2 (615,4-897,3)	685,4 (522,3-791,1)	849,9 (694,2-1046,0)	766,7 (536,2-902,6)	0,38
AD13/CBA (%)	83,74 (58,6-121,6)	44,26 (36,8-59,7)	74,77 (60,7-111,8)	76,43 (50,2-95,4)	<0,001
VEGFA(pg/mL)	34,8 (24,5-50,4)	38,33 (26,8-60,3)	31,99 (16,8-60,4)	55,9 (32,9-74,4)	0,26
sVEGFR1(pg/m)	107,9(78,5-128,8)	178 (140,1-221,3)	220,6 (150,5-338,3)	258 (135,6-328,8)	<0,001
sVEGFR2(pg/m)	4637 (3899-5598)	4609 (3979-5305)	3741 (2719-4312)	2682 (1357-4287)	<0,001
VEGF/sVEGF-R2	0,7393 (0,16-2,6)	0,8336 (0,09-2,75)	0,8843 (0,2-5,55)	1,815 (0,86-10,9)	0,005
tPA (ng/ml)	4,05 (1,9-5,5)	5,2 (3,1-11,6)	11,75 (6,5-21,7)	13,43 (7,1-26,2)	<0,001
DD (ng/ml)	515,5 (393,2-681,5)	1028 (679,2-2272,0)	1979 (1644-2735)	2146 (1439-3310)	<0,001
PAI-1 (ng/ml)	8,35 (5,1-11,5)	8,1 (3,8-12,7)	7,6 (5,3-15,8)	8,4 (3,5-23,6)	0,68

Tabela 5: Resumos dos valores obtidos com o TGT, os resultados estão expressos em mediana e percentis 25 e 75. No destaque em negrito estão as variáveis cujos resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey.

	Controles N=20	DC N=8	DC sangramento N=9	FHD N=7	P
Lag phase (min)	9,1 (7,8-10,3)	12,35 (10,3-13,1)	12,1 (9,8-13,3)	11,1 (8,1-16,1)	0,05
Índice de Velocidade	59,15 (40,8-101,2)	59,4 (31,5-64,7)	22 (14,0-56,6)	35,8 (12,5-58,9)	0,04
Pico de trombina (nM)	338,7 (291,3-463,1)	310,7 (253,2-386,3)	163,2 (111,0-354,1)	208,9 (119,3-322,6)	0,01
Trombina total (AUC)	3753 (3443-4068)	3591 (2797-3830)	2290 (1679-3769)	2341 (2153-3181)	0,005

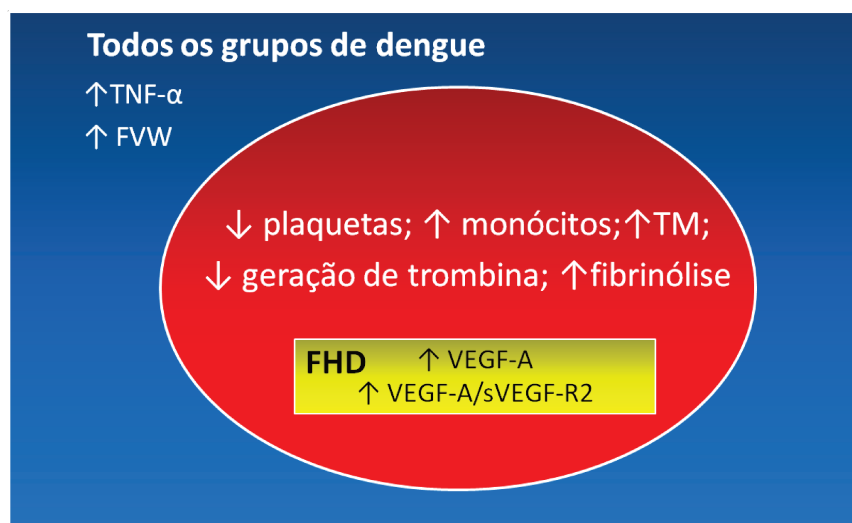


Figura 15: Esta figura ilustra os resultados encontrados pela análise laboratorial de inflamação, hemostasia e permeabilidade vascular dos pacientes com dengue.

5.9. Análise de correlação, regressão logística e curva ROC

5.9.1. Correlações

A plaquetopenia esteve correlacionada aos níveis circulantes dos diversos marcadores de ativação endotelial, permeabilidade microvascular e fibrinólise incluídos neste estudo. A Figura 16 ilustra os resultados estatisticamente significativos.

A gravidade do sangramento (leve/moderado) ou a presença de sangramentos múltiplos não apresentaram correlação com a contagem plaquetária, nem com os resultados das demais variáveis estudadas.

5.9.2. Regressão logística e curva ROC

Por causa do pequeno número de pacientes com FHD, os grupos de DC com sangramento e FHD foram avaliados em conjunto nas análises multivariada e curva ROC, com o objetivo de obtermos as variáveis mais significativamente envolvidas na coagulopatia da dengue.

Dentre as variáveis estudadas, foram associadas, de forma independente, com a ocorrência de complicações hemorrágicas: plaquetopenia (OR > 200; 95%IC=22-2000, P=0,0001), monocitose (OR=13,5; 95%IC=3,0-48,6, P=0,001) e aumento do DD (OR=14,9; 95% IC=2,4-90, P=0,003).

Os valores de corte que melhor discriminaram os casos de dengue com e sem sangramento foram: plaquetas < 67.500/mm³ (P<0,0001, 94% sensibilidade e 93% de especificidade) e monócitos > 714/mm³ (P<0,0001, 84% sensibilidade e 82% de especificidade).

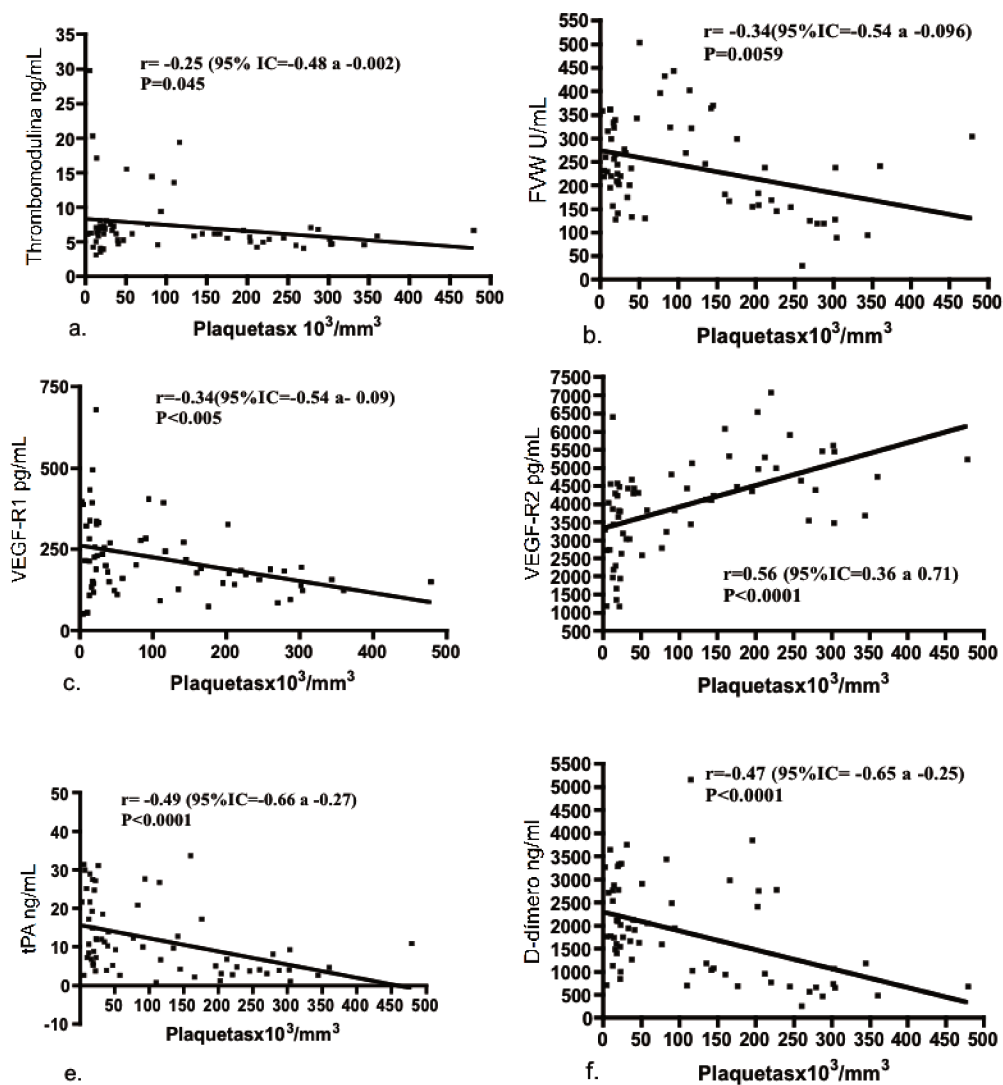


Figura 16: Correlação entre a contagem plaquetária e os marcadores de ativação endotelial, permeabilidade microvascular e fibrinólise. a. Correlação inversa com níveis de TM; b. correlação inversa com FVW; c. correlação inversa com sVEGF-R1; d. correlação inversa com sVEGF-R2; e. correlação inversa com tPA plasmático; f. Correlação inversa com DD plasmático.

6. Discussão

No presente estudo, foi demonstrado que pacientes com dengue podem apresentar episódios importantes de sangramento na ausência de evidências clínicas de aumento da permeabilidade vascular, e portanto, sem critérios estabelecidos pela OMS para o diagnóstico de FHD. A FHD é uma síndrome em que há predominantemente o aumento da permeabilidade vascular, associado à plaquetopenia e à tendência hemorrágica, e é a manifestação grave da dengue reconhecida pela classificação tradicional [1, 8], amplamente utilizada em todas as regiões do mundo e o principal objeto de estudos acerca da fisiopatogenia da dengue grave. Neste estudo, uma parcela dos pacientes classificados como DC, que seria a manifestação não grave da dengue, necessitou de internação e cuidados médicos específicos e portanto comportaram-se como pacientes potencialmente graves. Esta observação reforça o conceito atual de que pacientes com dengue, mesmo sem preencher critérios para FHD, podem apresentar complicações graves, além daquelas que são descritas na FHD, e que devem ser avaliados individualmente a fim de se oferecer tratamento adequado. Também evidencia que os critérios de classificação atualmente empregados podem não contemplar todas as variáveis importantes na prática clínico-laboratorial, que direcionam para o melhor tratamento da doença.

De fato, na última década têm-se discutido a revisão da classificação tradicional da dengue [5, 43-47]. Em 2009, a OMS propôs uma nova classificação baseada na identificação de sinais e sintomas de alerta de gravidade[2]. Esta classificação embora mais sensível do que a vigente para a identificação dos casos graves da doença e mais condizente com uma classificação que permita uma melhor correlação entre o estadiamento clínico e a classificação epidemiológica [45-47], ainda não foi implantada mundialmente. As críticas à nova classificação amparam-se no fato de que ela baseia-se predominantemente em critérios clínicos e em poucos critérios laboratoriais (mensuração do hematócrito, contagem de plaquetas), que muitos parâmetros seriam pouco precisos e que os variados mecanismos responsáveis por cada complicação detectada não estariam totalmente compreendidos [48]. Desta forma, a compreensão destes mecanismos poderia auxiliar tanto na melhor caracterização clínica, quanto possibilitar a

detecção precoce das complicações hemorrágicas, contribuindo, desta maneira, para o incremento da assistência prestada ao paciente com dengue. Além disso, poderia contribuir também para uma classificação mais condizente da doença que caracterizasse os diferentes espectros da dengue.

Particularmente, a hemorragia é a complicação comumente relatada nos pacientes com dengue. A classificação tradicional da dengue destaca os sangramentos como sendo um componente clínico da FHD e dá pouca ênfase aos sangramentos que ocorrem em casos não classificados como esta síndrome[1]. Porém, as manifestações hemorrágicas podem ser mais complexas, seja na magnitude clínica seja nos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos, como se observa, por exemplo no fato de que nos adultos os sangramentos podem ser mais exuberantes do que nas crianças [49] e podem ocorrer independentemente do aumento da permeabilidade vascular [50]. Estas observações levantam pelo menos duas questões: em primeiro lugar, que as manifestações hemorrágicas e o extravasamento plasmático não necessariamente ocorram em conjunto, como descrito na síndrome da FHD. Em segundo lugar, que a classificação tradicional da dengue pode subestimar alguns casos graves por não identificar todo o espectro de complicações da doença.

O foco deste estudo foi destacar em um grupo de pacientes com diagnóstico de dengue os achados clínicos, particularmente os hemorrágicos, e investigar os mecanismos fisiopatológicos que pudessem contribuir para o entendimento dessas complicações, como as alterações da hemostasia, inflamação e permeabilidade microvascular. A descrição dos mecanismos fisiopatológicos associados aos sangramentos da dengue pode vir a contribuir para uma melhor compreensão do espectro de complicações da dengue e possibilitar a definição de novos possíveis métodos diagnósticos e terapêuticos no manejo de pacientes com tal complicação.

Em relação à inflamação e à ativação endotelial, observamos que os níveis circulantes de TNF- α e de FVW-Ag foram semelhantes nos três grupos de dengue estudados. O aumento da TM plasmática foi mais evidente nos pacientes com complicações hemorrágicas, mas semelhante entre os pacientes com DC e

sangramento e FHD. Estes resultados foram diferentes dos anteriormente descritos na FHD. Estudos clínicos demonstraram que a inflamação e a ativação endotelial podem estar aumentadas principalmente em pacientes com FHD [16, 51]. De fato, a ativação das células endoteliais, pelo vírus ou pela inflamação, parece contribuir, em algum grau, para a patogênese inicial da FHD [38, 52-55], sendo responsável pela alteração da permeabilidade vascular e o extravasamento plasmático [52-55]. Diferentemente dos resultados do presente estudo, também já foi demonstrado em estudos clínicos anteriores que pode haver desbalanço entre FVW e ADAMTS13 nas formas graves da FHD, em que há choque hemodinâmico [56]. Entretanto, no presente estudo, o número de pacientes com FHD e com choque foi pequeno e isso poderia explicar, de certa maneira, a divergência entre os resultados aqui apresentados e alguns dados descritos na literatura. Desta forma, não podemos concluir que as complicações hemorrágicas não estão associadas à exacerbação da resposta inflamatória ou da atividade endotelial, porque inflamação e ativação endotelial são conceitos amplos que compreendem outros mecanismos complexos não abordados por este estudo. Por exemplo, outros marcadores da inflamação, que já foram descritos na patogênese da FHD, como interferon- γ e IL-6, não foram avaliados neste estudo [10, 51, 54]. Por outro lado, no presente estudo demonstrou-se haver aumento significativo dos monócitos nos pacientes com DC e sangramentos, e nos pacientes com FHD. Esta observação sugere que haja de fato uma exacerbação do processo inflamatório nos pacientes com apresentação clínica mais grave, em particular da resposta inflamatória celular. O aumento do número de monócitos no sangue dos pacientes que apresentaram formas hemorrágicas da dengue é um achado bastante interessante, que pode ser objeto de avaliação futura.

Em relação aos marcadores da permeabilidade microvascular, o aumento do VEGF-A é descrito principalmente em pacientes com quebra importante da barreira endotelial, como os com choque séptico [57]. A tendência ao aumento do VEGF-A observada nos pacientes com FHD deste estudo pode ser justificada pelo fato de que alguns (4 pacientes) apresentavam choque hemodinâmico. O significado clínico das alterações dos níveis circulantes dos receptores solúveis

sVEGF-R1 e sVEGF-R2 são porém menos conhecidas. Srikiatkachorn *et al* demonstraram que o vírus da dengue pode, *in vitro*, levar a diminuição da secreção do sVEGF-R2 pelas células endoteliais e que a queda do sVEGF-R2 estaria relacionada clinicamente com a carga viral e a ocorrência de FHD [13]. Então, a diminuição dos níveis circulantes do sVEGF-R2 nos pacientes com dengue, em particular nos com FHD, observada no presente estudo, corrobora os achados de estudos anteriores e sugere que o sVEGF-R2 pode controlar a atividade do VEGF-A nesses pacientes, determinando a ocorrência e a magnitude do extravasamento plasmático. Além disso, a diferença da razão VEGF-A/sVEGF-R2 entre pacientes com FHD e DC com sangramento pode sugerir que estes últimos possivelmente não apresentam um processo importante de aumento da permeabilidade vascular.

Em relação aos mecanismos de hemostasia, os pacientes com complicações hemorrágicas estudados apresentaram predominantemente plaquetopenia, diminuição da geração de trombina, aumento do tPA e do dímero D. Estas alterações foram observadas tanto nos pacientes com DC e sangramentos como nos classificados como FHD.

A plaquetopenia tem sido considerada como um dos principais fatores responsáveis por eventos hemorrágicos na FHD [7] e como uma alteração laboratorial comum na DC [4, 49]. O presente estudo mostrou que a plaquetopenia foi associada a complicações hemorrágicas, levantando a hipótese de que pode ser uma causa importante de hemorragia também na DC. Muitos fatores podem contribuir para a ocorrência da plaquetopenia na dengue, como a resposta imunológica contra as plaquetas, diminuição da produção ou aumento do consumo plaquetário [37, 58-61]; no entanto, a avaliação das causas de trombocitopenia não foi objeto deste estudo.

As causas da coagulopatia na dengue ainda são não são totalmente elucidadas. Nos casos de FHD, a coagulopatia muitas vezes é atribuída à coagulação intravascular disseminada (CIVD) ou à perda de proteínas da coagulação para o espaço extravascular [62]. No presente estudo, pudemos observar que a geração de trombina, e portanto, a atividade da coagulação,

estava diminuída nos pacientes com complicações hemorrágicas da dengue, tanto nos classificados como DC como nos classificados como FHD. A constatação da diminuição da geração de trombina foi um achado interessante e, em certo grau novo, uma vez que não há registros anteriores na literatura médica que demonstrem esta anormalidade em pacientes com dengue.

O resultado final da geração de trombina traduz o balanço entre as atividades dos fatores da coagulação e dos anticoagulantes naturais [63]; teoricamente a diminuição da geração da trombina poderia traduzir uma deficiência de fatores da coagulação ou uma ativação dos anticoagulantes naturais. Como exemplo, estudos clínicos que avaliaram o TGT em pacientes com doença hepática crônica demonstraram que, apesar dos pacientes apresentarem prolongamento do TTPA e TP, a geração de trombina era normal [64]. Os autores discutem que a diminuição da atividade dos anticoagulantes naturais poderia, nesses pacientes, estar compensando a deficiência dos fatores de coagulação, promovendo assim uma geração normal de trombina. É possível que um mecanismo semelhante ocorra na dengue.

No âmbito da dengue, a ativação das vias de coagulação é controversa [65]. As alterações do TTPA, TP e tempo de trombina são muito variáveis e inespecíficas [40, 41, 66] e as atividades dos fatores de coagulação aparentemente permanecem normais [40]. Pode ocorrer, porém, conforme demonstrado em alguns estudos clínicos, a alteração da atividade dos anticoagulantes naturais pela dengue [16]. O aumento da TM plasmática, como observado nos pacientes deste estudo e de estudos anteriores, pode contribuir para a ativação da proteína C, aumentando assim a atividade deste anticoagulante natural [67]. Além disso, foi demonstrado que o vírus da dengue, *in vitro*, pode se ligar diretamente à protrombina, inibindo sua ativação em trombina [68]. Portanto, é possível que a diminuição da geração da trombina observada nos pacientes com complicações hemorrágicas ocorra pela ativação dos anticoagulantes naturais ou por inibição direta da protrombina.

A ativação das vias de sinalização pró e anticoagulantes ainda pode ser estudada com mais detalhes, entretanto, neste estudo pudemos demonstrar, pelo

TGT, que a coagulação em pacientes com complicações hemorrágicas da dengue está prejudicada porque a produção da trombina está diminuída.

Outra alteração da hemostasia observada por este estudo nos pacientes com complicações hemorrágicas, tanto os classificados como DC quanto nos classificados como FHD, foi a hiperfibrinólise. A ativação da fibrinólise havia sido demonstrada anteriormente nos pacientes com FHD, mas não nos com DC [16, 40]. É controverso, no entanto, se o estímulo para a hiperfibrinólise na dengue seria primário ou secundário a uma CIVD [66, 69]. Apesar do aumento do DD sugerir haver fibrinólise secundária, não se pode excluir a hipótese de fibrinólise primária, porque observamos também o aumento do tPA e diminuição da produção da trombina nos pacientes. O aumento do tPA plasmático reflete o aumento da secreção desta proteína pelas células endoteliais, o que corrobora a hipótese de ativação primária da fibrinólise após estímulo endotelial. Além disso, não encontramos sinais de CIVD nos pacientes, pois os resultados do TTPA e do TP estavam dentro da faixa normal ou discretamente aumentados e não havia esquizócitos no sangue periférico.

Em resumo, os resultados deste estudo demonstraram que os casos de DC que manifestam sangramentos espontâneos podem apresentar alterações nas contagens plaquetárias, diminuição da produção da trombina e hiperfibrinólise. Esses distúrbios da hemostasia foram detectados de forma semelhante nos casos de FHD, mas não nos casos de DC sem sangramentos. Clinicamente e laboratorialmente o que diferiu os pacientes com FHD dos demais foram os sinais, clínicos e laboratoriais, sugestivos do aumento da permeabilidade vascular.

Estes resultados são consistentes porque vão ao encontro do conceito atual de que a dengue se manifesta clinicamente não de forma dicotômica, como propõe a classificação tradicional da OMS, mas de forma bastante heterogênea com um espectro de complicações clínicas de diferentes graus de gravidade. Os resultados deste estudo também demonstram que diferentes mecanismos patológicos podem estar presentes nos pacientes classificados como DC e que podem estar correlacionados a apresentação clínica da doença. Desta forma,

estes resultados corroboram, de certa forma, a importância da revisão da classificação dengue proposta pela OMS em 2009.

É importante, também, indicar algumas limitações que podem ser encontradas neste estudo, como o tamanho amostral, o desenho caso-controle e a classificação da dengue utilizada. O tamanho amostral é justificado porque os pacientes foram selecionados em uma fase tardia da doença e muitos perderam o seguimento antes do tempo de inclusão. De fato, a perda do seguimento médico antes do período de inclusão para o estudo foi o principal problema enfrentado durante a seleção dos pacientes. Muitos pacientes foram comunicados para o estudo, mas não compareceram na data agendada para a coleta das amostras ou retornaram às unidades de atendimento em um período tardio. No entanto, o número de sujeitos incluídos foi suficiente para o tamanho amostral do estudo ter poder estatístico de demonstrar as diferenças dos parâmetros de permeabilidade microvascular, coagulação e fibrinólise entre os três grupos de pacientes estudados, provavelmente porque estas diferenças eram muito significativas. Além do problema da inclusão dos indivíduos, o desenho do estudo pode ter gerado alguns vieses. Primeiramente, a seleção dos controles saudáveis pode gerar problemas pelo fato de os controles não serem provenientes da mesma região geográfica dos pacientes, porém, a seleção de controles saudáveis para dengue também não poderia ser feita na família ou dentre os vizinhos dos pacientes porque, como o foco da doença é regional (na casa ou nos locais do entorno da residência), haveria risco de serem incluídos como controles saudáveis pessoas com dengue assintomática. A inclusão de doentes de populações e epidemias distintas também pode gerar vieses, porque pode haver algumas particularidades de cada população ou de cada sorotipo viral infectante que não foram consideradas para a análise dos dados. Por ser um estudo caso-controle, é possível ainda que a gravidade da coagulopatia nos casos classificados como DC tenha sido superestimada porque todos os pacientes com sangramentos foram selecionados dentre os pacientes hospitalizados; casos menos graves, sem a necessidade de hospitalização, não foram detectados. Isso pode explicar as profundas diferenças nos números de plaquetas observadas entre os pacientes

com DC com e sem sangramento. Por fim, a classificação da dengue utilizada neste estudo pode gerar dúvidas quanto a divisão dos casos de DC com sangramento e FHD, uma vez que esses pacientes apresentam características clínicas semelhantes. Porém os pacientes foram submetidos aos exames recomendados pela OMS e muitos não preenchiam os critérios necessários para a classificação como FHD, particularmente pela ausência de sinais de aumento permeabilidade vascular. Posteriormente, este estudo também mostrou que os pacientes classificados como DC com sangramentos, diferentemente dos classificados como FHD, não tinham alterações muito significativas dos marcadores de permeabilidade vascular. Esse achado de certa forma confirmou a classificação utilizada e pôde mostrar que os pacientes classificados como DC com sangramentos não estavam experimentando uma quebra importante da barreira endotelial.

Apesar dessas limitações, os resultados deste estudo demonstraram que os pacientes classificados como DC podem apresentar uma coagulopatia complexa, semelhante a que ocorre nos classificados como FHD, porém sem manifestarem sinais tão significativos de aumento da permeabilidade vascular. Os resultados mostraram também que a classificação tradicional da dengue pode não identificar os casos com distúrbios da hemostasia relacionados a formas potencialmente graves da doença. Os achados deste estudo são importantes porque discriminam e analisam de forma original a complicação hemorrágica como uma complicação primária da dengue, independente da síndrome de extravasamento plasmático, sugerindo quais mecanismos fisiopatológicos poderiam ser responsáveis pelos sangramentos. A tendência mundial é de que as complicações da dengue sejam descritas clinicamente não mais como uma síndrome única, mas como um espectro de complicações clínicas independentes e concomitantes. Este estudo foi um dos primeiros a buscar embasamentos fisiopatológicos que expliquem a nova descrição clínica da dengue.

7. Considerações finais

Pacientes adultos classificados como DC com sangramentos apresentaram, neste estudo: diminuição do número de plaquetas, coagulopatia por diminuição da geração de trombina e hiperfibrinólise, sem sinais significativos de aumento da permeabilidade vascular. Pacientes com FHD apresentaram alterações hemostáticas semelhantes porém com evidências clínicas e laboratoriais sugestivas de aumento da permeabilidade vascular. Plaquetopenia, monocitose e aumento do DD foram os principais fatores relacionados às complicações hemorrágicas da dengue.

A identificação de que alguns pacientes classificados como DC podem apresentar um padrão complexo de coagulopatia reforça a hipótese de que esse grupo é bastante heterogêneo. Os resultados deste estudo evidenciam que a classificação atualmente empregada para a dengue não corresponde às alterações clinico-laboratoriais encontradas em vários pacientes, e que uma revisão desses critérios seria importante para definição de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para uma conduta mais adequada.

8. Conclusões

A hemorragia da dengue está associada a uma coagulopatia complexa que inclui: plaquetopenia, hipocoagulabilidade (por diminuição da geração de trombina) e hiperfibrinólise . Alguns quadros hemorrágicos podem ocorrer na ausência de sinais clínicos e laboratoriais significativos de aumento da permeabilidade vascular.

9. Referências

1. WHO: Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. In: World Health Organization; Geneva; 1997.
2. WHO: Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. In: World Health Organization; Geneva; 2009.
3. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. In.: Ministério da Saúde; 2012.
4. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K: The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007, 39(2):76-81.
5. Rigau-Perez JG: Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 2006, 6(5):297-302.
6. Srikiatkhachorn A: Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 2009, 102(6):1042-1049.
7. Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martinez-Vega RA: Predictors of spontaneous bleeding in patients with acute febrile syndrome from a dengue endemic area. *J Clin Virol* 2010, 49(1):11-15.
8. WHO: Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever. In: World Health Organization: 1975; Geneva; 1975.
9. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B: Dengue. *N Engl J Med* 2012, 366(15):1423-1432.
10. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC: Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001, 8(5):377-388.
11. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, ten CH, van der Meer JW: The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* 2002, 87(1):42-46.
12. Jiang Z, Tang X, Xiao R, Jiang L, Chen X: Dengue virus regulates the expression of hemostasis-related molecules in human vein endothelial cells. *J Infect* 2007, 55(2):e23-28.
13. Srikiatkhachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, Ennis FA, Rothman AL: Virus-induced decline in soluble vascular

- endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol* 2007, 81(4):1592-1600.
14. Wen DZ, Dittman WA, Ye RD, Deaven LL, Majerus PW, Sadler JE: Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987, 26(14):4350-4357.
 15. Chen LC, Shyu HW, Lin HM, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Yeh TM: Dengue virus induces thrombomodulin expression in human endothelial cells and monocytes in vitro. *J Infect* 2009, 58(5):368-374.
 16. Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J: Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost* 2007, 97(4):627-634.
 17. Moake JL: von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2004, 41(1):4-14.
 18. Dong JF: Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost* 2005, 3(8):1710-1716.
 19. Levy GG, Motto DG, Ginsburg D: ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005, 106(1):11-17.
 20. Moake JL: Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002, 347(8):589-600.
 21. Bongers TN, de Maat MP, van Goor ML, Bhagwanbali V, van Vliet HH, Gomez Garcia EB, Dippel DW, Leebeek FW: High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke* 2006, 37(11):2672-2677.
 22. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF: Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004, 104(1):100-106.
 23. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E: Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001, 98(9):2730-2735.

24. Mazetto BM, Orsi FL, Barnabe A, De Paula EV, Flores-Nascimento MC, Annichino-Bizzacchi JM: Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2012, 130(6):889-893.
25. Rossi FC, Angerami RN, de Paula EV, Orsi FL, Shang D, del Guercio VM, Resende MR, Annichino-Bizzacchi JM, da Silva LJ, Zheng XL et al: A novel association of acquired ADAMTS13 inhibitor and acute dengue virus infection. *Transfusion* 2010, 50(1):208-212.
26. Gavard J, Gutkind JS: VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 2006, 8(11):1223-1234.
27. Pickkers P, Sprong T, Eijk L, Hoeven H, Smits P, Deuren M: Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock* 2005, 24(6):508-512.
28. van der Flier M, van Leeuwen H, van Kessel K, Kimpen J, Hoepelman A, Geelen S: Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock* 2005, 23(1):35-38.
29. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N: Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001, 276(5):3222-3230.
30. Kendall RL, Wang G, Thomas KA: Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226(2):324-328.
31. Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodyak N, Kang PM, Tolti L, Belikoff B, Buras J et al: Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* 2006, 203(6):1447-1458.
32. Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS: A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004, 2(6):315-326.

33. Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG: Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, 43(1):99-102.
34. Seet RC, Chow AW, Quek AM, Chan YH, Lim EC: Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int J Infect Dis* 2009, 13(5):e248-253.
35. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG: Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002, 100(1):148-152.
36. Cesarman-Maus G, Hajjar KA: Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005, 129(3):307-321.
37. Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R: Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* 1995, 213(1):254-257.
38. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA: Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol* 2007, 81(11):5518-5526.
39. Wills B, Tran VN, Nguyen TH, Truong TT, Tran TN, Nguyen MD, Tran VD, Nguyen VV, Dinh TT, Farrar J: Hemostatic changes in Vietnamese children with mild dengue correlate with the severity of vascular leakage rather than bleeding. *Am J Trop Med Hyg* 2009, 81(4):638-644.
40. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, Yeh TM: Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol* 2001, 63(3):247-251.
41. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, Green S, Nisalak A, Endy TP, Vaughn DW et al: Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65(6):840-847.
42. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, Perng GC: Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood* 2010, 115(9):1823-1834.

43. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ: The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 2006, 368(9530):170-173.
44. Halstead SB: Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 2006, 20(6):407-415.
45. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Janisch T, Kroeger A, Lum LC, Martinez E et al: Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health* 2011.
46. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, Segarra CS, Pleites Sandoval EB, Mishra A, Laksono IS et al: Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis* 2011, 11:106.
47. Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, Harris E: Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, 5(11):e1397.
48. Halstead SB: Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health* 2012, 32 Suppl 1:5-9.
49. Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, Videa E, Rodriguez Y, Perez MA, Cuadra R et al: Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005, 73(6):1063-1070.
50. Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S: Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health* 2004, 9(9):1022-1029.
51. Butthep P, Chanhakan S, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Pattanapanyasat K, Chuansumrit A: Elevated soluble thrombomodulin in the febrile stage related to patients at risk for dengue shock syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2006, 25(10):894-897.

52. Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, Burrell CJ, Li P: Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol* 2003, 69(4):521-528.
53. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM: Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 2000, 63(1-2):71-75.
54. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS: Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 2003, 69(1):82-90.
55. Basu A, Chaturvedi UC: Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, 53(3):287-299.
56. Djamiatun K, van der Ven AJ, de Groot PG, Faradz SM, Hapsari D, Dolmans WM, Sebastian S, Fijnheer R, de Mast Q: Severe dengue is associated with consumption of von Willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6(5):e1628.
57. Alves BE, Montalvao SA, Aranha FJ, Lorand-Metze I, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula EV: Time-course of sFlt-1 and VEGF-A release in neutropenic patients with sepsis and septic shock: a prospective study. *J Transl Med* 2011, 9:23.
58. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS: Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol* 2001, 63(2):143-149.
59. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD, Jr., Kumatori A, Moji K, Alonzo MT et al: Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol* 2004, 138(2):299-303.
60. de Castro RA, de Castro JA, Barez MY, Frias MV, Dixit J, Genereux M: Thrombocytopenia associated with dengue hemorrhagic fever responds to intravenous administration of anti-D (Rh(0)-D) immune globulin. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 76(4):737-742.

61. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA: Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost* 2013, 11(5):951-962.
62. Funahara Y, Sumarmo, Shirahata A, Setiabudy-Dharma R: DHF characterized by acute type DIC with increased vascular permeability. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987, 18(3):346-350.
63. Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM: Acquired coagulation disorders: revisited using global coagulation/anticoagulation testing. *Br J Haematol* 2009, 147(1):77-82.
64. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Dell'Era A, Iannuzzi F, Aghemo A, Mannucci PM: Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method. *Hepatology* 2010, 52(1):249-255.
65. Mairuhu AT, Mac Gillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes DP, van Gorp EC: Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. *Lancet Infect Dis* 2003, 3(1):33-41.
66. Van Gorp EC, Setiati TE, Mairuhu AT, Suharti C, Cate Ht H, Dolmans WM, Van Der Meer JW, Hack CE, Brandjes DP: Impaired fibrinolysis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 2002, 67(4):549-554.
67. Uszynski M: Amniotic fluid embolism: the complication of known pathomechanism but without pathogenetic therapy? *Thromb Haemost* 2009, 101(5):795-796.
68. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM: Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J Infect* 2011, 64(3):325-334.
69. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Chambers M, Stepniowska K, Farrar JJ et al: Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis* 2002, 35(3):277-285.

10. Anexos

10.1. Anexo I – Termos de consentimento

10.1.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os adultos

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE FATORES DA HEMOSTASIA PRIMÁRIA E SUA CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA NAS FEBRES HEMORRÁGICAS.

Responsáveis pelo projeto: *Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi*

Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____

_____, CEP: _____, Telefon

es: _____, concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Este estudo pretende quantificar a presença e a atividade de fatores que agem principalmente na primeira fase da coagulação, chamada de hemostasia primária, que podem estar envolvidos na evolução clínica de pacientes com Dengue e outras Febres Hemorrágicas. Nestas doenças, o risco de complicações hemorrágicas, como a queda no número de plaquetas e o aparecimento de sangramentos, é grande e pode envolver uma série de fatores, entre os quais aqueles que pretendemos identificar em seu sangue. Os resultados da dosagem desses fatores serão comparados com sua evolução clínica durante a infecção e após 3 (três) meses da remissão. Isso poderá ajudar na compreensão do porquê pacientes que contraem Dengue, ou outras Febres Hemorrágicas, apresentam formas clínicas diferentes da doença, desde brandas até severamente hemorrágicas.

Para tanto, coletaremos 20mL de sangue, em duas ocasiões distintas, previamente estabelecidas, para exames laboratoriais destes fatores: (1ª) ao diagnóstico da Dengue ou Febre Hemorrágica, (2ª) após 3 (três) meses de remissão dos sintomas. O sangue será coletado por punção de veia periférica, juntamente com a coleta de outros exames que são necessários para seu tratamento (exemplo: hemograma, coagulograma, sorologias, etc).

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes.

A participação neste estudo poderá trazer benefício no tratamento atual da sua doença porque, caso seja encontrada alguma alteração nos exames que realizaremos em seu sangue, o tratamento da sua doença poderá ser mudado para um tratamento mais específico e efetivo. Esse tratamento diferenciado, se for indicado, poderá evitar o aparecimento de complicações mais graves, inclusive fatais, da sua doença.

Além disso, sua participação também contribuirá para o melhor entendimento desta doença e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em conseqüência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. Caso o (a) senhor (a) não concorde ou desista, a qualquer momento, de participar do estudo não haverá nenhum prejuízo ao tratamento da sua doença em curso.
4. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
5. O material sanguíneo plasma colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. ☐ Sim ☐ Não
6. Caso seja realizado um outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.
7. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
8. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: 19-3521-8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi
Médica Pesquisadora
Fone: (19) 3521-8601

Fernanda L. Andrade Orsi
Médica pesquisadora
Fone: (19) 3521-8756

10.1.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para controles

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE FATORES DA HEMOSTASIA PRIMÁRIA E SUA CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA NAS FEBRES HEMORRÁGICAS.

Responsáveis pelo projeto: Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Eu, _____,

Idade: _____, RG: _____, HC/AIH/RH: _____,

Residente à Rua/Av. _____

_____, CEP: _____, Telefon

es: _____, concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Este estudo pretende quantificar a presença e a atividade de fatores que agem principalmente na primeira fase da coagulação, chamada de hemostasia primária, que podem estar envolvidos na evolução clínica de pacientes com Dengue e outras Febres Hemorrágicas. Nestas doenças, o risco de complicações hemorrágicas, como a queda no número de plaquetas e o aparecimento de sangramentos, é grande e pode envolver uma série de fatores, entre os quais aqueles que pretendemos identificar no sangue das pessoas acometidas por essas doenças. Os resultados da dosagem desses fatores serão comparados com a evolução clínica dos doentes durante a infecção e após 3 (três) meses da remissão. Isso poderá ajudar na compreensão do porquê os pacientes que contraem Dengue, ou outras Febres Hemorrágicas, apresentam formas clínicas diferentes da doença, desde brandas até severamente hemorrágicas.

Entretanto, para termos confiança de que as alterações que por ventura encontraremos no sangue das pessoas acometidas pela Dengue, ou outras Febres Hemorrágicas, estão diretamente relacionadas a doença que apresentam, precisamos estudar os mesmos fatores no sangue de pessoas saudáveis, como o(a) senhor(a).

Para tanto, coletaremos 20mL de sangue do(a) senhor(a) em uma única ocasião, através da punção de veia periférica.

Os riscos a que o senhor(a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá a(o) senhor(a) nenhum outro risco importante.

Sua participação no estudo contribuirá para o melhor entendimento das Febres Hemorrágicas, como a Dengue, e conseqüentemente para a proposta de um tratamento mais eficaz para este tipo de doença no futuro. Além disso, o(a) senhor(a) será informado e orientado pessoalmente pelos médicos responsáveis por este estudo caso seja encontrada alguma alteração nos seus exames.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao complexo hospitalar, exclusivamente para a pesquisa
2. O (a) senhor (a), como voluntário, estará livre para negar-se a participar do estudo ou desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O (a) senhor (a), como voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. O plasma, material sanguíneo, colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que seu plasma possa ser armazenado. ☐ Sim ☐ Não
5. Caso seja realizado um outro estudo com este plasma, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo só será realizado após nova autorização do comitê de ética em pesquisa desta instituição.

6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
 7. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.
- Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: 19-3521-8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Joyce M. Annichino-Bizzacchi
Médico Pesquisador
Fone: (19) 3521-8601

Fernanda L. Andrade Orsi
Médica pesquisadora
Fone: (19) 3521-8756

10.2. Anexo II – Questionário padrão dos pacientes

Identificação	N. estudo	N. SINAN	Hospital	R H	Sexo
Idade	R	Interação	Dt da interação	Início sintomas	1o sintoma
Febre	DI	Duração	Cefaléia	DI	Duração
Prostração	DI	Duração	Exantema	DI	Duração
Náusea/vômitos	DI	Duração	Diarréia	DI	Duração
Dor abdominal	DI	Duração	Hepatomegalia	DI	Duração
Esplenomegalia	DI	Duração	Outros sinais/sintomas	DI	Duração
Manif Hemorrágicas	DI	Duração	Prova do laço	Dt realização	PL - Resultado
Petéquias	DI	Duração	Sufusões	DI	Duração
Hemor TGI	Gengivorragia	Hematêmese	Melena	DI	Duração
Hemor Trato Respiratório	Epistaxe	Hemoptise	DI	Duração	Hemor TGU
vaginal	hematúria	DI	Duração	Hipotensão	Menor PA
DI	Duração	Choque	DI	Duração	Icterícia
DI	Duração	Manifest neurológicas	DI	Duração	Ins. renal
DI	Duração	Insuf Resp	DI	Duração	Evolução
Dia evolução	Menor PA	Dia menor PA	Sorologia	Data coleta	Resultado
Isolamento viral	Data coleta	Resultado	Outro exame	Data coleta	Resultado
Duração interação	Duração sintomas	Classificação final	Se FHD: qual grau?	Se complicada: qual complicação?	Transfusão
Data	produto?	Maior Hb	Data	Menor Hb	Data
Maior Ht	Data	Menor Ht	Data	☐ Ht	Menor plaq
Data	Menor Albumina	Data	Leuco	Data	Neutr
Data	Linf	Data	Linfó atípicos	Data	Esquizócitos
Data	Ret	Data	LDH	Data	Derrame cavitário

10.3. Anexo III – Publicações e apresentações em congressos

- 1- Orsi F, Angerami R, Mazetto B, Quaino S, de Paula EV, Annichino-Bizzachi JM. “Endothelial Activation , FVW and ADAMTS 13 imbalance; and Fibrinolysis Impairment in Adults with Dengue Fever with Bleeding Complications”, 2011. American Society of Hematology (ASH) abstract #3325. Apresentação em poster Publicado nos anais do congresso. BLOOD 118 (21), 1429.
- 2- Orsi F, Angerami R, Mazetto B, Quaino S, de Paula EV, Annichino-Bizzachi JM. “Impaired Thrombin Generation in Patients with Dengue”, 2012. American Society of Hematology (ASH) abstract #3325. Apresentação em poster. Publicado nos anais do congresso. BLOOD 120 (21).
- 3- Rossi FC, Angerami RN, de Paula EV, Orsi FL, Shang D, del Guercio VM, Resende MR, Annichino-Bizzacchi JM, da Silva LJ, Zheng XL *et al*: A novel association of acquired ADAMTS13 inhibitor and acute dengue virus infection. *Transfusion* 2010, 50(1):208-212
- 4- Orsi A Fernanda, Angerami N Rodrigo, Mazetto M Bruna, Quaino KP Susan, Santiago-Bassora Fernanda, Castro Vagner, de Paula V Erich, Annichino-Bizzacchi M Joyce. Reduced thrombin formation and excessive fibrinolysis are associated with bleeding complications in patients with dengue fever: a case¿control study comparing dengue fever patients with and without bleeding manifestations. BMC Infectious Diseases 2013,13:350.

10.1. Anexo IV – Artigo publicado no BMC Infectious Diseases

Orsi et al. *BMC Infectious Diseases* 2013, **13**:350
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/350>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Reduced thrombin formation and excessive fibrinolysis are associated with bleeding complications in patients with dengue fever: a case-control study comparing dengue fever patients with and without bleeding manifestations

Fernanda A Orsi^{1*}, Rodrigo N Angerami^{2,4}, Bruna M Mazetto¹, Susan KP Quaino¹, Fernanda Santiago-Bassora¹, Vagner Castro¹, Erich V de Paula^{1,3} and Joyce M Annichino-Bizzacchi^{1,4}

Abstract

Background: Dengue cases have been classified according to disease severity into dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). Although DF is considered a non-severe manifestation of dengue, it has been recently demonstrated that DF represents a heterogeneous group of patients with varied clinical complications and grades of severity. Particularly, bleeding complications, commonly associated to DHF, can be detected in half of the patients with DF. Although a frequent complication, the causes of bleedings in DF have not been fully addressed. Thus, the aim of this study was to perform a comprehensive evaluation of possible pathophysiological mechanisms that could contribute to the bleeding tendency observed in patients with DF.

Methods: This is a case-control study that enrolled adults with DF without bleeding and adults with DF and bleeding complications during the defervescence period. Healthy controls were also included. Peripheral blood counts, inflammatory, fibrinolysis and endothelial cell activation markers, and thrombin generation were evaluated in patients and controls.

Results: We included 33 adults with DF without complications, 26 adults with DF and bleeding and 67 healthy controls. Bleeding episodes were mild in 15 (57.6%) and moderate in 11 (42.4%) patients, 8 (30.7%) patients had bleedings in multiple sites. Patients with DF and bleedings had lower platelet counts than DF without bleeding (median = 19,500 vs. 203,500/mm³, $P < 0.0001$). Levels of TNF- α , thrombomodulin and VWF were significantly increased in the two dengue groups than in healthy controls, but similar between patients with and without bleedings. Plasma levels of tPA and D-dimer were significantly increased in patients with bleedings (median tPA levels were 4.5, 5.2, 11.7 ng/ml, $P < 0.0001$ and median D-dimer levels were 515.5, 1028 and 1927 ng/ml, $P < 0.0001$). The thrombin generation test showed that patients with bleeding complications had reduced thrombin formation (total thrombin generated were 3753.4 in controls, 3367.5 in non-bleeding and 2274.5nM in bleeding patients, $P < 0.002$).

(Continued on next page)

* Correspondence: ferorsi@unicamp.br

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480 – 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Orsi et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Continued from previous page)

Conclusions: DF can manifest with spontaneous bleedings, which are associated with specific coagulation and fibrinolysis profiles that are not significantly present in DF without this complication. Particularly, thrombocytopenia, excessive fibrinolysis and reduced thrombin formation may contribute to the bleeding manifestations in DF.

Keywords: Acquired coagulation disorders, Fibrinolytic disorders, Thrombin generation, Infectious diseases, Dengue fever, Dengue hemorrhagic fever, Thrombocytopenia

Background

Dengue is caused by a common arthropod-born virus with worldwide distribution. It is estimated that 50 million individuals are infected annually and 2.5 billion live in endemic areas [1]. Dengue is a febrile illness, with non-specific clinical manifestations that include fever, headache and myalgia, known as dengue fever (DF) [2]. Some patients, however, can manifest a severe form of the disease characterized by plasma leakage, thrombocytopenia, bleedings and shock, denominated dengue hemorrhagic fever (DHF) [3-7]. Although associated with DHF, bleeding complications may also occur in cases of DF [8]. In fact, it is estimated that about 50% of patients with DF can present bleeding episodes [9]. However, in contrast to patients with DHF, bleeding manifestations in patients with DF occur in the absence of plasma leakage [3,10]. Yet, the pathogenesis of bleeding complications in DF has not been fully addressed.

The aim of this study was to evaluate possible pathophysiological mechanisms that contribute to bleeding complications in adults with DF. We performed a comprehensive evaluation of hemostasis in a well-selected population of adults with DF, with and without bleeding manifestations. Particularly, the evaluation of blood coagulation included the thrombin generation test (TGT), a global hemostasis assay that mimics the physiological process of coagulation and is more specific to determine the integrity of clot formation [11]. Markers of fibrinolysis, inflammation and endothelial activation were also evaluated.

Methods

Study design and patients selection

This is a case-control study that included patients with suspected dengue infection with bleeding complications and patients without bleeding complications. Patients were selected during distinct outbreaks of dengue in the cities of Rio de Janeiro and Campinas, Brazil, in 2 different hospitals and 3 primary care medical centers. The study duration was from January 2008 until May 2011, but patients were included mainly in 2008 and 2010, when two important dengue outbreaks occurred in the Southeast Brazil, particularly in Rio de Janeiro and in Campinas, respectively. According to the Brazilian Ministry of Health the

predominant circulating dengue serotype was DENV-2 in that period.

The inclusion criteria for the group with bleeding complications were suspected dengue infection, age over 17 years old, presence of spontaneous bleeding and being in the defervescence period. For the group without bleeding complications, the inclusion criteria were suspected dengue infection, age over 17 years old, no spontaneous bleeding and being in the defervescence period. The defervescence period was detected according to the medical follow-up at the primary care medical centers or at the hospitals; it was determined as the period when the body temperature tended to diminish. Usually, patients were enrolled for the study on the day they were tested for dengue serology (after the 5th day of fever), according to the Brazilian Ministry of Health protocol. Patients who met the inclusion criteria were reported to the study personnel who evaluated if the patients could be enrolled for the study. After the enrollment, patients were followed-up prospectively until recovery.

Exclusion criteria were the same for both groups: chronic kidney or liver disease, autoimmune or chronic infectious disease, hematological disorders and neoplasia. Pregnant women were excluded. Patients who lost follow-up after the enrollment were excluded. When the serology results were available, patients with negative anti-dengue IgM were excluded.

The serological tests for the detection of anti-dengue virus IgM and IgG antibodies were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and were conducted at the referral laboratories of public health. Patients with positive anti-IgM were diagnosed with dengue. All confirmed or discharged cases of dengue infection were in accordance with the disease notification by the official health authority.

The positive serological anti-dengue IgM test was used to confirm dengue diagnosis because the high sensibility of this test, above 80%, after the 5th day of symptoms. Also, the sensibilities of the virus antigen isolation or the virus acid nucleic detection by PCR are lower at the defervescence period, when our patients were enrolled for the study. In the Southeast Brazil other flaviviruses are not endemic and the population is not immunized against yellow fever virus, so the specificity of dengue serology is high.

Three hundred and nineteen (319) adult patients were attended with suspected dengue infection in the period of the study, 63 patients were in the hospitals because of complications and 256 were attended in the primary care medical centers. From the 63 patients with complications attended in the hospitals, we were able to include in the study 40 patients because 3 had other complications than bleedings, 6 refused to participate and 14 had signs of convalescence (bleeding cessation and platelet rise). Anti-dengue IgM was positive in 34 out of 40 patients with bleeding complications included. From those, 8 were classified as dengue hemorrhagic fever, so 26 patients with dengue fever and spontaneous bleeding were included for the final analyses. From the 256 patients attended in the primary care centers, 178 patients were not enrolled for the study because they were in the febrile phase of dengue, did not collect anti-dengue serology or lost the follow-up. One patient had chronic myeloid leukemia, one patient had previous history of idiopathic thrombocytopenic purpura, three patients had chronic kidney disease, 18 refused to participate and five blood samples arrived in the laboratory after 2 hours from the blood collection, they were all excluded from the study. From the 50 patients included, 33 had positive anti-dengue IgM (Figure 1).

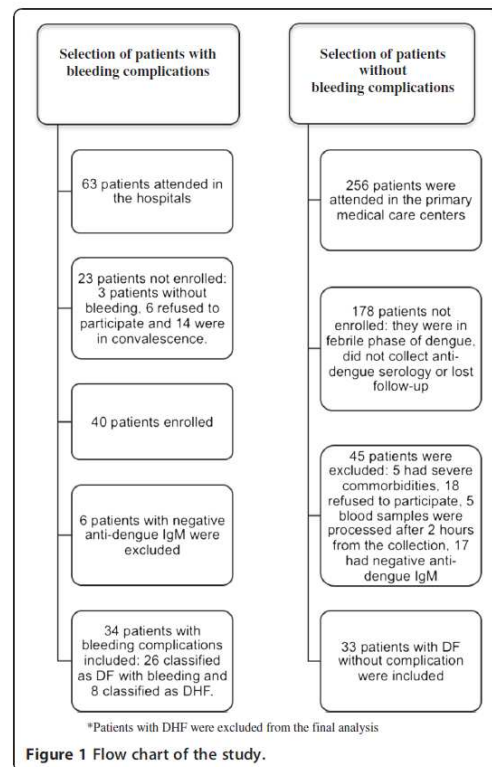
Healthy volunteers matched to patients by gender, age, ethnicity and ABO blood group were selected from the community as a control group. Exclusion criteria used for controls were equal to those used for patients.

The study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration. This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of the University of Campinas (UNICAMP) and was registered in the Brazilian National System of Information about Research Ethics (SISNEP) under the number CAAE = 0170.0.146.000-08 (<http://portal2.saude.gov.br/sisnep/>). A written informed consent was obtained from patients, or their attending relatives, and from controls.

Patients' clinical evaluation

Patients were prospectively evaluated by the same physician until they recovered from symptoms. Clinical evaluations and serial blood counts were performed from the enrollment day to the convalescence period to detect the changings in platelet counts and hematocrit. Previous blood counts from the febrile phase were retrospectively collected and used as basal parameters. The decreasing body temperature was evaluated clinically. Clinical and epidemiological data were recorded in a structured study form. Patients in the febrile phase or in convalescence were not selected for the study.

Dengue cases were classified according to the World Health Organization (WHO) [7], by two different expert physicians, into DF or DHF. The following exams were



performed for DHF diagnosis: serial hematocrit, chest X-ray, ultrasound and serum albumin levels. Blood counts were performed daily for inpatients and at intervals depending on the clinical course for outpatients. Chest X-ray, ultrasound and albumin were performed once during the hospitalization period. All patients with complicated dengue were hospitalized. Patients who were diagnosed with DHF on the day of the enrollment or during the follow-up were further excluded from the analysis, in accordance with our aim to evaluate only patients with DF (Figure 1).

Bleeding episodes were classified as mild, moderate and severe; this classification was adapted from WHO's definitions [1]. Petechiae, ecchymosis and gingivorrhagia were considered mild bleeding symptoms. Bleeding episodes of gastrointestinal (GI) or genitourinary (GU) tracts were considered moderate. Bleeding episodes accompanied by hemodynamic instability were classified as severe bleedings.

Laboratory procedures

Three tubes of blood samples were obtained from the participants at the time of their enrollment for the study.

Two citrate and one EDTA-containing tubes were collected and samples were immediately centrifuged. Serum and platelet-poor plasma (PPP) obtained were separated and stored at -80°C within two hours from the collection. Control samples were processed following the same protocols and by the same investigator.

Markers of inflammation and endothelial cells activation

Serum levels of tumor necrosis factor (TNF)- α were performed to evaluate the degree of inflammatory activation. Plasma levels of thrombomodulin (TM) and von Willebrand factor (VWF) were evaluated as markers of endothelial activation. Commercial ELISA kits were used to determine serum levels of TNF- α (Quantikine HS, R&D Systems, Minneapolis, USA) and plasma levels of TM (Imunobind Trombomodulin ELISA kit, American Diagnostica INC, Stamford, USA). VWF antigen (VWF-Ag) levels in plasma were measured by ELISA as previously described [12].

Fibrinolysis pathways

Specific markers of fibrinolysis, such as tissue plasminogen activator (tPA), D-dimer and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) were measured. Commercial ELISA assays were used to determine the plasma levels of D-dimer (IMUCLONE™ D-dimer, American Diagnostica INC, Stamford, USA), tPA (IMUBIND® tPA, American Diagnostica INC, Stamford, USA) and PAI-1 (PAI-1, American Diagnostica INC, Stamford, USA).

Thrombin generation test

Blood coagulation was evaluated by TGT in PPP using a commercial fluorescent assay (Technothrombin® TGA, Technoclone GmbH, Vienna, Austria) and fluorescence was read using FLx800 Fluorescence Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). Four parameters of TGT were evaluated: the lag phase, which is the time from the beginning of the experiment to the first burst in thrombin formation, the thrombin peak, which is the maximum concentration of thrombin formed, the velocity-index, which is the amount of thrombin formed per minute and the total thrombin formed, represented by area under curve (AUC).

Statistical analysis

Categorical variables were compared using Chi-square or Fisher exact test. To compare continuous variables between two groups Wilcoxon-Mann-Whitney test was used. To compare continuous variables among three or more groups Kruskal-Wallis analysis was used, followed by Tukey test to identify the differences, when necessary. The Spearman rank correlation was used to determine the correlation between variables. Multiple logistic regression and ROC curve were performed to identify variables associated

to bleeding tendencies and to estimate optimal cut-off values, respectively.

Data were analyzed using SPSS for Windows version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and SAS System for Windows version 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Graphics were made using GraphPad Prism, version 4 for Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Twenty-six adults with DF and spontaneous bleeding complications, 33 adults with DF without spontaneous bleeding and 67 healthy controls were included in the study. Eight patients had DHF and were excluded from the analysis. Twelve patients (20.3%) presented positive anti-dengue IgG serology.

Demographic parameters such as age, gender, ethnicity and ABO blood group were similar between patients and controls (Table 1). The most common comorbidity was hypertension, reported by 9 patients; patients with severe comorbidities were excluded.

Patients without bleeding complications were treated in the primary care medical centers where daily medical examination was performed and periodic blood counts obtained. In these centers, patients were treated with oral or parenteral hydration. Those with bleeding complications were hospitalized. Bleeding episodes were mild in 15 (57.6%) patients and moderate in 11 (42.4%) patients. Eight (30.7%) patients had bleedings in multiple sites. There were no severe bleedings. Patients with mild bleeding had predominantly disseminated ecchymosis and petechiae ($n = 8$), gingivorrhagia ($n = 5$) and epistaxis ($n = 2$). Patients with moderate bleeding had predominantly hypermenorrhea ($n = 4$), hematuria ($n = 3$), melena ($n = 2$), hemoptysis ($n = 1$) and hematemesis ($n = 1$). Only one patient received platelet transfusion. No other patient received blood transfusions. No hemostatic agents were administered to the patients. Patients were mainly treated with crystalloids replacement. Table 2 contains the detailed clinical presentation of all patients.

Blood count parameters

Platelets and monocytes counts were significantly altered among patients with bleedings (Figure 2). Median platelet counts were 203,500/mm³ (range 77,000-479,000/mm³) in patients without bleedings and 19,500/mm³ (range 3,000-58,000/mm³) in patients with DF and bleedings ($P < 0.0001$). Median monocytes counts were 497/mm³ (range 203-2320/mm³) in patients without bleedings and 1,320/mm³ (range 496-2597/mm³) in patients with bleedings ($P < 0.0001$). The degree of thrombocytopenia was statistically correlated to the degree of monocytosis ($r = -0.45$, $P < 0.0001$).

Table 1 Demographic data of patients and controls

Demographic data	Controls (n = 67)	DF without bleeding (n = 33)	DF with bleeding (n = 26)	P
Female/Male (n)	35/32	13/20	15/11	0.32
Age (median and range), years	38.5 (19–76)	39 (17 – 71)	41 (20 – 79)	0.45
Caucasian/Afrodescendent (n)	38/29	24/9	12/14	0.11
ABO "non-O"/ ABO "O" (n)	36/31	19/14	10/16	0.30

This table shows the demographic parameters, as gender, age, ethnicity and ABO blood group evaluated in patients and controls.

Median hemoglobin levels were within the normal range among patient groups and there was no difference in hematocrit levels (median values = 43% vs. 43% in non-bleeding vs. bleeding patients, $P = 0.48$).

Inflammatory and endothelial cell activation markers

Serum levels of TNF- α , plasma TM and VWF were increased in DF patients compared to controls. However, the levels of these markers were similar between non-bleeding and bleeding patients (Figure 3).

Markers of fibrinolysis activity

D-dimer and tPA levels were significantly increased in patients with bleedings. Median D-dimer levels were 515.5, 1028 and 1927 ng/ml in controls, non-bleeding and bleeding patients, respectively ($P < 0.0001$). Median tPA levels were 4.5, 5.2, 11.7 ng/ml in controls, non-bleeding and bleeding patients, respectively ($P < 0.0001$) (Figure 4). Plasma PAI-1 levels were similar among controls and DF groups (data not shown).

Thrombocytopenia was significantly correlated to higher D-dimer ($r = -0.47$, $P < 0.0001$) and tPA levels ($r = -0.49$, $P < 0.0001$) in patients.

Blood coagulation parameters

Patients presented normal, or slightly altered, aPTT and PT. Median aPTT was 30.3" (range 27.5" – 47.5") and median PT was 14.4" (range 13 – 24"). TGT was performed in 18 patients with DF (9 with bleedings and 9 without) and 24 controls. The first consecutive patients included in each group were selected for TGT analysis. All TGT parameters were significantly impaired in patients with bleedings, compared to controls. Particularly, decreased values of thrombin peak and AUC were observed in patients with bleedings ($P = 0.014$ and $P = 0.008$, respectively), suggesting that the thrombin formation is decreased in these patients (Table 3).

Evaluation of independent parameters associated with bleeding tendencies

Using a multivariate logistic regression analysis, thrombocytopenia (OR = 200; 95%CI = 22-1000; $P = 0.0003$), monocytosis (OR = 13.5; 95%CI = 3.0-48.6; $P < 0.0001$) and elevated D-dimer (OR = 14.9; 95%CI = 2.4-90; $P = 0.0032$) were the strongest parameters associated to bleeding complications in DF.

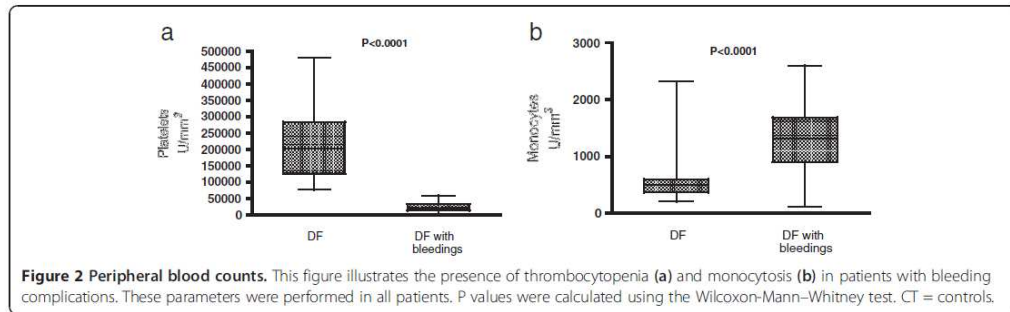
ROC curve analysis showed that the cut-off values that better discriminated cases of DF with bleeding

Table 2 Clinical presentation of patients with dengue fever

Clinical presentation	Patients with DF without bleeding (n = 33)	Patients with DF with bleeding (n = 26)	P
Days with symptoms, median (range)	7 (5–10)	7 (2–15)	0.68
Days in the hospital, median (range)	0	2 (1–10)	N.A.
Fever	33 (100)	26 (100)	N.A.
Headache	17 (51.5)	22 (84.6)	0.01
Prostration	20 (60.6)	24 (92.3)	0.006
Nausea or Vomiting, n (%)	11 (33.3)	13 (50)	0.28
Abdominal pain, n (%)	3 (9)	12 (46)	0.002
Liver enlargement, n (%)	0	2 (7.7)	N.A.
Hypotension, n (%)	0	2 (7.7)	N.A.
Syncope, n (%)	0	2 (7.7)	N.A.
Acute renal insufficiency, n (%)	0	1 (3.8)	N.A.
Signs of plasma leakage, n (%)	0	0	N.A.
Shock, n (%)	0	0	N.A.

N.A. = not applicable.

This table shows patients' symptoms and signs of dengue at the first clinical evaluation or during the follow-up.



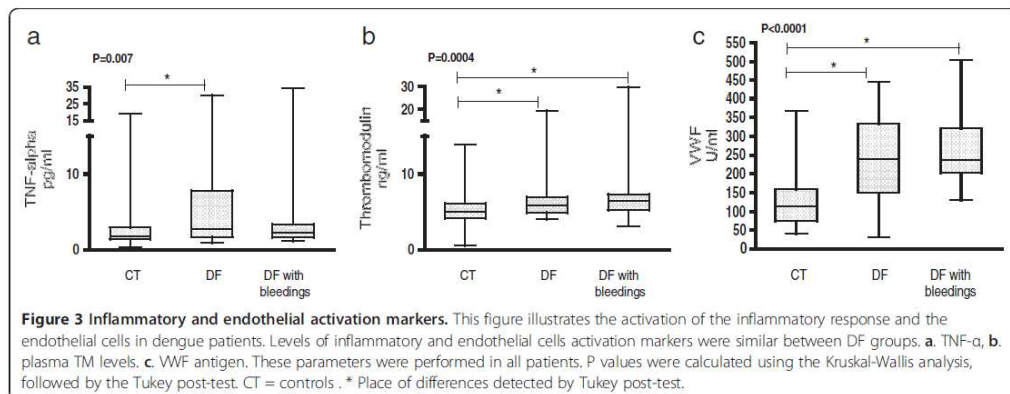
complications were platelets $< 67,000/\text{mm}^3$ ($P < 0.0001$, 94% sensitivity and 93% specificity) and monocytes $> 715/\text{mm}^3$ ($P < 0.0001$, 84% sensitivity and 82% specificity).

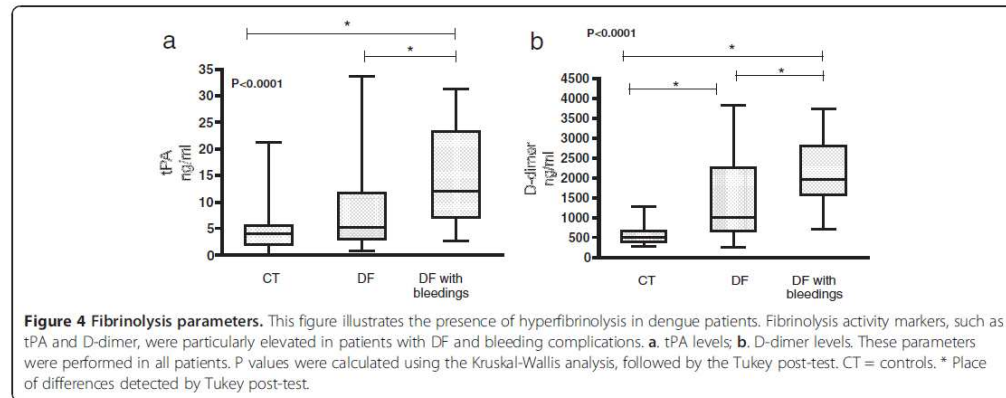
Discussion

In this study, patients with dengue that did not fulfill the WHO criteria of DHF, and could otherwise be considered as having a non-severe form of the disease, indeed presented bleeding episodes and needed special medical care for that. This observation highlights that patients with DF can present bleeding complications and reinforces the importance of a detailed clinical evaluation of these patients in order to deliver appropriate care. Nowadays, efforts have been done to implement a new dengue classification, capable to identify signs of potential severe manifestations of the disease [1,2,8,10,13-16]. This new classification, however, is based only on clinical evaluations, many parameters are subjective and the varied mechanisms responsible for each detected complication are not fully understood. Understanding these mechanisms could promote the early identification of patients with severe disease and ultimately improve diagnostic and therapeutic strategies, thus limiting morbidity and mortality.

Bleeding complication is the most common complication reported in patients with DF. Particularly, adult patients may present more bleeding manifestations than children [17], and the bleeding manifestations in adults may occur in the absence of plasma leakage [18]. These observations raise at least two questions: first, that bleeding manifestations and plasma leakage may be two independent complications of dengue. Second, that the dengue hemorrhagic fever classification may underestimate some severe cases of dengue. In this study, we focused on evaluating the bleeding complication in adults with DF.

Thrombocytopenia has been considered as an important factor responsible for bleeding events in DHF [19] and as a common laboratory changing of DF [2,17]. The present study showed that thrombocytopenia was strongly associated with bleeding complications; raising the hypothesis that thrombocytopenia is not only a laboratory changing in DF but also an important cause of bleeding. Many factors can contribute to the onset of thrombocytopenia in DF, from a reactive immune response against the platelets to decreased platelet production [20-23], however the evaluation of the causes of thrombocytopenia is beyond the scope of our study. Besides thrombocytopenia, absolute





monocytosis was also observed in patients with DF and bleedings.

Our results have demonstrated, as well, that the levels of TNF- α , TM and VWF were similar among DF patients, regardless of the presence of bleeding complications. These results were different from those previously described in DHF. Clinical studies have shown that markers of inflammation and endothelial cells activation may be increased in patients with DHF [5,24]. Indeed, the activation of the endothelial cells, by the virus or by inflammation, seems to be the initial pathogenesis of DHF [25]. Endothelial activation may be responsible for plasma leakage and shock [25-29]. However, our findings suggest that inflammation and endothelial cells activation may not be associated with bleeding complications of DF. Possibly, the fact that our patients with bleeding complications did not have an overt plasma leakage syndrome may explain the lack of increased inflammation and endothelial activation found in these patients, compared to those without bleedings.

On the other hand, excessive fibrinolysis was associated with bleeding complications in our patients with DF, since plasma levels of tPA and D-dimer were

significantly increased in these patients. In a similar way, previous studies have demonstrated that patients with DHF may also present with excessive fibrinolysis [4,5,30-32]. It has been controversial, however, whether the stimulus for fibrinolysis in dengue was secondary to a disseminated intravascular coagulation (DIC) [4,17,33].

We failed to detect signs of DIC in patients with DF and bleedings. All blood smears from these patients were analyzed and none presented schistocytes. Results of aPTT and PT were within the normal range or only slightly increased. Furthermore, thrombin generation was reduced in patients with DF and bleeding.

Indeed, the finding of decreased thrombin generation is interesting since, to our knowledge, this coagulation abnormality has not been confirmed in dengue before. The relationship between dengue and activation of coagulation pathways is controversial [31]. Prolonged aPTT was demonstrated in some but not all clinical studies [4,9] while PT and thrombin time seem to remain unchanged [9]. We could confirm, by TGT, that the coagulation in patients with bleedings was impaired and the thrombin generation was decreased. However, the causes of this coagulation disorder remain speculative.

Table 3 Thrombin generation test

TGT	Controls (n = 24)	DF without bleeding (n = 9)	DF with bleeding (n = 9)	P #
Lag phase *	9.1 (1.8-17.7)	12.3 (3.1 -17.1) [±]	11.6 (3.1 - 22.6) [±]	0.021
Thrombin peak (nM) *	338.7 (145.1 - 512.2)	251.6 (70.7 - 432.3)	199.0 (15.9 - 394.1) [±]	0.009
Velocity-index *	59.1 (13.3 - 128.7)	37.3 (6.7 - 193.2)	32.8 (12.6-73.0) [±]	0.033
AUC *	3753.4 (2228.9-4905.6)	3367.5 (1512.9-4284.2)	2274.5 (180.5-3829.2) [±]	0.002

* Median and range.

P values were calculated using the Kruskal-Wallis analysis.

* Tukey test detected places of differences. In lag phase the differences were in DF with and also in DF without bleeding vs. controls. In thrombin peak, velocity index and AUC the difference was significant in the DF with bleeding group vs. controls.

This table shows the TGT results in controls and patients with DF, according to the presence of bleeding manifestations.

Clinical studies that evaluated the TGT in patients with chronic liver disorder demonstrated that, besides the prolonged aPTT and PT, the thrombin generation was normal [34]. The authors hypothesized that the decreased activity of the natural anticoagulants might compensate the impaired activity of coagulation factors in these patients, promoting thus a normal thrombin formation [35]. It is possible that a similar mechanism may happen in dengue and the activity of natural anticoagulants may be important in determining the thrombin formation. It has been shown previously that the activity of coagulation factors seem to remain within the normal range [33], although the activity of natural anticoagulants may be altered in some cases of dengue [5,30]. Plasma TM is a molecule that contributes to the activation of C protein [36], thus the increased levels of plasma TM observed in our patients with dengue could contribute to the activation this natural anticoagulant. Furthermore, it has been recently demonstrated that DV could bind directly to prothrombin and inhibit its activation to thrombin [37]. Regardless of the cause of the coagulopathy, our study showed that the coagulation activity may be decreased during dengue infections and that this disorder may be associated with bleeding complications.

Our results have demonstrated not only that cases of DF can manifest with spontaneous bleedings, but also that these cases may be accompanied by changes in peripheral blood counts, coagulation and fibrinolysis that may be not significantly detected in DF without this complication. In regard of bleeding complications, these results are consistent with the new concept that DF represents a clinically heterogeneous group of patients and also raise the hypothesis that different pathological mechanisms may be present in these patients. These findings corroborate the importance of the revision of dengue classification proposed by WHO in 2009.

It is important, also, to point out some limitations that may be found in this study. It is possible that some results have been influenced by the selection process and the sample size. This is a case-control study and patients were included as they presented or not the outcome of interest. However, a great number of patients could not be enrolled; this posed a problem to the selection process because some patients with possibly important clinical manifestations may have been missed. Of note, all patients with bleeding complications were selected from the hospitals and presented potentially severe manifestations of dengue, less severe cases were not detected among patients with bleedings. Because of that, it is possible that the severity of the coagulopathy associated with DF with bleedings may have been overestimated. This may also explain that, although being small, the sample size had enough power

to show some differences in coagulation and fibrinolysis markers, particularly the profound differences in platelet counts observed between bleeding and non-bleeding patients. On the other hand, the careful selection approach warranted the standardization of the period of the disease analyzed and the well characterization of the groups. Another potential limitation is the fact that the dengue groups came from different medical settings. However the patients represent the same population, their follow-up and treatment were performed according to the WHO recommendations regardless of where they were treated. Although this study is not a controlled clinical trial, the methodology for patients' diagnosis and classification used in this study reflects the medical care on dengue in the real world. Because of that, this study raises problems on dengue risk stratification that appear in the current clinical practices. Also, this study demonstrated some laboratory abnormalities that could be detected during the patients' regular follow-up. The evaluation of patients in a real world set, without the need to follow a strict agenda of tests as in the controlled clinical trials, may represent an advantage because it allows the detection of laboratory changes that might possibly be reproduced in the clinical practice.

Moreover, our findings reflect dengue presentation and treatment in Brazil. The clinical presentation of dengue might be slightly different in Latin America than observed in Southeast Asia, because of the importance of non-dengue hemorrhagic fever syndromes for disease morbidity [8,16]. Therefore, our findings may raise important informations since the risk stratification of dengue has been reevaluated in order to englobe the disease presentation worldwide.

Finally, even with these limitations, our results highlighted that patients classified as dengue fever may present a complex coagulopathy and that the traditional dengue classification may not identify cases with laboratory abnormalities associated with potentially severe forms of the disease.

Conclusions

Bleeding complications in patients with DF were associated with thrombocytopenia, reduced thrombin formation and increased fibrinolysis activity. The identification that some patients with DF may present with a complex coagulopathy reinforces the heterogeneity of this group and the necessity for new strategies to better stratify the severity of the disease for clinical and epidemiological purposes. Furthermore, understanding the bleeding disorders associated with dengue could lead to new diagnostic and therapeutic strategies in DF, since, until recently, bleeding manifestations had been studied mainly in patients with DHF.

Abbreviations

Ng: Nanograms; ml: Milliliters; Pg: Picograms; S: Seconds; mm3: Cubic millimeters; DV: Dengue virus; DF: Dengue fever; DHF: Dengue hemorrhagic fever; WHO: World Health Organization; aPTT: Activated partial thromboplastin time; PT: Prothrombin time; TGT: Thrombin generation test; tPA: Tissue plasminogen activator; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor; TM: Thrombomodulin; VWF: Von Willebrand factor; TNF: Tumor necrosis factor; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FAO designed the study, enrolled patients, recorded clinical data, performed laboratory and statistical analysis, analyzed data and contributed to the manuscript production; RNA contributed with the design of the study, enrolled patients, recorded clinical data, contributed to data analysis and to manuscript production; BMM, SKP and FS performed laboratory analysis, VC contributed to patients enrollment and reviewed the manuscript, EVP contributed to the manuscript production, JMA designed the study, analyzed data and contributed to manuscript production. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Andre Ribas Freitas, coordinator of the city program for dengue control in Campinas, for contacting the city hospitals in Campinas and Rio de Janeiro and the healthy professionals of General Hospital of Ipanema, Clinical Hospital of Unicamp, Madre Theodora Hospital, Medical Center of Boa Esperança and Medical Center of Jardim Conceição for contacting the patients to participate in the study. The Hematology and Hemotherapy Center – Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue CNPq/MCT/FAPESP). This work received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Nº: 2008/11518-2).

Author details

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480 – 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ²Epidemiological Surveillance Center, Hospital of Clinics, University of Campinas, Campinas, Brazil. ³Department of Clinical Pathology, University of Campinas, Campinas, Brazil. ⁴Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Received: 22 December 2012 Accepted: 25 July 2013
Published: 28 July 2013

References

- WHO: *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva: World Health Organization; 2009.
- Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujjarat D, Siripanichgon K: **The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection.** *J Clin Virol* 2007, **39**(2):76–81.
- Binh PT, Matheus S, Huong VT, Deparis X, Marechal V: **Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults.** *J Clin Virol* 2009, **45**(4):276–280.
- Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, Chau NV, Chambers M, Stepniowska K, Farrar JJ, et al: **Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome.** *Clin Infect Dis* 2002, **35**(3):277–285.
- Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J: **Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection.** *Thromb Haemost* 2007, **97**(4):627–634.
- Wills B, Tran VN, Nguyen TH, Truong TT, Tran TN, Nguyen MD, Tran VD, Nguyen W, Dinh TT, Farrar J: **Hemostatic changes in Vietnamese children with mild dengue correlate with the severity of vascular leakage rather than bleeding.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**(4):638–644.
- WHO: *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Rigau-Perez JG: **Severe dengue: the need for new case definitions.** *Lancet Infect Dis* 2006, **6**(5):297–302.

- Krishnamurti C, Kalayanaraj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, Green S, Nisalak A, Endy TP, Vaughn DW, et al: **Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**(6):840–847.
- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ: **The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment.** *Lancet* 2006, **368**(9530):170–173.
- Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, Sivasava A: **Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders.** *Haemophilia* 2010, **5**(16):85–92.
- Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lammle B, Furlan M: **Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP).** *Thromb Haemost* 1999, **82**(5):1386–1389.
- Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Janisch T, Kroeger A, Lum LC, Martinez E, et al: **Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries.** *Trop Med Int Health* 2011, **16**(8):936–948.
- Barniol J, Gaczowski R, Barbato EV, Da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, Segarra CS, Pleites Sandoval EB, Mishra A, Laksono IS, et al: **Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries.** *BMC Infect Dis* 2011, **11**:106.
- Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, Harris E: **Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**(11):e1397.
- Halstead SB: **Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?** *Rev Panam Salud Publica* 2006, **20**(6):407–415.
- Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborio SJ, Mercado JC, Videia E, Rodriguez Y, Perez MA, Cuadra R, et al: **Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**(6):1063–1070.
- Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowornwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S: **Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**(9):1022–1029.
- Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martinez-Vega RA: **Predictors of spontaneous bleeding in patients with acute febrile syndrome from a dengue endemic area.** *J Clin Virol* 2010, **49**(1):11–15.
- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R: **Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets.** *Virology* 1995, **213**(1):254–257.
- Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS: **Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients.** *J Med Virol* 2001, **63**(2):143–149.
- De Castro RA, De Castro JA, Barez MY, Frias MV, Dixit J, Genereux M: **Thrombocytopenia associated with dengue hemorrhagic fever responds to intravenous administration of anti-D (Rh(0)-D) immune globulin.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(4):737–742.
- Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, et al: **Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections.** *Clin Exp Immunol* 2004, **138**(2):299–303.
- Butthep P, Chunhakan S, Tangnaratchakiet K, Yoksan S, Pattanapanyasat K, Chuansumrit A: **Elevated soluble thrombomodulin in the febrile stage related to patients at risk for dengue shock syndrome.** *Pediatr Infect Dis J* 2006, **25**(10):894–897.
- Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, Burrell CJ, Li P: **Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers.** *J Med Virol* 2003, **69**(4):521–528.
- Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM: **Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **63**(1–2):71–75.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS: **Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage.** *J Med Virol* 2003, **69**(1):82–90.
- Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA: **Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage.** *J Virol* 2007, **81**(11):5518–5526.

29. Basu A, Chaturvedi UC: **Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, **53**(3):287–299.
30. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, Yeh TM: **Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection.** *J Med Virol* 2001, **63**(3):247–251.
31. Mairuhu AT, Mac Gillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, Ten Cate H, Brandjes DP, Van Gorp EC: **Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence.** *Lancet Infect Dis* 2003, **3**(1):33–41.
32. Van Gorp EC, Setiati TE, Mairuhu AT, Suharti C, Cate Ht H, Dolmans WM, Van Der Meer JW, Hack CE, Brandjes DP: **Impaired fibrinolysis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.** *J Med Virol* 2002, **67**(4):549–554.
33. Funahara Y, Sumarmo, Shirahata A, Setiabudy-Dharma R: **DHF characterized by acute type DIC with increased vascular permeability.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987, **18**(3):346–350.
34. Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM: **Acquired coagulation disorders: revisited using global coagulation/anticoagulation testing.** *Br J Haematol* 2009, **147**(1):77–82.
35. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Dell'Era A, Iannuzzi F, Aghemo A, Mannucci PM: **Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method.** *Hepatology* 2010, **52**(1):249–255.
36. Uszynski M: **Amniotic fluid embolism: the complication of known pathomechanism but without pathogenetic therapy?** *Thromb Haemost* 2009, **101**(5):795–796.
37. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM: **Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation.** *J Infect* 2011, **64**(3):325–334.

doi:10.1186/1471-2334-13-350

Cite this article as: Orsi et al.: Reduced thrombin formation and excessive fibrinolysis are associated with bleeding complications in patients with dengue fever: a case-control study comparing dengue fever patients with and without bleeding manifestations. *BMC Infectious Diseases* 2013 **13**:350.