Caroline Marcondes Ferreira

**Potencial de geração de trombina e sua relação com o
tempo de protrombina em pacientes com cirrose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Caroline Marcondes
Potencial de geração de trombina e sua relação com
o tempo de protrombina em pacientes com cirrose /
Caroline Marcondes Ferreira. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Alberto Queiroz Farias.

Descritores: 1.Coagulação sanguínea 2.Tempo de
protrombina 3.Testes de coagulação sanguínea 4.Geração
de trombina 5.Hemorragia 6.Cirrose 7.Hepatopatias

USP/FM/DBD-392/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Amalia Carlos Antonio Ferreira e Luciano Marcondes Ferreira, que cumpriram seu papel com excelência e nas inseguranças ainda acertavam.

Ao meu amigo e companheiro Alexandre Veloso Ribeiro, que nas alegrias e nas tristezas soube estar ao meu lado, me ouvindo e me apoiando com paciência. Sua presença foi essencial nessa jornada.

E à minha irmã Luciana Marcondes Ferreira, que está sempre ao meu redor se dedicando em ser um bom exemplo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias, que em minhas mais simples dúvidas entre doenças hepáticas, coagulação e as duas juntas, não perdia o ânimo em me ensinar.

Ao Dr. Evandro de Oliveira Souza que deu início a este trabalho tornando o meu mais leve.

À Tania Rubia Flores da Rocha por sempre ser solícita quando eu tinha as mais variadas dúvidas na metodologia dos testes.

Aos pacientes que sem eles este trabalho não teria sido realizado.

À minha banca de Qualificação Profs. Élbio Antônio D'Amico, Daniel Ferraz de Campos Mazo e Paula Ribeiro Villaça por terem tornado aquela angustiante etapa um momento aprazível e de mais aprendizado.

À equipe de profissionais da secretaria do Departamento de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica que sempre que possível atendiam minhas solicitações.

Aos amigos feitos nessa caminhada: Enf. Danusa, Enf. Juliana, Enf. Beatriz, Enf. Patrícia, Psicóloga Mary Ellen, Dr. Miyake, Dra. Betânia, Dra. Renée, Dr. Rafael, Bióloga Luisa, Enf. Ramon e Farmacêutica Mariana que nos momentos de descontração compartilharam experiências para toda a vida.

Aos Profs. Flair José Carrilho e Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque por incentivar e viabilizar a pesquisa científica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

EPÍGRAFE

Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos.

Paulo Freire

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, *et al.* Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. 3º ed. São Paulo: divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas e títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Cirrose e suas complicações.....	2
1.2. Fisiologia da coagulação.....	5
1.3. Particularidades da coagulação na cirrose.....	10
1.4. Testes convencionais de hemostasia.....	12
1.5. Teste expandido de coagulação: <i>Calibrated Automated Thrombogram</i> (CAT).....	18
1.6. Racional do estudo e hipótese	21
2. OBJETIVO	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	25
3.1. Casuística	25
3.1.1. Critérios de inclusão	25
3.1.2. Critérios de exclusão	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Desenho do estudo.....	26
3.2.2. Período e local do estudo	26
3.2.3. Técnica de realização do tratamento endoscópico	27
3.2.4. Tratamentos permitidos	27
3.2.5. Características basais avaliadas nos pacientes	28
3.2.6. Coleta das amostras de sangue	28
3.2.7. Teste de geração de trombina (CAT - <i>Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®</i>).....	30
3.2.8. Interpretação do teste potencial de geração de trombina	32
3.2.9. Avaliação dos desfechos	34
3.2.10. Seguimento ambulatorial	34
3.3. Estatística	34
3.3.1. Cálculo do tamanho de amostra	34
3.3.2. Análise de dados	35
3.4. Aspectos éticos.....	35
4. RESULTADOS	37

4.1. International Normalized Ratio – INR.....	44
4.2. Geração de trombina	45
4.3. Sangramento.....	50
5. DISCUSSÃO.....	53
6- CONCLUSÕES.....	65
7. ANEXO	67
8. REFERÊNCIAS	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ETP - *Endogenous Thrombin Potential* (Potencial Trombina Endógena)

TM - Trombomodulina

INR - *International Normalized Ratio*

ISI - *International Sensitivity Index* (Índice Internacional de Sensibilidade)

MELD - *Model For End-Stage Liver Disease*

mM - milimolar

nM - nanomolar

pM - picomolar

PPP - plasma pobre em plaquetas

rETP - *Endogenous Thrombin Potential ratio* (relação do potencial de geração de trombina endógena com trombomodulina e sem trombomodulina)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das três fases da cascata da coagulação	6
Figura 2	Proteínas inibitórias e de regulação do sistema hemostático	8
Figura 3	Curva característica de geração de trombina	13
Figura 4	Trombograma do potencial de geração de trombina	20
Figura 5	<i>Calibrated Automated Thrombogram</i>	31
Figura 6	População do estudo e exclusões	38
Figura 7	Valores de bilirrubinas totais nos grupos	41
Figura 8	Valores de albumina nos grupos	42
Figura 9	Escore MELD nos grupos	43
Figura 10	ETP sem trombomodulina <i>versus</i> INR	48
Figura 11	ETP com trombomodulina <i>versus</i> INR	48
Figura 12	rETP (com e sem trombomodulina) <i>versus</i> INR	49
Figura 13	Child-Pugh <i>versus</i> INR <i>versus</i> rETP	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sangramento pós procedimento em pacientes com cirrose	16
Tabela 2	Parâmetros da geração de trombina em indivíduos sadios	33
Tabela 3	Características basais dos pacientes	39
Tabela 4	Características clínicas dos pacientes	40
Tabela 5	Etiologias da cirrose	44
Tabela 6	Parâmetros da geração de trombina e INR	45
Tabela 7	Correlação INR <i>versus</i> geração de trombina	51
Tabela 8	Características dos pacientes que evoluíram com sangramento	52

RESUMO

Ferreira CM. *Potencial de geração de trombina e sua relação com o tempo de protrombina em pacientes com cirrose* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Pacientes com cirrose possuem altos níveis de fator VIII e preservação da trombomodulina (TM) (ativador da proteína C) apesar da redução global nas concentrações dos procoagulantes e anticoagulantes naturais. Isto não é levado em conta no teste de TP/INR, o qual não requer a adição de trombomodulina. Deste modo, o TP/INR não é capaz de demonstrar a magnitude da geração de trombina, em condições similares à que ocorre *in vivo*. De fato, o teste de TP/INR mede o lado procoagulante e se correlaciona com somente 5% do total de trombina gerada. Nossa hipótese é que a geração de trombina está bem preservada na cirrose, ainda que avançada, apesar dos resultados anormais do TP/INR, os quais indicariam coagulopatia. **Objetivo:** correlacionar os resultados do teste TP/INR com a geração de trombina nos pacientes com cirrose após procedimento invasivo (ligadura elástica de varizes esofagianas – LEVE). **Pacientes e métodos:** 97 pacientes foram consecutivamente incluídos no estudo (58 homens; 54 ± 10 anos) e divididos em dois grupos $INR < 1,5$ e $INR \geq 1,5$. Todos os pacientes passaram por uma criteriosa análise clínica e laboratorial, que incluiu revisão dos prontuários, determinação do TP/INR e da geração de trombina (ETP) com e sem adição de trombomodulina e cálculo do rETP (razão dos resultados com e sem adição de trombomodulina). **Resultados:** Não houve diferença significativa na média dos valores de ETP sem trombomodulina no grupo $INR < 1,5$ ($n=72$), que foi $1.250 \pm 315,7$ nmol/min quando comparada ao grupo $INR \geq 1,5$ ($n=25$), cujos valores foram 1.186 ± 238 nmol/min, $p=0,3572$. Após adição de trombomodulina, os valores mudaram para $893,0 \pm 368,6$ e $965,9 \pm 232,3$ nmol/min, respectivamente ($p=0,6265$). Ambos os grupos apresentaram preservação da geração de trombina, com valores mais elevados no grupo $INR \geq 1,5$ do que no grupo de pacientes com $INR < 1,5$ (rETP $0,81 \pm 0,1$ versus $0,69 \pm 0,2$; $p=0,0042$). Evidência de hipercoagulabilidade (valores altos de rETP) foi demonstrada em 80% dos pacientes. Mesmo pacientes com $INR \geq 1,5$ apresentam geração de trombina preservada, o que justificaria a baixa prevalência de sangramento

após ligadura elástica de varizes esofagianas (5,2%; 3 pacientes no grupo INR<1,5 e 2 pacientes no grupo INR ≥1,5). **Conclusões:** a geração de trombina se encontrou preservada nos pacientes com cirrose e os valores anormais de INR não refletiram a ocorrência de sangramento. A maioria dos pacientes mostrou evidência de hipercoagulabilidade, apesar do INR alargado. Sangramento após LEVE ocorreu em pequena parcela dos pacientes e não foi relacionado ao status da coagulação.

Descritores: coagulação sanguínea; tempo de protrombina; testes de coagulação sanguínea; geração de trombina; hemorragia; cirrose; hepatopatias

ABSTRACT

Ferreira CM. *Thrombin generation potential and its relation to prothrombin time in patients with cirrhosis* [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction: Patients with cirrhosis have higher levels of factor VIII and preservation of endothelial thrombomodulin (protein C activator) in spite of the global reduction in procoagulant and natural anticoagulant concentrations. This is not taken into account in the laboratory test of INR/PT, which does not require the addition of thrombomodulin and, thus, is not able to emulate the generation of thrombin that happens in vivo. In fact, INR/PT is a measure of procoagulant status and correlates with only 5% of the total amount of generate thrombin. We hypothesized that thrombin generation is well preserved in cirrhosis, even in advanced stages, despite the abnormal result of INR/PT, which would indicate coagulopathy. **Aims:** to correlated INR/PT with thrombin generation in patients with cirrhosis in the elective setting of an invasive procedure (endoscopic variceal ligation- EVL). **Patients and Methods:** 97 consecutive patients were prospectively included in this study (58 men; 54±10 years old) and divided into two groups INR< 1.5 and INR ≥1.5. All patients underwent a stringent clinical and laboratory assessment which included review of the clinical chart, INR/PT determinations and assessment of endogenous thrombin potencial (ETP) without and with the addition of thrombomodulin and calculation of the ETP ratio (rETP= without/with thrombomodulin). **Results:** There was no significant difference in the mean value of ETP without thrombomodulin that was 1,250±315.7nmol/min for patients with INR <1.5 (n=72) and 1,186±238 in those with INR ≥1.5 (n=25); p= 0.3572. After the addition of thrombomodulin, values changed to 893.0±368.6 and 965.9±232.3, respectively (p= 0.6265). Both groups had preserved thrombin generation, which was higher in patients with INR ≥1.5 than in patients with INR<1.5 (rETP 0.81±0.1 versus 0.69±0.2; p=0.0042). Evidence of hypercoagulability (high rETP) was demonstrated in 80% of patients. Even patients with INR≥1.5 had preserved thrombin generation, which is likely to account for the low prevalence of post-EVL bleeding (5.2%; n=3 with INR<1.5 and n=2 with INR≥1.5). **Conclusions:** thrombin generation was well preserved in patients with cirrhosis and was not reflected by abnormal results of INR. Most of the patients had evidence of hypercoagulability, despite enlarged INR. Post-procedure bleeding occurred in a small subset of the patients and was not related to the coagulation status.

Descriptors: blood coagulation; prothrombin time; blood coagulation tests; thrombin generation; hemorrhage; cirrhosis; liver diseases

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cirrose e suas complicações

A cirrose tem sido reconhecida como importante causa de complicações e mortes em todo o mundo, inclusive no Brasil, tendo como principais etiologias o uso abusivo de álcool, a infecção pelo vírus da hepatite C e a esteatohepatite não alcoólica.^{1,2}

O surgimento de manifestações clínicas assinala a transição da fase compensada para a fase descompensada da cirrose e se associam a menor sobrevida. Atualmente a cirrose é compreendida como condição evolutiva em cinco estádios. No estágio 1 o paciente é assintomático, não apresenta hipertensão portal clinicamente significativa. Por isso, não há varizes esôfago-gástricas ou ascite. No estágio 2, apesar de ainda assintomático, surgem varizes. O estágio 3 é definido pela presença de ascite, independente de haver outras manifestações como varizes e encefalopatia hepática. O estágio 4 é caracterizado por sangramento varicoso, com ou sem ascite ou encefalopatia hepática associadas. No estágio 5 surge acometimento de outros órgãos ou sistemas como síndrome hepato-renal e infecções.

Os desfechos clínicos que caracterizam os diferentes estádios evolutivos correlacionam-se com as pressões do sistema portal e com a mortalidade. No estágio 1, o gradiente de pressão entre a veia hepática livre e ocluída caracteristicamente mostra valores entre 5 e 9 mmHg e a mortalidade em um ano situa-se ao redor de 1,5%. No estágio 2, os valores de pressão estão entre

10 e 12 mmHg e a mortalidade ao redor de 2%. No estágio 3, observam-se valores acima de 12 mmHg no gradiente venoso hepático e a mortalidade estimada sobe para 10%. No estágio 4, são encontrados valores de gradiente entre 12 e 20 mmHg e mortalidade que atinge 21%. No estágio seguinte, 5, o valor do gradiente está acima de 20 mmHg e a mortalidade chega a 87%.³⁻⁶

A mortalidade de pacientes com cirrose está diretamente relacionada aos valores de pressão no sistema venoso portal, ao grau de comprometimento da função hepática e ao surgimento de complicações clínicas. Entretanto, a avaliação pressórica é invasiva e pouco utilizada na prática clínica. Por esse motivo, geralmente se utilizam escores prognósticos para estimar a gravidade da cirrose e a probabilidade de sobrevida. Os principais são o escore Child-Pugh e o escore Meld.

A classificação de Child-Pugh combina cinco variáveis independentes: encefalopatia hepática, ascite, albumina, bilirrubina total e tempo de protrombina/INR, em uma pontuação que varia de 5 a 15 e definem três classes indicadas como A, B ou C.⁷ No anexo 1 está apresentada classificação de Child-Pugh e sua interpretação.

Este sistema de pontuação possui sensibilidade de 78% e especificidade de 83% em termos de prognóstico (sobrevida em um ano).⁸ Pacientes classificados como Child B ou C tipicamente apresentam taxas de sobrevida em um ano inferiores a 90%. Em um estudo conduzido na Universidade de Innsbruck, Áustria, com 620 pacientes, foram observadas taxas de sobrevida em cinco anos de 95%, 75% e 55% para as classes Child A, B e C, respectivamente.^{8,9}

Por conta da limitação do escore de Child-Pugh não avaliar uma importante gravidade da cirrose descompensada que é o comprometimento da função renal, foi proposto o escore MELD (Model for End-Stage Liver Disease) que se baseia nos valores de bilirrubina total, creatinina e INR do tempo de protrombina. Esta é uma objetiva e acurada ferramenta em prever mortalidade em três meses em pacientes com cirrose compensada e descompensada, independente da sua etiologia. Complicações da cirrose, ainda que graves, tais como hemorragia varicosa, ascite e peritonite bacteriana espontânea, possuem mínimo impacto na acurácia do modelo.⁷

O escore MELD tem um rendimento prognóstico a curto prazo que parece ser melhor do que o obtido pelo escore Child-Pugh e tem sido usado como índice de gravidade da doença hepática para determinar prioridades de alocação de órgãos para transplante hepático. No entanto, sua precisão diminui para previsões de longo prazo.⁷

As principais manifestações clínicas da cirrose são ascite, distúrbios da coagulação, infecções, sangramento varicoso, encefalopatia hepática, carcinoma hepatocelular e o comprometimento de outros órgãos como rins e pulmões. Assim refletem as duas principais síndromes clínicas que caracterizam a cirrose: a síndrome de hipertensão portal e a síndrome de insuficiência hepatocelular.¹⁰⁻

12

Dentre essas complicações, a coagulopatia vem merecendo destaque na literatura recente devido ao melhor entendimento acerca dos mecanismos da hemostasia em pacientes com cirrose. Nas seções seguintes apresentamos uma revisão do estado atual do conhecimento sobre a coagulação na cirrose.

1.2. Fisiologia da coagulação

Em meados de 1960 foi proposto o modelo de coagulação baseado na sequência de eventos que resultam em geração de trombina e consequentemente na formação da fibrina.¹³ Esse modelo é apresentado como “cascata” da coagulação, separando-a em vias intrínseca e extrínseca, iniciadas, respectivamente, pelo fator XII e pelo complexo fator tecidual/ fator VII ativado (FT/FVIIa).¹⁴ A cascata apresenta imprecisões como modelo fisiológico, uma vez que as vias intrínseca e extrínseca não poderiam funcionar de forma independente e não se considera o papel central das plaquetas na hemostasia nem as interações entre o endotélio e as superfícies celulares.^{14,15}

Por volta do ano 2000, foi proposto um novo modelo de coagulação, denominado modelo celular, em substituição ao clássico de 1960. O modelo celular considera três fases sobrepostas (iniciação, amplificação e propagação) para descrever o papel vital das células envolvidas (Figura 1), reproduzindo melhor o que ocorre fisiologicamente.^{16,17}

Figura 1 – Esquema das três fases da cascata da coagulação.

In vivo, a trombina é gerada diretamente na superfície da plaqueta ativada e não somente na superfície da célula que expressa o fator tecidual (FT), sugerindo que as vias intrínseca e extrínseca são, de fato, geradoras paralelas de fator Xa em diferentes superfícies celulares.¹⁸

Examinando esses mecanismos em detalhes, podemos afirmar que a coagulação sanguínea se inicia com a exposição do fator tecidual subendotelial ao fluxo sanguíneo. A exposição ocorre por lesão vascular ou ativação endotelial através de substâncias químicas, citocinas ou processos inflamatórios. O fator VII é ativado pelo FT formando o complexo FT/FVIIa que ativa os fatores IX e X. O FXa com seu cofator FVa formam o complexo Protrombinase. O fator Xa pode dissociar-se da superfície celular e, neste caso, é inativado pela antitrombina (AT) e pelo inibidor da via do fator

tecidual.^{15,19} Por outro lado pode permanecer na superfície celular e juntamente com o fator V, converter a protrombina em uma pequena quantidade de trombina, insuficiente para formação de fibrina, mas capaz de ativar as plaquetas, os fatores V, XI¹⁶ e dissociar o fator von Willebrand (FVW) do fator VIII, ativando-o.²⁰ Essa fase é denominada de fase de amplificação.^{15,16,21}

A plaqueta exerce duas importantes funções no controle da hemostasia, fornecendo a superfície fosfolipídica que facilita a atividade do complexo procoagulante FT/FVIIa e adsorvendo os fatores Va, VIII e IX, consequentemente auxiliando na propagação da coagulação.²² Nessa fase ocorre a formação do complexo tenase (FVIIIa/FIXa).^{15,23} A trombina converte o fibrinogênio em fibrina solúvel e ativa o fator XIII que por sua vez estabiliza a rede de fibrina.²⁴

As reações bioquímicas da coagulação são reguladas de modo a evitar ativação excessiva do sistema (Figura 2). A regulação é feita por proteínas inibitórias, denominadas anticoagulantes naturais como, proteína C, proteína S, antitrombina (AT) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que tem ação nas diferentes fases da coagulação.²⁴

com endotoxinas. A antitrombina é a inibidora mais importante dos fatores de coagulação, incluindo trombina, fator IXa e Xa. As fases de amplificação e propagação são controladas, principalmente, pela ação da antitrombina.^{15,16,21}

O sistema fibrinolítico é um sistema altamente integrado que opera quando há deposição de fibrina. O plasminogênio (proenzima) é convertido em sua enzima ativa (plasmina), a qual degrada a fibrina. Esta conversão é fortemente regulada por seus ativadores t-PA (ativador tecidual do plasminogênio) e o u-PA (ativador do plasminogênio tipo uroquinase), e inibidores específicos dos ativadores como o PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio) e inibidor da plasmina (principalmente o alfa 2-antiplasmina).²⁷

O TAFI (inibidor de fibrinólise ativado por trombina) é uma pro-carboxipeptidase sintetizada pelo fígado. Após ser ativado pela trombina ou pela plasmina, atua removendo os resíduos de lisina da fibrina, inibindo assim a ativação do plasminogênio mediado pelo t-PA. O equilíbrio da fibrinólise é importante para prevenir geração de plasmina não desejada, pois havendo perturbação deste equilíbrio pode ocorrer hipofibrinólise ou hiperfibrinólise.²⁸

Na cirrose, o sistema hemostático apresenta profundas modificações, que podem interferir no risco de sangramento ou de trombose. Passamos a seguir, a examinar os aspectos mais relevantes da coagulação nesse grupo de pacientes.

1.3. Particularidades da coagulação na cirrose

O fígado é o local de síntese para a maioria dos fatores de coagulação e de fibrinólise, por isso, é fato reconhecido que a cirrose resulta na combinação de vários distúrbios da coagulação, como redução dos fatores procoagulantes e dos anticoagulantes, incluindo as proteínas C e S. De forma geral, a doença crônica do fígado é caracterizada pela síntese diminuída da maioria desses fatores, exceto pelo fator VIII e o FVW que estão elevados. Nesses pacientes também pode ser encontrada uma contagem baixa de plaquetas com consequente redução da capacidade de geração de trombina, além de defeitos no sistema fibrinolítico.^{15,29,30}

A capacidade das plaquetas em fornecer uma superfície para a geração de trombina e o aumento dos níveis plasmáticos do FVW parecem compensar uma eventual diminuição da quantidade de plaquetas.³⁰ Pacientes com baixa contagem de plaquetas são os que geram menor quantidade de trombina; o que explica o bom desempenho das plaquetas nestes pacientes é que elas são qualitativamente capazes de proporcionar uma geração normal de trombina desde que em número suficiente, sendo este número *in vitro* de 56.000/mm³.^{24,31}

Diminuição nos níveis de proteínas pró e anticoagulantes é freqüentemente observado nos pacientes com cirrose. Em geral, o desequilíbrio procoagulante aparece no resultado do efeito combinado do aumento do fator VIII (procoagulante) com a diminuição da concentração da proteína C (anticoagulante natural). Além disso, a cirrose é caracterizada por resistência à ação da trombomodulina com menos eficiência na ativação da

proteína C, que está em menor quantidade, traduzindo um estado de hipercoagulabilidade. Tal desequilíbrio pode ser responsável pelo aumento do risco de trombose observado nos pacientes com cirrose.^{32,33}

O plasma de pacientes com cirrose quando em contato com o fator tecidual na presença de fosfolípides exógenos gera quantidades de trombina comparáveis à população sem cirrose, desde que a proteína C seja ativada pela trombomodulina. Considerando que a trombomodulina das células endoteliais em pacientes com cirrose é funcionalmente normal, foram desenvolvidos ensaios laboratoriais em que se utiliza a trombomodulina solúvel (fisiologicamente similar à trombomodulina endotelial) para simular as condições da hemostasia *in vivo* nesses ensaios.¹⁷

Graus variáveis de hiperfibrinólise são demonstráveis em paciente com cirrose. Entretanto sua comprovação baseada na medição individual dos componentes do sistema fibrinolítico não é representativa da complexa interação entre ativadores e inibidores, que regulam a conversão do plasminogênio em plasmina, explicando, pelo menos em parte, a variação de resultado entre os diferentes métodos descrita na literatura.^{29,34,35}

O saldo que se tem de todas as alterações hemostáticas é um sistema potencialmente instável em relação aos indivíduos saudáveis. O paciente com cirrose pode transitar em qualquer estado hemostático, com a coagulação equilibrada, hipocoagulável ou hipercoagulável. Essa situação explica tanto o potencial de sangramentos como o de complicações trombóticas.²⁹

1.4. Testes convencionais de hemostasia

Dentre os testes convencionais de hemostasia utilizados na prática clínica estão o tempo de protrombina/INR (TP/INR), o tempo de tromboplastina parcialmente ativado e a contagem de plaquetas. Tem sido empregados para avaliar o risco de sangramento após procedimentos invasivos, e quando apresentam resultados anormais, tradicionalmente aceita-se que indicam uma tendência à hemorragia ou à trombose.³⁵

O resultado do TP se dá no formato *ISI* (*International Sensitivity Index*), que é um índice determinado pela Organização Mundial da Saúde em 1999, utilizado para converter o TP em INR baseado na equação $INR = (TP_{paciente}/TP_{normal})^{ISI}$ e seu resultado é inserido no gráfico de calibração do aparelho, que correlaciona os logaritmos do TP e os relaciona com padrão internacional da tromboplastina, sua medida é a resposta ao *ISI*.³⁶

Os testes tempo de protrombina/INR e tempo de tromboplastina parcialmente ativado avaliam a redução da síntese de fatores procoagulantes mas não estimam a redução nos fatores anticoagulantes como a proteína C, S e antitrombina.^{37,38} Portanto, não indicam que o sistema hemostático está em um estado de "reequilíbrio", já que as mudanças na via procoagulante são acompanhadas por mudanças na via anticoagulante.^{30,34,35,38}

Além disso, esses testes detectam somente 5% da trombina gerada, deixando os restantes 95% indetectados (Figura 3).³⁹⁻⁴²

Figura 3 –Curva característica de geração de trombina. Linha tracejada – indica o momento em que os testes convencionais (TP/TTPa) perdem correlação em relação à geração de trombina (linha contínua). [Fonte: Adaptado de: Bolliger D, 2012]

Em diferentes laboratórios, o tempo de protrombina/INR apresenta resultados variáveis por conta do reagente utilizado (tromboplastina), como mostra a literatura.⁴³ Trotter e colaboradores mostraram, entre diferentes laboratórios, que dependendo da procedência do reagente utilizado há diferença analítica nos valores do TP/INR de 1,2 a 5,0.⁴⁴

Por conta das normas utilizadas para determinar o *ISI* não recomendarem correção e padronização específica no uso dos reagentes para amostras de pacientes com doença hepática, a aplicação deste teste na avaliação da coagulação na cirrose não é adequada.⁴⁵

Em um experimento conduzido na França, os pesquisadores padronizaram o INR para uso em pacientes com doença hepática. Foi verificado que essa padronização seria duas vezes mais acurada que a

padronização tradicional empregada para pacientes com anticoagulantes orais. Entretanto, esses resultados devem ser confirmados em estudos multicêntricos.⁴⁶

Deste modo, testes que avaliam somente o “braço” procoagulante do sistema não tem se mostrado capazes de prever com acurácia a tendência ao sangramento, contrariando o conceito até então aceito sobre sua utilidade como testes indicativos do status da coagulação.

A contagem de plaquetas é um dos testes úteis para avaliar o risco de sangramento ou trombose, embora sua quantidade por si só não indica que necessariamente ocorrerá uma dessas complicações. De fato, a contagem de plaquetas é um dos testes de hemostasia mais importantes pois dados *in vitro* relatados por Tripodi e colaboradores demonstraram que a geração de trombina é adequada com contagens plaquetárias de pelo menos 56.000/mm³.²⁴

Todavia, a contagem de plaquetas não permite a análise da sua função. Para analisar a função plaquetária são necessários testes que envolvem agregação e análise do conteúdo dos grânulos das plaquetas e tais testes demandam trabalho intensivo, custo elevado, consumo de tempo e *expertise*.^{47,48}

Acrescente-se o fato de que na rotina laboratorial, a contagem é realizada na maioria das vezes por métodos automatizados, que podem levar a algum grau de imprecisão, pelo não reconhecimento de macroplaquetas ou agregados plaquetários.

Desta forma, em que pese a importância clínica do teste, isoladamente a contagem de plaquetas não seria suficiente para prever, exceto nos casos de plaquetopenia grave, o risco real de sangramento na cirrose.

A tabela 1 mostra o resultado dos principais estudos que avaliaram a relação entre parâmetros hemostáticos e percentual de sangramento em diferentes procedimentos comuns em Gastroenterologia e Hepatologia. Tomados em conjunto, os dados permitem concluir que a frequência de sangramento é baixa e não se demonstrou correlação com os resultados anormais dos testes convencionais de hemostasia e contagem de plaquetas. Deste modo, não há dados na literatura que permitam aferir que testes de coagulação alterados predizem com acurácia a hemorragia relacionada à procedimentos invasivos no paciente com cirrose.³¹

Tabela 1 - Sangramento pós procedimento em pacientes com cirrose, em relação à contagem de plaquetas e valores de INR. [Fonte: Adaptado de: Andriulli, A. 2016]³¹

Procedimentos	Referências do estudo	Percentual de sangramento	Contagem de plaquetas ($\leq 50-60 \times 10^3$)	INR >1,5
Paracentese	49-53	0.3-3%	Não*	Não
Toracocentese	54,55	2%	Desconhecido	Desconhecido
Biópsia hepática percutânea	56-60	0.5%	Sim	Provável
Biópsia hepática transjugular	61-63	<1%	Desconhecido	Desconhecido
Procedimentos dentários	64,65	2.9%	Não	Não
Ligadura endoscópica de varizes	66,67	3-7.3%	Não	Não
Polipectomia endoscópica	68,69	3-12.4%	Não	Não
Ablação percutânea de CHC	70,71	1%	Desconhecido	Desconhecido
Transplante hepático	72-75	-	Não	Não
Cirurgia hepática	76	3.9-6.6%	Não	Não
Colecistectomia	77,78	3.9-6.6%	Não	Não
Hernioplastia	79,80	2.3-10.8%	Desconhecido	Desconhecido

*Não houve relação entre parâmetros de coagulação e percentual de sangramento.

Neste sentido, o real valor preditivo dos testes convencionais de hemostasia tem sido tema de intensa controvérsia na literatura, conforme revisão extensa publicada por Mannuci e Reverter.^{81,82}

Dentre os procedimentos apresentados na tabela 1, destacamos a ligadura elástica de varizes de esôfago, que é avaliada no presente trabalho como modelo para correlacionar o risco de sangramento após procedimento com o status da coagulação. Deste modo, passamos a analisar a literatura acerca do risco de sangramento após a ligadura elástica.

No estudo de Vieira da Rocha et al, foram avaliados prospectivamente 150 pacientes após ligadura elástica, demonstrando-se que testes convencionais e expandidos (tromboelastografia, fibrinogênio, fator V, proteínas C e S, fator de von Willebrand e D-dímero) não possuíam correlação com sangramento.⁶⁷

No trabalho de Vanbiervliet et al, foi observado que o escore de Child-Pugh, história prévia de sangramento varicoso, esofagite péptica, índice APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) elevado e atividade de protrombina baixa, foram preditores de sangramento.⁶⁶ Entretanto, o valor preditivo positivo do TP foi somente de 12%.

Coletivamente, esses estudos indicam que os testes utilizados atualmente possuem baixo ou nenhum valor preditivo, havendo espaço na literatura para estudar a aplicabilidade de novos exames de coagulação, preferencialmente que analisam a hemostasia de forma global. Um potencial candidato é o teste do potencial de geração de trombina, que permite avaliar as vias procoagulante e anticoagulante em conjunto.

1.5. Teste expandido de coagulação: *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT)

É um teste promissor, que se baseia no contínuo registro da geração de trombina sob condições que simulam àquelas encontradas na parede do vaso intacto e/ou lesado através da adição de fator tecidual e da trombomodulina.⁸³ Apesar dessas reações ocorrerem *in vitro*, elas são representativas do que se passa *in vivo*, pela capacidade de estimar a hipocoagulabilidade e a hipercoagulabilidade.⁸⁴⁻⁸⁵

Esta técnica inicia a produção de trombina pela adição de plasma recalcificado na presença de fosfolípidos, causando a clivagem de um substrato fluorogênico pela trombina. O método pode ser executado em plasma rico em plaquetas (PRP) ou plasma pobre em plaquetas (PPP).⁸⁶

A sua aplicabilidade seria na elucidação dos mecanismos de coagulação (hemofilia, deficiência de antitrombina, deficiência das proteínas C e S), investigação de coagulopatias hemorrágicas, monitorização da terapia de substituição em hemofilia, monitorização do risco de tromboembolismo venoso e do efeito de drogas antitrombóticas e no estudo da coagulopatia da doença hepática crônica.^{40,85}

Quando no teste de geração de trombina, é acrescentada a trombomodulina (ativador da proteína C), observa-se uma coagulação normal no plasma dos pacientes com cirrose, apesar dos testes convencionais de coagulação estarem alterados.^{33,37}

Os parâmetros medidos são apresentados da seguinte forma (Figura 4):

- a) Tempo de latência (*Lag time*) – ocorre o primeiro traço de trombina, o final da *Lag time* é o momento em que o coágulo aparece, traduzindo o início da formação de trombina em minutos.^{83,85}
- b) Pico de geração de trombina (*Peak height*) - é a concentração máxima de trombina, expressa em unidades nM;
- c) Tempo do pico de geração de trombina (*Time to peak*) – intervalo de tempo que a reação leva para atingir a concentração máxima de trombina gerada, medido em minutos;
- d) Potencial Trombina Endógena (ETP) - é a área sob a curva. Representa o equilíbrio entre a ação dos pró e anticoagulantes no plasma.⁸⁷ O resultado é expresso, em função da concentração de trombina multiplicada pelo tempo, expresso em nM x minutos.^{86,88} Este resultado representa o potencial de trombina endógena gerada.

A figura 4 ilustra o gráfico típico da curva do potencial de geração de trombina.

Figura 4 - Trombograma do potencial de geração de trombina com seus respectivos parâmetros. [Adaptado de referência 87]

Para expressar melhor a relação entre os procoagulantes e anticoagulantes, pode-se apresentar os resultados como a razão de geração de trombina com e sem adição de trombomodulina - ETP ratio (rETP). O rETP neste sentido pode ser utilizado para definir os três fenótipos da coagulação: hipocoagulabilidade, normocoagulabilidade e hipercoagulabilidade. Os valores da rETP descritos na literatura para pacientes com cirrose são 0,72 para o estágio Child A; 0,80 para Child B e 0,86 para Child C. Para os controles (indivíduos saudáveis) é de 0,66. O valor médio na cirrose independente da gravidade é de 0,80.^{33,37}

Doenças associadas à cirrose influenciam os níveis de trombomodulina. Aumento das concentrações tem sido descrito em casos de coagulação

intravascular disseminada, aterosclerose, diabetes mellitus e infarto agudo do miocárdio.⁸⁹ Estas variações contribuem no estado hemostático do paciente com doença hepática transitando entre hipocoagulável, normocoagulável e hipercoagulável.³⁵

1.6. Racional do estudo e hipótese

O entendimento da hemostasia na cirrose modificou-se de forma profunda nos últimos anos, com o surgimento do conceito de re-equilíbrio da coagulação, em que mecanismos compensatórios manteriam a funcionalidade da coagulação. Esse re-equilíbrio se dá entre fatores procoagulantes e anticoagulantes naturais, sendo suficiente para preservar a geração de trombina na maior parte dos pacientes. O TP/INR, apesar de estar com valores alterados, não demonstraria o re-equilíbrio por não avaliar os anticoagulantes naturais. Nossa hipótese é que apesar do INR alargado em pacientes com cirrose, haveria geração adequada de trombina. Deste modo, não haveria relação entre ambos - INR e geração de trombina – e correlação entre sangramento após procedimento e alteração dos exames de coagulação.

Escolhemos o cenário da ligadura elástica eletiva de varizes de esôfago como modelo de procedimento invasivo em paciente com cirrose. Entre 5% a 10% dos pacientes tratados podem apresentar sangramento em decorrência da queda da escara no local onde foi aplicada a banda elástica. Em nossa hipótese, valores alargados de INR não seriam fator de risco adicional para sangramento após esse procedimento.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a relação entre INR, potencial de geração de trombina e sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas eletiva nos pacientes com cirrose.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Critérios de inclusão

- Idade acima de 18 anos;
- Portadores de cirrose e varizes esofagianas de médio e grosso calibre com indicação de ligadura elástica eletiva;
- Concordância em participar do estudo;

3.1.2. Critérios de exclusão

- Síndrome hepatorrenal;
- Carcinoma hepatocelular avançado (fora dos critérios de Milão)⁹⁰;
- Antecedente de sangramento por varizes gástricas ou de outras etiologias;
- Antecedente de mais de duas sessões de tratamento endoscópico (ligadura ou esclerose);
- Portadores de TIPS - *Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*;
- Pacientes em uso de anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários ou necessidade de receber terapia procoagulante antes da sessão de ligadura elástica;
- Doenças pulmonares e cardíacas graves que contraindiquem realizar endoscopia digestiva;

- Insuficiência renal com uremia;
- Gestação;
- Recusa em participar do estudo.

3.2. Métodos

3.2.1. Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo prospectivo em que pacientes com cirrose submetidos à ligadura elástica eletiva, com diferentes valores de INR foram caracterizados quanto à geração de trombina e a ocorrência de sangramento após procedimento.

3.2.2. Período e local do estudo

A inclusão dos pacientes foi realizada no período de fevereiro de 2013 a maio de 2015 na Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Os testes foram executados no Laboratório de Hemostasia do Serviço de Hematologia – Divisão de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2.3. Técnica de realização do tratamento endoscópico

A ligadura elástica foi realizada utilizando kit fabricado pela companhia Wilson Cook®, com seis anéis elásticos. Os anéis foram aplicados nas varizes, a partir de dois centímetros acima da transição esofagogástrica, segundo a técnica convencional. As sessões de ligadura foram repetidas de duas a quatro semanas até a erradicação das varizes esofagianas, conforme rotina do serviço e o Consenso Internacional de Baveno, edições V e VI.^{91,92}

3.2.4. Tratamentos permitidos

Foram permitidos todos os tratamentos concomitantes ou adicionais necessários do ponto de vista clínico, conforme julgamento do médico assistente do paciente. Por protocolo, o uso de anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários ou terapia procoagulante antes da sessão de ligadura elástica levou à exclusão do paciente do estudo.

Na ocorrência de hemorragia varicosa, o paciente foi tratado de acordo com a rotina do serviço, podendo ser submetido à escleroterapia, tratamento com drogas vasoativas, obliteração com cianoacrilato, colocação de TIPS ou qualquer outra modalidade de tratamento, conforme julgamento clínico.

3.2.5. Características basais avaliadas nos pacientes

- Idade;
- Gênero;
- Etiologia da doença hepática;
- Estadiamento de Child-Pugh;
- MELD;
- Características endoscópicas das varizes (tamanho e sinais vermelhos);
- Parâmetros laboratoriais: hemoglobina, creatinina, bilirrubina, albumina, sódio e INR.
- Profilaxia primária (prevenção da ocorrência do primeiro episódio de sangramento) ou secundária (prevenção de sangramento recorrente) de sangramento varicoso.

3.2.6. Coleta das amostras de sangue

Como o exame de potencial de geração de trombina é fortemente influenciado por fatores pré-analíticos, utilizamos um protocolo padronizado de coleta e processamento das amostras.⁹³ Todas as amostras de sangue foram coletas no momento inicial da sessão de ligadura elástica através de venopunção antecubital, utilizando três tubos de coleta do tipo siliconizado contendo citrato de sódio 3,2% tamponado. A proporção sangue/anticoagulante foi de 9/1 (ex: 4,5 ml de sangue para 0,5 ml de citrato). Realizamos coleta

atraumática e com tempo de garroteamento não ultrapassando um minuto. O encaminhamento ao laboratório ocorreu no prazo máximo de 1 hora após a coleta.

O sangue foi processado em até quatro horas após a coleta. Uma das amostras de sangue foi centrifugada por 15 minutos a 3.500 G com refrigeração da centrífuga a 20°C, para realização do teste de protrombina. Outra amostra foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 G com refrigeração de 20°C para quantificação da geração de trombina.

O plasma sobrenadante (PPP) foi aliquoteado em tubos *Eppendorf*® de 1mL e congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados em temperatura -80°C.⁹⁴

Para o teste de contagem de plaquetas foi utilizado o método automatizado, de rotina na instituição. Resultados discrepantes foram verificados por contagem manual quanto à possível existência de macroplaquetas ou agregados plaquetários.

Os testes de tempo de protrombina/INR foram realizados, utilizando-se do reagente PT-Fibrinogen *HS Plus*® da *Instrumentation Laboratory HemosIL*® *Reagents*, (Bedford, USA) com ISI (*International Sensibility Index*) de 1,18 e equipamento ACL Top 500 CTS também da *Instrumentation Laboratory HemosIL*® (Bedford, USA).

3.2.7. Teste de potencial de geração de trombina (CAT - *Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®*)

A análise da geração de trombina foi realizada através do trombograma automatizado calibrado – *Calibrated Automated Thrombogram®* (CAT), utilizando-se de plasma pobre em plaquetas, conforme o método de Hemker modificado por Tripodi.^{34,95,96} O método fluorogênico foi o escolhido para este ensaio por possuir menor variabilidade analítica.⁸⁶ Seu equipamento e reagentes são:

- Fluorímetro Fluoroskan Ascent, da *Thermo Scientific®* (Helsinki, Finlândia) (Figura 5) com software *Thrombinoscope®*, da *Sinapse BV®* (Maastricht, Holanda);
- PPP reagente - *Stago®* (Maastricht, Holanda) - composto de fator tecidual e fosfolípidos;
- FluCa-Kit - *Stago®* (Maastricht, Holanda) - composto por tampão, cloreto de cálcio e substrato fluorogênico;
- Trombomodulina - *Sekisui Diagnostics®* (Stamford CT, USA) - obtida comercialmente de pulmão de coelho;
- Thrombin Calibrator - *Stago®* (Maastricht, Holanda) - necessário para correção da variabilidade na coloração do plasma entre as amostras, depleção de substrato e diferenças analíticas nos instrumentos.⁸⁸

Figura 5 – *Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®*

O ensaio foi realizado sob a supervisão de farmacêutica-bioquímica com expertise em hemostasia e coautora deste projeto. Foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno (Immulon 2HB, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia) de 96 poços arredondados, plasma pobre em plaquetas duplamente centrifugado e os reagentes citados, conforme indicação do fabricante. Para cada placa foram utilizadas 15 amostras de diferentes pacientes.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37° e testadas em duplicata. Cada poço da placa foi preenchido com 80 μ L de PPP, 3 μ L de trombomodulina (5nM) e 20 μ L de PPP-Reagent (5pM); de forma concomitante foram preenchidos 2 poços controle com 20 μ L de substrato fluorogênico acrescido de FluCa. A mistura final continha 4 μ M de fosfolípidos. Para cada amostra testada utilizamos seis poços, sendo dois para o material com

trombomodulina, dois para o material sem trombomodulina e dois para o calibrador.

A trombomodulina funciona como ativadora da proteína C e junto com seu cofator proteína S, cliva os fatores VIIIa e Va e inibe o processo de coagulação. Portanto, deve-se adicioná-la à reação porque não está presente no plasma utilizado no teste de TP, tornando então, o exame mais fidedigno às reações que ocorrem in vivo.

O dispensador do fluorímetro libera a solução de cálcio na concentração de 100 mM (FluCa) a 37°C em todos os poços da placa; o fluorímetro é agitado por 10 segundos e então é iniciada a leitura das amostras.⁹⁷ A reação é monitorizada na temperatura de 37°C e interrompida após 30 minutos do seu início, tempo suficiente para a análise da reação. Para minimizar a variabilidade analítica, as amostras com e sem trombomodulina foram analisadas no mesmo ensaio.

3.2.8. Interpretação do teste potencial de geração de trombina

O software Thrombinoscope® exibe a curva de geração de trombina (trombina gerada x tempo)³⁵ e calcula a área sob a curva definida como ETP (Potencial Trombina Endógena) que é expressa em nanomolares de trombina por minuto (nmol/L x min).^{33,96} Pico rápido no teste significa hipercoagulabilidade, enquanto que a demora em atingir o pico é característica de hipocoagulabilidade.⁴⁰

O resultado da geração de trombina com a adição de trombomodulina sobre o valor sem a adição de trombomodulina constitui a razão do potencial de geração de trombina (rETP).³³ Os valores de normalidade foram estabelecidos pelo laboratório a partir de amostras de 46 indivíduos sadios e encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 2 – Parâmetros de geração de trombina em indivíduos sadios

Parâmetros	Média	Mediana
	(desvio-padrão)	(min-max)
ETP S/ TM	1577,5 (362,8)	1515,5 (1113,5-2501,5)
ETP C/ TM	914,6 (457,5)	784,3 (266,3-2169,3)
rETP	0,57 (0,21)	0,56 (0,19-0,93)
Lagtime S/ TM	3,5 (0,6)	3,5 (2,1- 4,7)
Lagtime C/ TM	4,1 (0,7)	4,1 (2,5-6,0)
relação Lagtime	1,17 (0,06)	1,18 (1,03-1,28)
Peak S/ TM	297,8 (54,7)	295,1 (156,1-428,1)
Peak C/ TM	202,5 (90,1)	188,4 (63,0-425,4)
relação peak	0,66 (0,22)	0,65 (0,25-0,99)
ttpeak S/ TM	6,3 (0,9)	6,1 (4,7-8,7)
ttpeak C/ TM	6,5 (0,8)	6,5 (4,6-8,7)
relação ttpeak	1,05 (0,05)	1,05 (0,88-1,13)

3.2.9. Avaliação dos desfechos

Desfecho primário

Nosso desfecho principal foi definido como diferença maior que 20% no rETP entre os grupos de pacientes com $\text{INR} < 1,5$ ou $\geq 1,5$.

Desfecho secundário

Sangramento secundário à queda da escara da ligadura. Foi definido como a ocorrência de sangramento até quatro semanas após o procedimento e confirmado por endoscopia digestiva alta.

3.2.10. Seguimento ambulatorial

Durante o período de seguimento de quatro semanas foram especificamente avaliados: abstinência alcoólica; uso de betabloqueadores; TIPS; transplante hepático; episódio de sangramento e complicações.

3.3. Estatística

3.3.1. Cálculo do tamanho de amostra

Para o cálculo amostral, visando demonstrar diferença maior que 20% no rETP entre os grupos de pacientes com $\text{INR} < 1,5$ ou $\geq 1,5$, utilizamos os

valores do rETP descritos na literatura para pacientes com cirrose (0,6-0,8)³³ e consideramos nível de significância de 5%, poder estatístico de 0,8. O tamanho da amostra foi calculado em 44 pacientes (22 por grupo). Os cálculos foram realizados com o *software* G Power (<http://www.gpower.hhu.de/>).

3.3.2. Análise de dados

Foram utilizados os testes t de Student e Mann-Whitney para comparar as variáveis contínuas e os testes exato de Fisher e Chi-quadrado para as categóricas, quando apropriados. Todos os cálculos foram realizados com os *softwares* Prism 4 e InStat 3 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram expressos em mediana com intervalo de confiança de 95%. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.4. Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki e após a aprovação do protocolo pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de Normas Éticas do HCFMUSP (CapPesq protocolo 1.173.097). Cada paciente recebeu explicações em linguagem clara sobre o estudo. O pesquisador responsável obteve de cada paciente a assinatura do consentimento informado, por escrito, previamente à inclusão.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os pacientes foram recrutados dentre 566 pacientes admitidos para realização de ligadura elástica eletiva no Centro de Diagnóstico em Gastroenterologia da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica no período de fevereiro de 2013 a maio de 2015. 461 não preencheram os critérios de inclusão, sendo selecionados 105 pacientes para o estudo, conforme o fluxograma apresentado na figura 6. Cinco dentre esses foram posteriormente excluídos por não terem amostras de plasma adequadas (hemolisada/ formação de fibrina), 3 pacientes não completaram o período de 4 semanas de seguimento (2 por óbito não relacionado ao sangramento e 1 por perda de seguimento), ficando, deste modo, 97 casos para análise, divididos em dois grupos: $INR < 1,5$ e $INR \geq 1,5$.

Figura 6 - População do estudo e exclusões

A população do estudo foi constituída por adultos do sexo masculino com média de idade de 55 anos e com comprometimento moderado de função hepática. Dentre os 97 pacientes a classificação de Child-Pugh foi A n= 52 (53,6%); B n= 36 (37,1%) e C n= 9 (9,3%).

Os grupos foram homogêneos quanto às características endoscópicas das varizes e quanto à indicação de profilaxia primária ou secundária. Como esperado, o grupo de pacientes com INR mais alargado apresentou maior frequência de encefalopatia hepática, bilirrubina mais elevada, albumina mais baixa, refletindo a gravidade da cirrose subjacente (tabelas 3 e 4). Foram

realizadas um total de 227 sessões de ligaduras elásticas de varizes de esôfago, com valor mediano de 2 sessões por paciente (IC 95% 2,0-2,7).

Tabela 3 - Características basais dos pacientes

Características	Total (n= 97)	INR < 1,5 (n=72)	INR ≥ 1,5 (n=25)	p
Idade	55 (52.2-56.1)	56 (52.7-57.2)	53 (47.8-56)	0,1694
Masculino	57 (59%)	39 (54%)	18 (72%)	0,1583
Child-Pugh				0,0009
A/B	88 (91%)	70 (97%)	18 (72%)	
C	9 (9%)	2 (3%)	7 (28%)	
MELD	12 (12.1-13.5)	11 (10.9-12.2)	16 (15.2-17.5)	<0,0001
Sangramento	5 (5%)	3 (4%)	2 (8%)	0,6009
Profilaxia				0,4840
1°	54 (56%)	42 (58%)	12 (48%)	
2°	43 (44%)	30 (42%)	13 (52%)	
Encefalopatia	14 (14%)	5 (7%)	9 (36%)	0,0012
Ascite	29 (30%)	19 (26%)	10 (40%)	0,2144
Varizes de grosso calibre	90 (93%)	69 (96%)	21 (84%)	0,0703
Sinais vermelhos	72 (74%)	54 (75%)	18 (72%)	0,7941
Gastropatia hipertensiva	90 (93%)	65 (90%)	25 (100%)	0,1850

Variáveis contínuas apresentadas em mediana (IC 95%). p se refere à comparação INR <1,5 versus INR ≥1,5.

Os valores basais dos parâmetros hematológicos e bioquímicos estão na tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas dos pacientes

Características	Total (n= 97)	INR < 1,5 (n=72)	INR ≥ 1,5 (n=25)	p
Hemoglobina (g/dL)	12,30 (11,97-12,89)	12,50 (12,07-13,13)	11,70 (10,96-12,89)	0,2025
Plaquetas (x10³/mm³)	63.000 (68.436-92.781)	64.000 (67.227-95.857)	55.000 (53.144-10.2696)	0,2691
Sódio (mEq/L)	140,0 (139,4-140,8)	140,0 (139,5-141,1)	140,0 (138,2-141,1)	0,4058
Creatinina (mg/dL)	0,8400 (0,8442-0,9781)	0,8250 (0,8438-0,9854)	0,8400 (0,7296-1,073)	0,6033
Bilirrubinas totais (mg/dL)	1,540 (1,684-2,281)	1,345 (1,326-1,891)	2,690 (2,361-3,759)	<0,0001
Albumina (g/dL)	3,500 (3,528-3,754)	3,700 (3,651-3,893)	3,300 (3,052-3,476)	<0,0001

Variáveis contínuas apresentadas em mediana (IC 95%). p se refere à comparação INR <1,5 versus INR ≥1,5.

Os pacientes com INR≥1,5 apresentaram valores de bilirrubinas totais mais elevados e valores de albumina mais baixos e essa diferença foi estatisticamente significativa. Como esses parâmetros compõem a fórmula do

MELD esse grupo de pacientes apresentou escore mais elevado, conforme se observa na figura 9.

A figura 7 mostra as bilirrubinas totais aumentada nos pacientes com $\text{INR} \geq 1,5$.

Figura 7 - Bilirrubinas totais de acordo com os grupos de pacientes definidos pelo valor de INR. Valores de referência 0,2 mg/dl – 1,0 mg/dl.

A figura 8 ilustra que os pacientes com INR $>1,5$ tiveram em média valores mais baixos de albumina.

Figura 8 – Valores de albumina de acordo com os grupos de pacientes definidos pelo valor de INR. Valores de referência de 3,5 g/dl – 4,8 g/dl.

A figura 9 mostra a distribuição do MELD no total de pacientes e nos pacientes com INR <1,5 e INR ≥ 1,5.

Figura 9 – Escore MELD de acordo com os grupos de pacientes definidos pelo valor de INR.

As etiologias mais frequentes de cirrose foram infecção pelo vírus da hepatite C e álcool, refletindo as causas mais comuns de hepatopatia no nosso meio (tabela 5).

Tabela 5 - Etiologias da cirrose

Etiologia	Total 97 (%)
Infecção pelo vírus da hepatite C	28 (28,9)
Criptogênica	20 (20)
Álcool	18 (18,6)
Esteato-hepatite não alcoólica (NASH)	7 (7,2)
Hepatite C e alcoólica	4 (4,1)
Hepatite B	4 (4,1)
Criptogênica e esquistossomose hepatoesplênica	3 (3,2)
Cirrose biliar secundária	3 (3,2)
Hepatite B e Hepatite C	2 (2,2)
Colangite biliar primária	2 (2,2)
Outras	6 (6,2)

4.1. International Normalized Ratio – INR

72 (74,2%) pacientes apresentaram INR $<1,5$ e os outros 25 (25,8) pacientes apresentaram INR $\geq 1,5$. Dentre os pacientes com INR $<1,5$ a etiologia foi infecção por vírus da hepatite C (n=21), álcool (n=12) e outras etiologias nos restantes (n=39). Dentre os pacientes com INR $\geq 1,5$, a etiologia foi infecção pelo vírus da hepatite C (n=7), álcool (n=5) e outras (n=13).

4.2. Geração de trombina

Os resultados dos diferentes parâmetros que compõem a geração de trombina estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros da geração de trombina e INR

Parâmetros	Total (n=97)	INR < 1,5 (n=72)	INR ≥ 1,5 (n=25)	p
Lagtime S/TM	3,0 (3,0-3,4)	3,3 (3,1-3,6)	3,0 (2,7-3,2)	0,0741
Lagtime C/TM	3.800 (3,8-3,5)	4,0 (3,9-4,8)	3,5 (3,2-3,8)	0,0179
Peak S/TM	218,7 (207,9-229,1)	229,3 (213,1-239,0)	193,4 (181,0-212,5)	0,0158
Peak C/TM	185,6 (170,7-197,8)	198,4 (168,2-203,2)	183,2 (163,6-196,4)	0,7156
ETP S/TM	1.238 (1.174-1.294)	1.242 (1.176-1.324)	1.234 (1.088-1.284)	0,3572
ETP C/TM	986,0 (843,5-980,2)	972,3 (806,4-979,7)	1.002 (870,0-1.062)	0,6265
rETP	0,79 (0,68-0,76)	0,75 (0,64-0,73)	0,85 (0,77-0,85)	0,0042

Variáveis contínuas apresentadas em mediana (IC 95%). p se refere à comparação INR <1,5 versus INR ≥1,5.

Vistos globalmente, nota-se que os pacientes com cirrose, quando comparados aos indivíduos saudáveis, sem cirrose, apresentaram valores inferiores de lagtime, peak e ETP na reação sem trombotomodulina. Após a adição da trombotomodulina à reação, os valores tornaram-se mais próximos ou

superiores aos valores observados nos indivíduos sadios, indicando resistência à ação da proteína C. Os pacientes com $\text{INR} \geq 1,5$ apresentaram valores de lagtime com TM significativamente menores que os pacientes com $\text{INR} < 1,5$. Em combinação com valores maiores de rETP, esses resultados indicam hipercoagulabilidade. O peak sem TM nos pacientes com $\text{INR} \geq 1,5$ foi significativamente menor, refletindo a via procoagulante não contrabalanceada pelos anticoagulantes naturais (TM na reação).

O grupo de pacientes com $\text{INR} < 1,5$ apresentou ETP sem TM 1.250 ± 315.7 (IC 95% 1.176-1.324) e $\text{INR} \geq 1,5$ apresentou ETP sem TM de 1.186 ± 238.2 (IC 95% 1.088-1.284) $p = 0,3572$. Considerando o valor de 1577,5 nmol x min como referência para indivíduos sadios, temos que pacientes com cirrose aparentam gerar menos trombina.

Após a adição de TM, os valores diminuíram em ambos os grupos, indicando a ação do sistema anticoagulante (TM da reação). Entretanto, os valores tornaram-se superiores à referência (sadios 914,6 nmol x min), indicando que havia resistência a ação da proteína C, mimetizada no ensaio pela adição da trombomodulina. Comparando-se os grupos $\text{INR} \geq 1,5$ e $< 1,5$ não se observaram diferenças significantes entre ambos em relação à ETP sem TM nem em relação à ETP com TM. A adição de TM leva à redução da ETP em todos os indivíduos, sadios ou com cirrose. A magnitude dessa redução é 42% em sadios, 22% em pacientes com $\text{INR} < 1,5$ e 19% em pacientes do grupo $\text{INR} \geq 1,5$. A implicação desse resultado é o rETP ser mais elevado no grupo $\text{INR} \geq 1,5$, indicando hipercoagulabilidade, apesar de INR alargado mostrar o contrário.

87 (89,7%) pacientes apresentaram ETP sem TM com valores abaixo do valor de referência e 10 (10,3%) pacientes com valores superiores. Após a adição de trombomodulina, o número de pacientes com resultados abaixo do valor de referência passou para 41 (42,3%).

Na relação entre eles (rETP) 19 (19,6%) pacientes apresentaram hipocoagulabilidade, 12 (12,4%) mostrando normocoagulabilidade e 66 (68%), hipercoagulabilidade.

As figuras 10, 11 e 12 ilustram a dispersão de valores do ETP sem TM, com TM e a razão entre ambos. A linha de corte representa a média de controles sadios.

Figura 10 - ETP sem trombomodulina *versus* INR

Figura 11 - ETP com trombomodulina *versus* INR

Figura 12 - rETP (com e sem trombomodulina) *versus* INR

Figura 13 – Child-Pugh *versus* INR *versus* rETP

Na figura 13, pode-se observar que à medida que a doença hepática progride (avaliada pelo Child-Pugh) o INR aumenta e a geração de trombina se mantém acima dos valores de normalidade estabelecidos pela literatura, e é progressivamente maior nos estádios mais avançados da cirrose.

Tabela 7 – Correlação INR *versus* geração de trombina.

Parâmetro	Spearman R	IC 95%	p
INR x ETP S/ TM	-0,045	-0,52 a 0,16	0,66
INR x ETP C/ TM	0,13	-0,08 a 0,33	0,21
INR x rETP	0,34	0,14 a 0,50	0,0008

TM= trombomodulina

Representado na tabela 7 pode-se observar uma correlação indireta com p significativa entre INR e o parâmetro rETP, porém como mostra o teste de Spearman R essa correlação não é forte.

4.3. Sangramento

Do total de 97 pacientes, 5 pacientes evoluíram com sangramento no período observacional. As principais características encontradas nesses pacientes estão listadas na tabela 8.

Tabela 8 - Características dos pacientes que evoluíram com sangramento após a queda da escara da ligadura elástica.

Paciente	1	2	3	4	5
Idade	56	54	47	46	37
Etiologia	Hepatite B	Álcool	Hepatite C/álcool	Hepatite C	Cirrose biliar 2°
Sessões LEVE	7	9	2	3	13
Profilaxia	1°	2°	2°	2°	2°
Encefalopatia	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Ascite	Ausente	Leve	Moderada	Ausente	Ausente
TP/INR	1,52	1,32	1,85	1,38	1,49
Plaquetas (mm³)	51.000	110.000	104.000	138.000	59.000
MELD	15	10	24	10	22
Child-Pugh	A6	A6	C11	A6	B8
Óbito em 4 semanas	Não	Não	Não	Não	Não
ETP s/TM	1396,5	1644,5	887,0	744,0	1386,0
ETP c/TM	1173,5	1477,5	750,0	533,5	1177,5
rETP	0,84	0,90	0,85	0,72	0,85

Durante o período de observação, sangramento ocorreu em três pacientes do grupo INR<1,5 (pacientes número 1 e 3) e em dois pacientes do grupo INR ≥1,5 (pacientes número 2, 4 e 5) sem diferença significativa entre os grupos ($p= 0.6$). Esses episódios de sangramento foram atribuídos à queda de escara após ligadura. Nenhum paciente recebeu TIPS ou foi submetido a transplante hepático ou evoluiu para óbito.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos avaliar a relação entre o tempo de protrombina /INR e a geração de trombina à luz dos novos conhecimentos sobre hemostasia na cirrose. O entendimento atual é que ocorre re-equilíbrio da hemostasia pelo fato do declínio da função hepática levar à perda de atividade de fatores procoagulantes e de anticoagulantes naturais. Nosso objetivo foi demonstrar que pacientes com INR alargado podem gerar quantidades de trombina suficientes e comparáveis aos indivíduos sem cirrose. Elegemos o cenário de um procedimento eletivo frequente em pacientes com cirrose e hipertensão portal, que é a realização da ligadura elástica de varizes de esôfago. Nesse procedimento, considerado como de risco intermediário de sangramento, a principal preocupação é a queda da escara que se forma no local da ligadura cerca de uma semana após o procedimento, levando a sangramentos, muitas vezes letais. O racional do estudo foi demonstrar que mesmo pacientes com INR alargado poderiam gerar trombina suficiente. Com isso, o risco de sangramento após procedimento não seria superior ao risco observado nos pacientes com INR baixo.

Desta forma elegemos o teste de geração de trombina para avaliar não só os fatores procoagulantes, mas também os fatores anticoagulantes em uma escala global, refletindo deste modo, o re-equilíbrio hemostático observado na cirrose.

Observamos em nosso trabalho através do parâmetro ETP, o qual reflete a trombina gerada em função do tempo e concentração, que os pacientes com

cirrose preservam, em sua maioria, a capacidade de gerar trombina. Quando o teste foi realizado sem trombomodulina o resultado se apresentou inferior ao valor de normalidade. Quando se acrescentou trombomodulina os valores se tornaram maiores que dos sadios. Esses mesmos achados foram observados no índice rETP, relação entre com e sem adição de trombomodulina. Tomados em conjunto, esses resultados comprovam que ensaios que avaliam todos os componentes do sistema e que simulam as condições *in vivo* permitem demonstrar geração adequada de trombina.

No parâmetro Lagtime, onde se demonstra o primeiro traço de trombina gerada, quando não foi adicionado trombomodulina o resultado se comportou de forma similar ao observado no teste de TP/INR, ou seja, abaixo do valor dos pacientes sadios. Quando foi adicionada trombomodulina, houve aumento nesse primeiro traço de trombina, na mesma magnitude observada nos sadios.

Quando observamos o parâmetro Peak, que é a concentração máxima de trombina que o paciente consegue gerar, no teste sem trombomodulina os pacientes também se comportam como no teste de INR. Entretanto, os valores foram menores que nos sadios em todos os grupos. Após a adição de trombomodulina ao teste, foi possível demonstrar redução na concentração máxima de trombina, refletindo que talvez a trombomodulina não tenha conseguido se ligar à proteína C, por conta de sua diminuição, característica naturalmente encontrada nesses pacientes. Esse fenômeno é mais evidente no grupo de $INR \geq 1,5$ onde ocorre maior comprometimento da função hepática.

O mesmo padrão pode ser observado no trabalho de Tripodi e colaboradores.³⁷ Quando o teste foi realizado sem trombomodulina, a mediana

do ETP foi 308 unidades fluorogênicas/min (variação 40-585) para pacientes e 451 unidades fluorogênicas/min (variação 300-632) para os controles ($p < 0,0001$), indicando que menos trombina foi gerada em pacientes com cirrose. Os valores do ETP em pacientes foram negativamente correlacionados com o MELD ($r = -0,66$; $p < 0,0001$) e com o Child-Pugh ($r = -0,55$; $p < 0,0001$). Quando se repetiu a reação com a adição de trombomodulina, a mediana do ETP foi 209 unidades fluorogênicas/min (variação 34-368) para pacientes e 188 unidades fluorogênicas/min (variação 0-455) para os controles. Esses valores não foram estatisticamente significantes ($p = 0,50$). Valores do ETP com e sem trombomodulina se correlacionaram positivamente tanto para pacientes ($r = 0,53$; $p < 0,0001$) como para controles ($r = 0,42$; $p < 0,01$). Esses resultados mostram que a redução da trombina (procoagulante) é balanceada pela redução da proteína C (anticoagulante), sugerindo que eventos de sangramento são principalmente devidos às alterações hemodinâmicas secundárias à hipertensão portal.

A bibliografia consultada para este trabalho foi maiormente composta de trabalhos observacionais que demonstram a ocorrência de geração de trombina em pacientes com cirrose, sem se preocupar em correlacionar os resultados com o coagulograma convencional ou desfechos clínicos. Nesse sentido, nosso estudo difere dos demais, pelo fato de termos escolhido um cenário clínico de procedimento invasivo eletivo comum em pacientes para avaliar se o resultado da geração de trombina se correlacionaria com o INR e se poderia prever sangramento.

INR e geração de trombina

O teste de TP é utilizado e aceito há anos, pois ilustra a ação dos fatores procoagulantes e assim se assumiu que estaria mostrando a capacidade do paciente de gerar trombina pois ela é gerada em pequenas quantidades na fase conhecida como fase de iniciação (Lag time). No entanto, é fato que independente da análise escolhida a geração de trombina só é iniciada após a adição do fator tecidual, sendo aproximadamente 95% de sua geração na fase de propagação. Essa é refletida no teste de Geração de Trombina, mas não no TP, que somente detecta os 5% iniciais da geração de trombina. Assim se assume que a principal limitação do TP está associada à ausência de uma continuidade na leitura do coágulo, a fase de propagação.⁴¹

Nossos resultados mostraram que à medida que a doença hepática progride, caracterizada pela passagem do estágio Child A para os estágios subsequentes B e C, os valores de INR aumentaram, fato interpretado convencionalmente como piora da coagulação. Todavia, quando observamos a geração de trombina constatamos seu aumento, sinalizando interpretação contrária ao INR, de que a coagulação está preservada ou mesmo hipercoagulável, mesmo nos estágios avançados da cirrose.

Apesar de o teste TP/INR ser aceito por décadas no intuito de identificar os pacientes com risco de sangramento, guiar a terapia hemostática e até mesmo contraindicar procedimentos invasivos, atualmente tem sido discutido seu uso nos pacientes com cirrose, com a finalidade de avaliar a hemostasia, pois estes

se encontram num estado de reequilíbrio hemostático caracterizado por redução dos fatores procoagulantes, mas que também cursam com redução dos fatores anticoagulantes, o qual o TP não é capaz de captar.³⁵ Por conta dos níveis de proteína C estarem reduzidos na cirrose seria ideal que os testes de coagulação fossem desenvolvidos para refletir o equilíbrio entre os fatores anticoagulantes e procoagulantes. O INR não preenche esse critério e por isso é um teste de aplicabilidade questionável para prever sangramentos em pacientes com cirrose.

O teste TP é realizado à partir da recalcificação do plasma citratado na presença do reagente tromboplastina *versus* o tempo. O nome tromboplastina refere-se à uma mistura de fator tecidual e fosfolípidos extraídos de tecido animal (pulmão de coelho) ou origem humana (cérebro). Atualmente as tromboplastinas são compostas de fator tecidual recombinante. Sabemos que TP é capaz de detectar os fatores II, V, VII, X e o fibrinogênio, sendo os fatores II, VII e X sintetizados pelo fígado e dependentes de vitamina K. O INR é padronizado para pacientes em anticoagulação oral e tem sido usado como calibrador para as tromboplastinas propostas pela Organização Mundial da Saúde. Este sistema é definido pelo *ISI* (*International Sensitivity Index*), uma tromboplastina específica, obtida através de plasma de pacientes em uso de doses estáveis de anticoagulantes orais. O *ISI* é um número que reflete a capacidade de resposta de uma determinada tromboplastina aos fatores de coagulação dependentes de vitamina K. Assim, o resultado do TP se dá no formato de INR, calculado através da equação $INR = (TP_{paciente}/TP_{normal})^{ISI}$.⁴⁶

No uso do teste de TP/INR em doença hepática, o ISI é utilizado inadequadamente, pois reflete a sensibilidade da tromboplastina nos efeitos dos anticoagulantes orais (dependentes de vitamina K) e não é sensível aos efeitos das doenças hepáticas.^{46,98} Desta forma o teste não deveria ser utilizado indiscriminadamente em condições para as quais ele não foi designado nem validado,⁹⁹ mas sim para pacientes em uso de anticoagulantes e tratamento com terapia anti-vitamina K, pois a relação do uso do TP/INR com indicação de sangramento nos pacientes com doença hepática, não é sempre presente.¹⁰⁰

Em um experimento realizado nos Estados Unidos, foram coletadas amostras de cinco pacientes e enviadas para 14 laboratórios distintos (cada laboratório recebeu uma amostra de cada um dos cinco pacientes). Como resultado se obteve grande variação nas amostras sendo o menor valor de INR entre 1.2-2.0 e o maior valor de INR entre 2.4-5.1,⁴⁴ existindo uma média de valor do INR de 3,1 de diferença entre os laboratórios, nos indicando mais uma vez que o uso deste teste necessita ser melhor avaliado quando se trata de doença hepática.

Alguns estudos questionam o uso do MELD para indicação de fila transplante, pois, este score incorpora o INR, trazendo os inconvenientes da considerável variabilidade de resultados comentada anteriormente. Por essa perspectiva, Trotter e colaboradores¹⁰¹ mostraram que na comparação entre seu laboratório e em outros dois laboratórios, houve uma diferença de 26% de variabilidade no teste de INR; sendo consequência disto um resultado de MELD que prioriza o paciente na fila de transplante, ao invés de mantê-lo na posição compatível com seu resultado.¹⁰¹ Em uma revisão, Porte e

colaboradores¹⁰² sugeriram que houvesse o INR voltado para doença hepática ($\text{INR}_{\text{liver}}$) e deram algumas possíveis soluções acerca de padronizações para o teste de $\text{INR}_{\text{liver}}$ como, novas fórmulas de ISI, reagentes específicos e padronizações de métodos voltados para doença hepática. Os autores sugerem à Eurotransplant (organização que intermedia a alocação de órgãos da Europa) mais estudos acerca de qual nível de variação interlaboratorial no escore MELD é aceitável para a prática clínica. Dessa forma teríamos uma confiabilidade maior nos resultados do MELD como mostrado por Bellest e colaboradores⁴⁶ onde os autores testaram 5 tromboplastinas calibradas por uma referência internacional em 60 amostras de pacientes com doença hepática ao invés de plasma de pacientes em uso de anticoagulantes. Eles também fizeram o cálculo do MELD desses pacientes e encontraram uma diferença de 4 pontos em 52% dos pacientes e mais de 7 pontos em 17% dos pacientes entre as 5 diferentes tromboplastinas.

Estudos piloto tem feito validações com números amostrais pequenos para caracterizar a relação entre geração de trombina e INR em doença hepática, comparando-os com pacientes saudáveis e pacientes em anticoagulação, e eles observaram um grande intervalo interquartil na geração de trombina nos pacientes com doença crônica do fígado contra uma faixa estreita de INR, sugerindo que o INR é uma medida subestimada.¹⁰³ Após essa minuciosa análise podemos observar que o teste de TP/INR pode ser nomeado como mais um indicador da função hepática do paciente com cirrose ao invés de avaliador do estado hemostático.

Sangramento após ligadura elástica e coagulação

Dos pacientes que cursaram com sangramento não encontramos nenhuma característica clínica ou laboratorial que pudesse prever sangramento. Embora a casuística seja pequena, não observamos diferença no percentual de sangramento quando estratificamos os pacientes de acordo com a contagem de plaquetas ou valores de INR ou geração de trombina.

Após a ligadura, em 5 a 10% dos casos, pode ocorrer sangramento por queda da escara que se forma no local tratado, com elevado potencial de mortalidade. Os fatores de risco para essa complicação são pouco compreendidos na literatura. Em particular discute-se se resultados anormais de testes convencionais de coagulação, baseados na dosagem de fatores plasmáticos, seriam preditivos de sangramento nos pacientes com cirrose, no entanto, tais exames avaliam somente os fatores procoagulantes e não levam em conta os anticoagulantes naturais, tornando seus resultados nem sempre associados com as manifestações clínicas. Portanto, como não avaliam globalmente a hemostasia se tornam questionáveis como bons preditores do risco de sangramento.

No trabalho de Vanbiervliet *et al.*⁶⁶ foram observados sangramentos após a queda da escara em 17 de 605 pacientes na 1ª sessão de ligadura elástica. Pode-se observar que entre os preditores de sangramento, o tempo de protrombina apresentou valor preditivo positivo de apenas 12%, o que não o

torna eficazmente preditor. De fato, esse parâmetro foi o menor dentre todos os preditores do estudo.

Em um estudo envolvendo 150 pacientes com cirrose que passaram por ligadura elástica, foram realizados testes convencionais e expandidos de coagulação afim de avaliar o risco de um paciente sangrar após o procedimento invasivo de ligadura elástica. Observou-se que testes como fibrinogênio, fator V, proteína C, proteína S, FVW e Tromboelastografia (TEG) não se correlacionaram com o sangramento; em contrapartida a avaliação da classificação do Child-Pugh foi o único fator associado com o sangramento do paciente cirrótico,⁶⁷ o que contribui para concluir que testes de coagulação convencionais não são bons preditores de sangramento nestes pacientes. Ainda neste trabalho foi possível visualizar que os valores elevados do INR foram encontrados em pacientes com padrões de TEG normal, hiper e hipocoagulável, sem diferença significativa para afirmar sangramento.

O INR alargado não é uma explicação convincente para ocorrência do sangramento após ligadura elástica, pois não se correlacionou com a geração de trombina. A geração de trombina preservada ajuda a explicar a baixa frequência de sangramento, sugerindo que sangramento está relacionado a alterações hemodinâmicas e que testes convencionais de coagulação não refletem o status da coagulação desses pacientes.

Limitações

Embora a geração de trombina seja um teste promissor, possui limitações. Por utilizar um sistema aberto, seus reagentes não são produzidos nem validados pelo próprio fabricante do equipamento,¹⁰⁴ podendo haver, conseqüentemente, variações de desempenho. Talvez por esse motivo, se demonstra um erro experimental pouco menor que 5%⁸³. O método necessita ser validado internacionalmente de forma multicêntrica em diversas áreas, inclusive na população hemofílica e, mais importante, como preditor de sangramento ou teste de hemostasia clinicamente útil.¹⁰⁵

Para avaliação da hemostasia no paciente com doença hepática, o ideal seria que o teste fosse realizado com plasma rico em plaquetas, para obtermos a geração de trombina como ocorre *in vivo*. Todavia, a realização do teste com plasma rico em plaquetas requer considerável esforço logístico, uma vez que a reação deve ser feita imediatamente após a coleta, não havendo possibilidade de congelar as amostras para uso posterior. Entretanto, nosso objetivo foi avaliar a relação entre o INR e a geração de trombina e nesse sentido não haveria superioridade em se utilizar o plasma rico em plaquetas.

Devemos mencionar que nossas conclusões não são aplicáveis a todos os pacientes que se submetem à ligadura elástica na prática clínica. Não avaliamos pacientes que apresentam coagulopatias diferentes da cirrose ou portadores de condições clínicas que interferem na coagulação (uremia, carcinoma hepatocelular, gestação). Do mesmo modo, pacientes em uso de anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários ou que necessitavam receber terapia procoagulante antes da sessão de ligadura elástica não foram

selecionados para o presente estudo. Os pacientes do presente estudo foram recrutados no cenário eletivo da ligadura elástica. Não avaliamos a hemostasia durante o sangramento varicoso agudo, condição que deve ser levada em consideração na interpretação dos nossos resultados. Tais manifestações são comuns em pacientes com cirrose e devem merecer atenção especial em futuros estudos.

Perspectivas

Para validação de nossos achados seria necessário realizar estudos clínicos prospectivos para avaliar o papel da geração de trombina com adição de trombomodulina como teste de coagulação de uso clínico. O desfecho deveria ser a capacidade em prever a ocorrência de sangramento após procedimentos invasivos. Na mesma linha de investigação, há espaço para validação de marcadores substitutos à geração de trombina. Um candidato potencial seria correlacionar a razão entre o fator VIII (aumentado na cirrose) e a proteína C (diminuída) com a geração de trombina e validar sua aplicabilidade como preditora de sangramento.

Em síntese, no presente estudo demonstramos a preservação da geração de trombina mesmo nos pacientes com cirrose e INR alargado, refletindo baixo risco de sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

1- A geração de trombina sem trombomodulina nos pacientes com cirrose foi menor que nos valores de referência para indivíduos saudáveis.

2- Após a adição de trombomodulina, a geração de trombina tornou-se mais elevada que a dos indivíduos, indicando reequilíbrio entre fatores procoagulantes e anticoagulantes naturais na cirrose.

3- A maioria dos pacientes apresentou evidência de hipercoagulabilidade caracterizada por valores mais elevados na razão da geração de trombina com e sem trombomodulina (rETP).

4- A hipercoagulabilidade foi observada em pacientes com INR alargado ou não.

5- INR e a geração de trombina não foram preditivos de sangramento por queda de escara após ligadura elástica.

7. ANEXO

Anexo 1. Classificação de Child-Pugh.

Parâmetros	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Encefalopatia	Ausente	1-2	3-4
Ascite	Ausente	Leve	Moderada
Bilirrubina (mg/dl)	< 2,0	2,0 – 3,0	> 3,0
Albumina (g/dl)	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
Tempo de protrombina (INR)	1 – 4	4 – 6	> 6
	< 1,7	1,7 – 2,3	> 2,3

Child A= 5-6 pontos **Child B**= 7-9 pontos **Child C**= 10 -15 pontos

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(1):14-32.
2. Goncalves PL, Zago-Gomes MdP, Marques CC, Mendonca AT, Goncalves CS, Lima Pereira FE. Etiology of liver cirrhosis in Brazil: chronic alcoholism and hepatitis viruses in liver cirrhosis diagnosed in the state of Espirito Santo. *Clinics*. 2013;68(3):291-295.
3. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*. 2006;44(1):217-231.
4. Garcia-Tsao G, Lim JK, Lim J, Program MoVAHCRC. Management and treatment of patients with cirrhosis and portal hypertension: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(7):1802-1829.
5. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1445-1449.
6. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-1256, 1256.e1241-1245.
7. Carrilho FJ, Farias AQ. *Natural history of cirrhosis*. In: *Cirrhosis* (Arroyo V, Navasa M., editors) 1° ed. Barcelona: P. Permanyer; 2005.

8. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology*. 1987;7(4):660-664.
9. Propst A, Propst T, Zangerl G, Ofner D, Judmaier G, Vogel W. Prognosis and life expectancy in chronic liver disease. *Digestive Disease Science*. 1995;40(8):1805-1815.
10. Thomas MB, Jaffe D, Choti MM, et al. Hepatocellular Carcinoma: Consensus Recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(25):3994-4005.
11. John JA, de Mattos AA, da Silva Miozzo SA, et al. Survival and risk factors related to death in outpatients with cirrhosis treated in a clinic in Southern Brazil. *European Journal Gastroenterology and Hepatology*. 2015;27(12):1372-1377.
12. Stine JG, Shah PM, Cornella SL, et al. Portal vein thrombosis, mortality and hepatic decompensation in patients with cirrhosis: A meta-analysis. *World Journal Hepatology*. 2015;7(27):2774-2780.
13. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence For Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964;145(363):1310-1312.
14. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade In The Blood Clotting Mechanism, And Its Function As A Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964;202:498-499.
15. Monroe DM, Hoffman M. The Coagulation Cascade in Cirrhosis. *Clinics in Liver Disease*. 2009;13(1):1-9.
16. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;85(6):958-965.

17. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology*. 2006;44(2):440-445.
18. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)*. 2009;19(1):3-10.
19. Lu G, Broze GJ, Krishnaswamy S. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(17):17241-17249.
20. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006;32 Supplement 1:32-38.
21. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2003;16(1-2):17-20.
22. Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, et al. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: Pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology*. 2006;44(4):1039-1046.
23. Ferreira CN, Sousa MdO, Dusse LMSA, Carvalho MdG. A cell-based model of coagulation and its implications. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010;32(5):416-421.
24. Tripodi A, Mannucci PM. Abnormalities of hemostasis in chronic liver disease: reappraisal of their clinical significance and need for clinical and laboratory research. *Journal of Hepatology*. 2007;46(4):727-733.
25. Peraramelli S, Thomassen S, Heinzmann A, et al. Inhibition of tissue factor:factor VIIa-catalyzed factor IX and factor X activation by TFPI and

- TFPI constructs. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(11):1826-1837.
26. Pepler L, Wu C, Dwivedi DJ, Kim PY, Liaw PC. The impact of the endothelial protein C receptor on thrombin generation and clot lysis. *Thrombosis Research*. 2017;152:30-37.
 27. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999;82(2):259-270.
 28. Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology*. 2001;121(1):131-139.
 29. Lisman T, Leebeek FWG, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *Journal of Hepatology*. 2002;37(2):280-287.
 30. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, et al. Elevated levels of von Willebrand factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology*. 2006;44(1):53-61.
 31. Andriulli A, Tripodi A, Angeli P, Senzolo M. Hemostatic balance in patients with liver cirrhosis Report of a consensus conference. *Digestive and Liver Disease*. 2016;48(5):455-467.
 32. Tripodi A, Fracanzani AL, Primignani M, et al. Procoagulant imbalance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2014;61(1):148-154.
 33. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An Imbalance of Pro- vs Anti-Coagulation Factors in Plasma From Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2105-2111.

34. Tripodi A, Mannucci PM. MECHANISMS OF DISEASE The Coagulopathy of Chronic Liver Disease. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(2):147-156.
35. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: The ups and downs. *Journal of Hepatology*. 2010;53(2):362-371.
36. van den Besselaar AM, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Réveillard LL, et al. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2(11):1946-1953.
37. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41(3):553-558.
38. Tripodi A. Tests of Coagulation in Liver Disease. *Clinics in Liver Disease*. 2009;13(1):55-61.
39. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(7):1504-1514.
40. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*. 2016.; 62(5):1-9.
41. Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):4S-10S.
42. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfusion Medicine Review*. 2012;26(1):1-13.

43. Arjal R, Trotter JF. International normalized ratio of prothrombin time in the model for end-stage liver disease score: an unreliable measure. *Clinical Liver Disease*. 2009;13(1):67-71.
44. Trotter JF, Olson J, Lefkowitz J, Smith AD, Arjal R, Kenison J. Changes in international normalized ratio (INR) and model for endstage liver disease (MELD) based on selection of clinical laboratory. *American Journal of Transplantation*. 2007;7(6):1624-1628.
45. Marlar RA. Determining the model for end-stage liver disease with better accuracy: neutralizing the international normalized ratio pitfalls. *Hepatology*. 2007;46(2):295-296.
46. Bellest L, Eschwège V, Poupon R, Chazouillères O, Robert A. A modified international normalized ratio as an effective way of prothrombin time standardization in hepatology. *Hepatology*. 2007;46(2):528-534.
47. Witters P, Freson K, Verslype C, et al. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008;27(11):1017-1029.
48. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Review*. 2005;19(2):111-123.
49. Grabau CM, Crago SF, Hoff LK, et al. Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis. *Hepatology*. 2004;40(2):484-488.
50. De Gottardi A, Thévenot T, Spahr L, et al. Risk of complications after abdominal paracentesis in cirrhotic patients: a prospective study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(8):906-909.

51. Pache I, Bilodeau M. Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2005;21(5):525-529.
52. Lin CH, Shih FY, Ma MH, Chiang WC, Yang CW, Ko PC. Should bleeding tendency deter abdominal paracentesis? *Digestive Liver Disease*. 2005;37(12):946-951.
53. Webster ST, Brown KL, Lucey MR, Nostrant TT. Hemorrhagic complications of large volume abdominal paracentesis. *American Journal of Gastroenterology*. 1996;91(2):366-368.
54. Castellote J, Xiol X, Cortés-Beut R, Tremosa G, Rodríguez E, Vázquez S. Complications of thoracentesis in cirrhotic patients with pleural effusion. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2001;93(9):566-575.
55. Xiol X, Castellote J, Cortes-Beut R, Delgado M, Guardiola J, Sesé E. Usefulness and complications of thoracentesis in cirrhotic patients. *American Journal of Medicine*. 2001;111(1):67-69.
56. Seeff LB, Everson GT, Morgan TR, et al. Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the HALT-C trial. *Clinical Gastroenterology Hepatology*. 2010;8(10):877-883.
57. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *Journal of Hepatology*. 1986;2(2):165-173.
58. Actis GC, Olivero A, Lagget M, Pellicano R, Smedile A, Rizzetto M. The practice of percutaneous liver biopsy in a gastrohepatology day hospital:

- a retrospective study on 835 biopsies. *Digestive Disease Science*. 2007;52(10):2576-2579.
59. Caturelli E, Giacobbe A, Facciorusso D, et al. Percutaneous biopsy in diffuse liver disease: increasing diagnostic yield and decreasing complication rate by routine ultrasound assessment of puncture site. *American Journal of Gastroenterology*. 1996;91(7):1318-1321.
 60. West J, Card TR. Reduced mortality rates following elective percutaneous liver biopsies. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1230-1237.
 61. Kalambokis G, Manousou P, Vibhakorn S, et al. Transjugular liver biopsy--indications, adequacy, quality of specimens, and complications--a systematic review. *Journal of Hepatology*. 2007;47(2):284-294.
 62. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, García-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2009;6(10):573-582.
 63. Woolfson J, John P, Kamath B, Ng VL, Ling SC. Measurement of hepatic venous pressure gradient is feasible and safe in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2013;57(5):634-637.
 64. Ward BB, Weideman EM. Long-term postoperative bleeding after dentoalveolar surgery in the pretransplant liver failure patient. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2006;64(10):1469-1474.
 65. Perdigão JP, de Almeida PC, Rocha TD, et al. Postoperative bleeding after dental extraction in liver pretransplant patients. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2012;70(3):e177-184.
 66. Vanbiervliet G, Giudicelli-Bornard S, Piche T, et al. Predictive factors of bleeding related to post-banding ulcer following endoscopic variceal

- ligation in cirrhotic patients: a case-control study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2010;32(2):225-232.
67. Vieira Da Rocha EC, D'Amico EA, Caldwell SH, et al. A Prospective Study of Conventional and Expanded Coagulation Indices in Predicting Ulcer Bleeding After Variceal Band Ligation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(9):988-993.
 68. Lee S, Park SJ, Cheon JH, et al. Child-Pugh score is an independent risk factor for immediate bleeding after colonoscopic polypectomy in liver cirrhosis. *Yonsei Medical Journal*. 2014;55(5):1281-1288.
 69. Jeon JW, Shin HP, Lee JI, et al. The risk of postpolypectomy bleeding during colonoscopy in patients with early liver cirrhosis. *Surgical Endoscopy*. 2012;26(11):3258-3263.
 70. Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology*. 2008;47(1):82-89.
 71. Cammà C, Di Marco V, Orlando A, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis with radio-frequency thermal ablation (RFTA): a prospective study. *Journal of Hepatology*. 2005;42(4):535-540.
 72. McCluskey SA, Karkouti K, Wijeyesundera DN, et al. Derivation of a risk index for the prediction of massive blood transfusion in liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2006;12(11):1584-1593.

73. Massicotte L, Beaulieu D, Thibeault L, et al. Coagulation defects do not predict blood product requirements during liver transplantation. *Transplantation*. 2008;85(7):956-962.
74. Massicotte L, Denault AY, Beaulieu D, et al. Transfusion rate for 500 consecutive liver transplantations: experience of one liver transplantation center. *Transplantation*. 2012;93(12):1276-1281.
75. Esmat Gamil M, Pirenne J, Van Malenstein H, et al. Risk factors for bleeding and clinical implications in patients undergoing liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(9):2857-2860.
76. Kubo S, Takemura S, Yamamoto S, et al. Risk factors for massive blood loss during liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(75):830-833.
77. Delis S, Bakoyiannis A, Madariaga J, Bramis J, Tassopoulos N, Dervenis C. Laparoscopic cholecystectomy in cirrhotic patients: the value of MELD score and Child-Pugh classification in predicting outcome. *Surgical Endoscopy*. 2010;24(2):407-412.
78. da Silveira EB. Outcome of cirrhotic patients undergoing cholecystectomy: applying Bayesian analysis in gastroenterology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2006;21(6):958-962.
79. Ammar SA. Management of complicated umbilical hernias in cirrhotic patients using permanent mesh: randomized clinical trial. *Hernia*. 2010;14(1):35-38.
80. Carbonell AM, Wolfe LG, DeMaria EJ. Poor outcomes in cirrhosis-associated hernia repair: a nationwide cohort study of 32,033 patients. *Hernia*. 2005;9(4):353-357.

81. Mannucci PM. Abnormal hemostasis tests and bleeding in chronic liver disease: are they related? No. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(4):721-723.
82. Reverter JC. Abnormal hemostasis tests and bleeding in chronic liver disease: are they related? Yes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(4):717-720.
83. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006;96(5):553-561.
84. Hemker HC, Béguin S. Phenotyping the clotting system. *Thrombosis and Haemostasis*. 2000;84(5):747-751.
85. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2002;32(5-6):249-253.
86. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology*. 2008;142(6):889-903.
87. La Mura V, Tripodi A, Tosetti G, et al. Resistance to thrombomodulin is associated with de novo portal vein thrombosis and low survival in patients with cirrhosis. *Liver International*. 2016.
88. Peter G. The thrombogram guide. In. *Outline of the method to measure thrombin generation using the Calibrated Automated Thrombogram*. Holanda: Thrombinoscope bv; 2007:65.

89. Califano F, Giovanniello T, Pantone P, et al. Clinical importance of thrombomodulin serum levels. *Europena Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2000;4(3):59-66.
90. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(11):693-699.
91. de Franchis R, Faculty BV. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *Journal of Hepatology*. 2010;53(4):762-768.
92. de Franchis R, Faculty BV. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *Journal of Hepatology*. 2015;63(3):743-752.
93. Saraiva A, Sternick G, Santos M, Montalvão S, Machado T, da Rocha T. *Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias*. Vol 1. 1º ed. Brasília/ Brasil 2012.
94. De Smedt E, Al Dieri R, Spronk HM, Hamulyak K, ten Cate H, Hemker HC. The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008;100(2):343-349.
95. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, et al. Thrombin generation and other coagulation parameters in a patient with homozygous congenital protein S deficiency on treatment with rivaroxaban. *International Journal of Hematology*. 2016;103(2):165-172.

96. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Mannucci PM. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2013;59(2):265-270.
97. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology Haemostasis Thrombosis*. 2003;33(1):4-15.
98. Sharara AI, Rockey DC. Gastroesophageal variceal hemorrhage. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(9):669-681.
99. Tripodi A, Baglin T, Robert A, et al. Reporting prothrombin time results as international normalized ratios for patients with chronic liver disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(6):1410-1412.
100. Lisman T, Leebeek FW. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Digestive Surgery*. 2007;24(4):250-258.
101. Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C. Specific laboratory methodologies achieve higher model for endstage liver disease (MELD) scores for patients listed for liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2004;10(8):995-1000.
102. Porte RJ, Lisman T, Tripodi A, Caldwell SH, Trotter JF, Group CiLDS. The International Normalized Ratio (INR) in the MELD score: problems and solutions. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(6):1349-1353.
103. Yang ZNJ, Sheth SH, Smith CH, et al. Plasma from chronic liver disease subjects exhibit differential ability to generate thrombin. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2015;26(7):844-847.

104. Brummel-Ziedins K. Models for thrombin generation and risk of disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11 Suppl 1:212-223.
105. Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, et al. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thrombosis Research*. 2012;130(6):929-934.