

MARINA PAMPONET MOTTA

**Geração de trombina e efeito heparinoide endógeno
em pacientes com cirrose antes e após o
tratamento da infecção bacteriana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias

São Paulo

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a meu marido, Bruno, por caminhar a meu lado na longa jornada que foi este projeto. Obrigada por compreender tantos momentos de ausência, por ter sido a voz que me incentivou nos períodos de cansaço e por me auxiliar a superar todas as dificuldades que encontrei no caminho.

A meu pai, Arnaldo Motta, por ser meu grande exemplo de médico, ética e amor à família. Obrigada por me fazer compreender que os maiores ensinamentos são transmitidos com os exemplos, por me inspirar na busca da realização de meus sonhos e por estar continuamente a meu lado.

A minha mãe, Gorete, o alicerce indispensável na construção de todas as conquistas de minha vida. Obrigada por doar tanto de seu tempo a meus projetos de vida, o que me permitiu ter o tempo e tranquilidade necessários a redução deste projeto, por ser este exemplo de amor e dedicação inesgotáveis!

A minha irmã, Gabriela, e à querida tia Marilu, pela verdadeira torcida, por me oferecerem o apoio e presença sempre que preciso, tão importantes para esta conquista.

Por fim, dedico esta tese a meu filho, Guilherme, o melhor e mais importante projeto de minha vida. Obrigada por representar a fonte de amor e força que me impulsionaram na concretização deste estudo, por ser minha motivação diária a buscar ser sempre alguém melhor... é pra você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a meu orientador, Prof. Dr. Alberto Farias, um pesquisador genuíno, um orientador sempre presente e uma das mentes mais brilhantes que conheço. Obrigada por tantos ensinamentos, pelo incentivo à pesquisa, conselhos profissionais e amizade construída. O crescimento científico que adquiri nestes anos de trabalho com você é imensurável e vai muito além do que sintetizei nesta tese.

Ao Prof. Dr. Elbio D'Amico, por sempre demonstrar disponibilidade em nos ajudar no aprimoramento deste estudo.

Aos Professores Dr. Flair José Carrilho e Dr. Luiz Augusto Carneiro d'Albuquerque, pelo apoio que viabilizaram no desenvolvimento desta pesquisa.

A mestre Tânia Rubia Flores da Rocha, cujo suporte constante e amplo conhecimento laboratorial sobre a hemostasia foram imprescindíveis para conseguirmos transformar meras hipóteses científicas em resultados laboratoriais.

As demais integrantes do laboratório de Hemostasia do HC-FMUSP, Valéria de Oliveira e Regina Tanzi, sempre gentis e disponíveis a auxiliarem no processamento e análise das amostras de sangue.

As queridas enfermeiras Beatriz Migita, Juliana Medeiros e Caroline Marcondes, excelentes profissionais que tanto se empenharam em me auxiliar no árduo trabalho que representou a inclusão dos pacientes neste estudo. O apoio de vocês foi essencial à concretização deste projeto.

Aos colegas médicos, enfermeiras e secretárias da Divisão de Gastroenterologia e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da FMUSP, que se dispuseram a contribuir no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes que, ainda que tão fragilizados pela doença, aceitaram doar um pouco de si por compreenderem a relevância da participação de cada um deles. Obrigada por confiarem nesta nossa busca por respostas à algumas incertezas desta grave doença.

Por fim, a Deus e São Judas Tadeu, por me permitirem a alegria desta conquista e por colocarem em meu caminho todas as pessoas a quem agradeço e dedico esta tese.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as
coisas serem o que são” ...

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese 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, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão da Literatura	2
1.1.1 Fisiologia da coagulação em indivíduos sadios	2
1.1.2 Distúrbios da hemostasia na cirrose	6
1.1.3 Alterações na hemostasia relacionadas à infecção bacteriana na cirrose	10
1.1.4 Testes laboratoriais da coagulação	12
1.1.4.1 Testes convencionais	12
1.1.4.2 Testes Globais	13
1.1.4.3 Testes Viscoelásticos	14
1.2 Racional e hipótese do estudo	28
2 OBJETIVOS	30
3 MÉTODOS	32
3.1 Desenho do estudo	33
3.2 Casuística	33
3.2.1 Locais de inclusão dos pacientes	33
3.2.2 Seleção	33
3.2.3 Critérios de inclusão	34
3.2.4 Critérios de exclusão	34
3.3 Critérios diagnósticos	35
3.3.1 Cirrose	35
3.3.2 Infecção	35
3.4 Cálculo amostral	36
3.5 Procedimentos realizados	36
3.5.1 Detalhamento dos procedimentos rotineiros	36
3.5.2 Detalhamento dos procedimentos específicos do estudo	37
3.5.2.1 Coletas de amostras de sangue	37

3.5.2.2	<i>Testes convencionais da coagulação (TP e TTPa)</i>	38
3.5.2.3	<i>Tromboelastometria (ROTEM®)</i>	39
3.5.2.4	<i>Potencial de geração de trombina</i>	41
3.5.3	<i>Avaliação da atividade do Anti-Xa, Proteína C e Antitrombina.</i>	45
3.6	<i>Análise estatística</i>	46
4	RESULTADOS	48
4.1	<i>Inclusões</i>	49
4.2	<i>Caracterização da amostra</i>	50
4.2.1	<i>Características basais relacionadas aos testes convencionais da coagulação</i>	52
4.2.2	<i>Características basais relacionadas à gravidade da cirrose</i>	53
4.3	<i>Características relacionadas à Infecção bacteriana</i>	55
4.4	<i>Perfil microbiológico</i>	56
4.5	<i>Intervalo de reavaliações</i>	56
4.6	<i>Efeito da infecção na gravidade da cirrose</i>	57
4.7	<i>Efeito da infecção nos testes convencionais da coagulação</i>	59
4.8	<i>Efeito da infecção na atividade heparinoide na tromboelastometria – ROTEM: INTEM/HEPTM</i>	61
4.9	<i>Dosagem do Anti Xa</i>	66
4.10	<i>Efeito da infecção no teste de geração de trombina</i>	67
4.10.1	<i>Efeito da infecção do ETP</i>	67
4.10.2	<i>Efeito da infecção no estado de hipercoagulabilidade</i>	70
4.10.3	<i>Efeito da infecção dos demais parâmetros da GT</i>	71
4.11	<i>Efeito da infecção na atividade dos anticoagulantes naturais</i>	73
4.11.1	<i>Atividade da Proteína C</i>	73
4.11.2	<i>Atividade da Antitrombina</i>	74
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	91
7	REFERÊNCIAS	94
8	ANEXOS	108
ANEXO A	109
ANEXO B	114

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACLF	insuficiência hepática crônica agudizada, do inglês <i>acute on chronic liver failure</i>
AICF	coagulação e fibrinólise intravasculare acelerada
AT	antitrombina
CAT	trombograma automatizado, do inglês <i>Calibrated Automated Thrombogram</i>
CFT	cinética da formação de fibrina <i>no ROTEM</i> , do inglês <i>clotting formation time</i>
CIVD	coagulação intravascular disseminada
CT	formação inicial da fibrina no ROTEM, do inglês <i>clotting time</i>
EH	encefalopatia hepática
ETP	potencial de trombina endógeno
ETPr	razão do potencial de trombina endógeno
FluCa	substrato fluorogênico diluído em tampão de cálcio
FT	fator tecidual
fVW	fator de von Willebrand
GT	geração de trombina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDA	hemorragia digestiva alta
ISI	índice internacional de sensibilidade
K	<i>kinetics time</i>
LT	tempo de latência, do inglês <i>lag time</i>
Ly	<i>lise do coágulo no ROTEM</i> , do inglês <i>lysis index</i>
MA	amplitude máxima do coágulo no TEG, do inglês <i>maximum amplitude</i>

MCF	amplitude máxima do coágulo no TEG, do inglês <i>maximum clot firmness</i>
MELD	modelo para doença hepática terminal, do inglês <i>model for end-stage liver disease score</i>
NASH	esteatohepatite não alcoólica, do inglês <i>nonalcoholic steatohepatitis</i>
NO	óxido nítrico
PAI	inibidor do ativador do plasmogênio
PAM	Pressão arterial média
PBE	peritonite bacteriana espontânea
PC	proteína C
PFC	plasma fresco congelado
PPP	plasma pobre em plaquetas
PS	proteína S
R	formação inicial da fibrina no TEG, do inglês <i>reaction time</i>
RNI	razão normalizada internacional
RNI _{liver}	razão normalizada internacional calibrado por plasmas de pacientes com cirrose
ROTEM	Tromboelastometria rotacional
TAFI	inibidor da fibrinólise ativável pela trombina
TEG	tromboelastograma
TEG-Hep	TEG com adição de heparinase
TFPI	inibidor da via do fator tecidual
TGT	teste de geração de trombina
TM	trombomodulina
TP	tempo de protrombina
t-PA	ativador do plasminogênio tecidual
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativado
ttpico	tempo para o pico na geração de trombina

FIGURAS

- Figura 1 -** Cascata de coagulação. A ativação gradual dos fatores de coagulação, leva à geração de trombina por meio das vias extrínseca e intrínseca da coagulação. A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel..... 3
- Figura 2 -** Modelo celular da hemostasia dividido em 3 três fases: 1) Iniciação; 2) Amplificação 3) Propagação. A trombina tem participação relevante em todas as fases. 4
- Figura 3 -** Ativação da proteína C. A trombomodulina (TM) é uma proteína transmembrana do endotélio vascular. A trombina liga-se à TM e o complexo formado ativa a proteína C (A). A proteína C ativada se liga ao seu cofator proteína S e é liberada do complexo para a circulação, onde exercerá seu papel anticoagulante (B) 5
- Figura 4 -** Efeitos anticoagulantes da antitrombina (AT). A potencialização do efeito inibitório da AT pelo heparan sulfato e heparina também está representada. 6
- Figura 5 -** Alterações da coagulação em pacientes com cirrose. VWF: fator de von Willebrand, TAFI: inibidor da fibrinólise ativada pela trombina, t-PA: ativador do plasminogênio tecidual, PAI: inibidor do plasminogênio ativado. 8
- Figura 6 -** Reequilíbrio da hemostasia na cirrose. (A) Indivíduos saudáveis: níveis preservados de fatores pró e anticoagulantes permitem um equilíbrio da hemostasia estável, mesmo sob condições de estresse. (B) Pacientes com cirrose: deficiências nas vias pró e anticoagulantes preserva o reequilíbrio da hemostasia mas de maneira menos estável que nos indivíduos saudáveis..... 9
- Figura 7 -** Comparação entre os testes da coagulação. A linha pontilhada representa o ponto em que testes convencionais da coagulação (TP e TTPa) são interrompidos em relação ao teste de geração de trombina (curva preta) e ao tromboelastograma (curva cinza). 13

Figura 8 -	Representação esquemática do ROTEM. Uma cubeta com sangue total permanece fixa em um bloco aquecido enquanto um pino suspenso oscila a uma velocidade constante. As rotações subsequentes do pino são inversamente proporcionais à força viscoelástica do coágulo em formação, a qual é detectada por um sistema intergrado a um sensor óptico.....	15
Figura 9 -	Principais parâmetros na curva do ROTEM.	15
Figura 10 -	Curva do TEG. A nomenclatura dos principais parâmetros do TEG estão em laranja e a nomenclatura correspondente do ROTEM encontra-se em azul.....	15
Figura 11 -	Desaparecimento do efeito heparinoide após resolução da infecção em paciente com cirrose hepática. Durante a infecção (PBE) foi observado um efeito heparinoide no TEG-Nat e TEG-Hep que desapareceu após a resolução da infecção, 10 dias após a avaliação inicial.....	21
Figura 12 -	Curva representativa do teste da Geração de Trombina e os principais parâmetros.....	23
Figura 13 -	A curva da geração de trombina analisa a participação dos fatores pró e anticoagulantes endógenos na geração de trombina.	24
Figura 14 -	Valores de ETP nos controles sadios (triângulos) e pacientes com cirrose (círculos) analisados sem e com trombomodulina. Barras horizontais representam valores medianos.	26
Figura 15 -	Gráficos de caixa da distribuição dos valores da razão do ETP com/sem trombomodulina (ETPr) em controles sadios, pacientes com cirrose (estratificados de acordo com o escore de Child Pugh) e indivíduos portadores de deficiência congênita de proteína C.	27
Figura 16 -	Aparelho para realização do ROTEM® (tromboelastometria). A pipetagem é automática e existem quatro canais distintos para a realização dos ensaios.....	39
Figura 17 -	Principais parâmetros na curva do ROTEM. A presença de heparina ou heparinoides na amostra de sangue interferem no parâmetro inicial da curva (CT) do INTEM e do HEPTM, que representa o tempo de formação inicial da fibrina	40

Figura 18 - Curvas representativas da detecção de efeito heparinoide no sangue: prolongamento na duração do CT _{INTEM} (A) e encurtamento na duração do CT _{HEPTEM} (B) quando comparado ao CT _{INTEM}	41
Figura 19 – Aparelho utilizado no teste da geração de trombina (GT): CAT (The Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®) e placa de microtitulação de polipropileno, com 96 poços arredondados (Immulon 2Hb, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia).....	42
Figura 20 - Técnica de preenchimento dos poços da placa de microtitulação para teste de geração de trombina. Cada paciente teve suas amostras colhidas na inclusão no estudo (sem e com TM) e na reavaliação (sem e com TM) analisadas na mesma placa. Todas as quatro análises foram realizadas em triplicata O teste com calibrador nas fases pré e pós-transfusional também foi realizado em triplicata, totalizando 18 poços por paciente. Todos os poços foram preenchidos com PPP do paciente. Aos poços para análise foram acrescentados reagente contendo FT, FLP e FluCa (com ou sem adição de TM) e aos poços para controle foi adicionado o calibrador.....	44
Figura 21 - Fluxograma dos pacientes elegíveis e pacientes que completaram o estudo	50
Figura 22 - Características basais dos testes de coagulação convencionais	52
Figura 23 - Escores basais de gravidade da cirrose dos pacientes.....	54
Figura 24 - Comparação dos testes convencionais da coagulação entre a inclusão e a reavaliação no grupo infectado e no grupo não infectado	60
Figura 25 - Comparação entre os parâmetros do CT _{INTEM} e CT _{HEPTEM} na inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo.....	62
Figura 26 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTEM na inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo	65
Figura 27 - Comparação dos valores entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo dos parâmetros da geração de trombina. A) geração de trombina sem trombomodulina (ETP). B) geração de trombina com trombomodulina (ETP + TM) e C) Razão de ETP (ETPr)	68

Figura 28 - Comparação dos valores entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo dos demais parâmetros da geração de trombina. A) lag time (LT) B) tempo para o pico (tpico) e C) pico.....	72
Figura 29 - Comparação dos valores de PC entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo	73
Figura 30 - Comparação dos valores da AT entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo	74

TABELAS

Tabela 1 - Principais parâmetros nas curvas do ROTEM e TEG, definições, significados.....	17
Tabela 2 – Parâmetros de geração de trombina em indivíduos normais.....	44
Tabela 3 - Características basais dos pacientes com cirrose	51
Tabela 4 - Características basais dos testes convencionais de coagulação	52
Tabela 5 - Características basais dos escores de gravidade da cirrose	54
Tabela 6 - Sítios das infecções bacterianas	55
Tabela 7 - Comparação entre as características clínicas e laboratoriais no momento da inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo.....	58
Tabela 8 - Comparação dos resultados dos testes convencionais da coagulação entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes de cada grupo.....	60
Tabela 9 - Comparação entre os parâmetros do INTEM e HEPTM na inclusão e na reavaliação no grupo com infecção.....	62
Tabela 10 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTM na inclusão e na reavaliação dos pacientes do grupo infectado	64
Tabela 11 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTM na inclusão e na reavaliação no grupo sem infecção	64
Tabela 12 - Comparação dos resultados do Anti-Xa entre a inclusão e a reavaliação de cada grupo	66
Tabela 13 - Comparação dos valores de geração de trombina entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo	69
Tabela 14 - Comparação entre frequências na inclusão e na reavaliação de pacientes com padrões de normalidade ou hipercoagulabilidade na geração de trombina.....	70

RESUMO

Motta, MP *Geração de trombina e efeito heparinoide endógeno em pacientes com cirrose antes e após o tratamento da infecção bacteriana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O conceito atual sobre a coagulopatia na cirrose indica que existe um reequilíbrio da hemostasia com tendência à hipercoagulabilidade plasmática. A infecção bacteriana pode romper este reequilíbrio, pois promove alterações na coagulação e induz à liberação endotelial de heparinoides endógenos. Entretanto, o impacto desta condição na geração de trombina é desconhecido. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da infecção bacteriana na geração de trombina em pacientes com cirrose.

Métodos: pacientes com cirrose e infecção bacteriana (grupo infectado) foram incluídos até 24h, após o início da terapia antibiótica e reavaliados, no mínimo, 5 dias após o término do tratamento. Pacientes com cirrose descompensada e sem infecção (grupo não infectado) também foram incluídos e reavaliados, sem intervenção entre as coletas. O desfecho principal foi o impacto da infecção bacteriana no parâmetro da geração de trombina (GT), ETP com trombomodulina (TM). TM é um ativador da proteína C adicionado ao ensaio para reproduzir as condições *in vivo*. Todos os parâmetros da GT (com e sem TM) também foram analisados. Os ensaios ROTEM, INTEM e HEPTM (modificados com heparinase), foram utilizados na avaliação do efeito heparinoide endógeno. Foram realizados ensaios de anti-Xa, proteína C (PC), antitrombina(AT), RNI / TP e TTPa. Todos os resultados foram comparados em cada grupo entre os tempos de avaliação. **Resultados:** foram incluídos e reavaliados 36 pacientes com cirrose infectados e 28 com cirrose sem infecção. Os valores do ETP TM durante a infecção foram significativamente maiores, após a resolução da infecção (de $1.145,4 \pm 360,7$ nmol / L * min a $958,1 \pm 254,8$ nmol / L * min, $p = 0,005$). A ETP razão (com / sem TM) permaneceu praticamente inalterada ($0,78 \pm 0,15$ vs $0,77 \pm 0,09$, $p = 0,89$). A frequência de GT normal a elevada no parâmetro ETP TM foi a mesma durante e após a resolução da infecção (97,2%) e no parâmetro ETP a razão foi idêntica (respectivamente, 97,2% e 100%). O efeito heparinoide foi visto somente nos pacientes com infecção, com duração do CT_{INTEM} significativamente maior que a CT_{HEPTM} ($p = 0,004$) neste grupo. Este efeito desapareceu, após a resolução da infecção ($p = 0,75$). As deficiências de PC e AT foram significativamente mais graves nos pacientes infectados ($p < 0,01$). RNI / TP, aPTT que pioraram na infecção ativa ($p < 0,05$). No grupo não infectado, nenhum destes parâmetros apresentou diferença significativa entre a inclusão e a reavaliação.

Conclusão: Nos pacientes com cirrose e infecção bacteriana, a quantidade total de trombina gerada é maior que a observada após a resolução da infecção, e está associada a um agravamento na deficiência de PC e AT. Apesar do efeito heparinoide endógeno durante a infecção na cirrose, a hipercoagulabilidade plasmática encontra-se preservada e não pôde ser avaliada pelos testes de coagulação convencionais.

Descritores: cirrose; hepatopatias; coagulação sanguínea; hemostasia; testes de geração de trombina; tromboelastograma; infecção; heparinoides.

ABSTRACT

Motta, MP. *Thrombin generation and endogenous heparinoids effect in patients with cirrhosis before and after treatment of bacterial infection* [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Background and aims: The current concept of coagulopathy in cirrhosis indicates that there is a rebalancing of hemostasis with a tendency to plasma hypercoagulability. Bacterial infection can disrupt this rebalancing, as it promotes changes in coagulation and releases endothelial heparinoids. However, the effect of this condition on the thrombin generation is unknown. Our aim was to assess the effect of bacterial infection on thrombin generation in patients with cirrhosis. **Methods:** patients with cirrhosis and bacterial infection (infected group) were evaluated within 24 hours after start antibiotic therapy and at least 5 days after infection resolution. Patients with decompensated cirrhosis and not infected (not infected group) were also enrolled and reevaluated, without any intervention between evaluation times. Primary endpoint was the effect of bacterial infection on thrombin generation (TG) parameter ETP with TM (ETP TM). TM is a protein C activator added to mimic *in vivo* conditions. All TG parameters (with and without TM) were also analysed. ROTEM assays, INTEM and HEPTM (heparinase-modified), was performed to evaluate the endogenous heparinoids effect. Anti-Xa, protein C (PC), antithrombin (AT), RNI/TP and TTPa assays were performed. All results were compared within each group between evaluation times. **Results:** we included and reevaluated 36 cirrhotic infected patients and 28 cirrhotics not infected. ETP TM values in infected cirrhotics were significantly higher than after resolution of infection (from 1145.4 ± 360.7 nmol/L * min to 958.1 ± 254.8 nmol / L * min, $p = 0.005$). ETP ratio (with/without TM) remained practically unchanged ($0,78 \pm 0,15$ vs $0,77 \pm 0,09$, $p = 0,89$). Frequency of normal or high TG during infection and after resolution of infection was the same by the ETP TM (97,2%) and was identical by the ETP ratio (respectively, 97,2% and 100%). A heparinoid effect was found only in infected cirrhotics, with CT_{INTEM} duration significantly longer than CT_{HEPTM} ($p = 0.004$). This effect disappeared after resolution of infection ($p = 0.75$). PC and AT deficiencies were significantly more severe in infected patients ($p < 0,01$). RNI/TP, aPTT was worsen at active infection ($p < 0.05$). None of these parameters exhibited a significant difference between inclusion and reevaluation times in not infected group. **Conclusion:** patients with cirrhosis exhibits significant higher amount of thrombin generation during bacterial infection and it is associated with reduction of PC and AT levels. Despite the endogenous heparinoid effect during infection in cirrhosis, plasma

hypercoagulability is preserved and cannot be assessed by conventional coagulation tests.

Descriptors: cirrhosis; liver diseases; blood coagulation; hemostasis; thrombin generation; thromboelastogram; infection; heparinoid.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Fisiologia da coagulação em indivíduos sadios

O conhecimento de conceitos básicos da hemostasia é essencial para a compreensão das complexas alterações na coagulação que ocorrem na cirrose e na infecção bacteriana.

A hemostasia representa o equilíbrio ténue entre fatores procoagulantes e anticoagulantes, que atuam em conjunto para manter o fluxo sanguíneo ou promover a formação de coágulos após lesão vascular. Classicamente, o processo da hemostasia é dividido nas seguintes fases (1-3): 1) hemostasia primária, representada pela adesão, ativação e agregação das plaquetas 2) hemostasia secundária, quando ocorre a ativação da tradicional "cascata de coagulação", dividida nas vias intrínsecas, extrínsecas e comuns, cujo objetivo final é a produção de trombina em larga escala, para conversão do fibrinogênio em fibrina 3) fibrinólise, caracterizada pela degradação do coágulo (**Figura 1**). Embora o conceito de "cascata da coagulação" tenha representado um avanço importante no entendimento da coagulação, observações experimentais e clínicas posteriores demonstraram que ele não reflete de maneira fidedigna os eventos da hemostasia *in vivo*, pois não representa a participação dos elementos celulares na formação do coágulo. Mais recentemente, o modelo clássico da hemostasia foi substituído pelo modelo celular da hemostasia, descrito por Hoffman et al. ^(4, 5). De acordo com o modelo celular, as diferentes fases da hemostasia ocorrem simultaneamente nas superfícies celulares e são divididas em (**Figura 2**): 1) Iniciação; 2) Amplificação 3) Propagação e a trombina têm participação central em todas as fases ⁽⁶⁾.

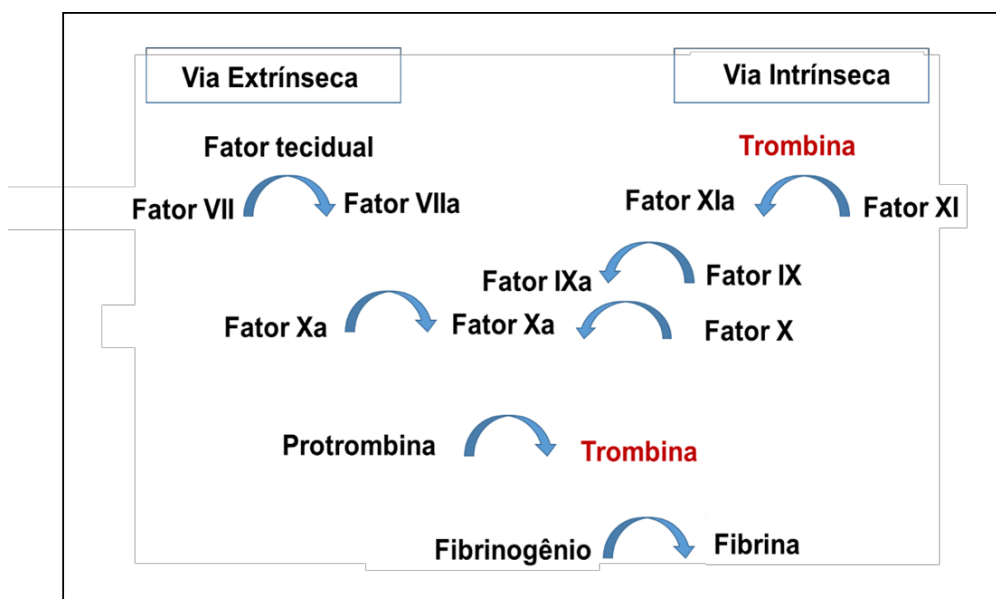


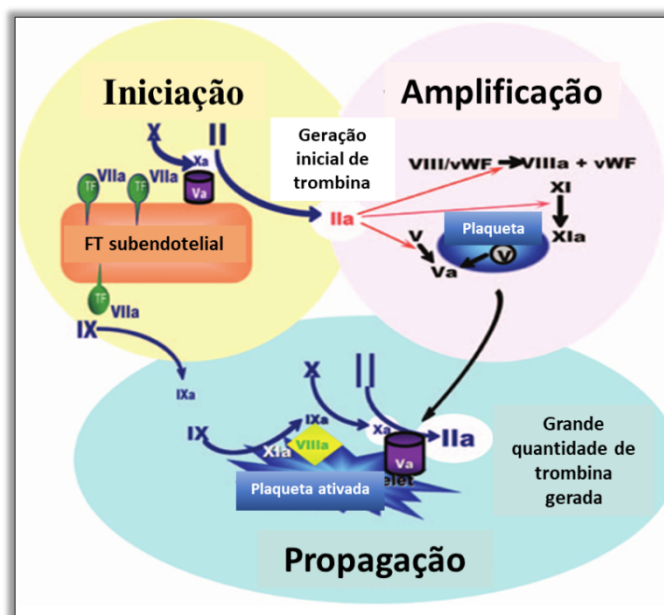
Figura 1 - Cascata de coagulação. A ativação gradual dos fatores de coagulação leva à geração de trombina por meio das vias extrínsecas e intrínsecas da coagulação. A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel

Na fase de iniciação, a lesão vascular promove exposição do fator tecidual (FT), o principal iniciador fisiológico da coagulação, presente constitutivamente nas células do endotélio vascular, mas também encontrado nas células musculares lisas e fibroblastos. O FVII plasmático, ao entrar em contato com o FT exposto no vaso, forma o complexo FVIIa/FT. Por sua vez, este complexo ativa sobretudo os fatores IX e X, seguidos da geração de trombina em pequena quantidade (**Figura 2**)^(4, 7).

Na fase de amplificação, a pequena quantidade de trombina gerada pelas células que expressam o FT promove a ativação das plaquetas. Por sua vez, as plaquetas ativadas permitem que os fatores que compõem a antiga “cascata da coagulação” liguem-se à sua superfície. A trombina também participa da ativação do fator de von Willebrand (FvW), que promove a adesão e agregação plaquetárias no sítio da lesão^(4, 7, 8).

A fase de propagação caracteriza-se pelo recrutamento e ativação de mais plaquetas para o sítio da lesão e pela geração de trombina em larga

escala (FIIa). Finalmente, a trombina promove a conversão do fibrinogênio em fibrina que, com o tampão plaquetário e sob a ação estabilizadora do fator XIII, representam o coágulo estável ⁽⁹⁻¹¹⁾.

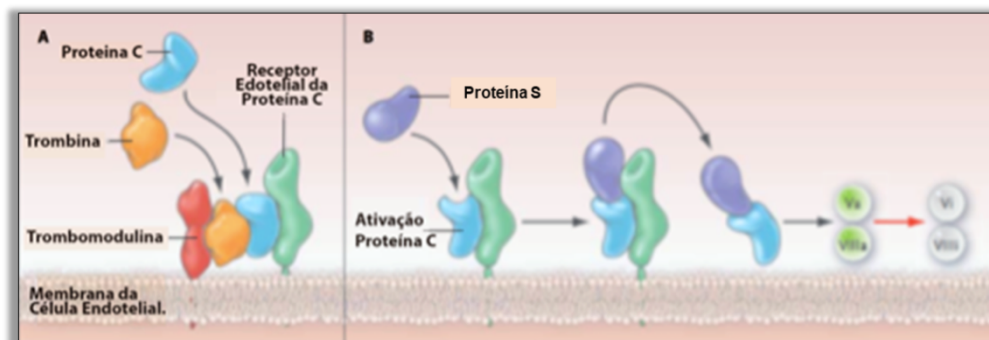


Fonte: Adaptado de Hoffman et al. ⁽⁵⁾.

Figura 2 – Modelo celular da hemostasia dividido em três fases: 1) Iniciação; 2) Amplificação 3) Propagação. A trombina tem participação relevante em todas as fases

Uma vez formado o coágulo, o sistema anticoagulante impede a propagação indiscriminada da coagulação e restringe a formação do trombo ao local da lesão. As proteínas que integram o sistema anticoagulante são representadas pela proteína C (PC), antitrombina (AT), TFPI (“*tissue factor pathway inhibitor*”) e a proteína S ^(12, 13). A proteína C é uma proteína plasmática circulante que possui um receptor endotelial (**Figura 2**). O principal evento inicial para a ativação da proteína C é a ligação da trombina à trombosmodulina (TM), uma proteína transmembrana do endotélio vascular (**Figura 2**). Em seguida, o complexo trombina-TM ativa a proteína C que se encontra ligada a seu receptor endotelial. A proteína C ativada liga-se a seu cofator proteína S e é liberada do complexo para a circulação, onde exercerá seu papel anticoagulante: inativa outros fatores da coagulação

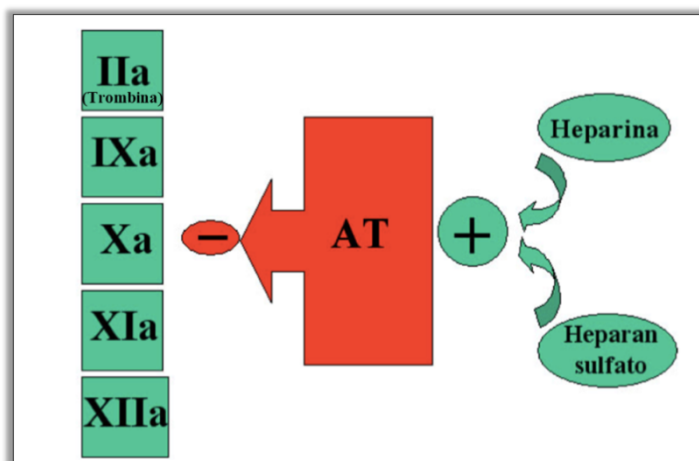
(fatores V e VIII), suprime a formação de mais trombina e interrompe a propagação do coágulo (**Figura 3**).



Fonte: Adaptado de Tripodi et al. ⁽¹¹⁾.

Figura 3 – Ativação da proteína C. A trombomodulina (TM) é uma proteína transmembrana do endotélio vascular. A trombina liga-se à TM e o complexo formado ativa a proteína C (**A**). A proteína C ativada liga-se a seu cofator proteína S e é liberada do complexo para a circulação, onde exercerá seu papel anticoagulante (**B**)

A AT (anteriormente denominada AT III) é o inibidor primário da trombina e também possui efeito inibitório sobre outras enzimas da coagulação, sobretudo o fator Xa (Figura 4). Ela possui potente ação anticoagulante, capaz de interromper qualquer atividade enzimática procoagulante excessiva. A ação anticoagulante da heparina e do heparan sulfato, um proteoglicano com efeito heparinoide presente no endotélio vascular deve-se à capacidade destas moléculas potencializarem o efeito anticoagulante da AT em cerca de 1.000 vezes ^(7, 13), (**Figura 4**).



Fonte: Adaptado de Franco et al. ⁽⁷⁾

Figura 4 – Efeitos anticoagulantes da antitrombina (AT). A potencialização do efeito inibitório da AT pelo heparan sulfato e heparina também está representada

Finalmente, o sistema fibrinolítico, mediado pela ativação do sistema plasminogênio/plasmina, promove a degradação da fibrina. A trombina também é capaz de estimular um inibidor da fibrinólise, denominado TAFI (“*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*”) ⁽¹⁴⁾.

Diante do exposto, torna-se compreensível o papel central da trombina na hemostasia, notadamente, como uma potente ativadora das vias pró-coagulantes, mas também com importante função regulatória nas vias celulares, anticoagulantes e antifibrinolíticas.

1.1.2 Distúrbios da hemostasia na cirrose

Na cirrose hepática os distúrbios da hemostasia são complexos e multifatoriais, pois coexistem alterações em graus variados nas vias pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticas, que interagem de modo dinâmico ^(11, 15, 16). As principais alterações estão resumidas na **Figura 5**.

Na cirrose, a síntese hepática de fatores pró-coagulantes plasmáticos (fatores II, V, VII, IX, X, XI) encontra-se reduzida, com exceção do fator VIII, que é produzido pelas células endoteliais dos sinusóides hepáticos ^(16, 17). Os

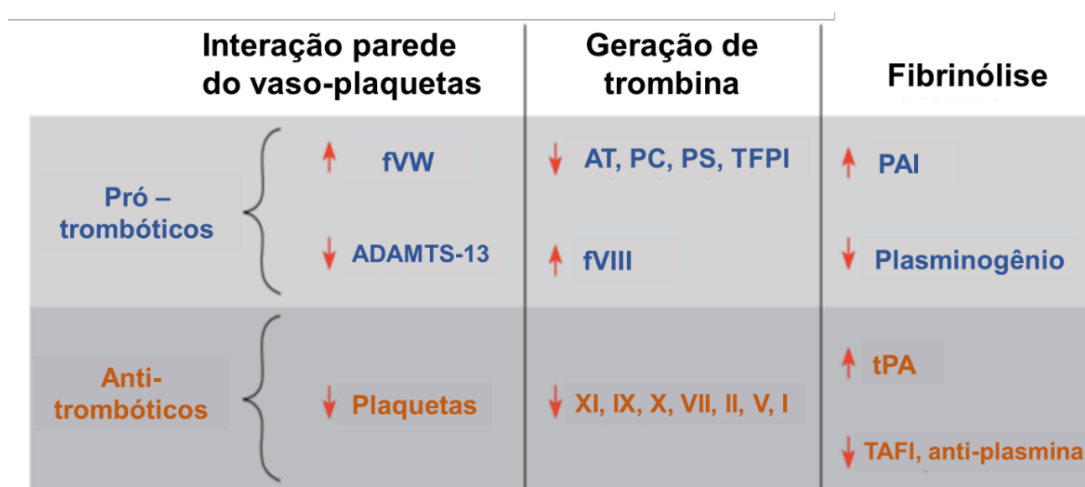
fatores com as menores meias-vidas são o V e VII (12h e 4-6h, respectivamente) e eles também são os fatores pró-coagulantes mais deficientes na cirrose. Portanto, este é um dos motivos para a alteração isolada do TP/INR, exame dependente de ambos fatores, ser um achado comum na cirrose. A deficiência de vitamina K também contribui para a alteração do TP/INR, observada entre 2% e 23% dos pacientes com cirrose, seja pela desnutrição comumente observada nestes pacientes, pela colestase ou pela redução de sua absorção ⁽¹⁸⁾.

Os principais anticoagulantes naturais proteína C, proteína S e AT, também são sintetizados pelo fígado e encontram-se deficientes na cirrose ^(19, 20). Na cirrose avançada, os níveis de fibrinogênio também estão diminuídos pela produção hepática deficiente e sua funcionalidade alterada, em razão da elevação do ácido siálico que impede sua polimerização ⁽²¹⁾.

A redução do número de plaquetas na cirrose deve-se sobretudo à destruição plaquetária pelo hiperesplenismo, à redução na produção das plaquetas pela menor produção hepática de trombopoietina e à formação de anticorpos contra as plaquetas, podendo levar a uma CIVD (coagulação intravascular disseminada) crônica de baixo grau. A ativação das plaquetas também pode estar diminuída, em razão do aumento da produção endotelial de óxido nítrico e prostaciclina, e a interação entre plaquetas e endotélio vascular alterada pela proteólise dos receptores plaquetários mediada pela plasmina ^(22, 23). Em contrapartida, a adesividade e agregação plaquetárias estão preservadas ou até aumentadas, pois existe uma elevação compensatória nos níveis de FvW, pelo aumento de sua produção endotelial e redução do ADAMTS-13, uma protease responsável pela clivagem da estrutura multimérica e consequente inativação do FvW ⁽²⁴⁾.

Na cirrose, coexistem alterações nas vias pró e antifibrinolíticas, pois todas as proteínas que participam do sistema fibrinolítico, exceto o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e seu inibidor (PAI-1), são sintetizadas pelo fígado ⁽²⁵⁻²⁷⁾. Na cirrose avançada, é descrita uma tendência à hiperfibrinólise

que se correlaciona com a gravidade da doença hepática e parece ser decorrente da deficiência de TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) (25, 27-29). Estudos que utilizaram ensaios sensíveis e específicos para o diagnóstico de CIVD permitiram documentar, particularmente na cirrose avançada, na infecção e na sepse, uma condição denominada de coagulação intravascular e fibrinólise aceleradas (*accelerated intravascular coagulation and fibrinolysis – AICF*) (30).



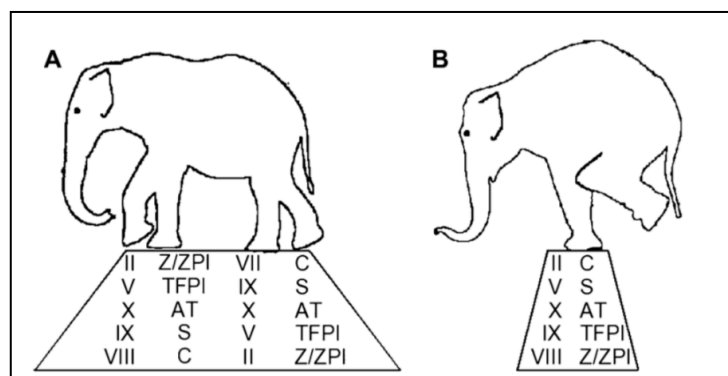
Fonte: Adaptado de Tripodi et al. (31).

Figura 5 – Alterações da coagulação em pacientes com cirrose. VWF: fator de von Willebrand, TAFI: inibidor da fibrinólise ativada pela trombina, t-PA: ativador do plasminogênio tecidual, PAI: inibidor do plasminogênio ativado

Até recentemente, a cirrose era considerada um estado de “autoanticoagulação” com tendência hemorrágica. Este conceito foi sustentado sobretudo pelas alterações nos testes convencionais da coagulação (TP e TTPa), pela redução na contagem de plaquetas, por evidências laboratoriais sugestivas de hiperfibrinólise na cirrose avançada e pelas manifestações hemorrágicas observadas nos pacientes com cirrose. Entretanto, estas evidências a favor de uma tendência “antitrombótica” (**Figura 5**) não representam o real estado da hemostasia na cirrose, à

medida que os testes convencionais de coagulação não são capazes de identificar deficiências concomitantes nas vias anticoagulantes, a contagem de plaquetas não avalia a maior capacidade de ativação e agregação plaquetária na cirrose ^(11, 15, 16, 31). Adicionalmente, a hiperfibrinólise na cirrose avançada coexiste com a coagulação intravascular acelerada e os principais eventos hemorrágicos estão relacionados ao agravamento da hipertensão portal.

No atual entendimento da coagulação na cirrose, a coexistência de alterações nas vias protrombóticas e antitrombóticas, promove um reequilíbrio da hemostasia, porém de modo mais instável quando comparado a indivíduos saudáveis (**Figura 6**). Esta hemostasia preservada em um limiar mais baixo é denominada de “teoria das margens estreitas” ^(20, 32) (**Figura 6**). Algumas circunstâncias, representadas sobretudo pelas infecções bacterianas, insuficiência renal e sangramentos podem interromper o tênue reequilíbrio da hemostasia mais facilmente em favor de uma tendência protrombótica ou antitrombótica ⁽³³⁾.



Fonte: Adaptado de Monroe et al.⁽³⁴⁾.

Figura 6 – Reequilíbrio da hemostasia na cirrose. **(A)** Indivíduos saudáveis: níveis preservados de fatores pro e anticoagulantes permitem um equilíbrio da hemostasia estável, mesmo sob condições de estresse. **(B)** Pacientes com cirrose: deficiências nas vias pro e anticoagulantes preserva o reequilíbrio da hemostasia, mas de modo menos estável que nos indivíduos saudáveis

1.1.3 Alterações na hemostasia relacionadas à infecção bacteriana na cirrose

A frequência de infecção bacteriana na cirrose avançada é elevada, com incidência anual estimada entre 35% e 45%, esta condição é considerada a principal causa de morte na cirrose, seguida de hemorragia digestiva ^(35, 36). Dados extraídos de uma metanálise revelam que a infecção eleva a mortalidade na cirrose em cerca 4 vezes e, aproximadamente, 30% dos óbitos ocorrem em até um mês, após o quadro infeccioso ⁽³⁷⁾.

O aumento da susceptibilidade à infecção na cirrose está relacionada a diversos distúrbios da imunidade celular e inata nestes pacientes como: prejuízo na atividade bactericida; redução nos níveis de opsoninas e complementos circulantes; deficiências na função monocitária, fagocítica e na quimiotaxia das células do sistema imune; defeitos atividade do sistema retículo-endotelial. Adicionalmente, alterações na motilidade intestinal, supercrescimento bacteriano e aumento da permeabilidade intestinal, predispõem a endotoxemia e a translocação bacteriana ⁽³⁸⁾.

As enzimas que participam da resposta imune e inflamatória estão intimamente relacionadas às proteínas da coagulação e contribuem para a coagulopatia da infecção ^(39, 40). Por isto, a infecção representa uma das principais condições que podem interromper o reequilíbrio da hemostasia na cirrose. A favor de um desequilíbrio com tendência anticoagulante na infecção em pacientes com cirrose, está a liberação de substâncias heparinoides pelo endotélio vascular ^(41, 42), o consumo dos fatores da coagulação ⁽⁴³⁾, o prejuízo da agregação plaquetária em razão da liberação de NO e prostaciclina ⁽⁴⁴⁾ e a hiperfibrinólise induzida pelas citocinas ⁽⁴⁵⁾. A favor de uma tendência pró-coagulante em pacientes com cirrose durante a infecção bacteriana, existe a lesão endotelial e ativação da coagulação via FT, a liberação do FvW e consequente aumento da capacidade de agregação plaquetária ⁽⁴⁶⁾ e a redução dos níveis de fatores anticoagulantes, (proteína C e AT) ⁽⁴³⁾.

Clinicamente, as infecções bacterianas são consideradas um fator de risco independente para a hemorragia digestiva alta (HDA) varicosa e estima-se que elas estejam presentes em 35%-66% dos pacientes com cirrose e sangramento digestivo ⁽⁴⁷⁾. Além disso, a presença de infecção dificulta o controle da HDA varicosa ⁽⁴⁸⁾, aumenta o risco de ressangramento precoce e a probabilidade de óbito pelo sangramento varicoso ^(48, 49). Estes dados sustentam a recomendação formal pelas diretrizes internacionais de profilaxia antibiótica nos pacientes com cirrose e HDA varicosa ^(50, 51). Entretanto, é importante ressaltar que o risco de sangramento varicoso em pacientes com cirrose e infecção parece estar mais relacionado ao agravamento da hipertensão portal que aos distúrbios da hemostasia induzidos pela infecção bacteriana em si. Isto porque a ocorrência de sangramentos espontâneos em outros sítios não relacionados à hipertensão portal é um evento incomum em pacientes com cirrose e infecção ⁽⁵²⁾. Este agravamento da hipertensão portal durante a infecção é justificado pela produção de endotelina e de outras substâncias vasoconstrictoras induzidas pela endotoxemia. Estas substâncias promovem a contração das células estreladas sinusoidais do fígado, elevação da resistência vascular intra-hepática e provocam consequente aumento da hipertensão portal ^(53, 54).

Na literatura, não identificamos estudos clínicos desenhados para avaliar o risco de eventos tromboembólicos em pacientes com cirrose e infecção bacteriana. De acordo com dados extraídos de estudos de base populacional, pacientes com cirrose hospitalizados exibem maior risco de tromboembolismo venoso que controles hospitalizados sem doença hepática ^(55, 56). Embora a infecção bacteriana seja uma das principais causas de hospitalização na cirrose, nestes trabalhos populacionais a prevalência de infecção bacteriana na amostra não foi descrita.

Tendo em vista a complexidade dos distúrbios de hemostasia resultantes da associação entre a coagulopatia da infecção e a coagulopatia da cirrose, torna-se um desafio compreender se esta associação promove um desequilíbrio da hemostasia em favor de um estado pro-sangramento ou protrombótico.

1.1.4 Testes laboratoriais da coagulação

1.1.4.1 Testes convencionais

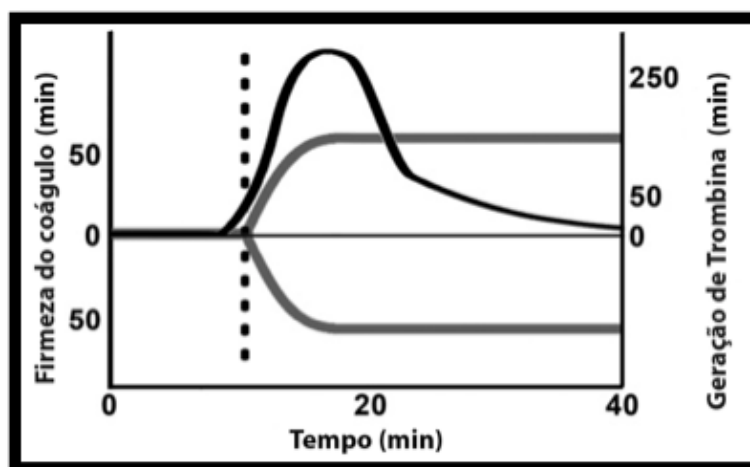
Embora a visão clássica da cascata de coagulação baseada em vias intrínsecas e extrínsecas não seja fisiologicamente recomendada, ela é útil na interpretação de testes de coagulação convencionais, representados pelo tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa).

O TP é um exame sensível a alterações sobretudo na “via extrínseca” da coagulação, representada pelos fatores I, II (protrombina), V, VII e X, produzidos no fígado. Este exame foi amplamente utilizado nas últimas décadas para avaliar e prever o risco de sangramento em pacientes com cirrose, pois ele representa a redução dos níveis desses fatores procoagulantes na cirrose. A conversão dos resultados do TP para a escala *international normalized ratio* (INR) é validada apenas para a monitorização de pacientes em anticoagulação com antagonistas da vitamina K e o resultado está sujeito a ampla variabilidade ^(57, 58). Com o intuito de melhorar a reprodutibilidade do INR em pacientes com cirrose, foi descrita uma padronização metodológica diferenciada, denominada na literatura de INR-Liver ⁽⁵⁹⁾. A aplicabilidade deste teste é limitada e ele não foi adotado para uso rotineiro. O TTPa é sensível a deficiências de fatores da “via intrínseca” da coagulação, notadamente, os fatores VIII, IX, XI, XII e, em menor escala, da “via comum” representada pelos fatores V, X, protrombina e fibrinogênio ⁽⁵⁸⁾. Entretanto, o TP/INR e o TTPa não avaliam a elevação plasmática dos fatores procoagulantes (como o fator VIII), a deficiência dos anticoagulantes naturais (como a antitrombina e a proteína C), nem a maior capacidade de agregação plaquetária na cirrose. Portanto, eles não representam as alterações que promovem o reequilíbrio da hemostasia na cirrose ^(11, 60). Além disso, ambos os testes têm como etapa final a conversão de fibrinogênio em fibrina e são interrompidos precocemente, quando apenas 5% da trombina total é gerada (**Figura 7**) ⁽⁶¹⁾. Nesse sentido, não é surpreendente que os estudos demonstrem uma baixa correlação entre os

resultados dos testes convencionais da coagulação e o estado final da hemostasia na cirrose (20, 32, 62, 63).

1.1.4.2 Testes Globais

Em razão das limitações descritas nos testes convencionais, os testes globais de coagulação destacam-se como ferramentas úteis para uma melhor compreensão dos distúrbios da hemostasia na cirrose. Os principais representantes dos testes globais são os testes viscoelásticos, representados pela tromboelastograma (TEG) e tromboelastometria (ROTEM), e o teste da geração de trombina (GT) (64-66). A **Figura 7** ilustra as limitações dos testes convencionais na análise da hemostasia, quando comparados aos testes globais da coagulação.



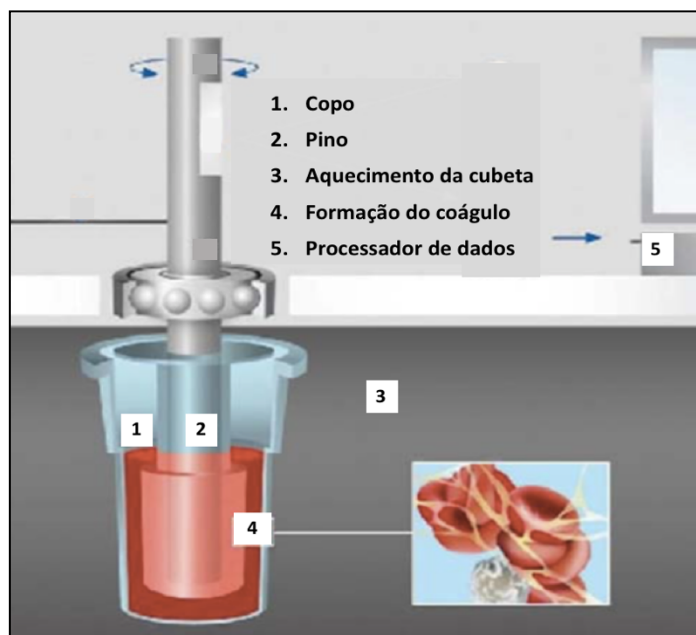
Fonte: Adaptado de Bolliger et al. (67).

Figura 7 – Comparação entre os testes da coagulação. A linha pontilhada representa o ponto em que testes convencionais da coagulação (TP e TTPa) são interrompidos em relação ao teste de geração de trombina (curva preta) e ao tromboelastograma (curva cinza)

1.1.4.3 Testes Viscoelásticos

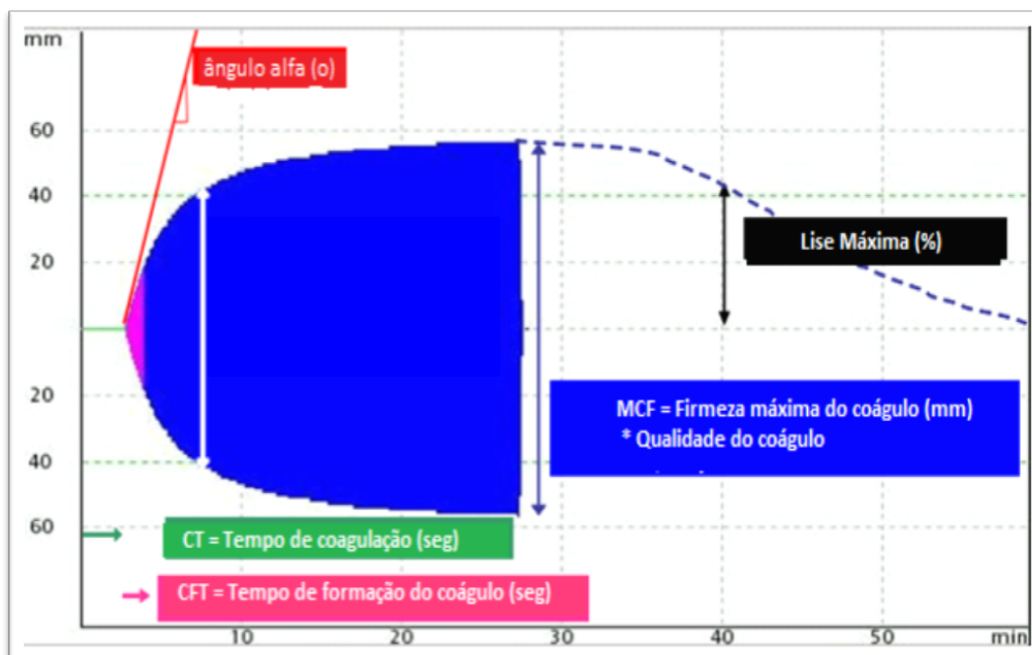
O tromboelastograma (TEG) e a tromboelastometria (ROTEM) são testes dinâmicos que se baseiam nas alterações viscoelásticas que ocorrem durante a iniciação, formação e lise do coágulo. A representação gráfica do teste permite analisar o processo global da coagulação, incluindo a participação das plaquetas, células sanguíneas e proteínas da coagulação. Os dois dispositivos, TEG® e ROTEM®, nos fornecem essencialmente as mesmas informações, entretanto em razão de algumas diferenças comerciais e técnicas operacionais entre os exames, os resultados não são diretamente superponíveis. As principais diferenças operacionais incluem⁽⁶⁸⁾: o ROTEM é capaz de analisar quatro amostras simultaneamente, enquanto o dispositivo do TEG é capaz de analisar duas amostras; o ROTEM é menos sensível que o TEG às vibrações da bancada de suporte do aparelho; no ROTEM, a pipetagem das amostras de sangue é automatizada, e no TEG é manual; a cubeta do ROTEM é estriada e do TEG é lisa⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Ou seja, a tecnologia mais moderna do ROTEM promoveu melhorias e reduziu a variabilidade intra e interoperador dos resultados⁽⁷¹⁾.

Na execução do teste, inicialmente uma amostra de sangue total citratado é colocada em uma cubeta própria e, em seguida, um pino que se encontra conectado a um sistema de detecção é posicionado em suspensão dentro da cubeta (**Figura 8**). Durante o ensaio, o pino (no ROTEM) ou a cubeta (no TEG) realiza um movimento contínuo de rotação dentro da cubeta contendo sangue. A formação progressiva do coágulo interfere nesta rotação e, à medida que o coágulo se forma, as fibras de fibrina interligam as paredes da cubeta ao pino. Estas alterações viscoelásticas no sangue são identificadas por um detector no pino e a informação, por sua vez, é transmitida a um computador para visualização gráfica, originando a curva que representa todas as fases de formação e lise do coágulo (**Figura 8**)⁽⁶⁸⁾. As nomenclaturas para os parâmetros na curva gerada são distintas entre os testes, conforme ilustrado nas **Figuras 9 e 10**.



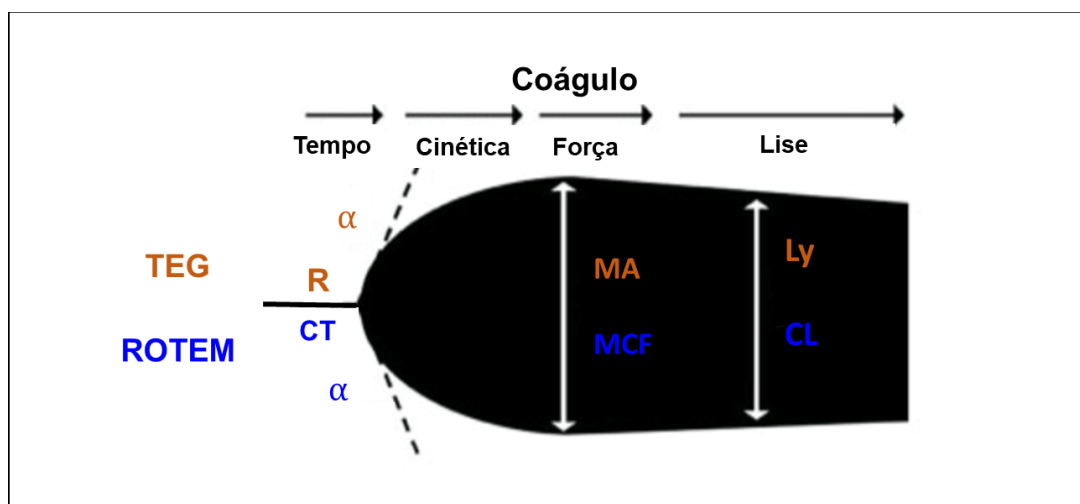
Fonte: Adaptado de Whiting, D. et al. (68)

Figura 8 - Representação esquemática do ROTEM. Uma cubeta com sangue total permanece fixa em um bloco aquecido, enquanto um pino suspenso oscila a uma velocidade constante. As rotações subsequentes do pino são inversamente proporcionais à força viscoelástica do coágulo em formação, a qual é detectada por um sistema integrado a um sensor óptico



CT - Clotting time; CFT - Clotting formation time; MCF- Maximum clot firmness; MA- Maximum amplitude; Li - Lysis index

Figura 9 - Principais parâmetros na curva do ROTEM



CT - Clotting time; R- Reaction time; CFT - Clotting formation time; K- Kinetics time; MCF- Maximum clot firmness; MA-Maximum amplitude; Ly ou Li - Lysis index.

Fonte: Adaptado de Mallett et al. ⁽⁷²⁾.

Figura 10 - Curva do TEG. A nomenclatura dos principais parâmetros do TEG está em laranja e a nomenclatura correspondente do ROTEM encontra-se em azul

O primeiro parâmetro da curva, o CT (no ROTEM) ou R (no TEG), representa o tempo até a formação da fibrina inicial e traduz a atividade dos fatores procoagulantes, sem a participação das plaquetas. Este parâmetro também sofre interferência da presença de anticoagulantes na amostra, como a heparina. Os dados da **Tabela 1** resumem as definições, significados e elementos interferentes dos principais parâmetros no ROTEM e TEG.

Tabela 1 - Principais parâmetros nas curvas do ROTEM e TEG , definições, significados

Rotem	TEG	Definição	Significado	Fatores interferentes
CT	R	Tempo até o traçado atingir 2mm	Formação inicial da fibrina	Fatores procoagulantes Ação da heparina e protamina
CFT	K	Tempo necessário para a amplitude do traçado do coágulo aumentar de 2mm para 20 mm.	Cinética da formação de fibrina	Fibrinogênio Plaquetas (Nº e função)
Ângulo α	Ângulo α	Ângulo formado pela linha tangente entre o CT (ou R) e a curva do gráfico	Taxa de polimerização da fibrina	Fibrinogênio Plaquetas (Nº e função)
MCF	MA	Amplitude máxima vertical do traçado	Força máxima do coágulo rico em fibrina e plaquetas	Plaquetas (Nº e função) Fibrinogênio Factor XIII
Ly	Li	Percentual de redução da amplitude do coágulo após atingir a sua firmeza máxima	Estabilidade do coágulo e fibrinólise	Ativadores e inibidores da fibrinólise

CT - Clotting time; R- Reaction time; CFT - Clotting formation time; K- Kinetics time;MCF- Maximum clot firmness; MA-Maximum amplitude;Ly ou Li - Lysis index. (68)

No ROTEM, método utilizado no presente estudo, existem seis ensaios disponíveis que se distinguem pelos reagentes ativadores de coagulação adicionados a cada um deles. De modo resumido, em cada ensaio do ROTEM as principais vias avaliadas são ^(73, 74): 1) INTEM - deficiência de fatores da via intrínseca; 2) HEPTTEM (análise conjunta com o INTEM) – efeito da heparina / heparinoides ou protamina; 3) EXTEM – deficiência de fatores da via extrínseca; 4) APTTEM (análise conjunta com o EXTEM) – atividade do sistema fibrinolítico; 5) FIBTEM – polimerização da fibrina e 6) NATEM (TEM “*não ativado*”) - ensaio que não utiliza ativadores específicos da coagulação, o que torna sua velocidade de análise lenta e limita o seu uso na prática clínica. No TEG, também é possível a realização de ensaios com ativadores de vias específicas de coagulação, análogos àqueles utilizados no ROTEM ^(68, 75). Na prática clínica, sobretudo, no manejo do sangramento ativo, o uso de reagentes de ativadores da coagulação apresentam a vantagem de otimizarem a performance diagnóstica do método para alterações específicas da coagulação e disponibilizarem mais rapidamente os resultados para a tomada de decisão. Por permitirem uma análise global da hemostasia, os testes viscoelásticos vêm sendo cada vez mais úteis na compreensão e manejo dos distúrbios complexos da coagulação, como no trauma grave ⁽⁷⁶⁾, sepse ⁽⁷³⁾, sangramento obstétrico ⁽⁷⁷⁾, cirurgia cardíaca ⁽⁷⁸⁾ e cirrose ^(72, 79, 80).

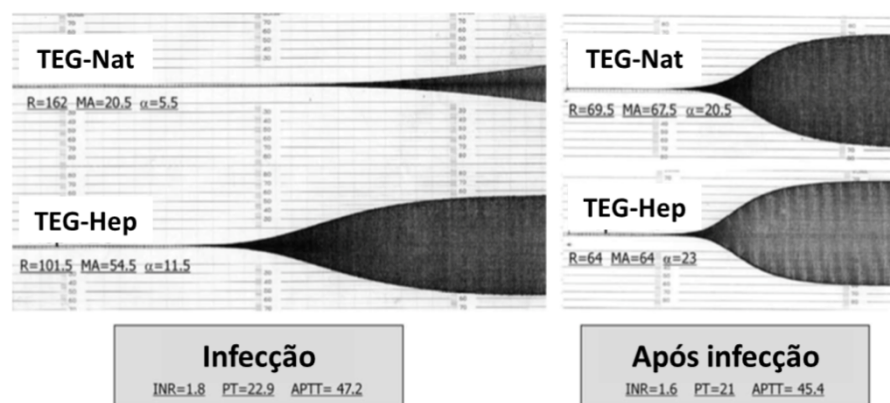
Na cirrose, seja estável ou descompensada, muitos pacientes exibem parâmetros dos testes viscoelásticos dentro da faixa normalidade, em concordância com o conceito atual do reequilíbrio da hemostasia na cirrose ⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. Este achado reforça que a transfusão profilática de hemocomponentes, antes de procedimentos invasivos, baseada somente no prolongamento do INR ou na contagem de plaquetas moderadamente reduzida não é racional. A maioria dos dados sobre a utilidade dos testes viscoelásticos em pacientes com cirrose advém de estudos sobre seu uso no manejo transfusional durante o transplante hepático. Nesta condição, o TEG/ROTEM reduz significativamente as taxas de hemotransfusões, permite o emprego mais racional de hemocomponentes e, conseqüentemente, reduz

os custos relacionados às transfusões e os efeitos adversos pós-transfusionais ⁽⁸⁵⁻⁹¹⁾. Alguns ensaios clínicos randomizados, recentemente publicados, sugerem que os testes viscoelásticos sejam úteis também no manejo da transfusão profilática, antes de procedimentos invasivos eletivos ⁽⁸³⁾ e, no tratamento de eventos hemorrágicos agudos na cirrose, entretanto ainda não há dados suficientes para preconizar seu uso sistemático nestas situações ⁽³¹⁾.

Durante a infecção bacteriana em pacientes com cirrose, estudos baseados em testes viscoelásticos sugerem uma tendência anticoagulante, em razão da presença do efeito heparinoide endógeno na circulação ^(41, 92). Os heparinoides endógenos são substâncias com ação semelhante à heparina, presentes nos glicosaminoglicanos do glicocálix endotelial vascular, mas também nos hepatócitos e macrófagos. Seus principais representantes são o dermatan sulfato, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, heparan sulfato e heparina ⁽⁹³⁾. Estas substâncias são liberadas na circulação em condições de estresse e lesão do glicocálix endotelial, como na cirurgia, trauma e sepse ^(94, 95). Na cirrose, a liberação de heparinoides na circulação também foi descrita durante o transplante hepático, sobretudo na fase reperfusão do enxerto ⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾. A liberação dos heparinoides durante a infecção bacteriana é decorrente da lesão endotelial induzida pelas endotoxinas, citocinas e neutrófilos circulantes. Os leucócitos também produzem proteases que clivam a ligação entre os heparinoides circulantes e seus ligantes peptídicos plasmáticos, tornando-os livres para ação ⁽⁹⁴⁾. Adicionalmente, o fígado cirrótico exibe menor capacidade de depuração dessas substâncias ⁽⁹⁸⁾. A presença do efeito heparinoide é definida por um prolongamento no parâmetro inicial (R/CT) da curva do TEG/ROTEM, seguido de seu encurtamento no ensaio com adição de heparinase (TEG-Hep/HEPTM), indicando inequivocamente a existência de heparina ou heparinoides na amostra. Embora outros parâmetros da curva também possam sofrer interferência da heparinase, o R /CT é considerado o parâmetro mais sensível para detecção de substâncias semelhantes à heparina ^(42, 75).

Em 1999, Papatheodoridis et al. ⁽⁹²⁾ demonstraram haver relação entre a deterioração nos parâmetros TEG nativo e a ocorrência de infecção bacteriana na cirrose. Neste estudo prospectivo, o TEG foi realizado no momento da admissão hospitalar e/ou no primeiro dia da infecção bacteriana e repetido após 5 dias. Os pacientes com cirrose que desenvolveram infecção hospitalar, exibiram uma deterioração significativa em todos os parâmetros do TEG no primeiro dia da infecção e, naqueles cuja infecção foi resolvida, houve uma melhora significativa dos parâmetros. Nos pacientes com infecção persistente, foi observada uma piora significativa nos parâmetros do TEG.

Em 2002, o mesmo grupo, representado por Montalto et al. ⁽⁴¹⁾, utilizou o TEG nativo (TEG-Nat) e o TEG modificado com adição de heparinase (TEG-Hep) para investigar se a deterioração nos parâmetros do TEG-Nat durante a infecção seriam atribuíveis a um efeito heparinoide endógeno. Neste trabalho, foram avaliados três grupos: 30 pacientes com cirrose e infecção bacteriana, 30 pacientes com cirrose não infectados e cinco indivíduos sem doença hepática e infectados. Somente os pacientes com cirrose e infecção apresentaram alterações significativas nos principais parâmetros do TEG (R, ângulo alfa e MA) compatíveis com a presença de heparinoides na amostra. Nos testes convencionais de coagulação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Após a resolução da infecção, oito pacientes com cirrose foram reavaliados e todos eles apresentaram reversão do efeito heparinoide no TEG (**Figura 10**), sugerindo, portanto, que este seria um fenômeno restrito aos pacientes com cirrose e infecção bacteriana.



Fonte: Adaptado de Montalto et al. ⁽⁴¹⁾.

Figura 11 - Desaparecimento do efeito heparinoide após resolução da infecção em paciente com cirrose hepática. Durante a infecção (PBE) foi observado um efeito heparinoide no TEG-Nat e TEG-Hep que desapareceu após a resolução da infecção, 10 dias após a avaliação inicial

No terceiro trabalho publicado pelo mesmo grupo de estudiosos, Zambruni et al. ⁽⁴²⁾, descreveu uma associação entre efeito heparinoide e atividade do anti-Xa nos pacientes com cirrose e infecção bacteriana. Neste estudo, foram incluídos 15 indivíduos com cirrose e infecção bacteriana, 15 com cirrose sem infecção e nove pacientes sem doença hepática infectados. O anti-Xa foi detectável em nove (60%) pacientes com cirrose e infecção, mas somente em um (6,7%) não infectado, com p valor < 0,01. No grupo sem cirrose e infectado, o anti-Xa também foi detectável, mas em uma menor frequência (44%), e em nenhum dos quatro controles saudáveis, ele foi detectável. Em seguida, os ensaios do TEG foram realizados em um subgrupo da amostra (11 pacientes com cirrose e infecção bacteriana e oito sem infecção) e somente nos infectados foi observado um efeito heparinoide nos parâmetros do TEG, k (p < 0,01) e ângulo alfa (p < 0,01). Entretanto, em oposição ao observado no estudo anterior, as alterações no parâmetro R não atingiram significância estatística (p = 0,05).

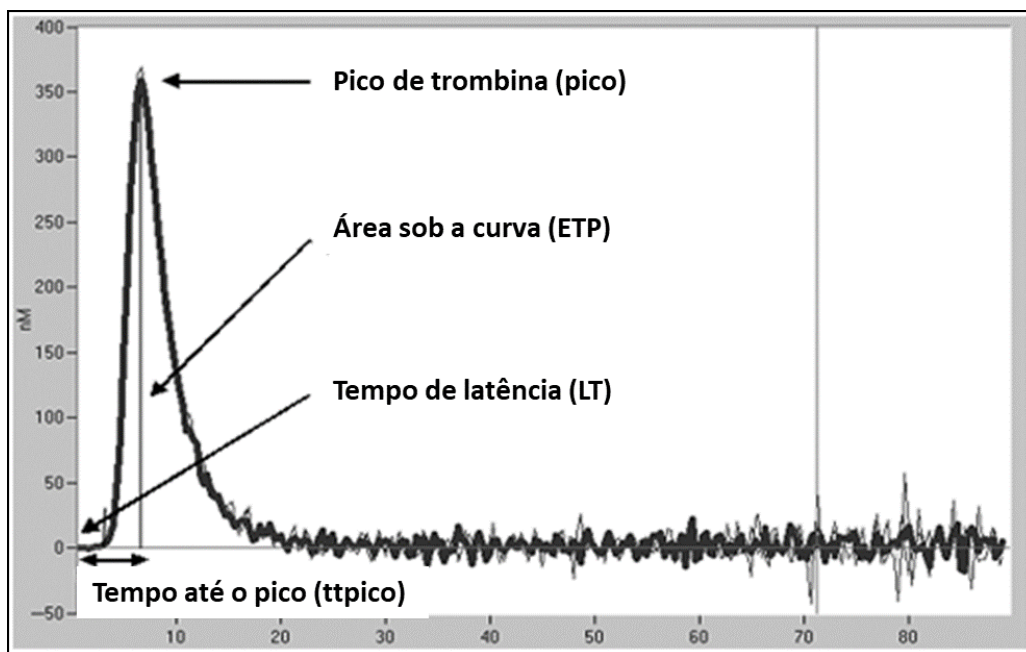
O efeito heparinoide endógeno também foi descrito durante o sangramento varicoso agudo na cirrose, mas nos trabalhos que encontraram

esta associação ^(99, 100), o efeito heparinoide ocorreu independente da presença de infecção bacteriana ativa. Por isto, não podemos afirmar que o aumento do risco de sangramento e ressangramento varicoso durante a infecção bacteriana seja atribuível diretamente ao efeito heparinoide endógeno. Neste contexto, o agravamento da hipertensão portal permanece como uma importante base fisiopatológica para o maior risco de sangramento varicoso durante a infecção em pacientes com cirrose .

Teste de Geração de Trombina - Uma vez reconhecido o papel central da trombina na hemostasia, o teste de geração de trombina (GT) destaca-se como uma ferramenta importante na avaliação dos distúrbios complexos da coagulação, pois mensura a quantidade de trombina gerada ⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁵⁾. O resultado deste exame é sensível a alterações nas vias procoagulantes (com exceção do XII) e anticoagulantes, à ação de anticoagulantes orais, heparinas e inibidores diretos da trombina ^(10, 106). Além disso, as condições do ensaio são mais representativas das reações que ocorrem *in vivo* que os testes convencionais, pois os ativadores da coagulação, representados pelo fator tecidual e fosfolipídeos, são adicionados ao ensaio em menores concentrações ^(101, 106).

Atualmente, o método mais utilizado no teste GT é o fluorogênico automatizado e calibrado. Nesta técnica, à medida que a trombina é gerada o substrato fluorimétrico adicionado à reação emite um sinal fluorescente. Por sua vez, este sinal é convertido por um programa de computador em uma curva de geração de trombina, denominada trombograma ^(104, 106) (**Figura 11**). Conforme ilustrado na **Figura 11**, a área sob a curva do trombograma corresponde ao potencial de trombina endógeno (ETP) e representa o total de trombina gerada. A nomenclatura e significado dos demais parâmetros representados na curva são (**Figura 11**): 1) tempo de latência (do inglês *lag time*, *LT*) – tempo transcorrido entre o início do teste e a formação de trombina inicial; 2) pico - concentração máxima de trombina gerada; 3) tempo até o pico (*ttpico*) - representa a velocidade de formação da trombina. Na interpretação dos resultados, uma duração prolongada do

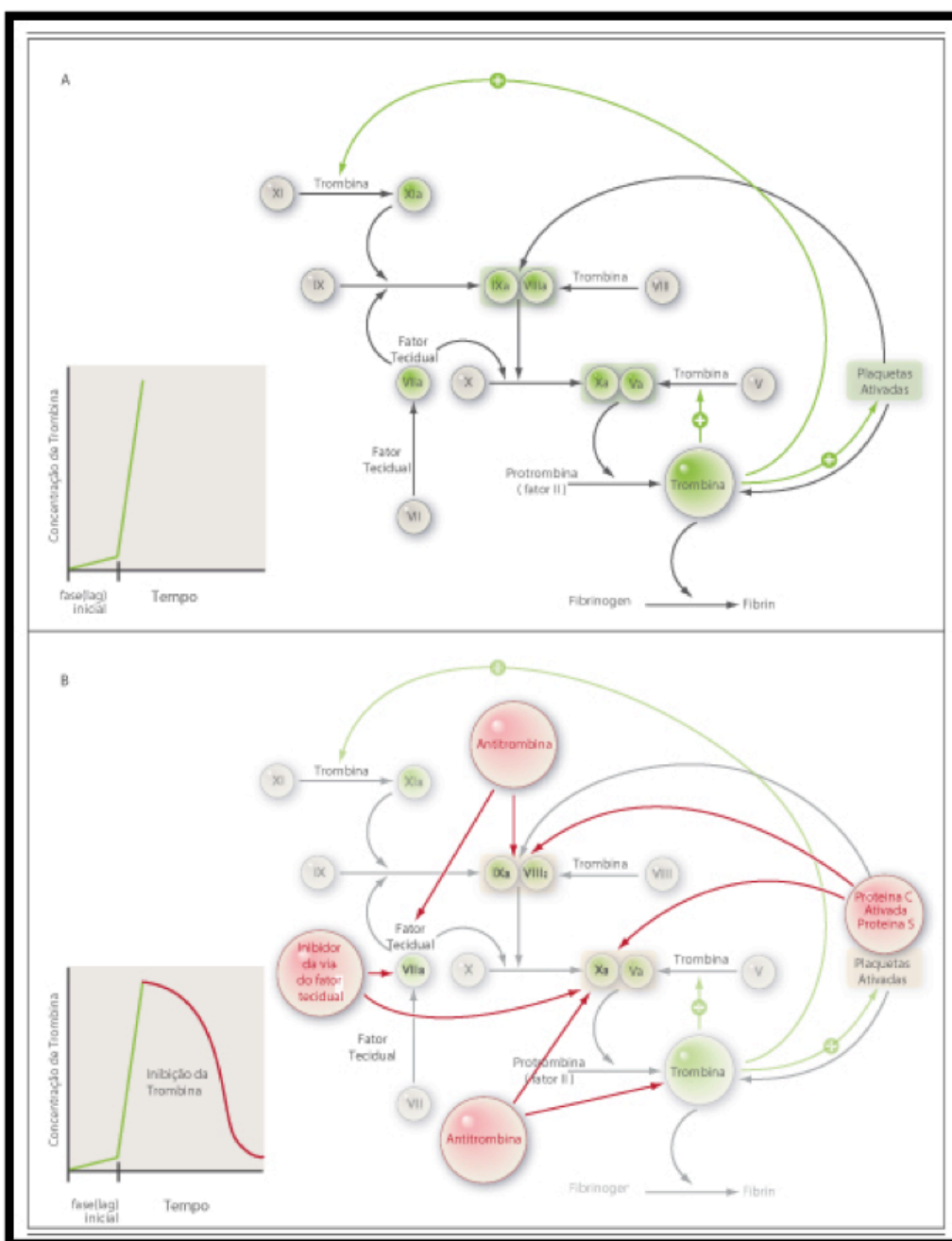
tempo de latência (LT), valores baixos de ETP e do pico indicam uma tendência anticoagulante. Contrariamente, tempos de latência curtos, valores elevados do ETP e do pico sugerem um estado procoagulante ⁽¹⁰⁵⁾.



Fonte: Adaptado de Van Veen et al. ⁽¹⁰⁷⁾.

Figura 12 - Curva representativa do teste da Geração de Trombina e os principais parâmetros

A **Figura 12** destaca que a curva do teste GT analisa a participação das vias procoagulantes (painel A) e anticoagulantes (painel B) na geração da trombina, e também ressalta o papel central que a trombina exerce nas diversas fases da hemostasia.



Fonte: Adaptado de Tripodi et al. 2011 ⁽¹¹⁾

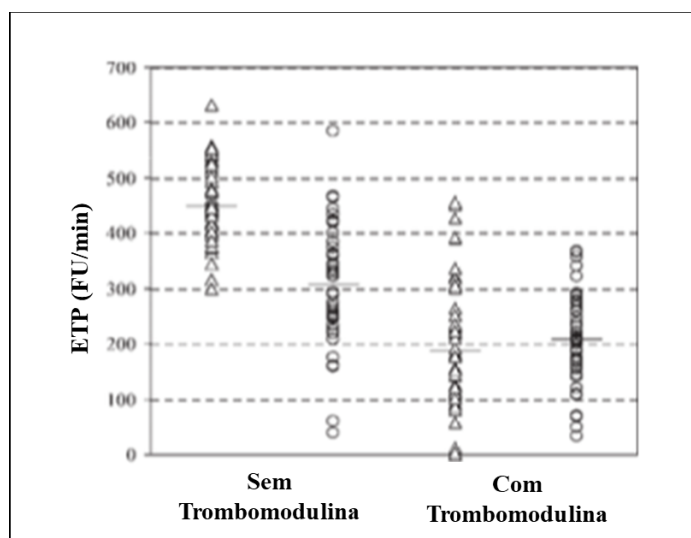
Figura 13 – A curva da geração de trombina analisa a participação dos fatores pro e anticoagulantes endógenos na geração de trombina

O teste da geração de trombina pode ser modificado pela adição de trombomodulina (TM). A TM é o principal ativador da PC *in vivo*, situada no

endotélio e que está ausente ou presente em apenas pequenas quantidades no plasma. Na ausência da TM, a ativação da proteína C é 20.000 vezes mais lenta que em sua presença ⁽¹⁰⁸⁾. Portanto, a adição de TM ao ensaio permite a análise da integridade deste importante sistema anticoagulante ⁽¹⁰⁾. Em pessoas saudáveis, a adição de TM ao ensaio reduz a quantidade de trombina gerada, quando comparada ao teste realizado sem TM. Nos indivíduos com doenças procoagulantes associadas a resistência à ação desta via anticoagulante como, por exemplo, a deficiência de antitrombina e a Síndrome Antifosfolípide, a adição de TM mantém os níveis de geração de trombina elevados ^(20, 105).

Os trabalhos que avaliaram o teste GT na cirrose ^(20, 32, 62, 63, 109-111) sugerem que a geração de trombina, notadamente, no teste modificado pela adição de TM, encontra-se preservada ou aumentada em relação aos valores de referência em controle sadios, em oposição aos resultados dos testes convencionais da coagulação que comumente apresentam um padrão de hipocoagulabilidade nestes indivíduos.

Em 2005, Tripoddi et al.⁽³²⁾ compararam o potencial de geração de trombina, com e sem adição de TM recombinante, entre 44 pacientes com cirrose e 44 controles sadios. O estudo demonstrou, que no teste sem TM, os valores de ETP nos pacientes com cirrose (308 UF/min, intervalo de 40-585) foram significativamente inferiores aos controles sadios (451 UF/min, intervalo 300-632), com valor de $p < 0,001$, indicando uma menor geração de trombina na cirrose. Entretanto, quando o teste foi modificado pela adição de TM, os valores de ETP na cirrose (209 UF/min, intervalo entre 34 e 368) tornaram-se semelhantes aos encontrados nos controles sadios (188 UF / min, intervalo entre 0 e 455), com valor de $p=0,50$ (**Figura 14**), devido à deficiência de proteína C na cirrose. Os autores também destacaram que deficiências nas vias procoagulantes e anticoagulantes, representadas respectivamente pela dosagem do fator II e da proteína C, interferem na quantidade de trombina gerada. E destacam que o TP e TTPa não predizem o padrão da geração de trombina.

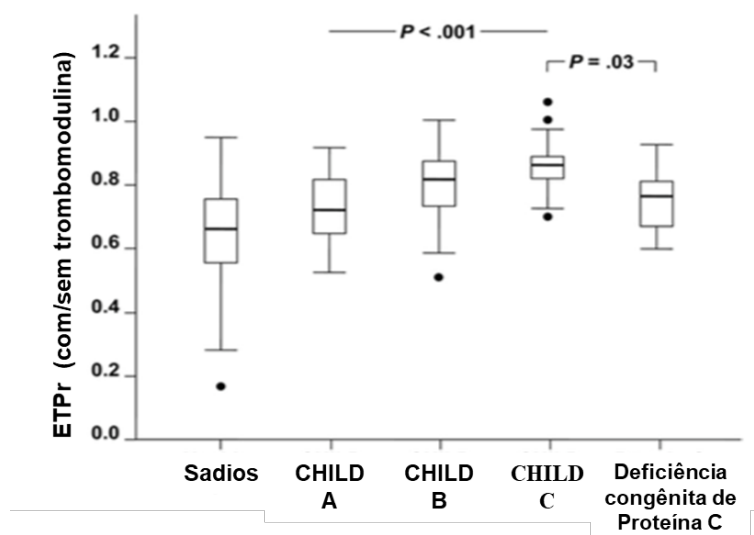


Fonte: Tripodi et al. ⁽³²⁾.

Figura 14 - Valores de ETP nos controles sadios (triângulos) e pacientes com cirrose (círculos), analisados sem e com trombomodulina. Barras horizontais representam valores medianos

Em 2009 ⁽²⁰⁾, este mesmo grupo avaliou uma amostra maior de pacientes, sendo 134 com cirrose, 131 controles sadios e seis indivíduos portadores de deficiência congênita de PC. Para a análise comparativa, os autores utilizaram a razão do ETP (ETPr), definida pela razão entre ETP com TM e ETP sem TM, que representa o equilíbrio final entre a participação dos sistemas anticoagulantes e procoagulantes na geração da trombina. Valores aumentados de ETPr em relação aos sadios sugerem resistência à ativação da proteína C pela TM e podem representar um índice de hipercoagulabilidade: quanto maior a razão, maior a resistência à ativação da proteína C e a hipercoagulabilidade. Os autores observaram valores de ETPr maior nos cirróticos (0,80; variação entre 0,51 e 1,06) que nos controles sadios (0,66; variação entre 0,17 e 0,95), indicando uma tendência à hipercoagulabilidade na cirrose. A hipercoagulabilidade nos pacientes Child-Pugh classe C foi ainda maior que a observada nas demais classes e nos pacientes com deficiência congênita de proteína C, condição conhecidamente protrombótica (**Figura 15**). Os autores destacaram que o padrão de hipercoagulabilidade esteve relacionado a maiores níveis

plasmáticos de fator VIII e a baixos níveis de proteína C, e novamente não houve correlação entre os resultados do teste GT e o TP/TTPa.



Fonte: Tripodi et al. (20)

Figura 15 - Gráficos de caixa da distribuição dos valores da razão do ETP com/sem trombomodulina (ETPr) em controles sadios, pacientes com cirrose (estratificados; de acordo com o escore de Child Pugh) e indivíduos portadores de deficiência congênita de proteína C

Os demais estudos que o sucederam (62, 110, 112, 113), sedimentaram este então novo conceito de geração de trombina normal ou aumentada na cirrose, melhor representada no ensaio com adição de TM. Vale ressaltar que o teste de GT não é padronizado, estes estudos exibem diferenças na metodologia no que se refere às diferentes concentrações de TM e de fator tecidual utilizados no ensaio, além de alguns autores substituírem a TM pelo Protac®, um ativador da proteína C com ação *in vitro* semelhante à TM (110, 114). Mas, isto não compromete o padrão de normo ou hipercoagulabilidade encontrado na cirrose, quando comparado aos resultados em controles sadios (111).

Em síntese, os pacientes com cirrose preservam sua capacidade de geração de trombina e podem exibir um estado de hipercoagulabilidade

plasmática comparável ao observado em condições de elevado risco trombótico. Tais evidências representam uma mudança de paradigma sobre a hemostasia na cirrose que, baseada nos frágeis testes convencionais de coagulação e na contagem de plaquetas, historicamente, era considerada um distúrbio hemorrágico adquirido. Pela mesma perspectiva, resta ser provado se o efeito heparinoide anticoagulante descrito durante a infecção bacteriana na cirrose modifica este estado normo à hipercoagulabilidade.

1.2 Racional e hipótese do estudo

Durante a infecção bacteriana, pacientes com cirrose apresentam alterações imprevisíveis, tanto na via procoagulante como na anticoagulante, geralmente, indetectáveis pelos testes convencionais de coagulação utilizados rotineiramente. Deste modo, esta população comumente é considerada de alto risco hemorrágico quando são necessários procedimentos invasivos. As infecções bacterianas poderiam contribuir para a ocorrência de hemorragia na cirrose por dois mecanismos principais: a) aumento da pressão portal por ação de endotoxinas sobre o sistema de endotelinas e liberação de substâncias vasoconstrictoras; b) distúrbios da hemostasia promovidos pela infecção. Embora haja evidências sobre o efeito heparinoide endógeno, demonstráveis pela tromboelastografia em pacientes com cirrose e infecção bacteriana, não há dados sobre seu impacto na geração de trombina. Mais importante, não existem relatos conclusivos de que os heparinoides influenciem desfechos clínicos hemorrágicos não diretamente relacionados à hipertensão portal, como sangramento cutâneo-mucoso ou após procedimentos invasivos. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o efeito heparinoide não seria capaz de reduzir a geração de trombina em pacientes com cirrose.

Com base nestas premissas, formulamos a hipótese que a liberação de heparinoides endógenos durante infecções bacterianas no paciente com cirrose não seja suficiente para reduzir a geração de trombina, que

habitualmente se encontra com valores normais ou elevados em condições basais.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Tivemos como objetivo principal: avaliar o impacto da infecção na geração de trombina em pacientes com cirrose, avaliados de modo pareado durante a infecção bacteriana e após a resolução do quadro infeccioso.

Nossos objetivos secundários foram avaliar o impacto da infecção:

- a) no efeito heparinoide endógeno avaliado por meio da tromboelastometria (ROTEM);
- b) no efeito heparinoide endógeno avaliado pela dosagem de anti-Xa;
- c) na dosagem dos anticoagulantes naturais (Proteína C e AT);
- d) nos parâmetros RNI, TP, TTPa.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional, de coorte, unicêntrico, desenvolvido de acordo com a metodologia STROBE (*“Strengthening the Report of Observacional Studies in Epidemiology”*)⁽¹¹⁵⁾ que avaliou pacientes com cirrose e infecção bacteriana (grupo infectado), e pacientes com cirrose descompensada sem infecção (grupo não infectado). Após a resolução da infecção o grupo infectado foi reavaliado para análise do impacto da infecção nos parâmetros da coagulação. O grupo não infectado também foi reavaliado para análise pareada comparativa, sem nenhuma intervenção entre as coletas.

3.2 Casuística

3.2.1 Locais de inclusão dos pacientes

Foram incluídos pacientes acompanhados pela Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes do grupo infectado foram recrutados na enfermaria e os pacientes do grupo não infectado no ambulatório.

3.2.2 Seleção

No grupo infectado foram incluídos pacientes com diagnóstico estabelecido de cirrose, com infecção bacteriana ativa em qualquer sítio,

incluindo peritonite bacteriana espontânea, infecção do trato urinário, infecção do trato respiratório/pneumonia e infecção cutânea ou sítio indeterminado.

No grupo não infectado foram incluídos pacientes com cirrose descompensada, de acordo com o escore de *Child Pugh* (B ou C), sem evidência clínica ou laboratorial de infecção.

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). O consentimento informado escrito foi obtido de cada participante do estudo.

3.2.3 Critérios de inclusão

Incluímos pacientes adultos (> 18 anos), com diagnóstico estabelecido de cirrose, com infecção em qualquer sítio (grupo infectados) e sem infecção bacteriana ativa (grupo controle não infectados).

3.2.4 Critérios de exclusão

Excluímos pacientes nas seguintes situações:

- a. Uso de drogas que interfiram na coagulação (anti-agregantes plaquetários, heparina em dose terapêutica, anticoagulantes orais ou parenterais, antifibrinolíticos, eritropoietina e drogas pró-trombóticas parenterais);
- b. História de trombose venosa profunda de repetição, exceto trombose de veia porta, visto que tal trombose está mais relacionada à diminuição de velocidade do fluxo na cirrose;
- c. Presença de distúrbios da hemostasia adquiridos (exceto cirrose) ou hereditários;
- d. Gestantes;
- e. Pacientes em terapia de substituição renal (diálise) com heparina;

- f. Presença de câncer ativo, exceto neoplasia de pele não melanoma e não metastática;
- g. Transfusão de hemocomponentes nos últimos 10 dias, exceto concentrado de hemácias;
- h. Realização de cirurgia de médio e grande porte nas últimas 4 semanas.

3.3 Critérios diagnósticos

3.3.1 Cirrose

Definida pela combinação de achados clínicos (estigmas periféricos de doença hepática crônica), laboratoriais (alteração das provas funcionais hepáticas), endoscópicas (varizes esôfago-gástricas), métodos de imagem (redução volumétrica do fígado, esplenomegalia e presença de circulação colateral porto-sistêmica), elastografia hepática por Fibroscan ou ARFI compatíveis com fibrose em estágio F4 e/ou pelo resultado do exame anatomopatológico quando disponível, conforme critérios clássicos de uso clínico rotineiro.

3.3.2 Infecção

Diagnóstico baseado em critérios clínicos e laboratoriais, estabelecidos conforme as recomendações internacionais ⁽¹¹⁶⁾:

- Peritonite bacteriana espontânea: definida pela contagem de leucócitos polimorfonucleares acima de 250/mm³ em amostra do líquido ascítico, independentemente do resultado das culturas do líquido ascítico ⁽¹¹⁷⁾;
- Pneumonia: evidência em radiografia ou tomografia computadorizada de infiltração pulmonar associada a outros sinais

típicos (febre, dispneia, tosse, dor no peito pleural ou sinais de consolidação no exame físico);

- Infecção do trato urinário: sintomas sugestivos e contagem confirmada de leucócitos na urina > 10 células por campo de grande aumento e/ou cultura de urina positiva;
- Infecção de corrente sanguínea: identificação de bactéria(s) (análise direta e culturas) em amostras de sangue e quadro clínico compatível;
- Infecção de partes moles: febre e sinais clínicos de celulite;
- Diarreia infecciosa: quadro clínico compatível e pesquisa fecal positiva.

3.4 Cálculo amostral

Elegemos para o cálculo do tamanho amostral o estudo publicado por Tripodi et al. (2009), que estabeleceu os valores do potencial de geração em pacientes com cirrose em diferentes estádios e em controles normais ⁽²⁰⁾.

Utilizamos o teste de Mann-Whitney e consideramos a probabilidade de erro alfa de 0,05, poder de 0,8 e um intervalo de confiança 95% unilateral com uma margem de 10%. Para demonstrar diferença superior a 10% no potencial de geração de trombina com trombomodulina, estimamos o tamanho da amostra em pelo menos 28 pacientes por grupo (grupo infectado e grupo não infectado).

3.5 Procedimentos realizados

3.5.1 Detalhamento dos procedimentos rotineiros

De forma resumida, realizamos os procedimentos listados abaixo. O detalhamento dessas etapas está apresentado na Seção seguinte.

- a. Convite para o paciente participar do estudo, exposição do protocolo e assinatura do termo de consentimento pelo paciente ou seu responsável legal;
- b. Entrevista com o paciente e consulta aos registros no prontuário. Foram pesquisados os dados demográficos, laboratoriais e clínicos necessários à estimativa da gravidade da doença hepática, dados relacionados à infecção, assim como foram registrados os exames destinados à definição etiológica da doença de base e ao diagnóstico de infecção;
- c. Coleta de amostras de sangue venoso periférico para realização dos procedimentos específicos deste estudo no momento da admissão e da reavaliação.

3.5.2 Detalhamento dos procedimentos específicos do estudo

3.5.2.1 Coletas de amostras de sangue

No grupo infectado as amostras de sangue foram coletadas em até 24 horas após o início da antibioticoterapia e repetidas, no mínimo, 5 dias após o término do tratamento da infecção, durante a consulta de retorno ambulatorial. No grupo não infectado as amostras de sangue foram colhidas após exclusão de quadro infeccioso nas últimas 4 semanas e repetidas, no mínimo, 5 dias após a coleta inicial para a realização dos mesmos exames realizados no grupo infectado.

A fim de evitar a interferência de variáveis pré-analíticas e analíticas nos resultados da GT e do ROTEM, seguimos rigoroso procedimento operacional padrão na coleta (**Anexo A**).

O sangue foi coletado com tempo mínimo de estase (tempo de torniquete inferior a 1 min.), utilizando-se agulhas de tamanho máximo de 21/23 G para evitar a hemólise. Foram colhidos 20 ml de sangue, distribuídos em tubos plásticos a vácuo de 2,7 mL (*BD Vacutainer®. Franklin*

Lakes, NJ. EUA) contendo 3,2% de citrato de sódio tamponado, destinados à realização dos testes específicos do estudo.

Imediatamente após a coleta de sangue, um tubo foi destinado à realização dos ensaios do ROTEM (INTEM e HEPTM), iniciados em até 2 horas após a coleta das amostras. Os demais tubos foram encaminhados ao Laboratório de Hemostasia, onde foram submetidos à centrifugação durante 20 minutos a 3.000 g e à temperatura controlada de 20°C, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) em até 1 hora. Após centrifugação, apenas os dois terços superiores do plasma foram pipetados e transferidos para tubos plásticos de criopreservação (amostras de 0,5 mL), devidamente identificados. As alíquotas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a retirada das amostras para realização dos demais testes específicos. A centrifugação, pipetagem e congelamento do plasma foram realizados em até duas horas após a coleta da amostra.

Os testes laboratoriais (GT, dosagem de PC, AT, Anti-Xa, TP e TTPa), exceto a tromboelastometria (ROTEM), foram realizados no Laboratório de Hemostasia do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP. A tromboelastometria (ROTEM) foi realizada no Centro Cirúrgico do HC-FMUSP, local onde permanece o aparelho utilizado na realização do ensaio.

3.5.2.2 Testes convencionais da coagulação (TP e TTPa)

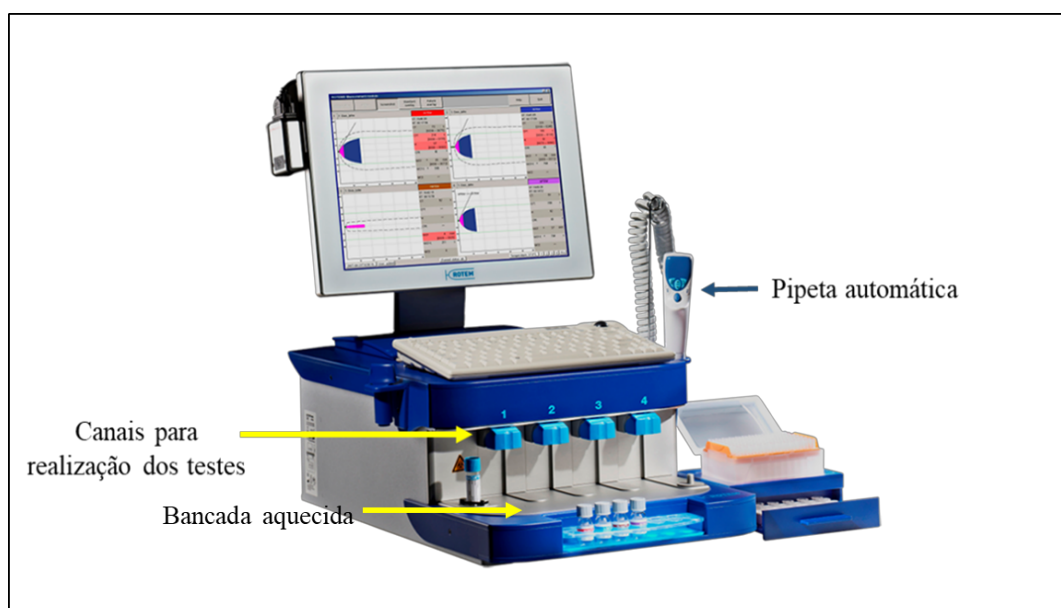
O TP foi determinado pelo método de Quick ⁽¹¹⁸⁾ utilizando-se o reagente *PT-Fibrinogen HS Plus*®, ISI=1,18 (HemosIL®, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA). Os resultados foram expressos em relação dos tempos (paciente/*pool* de plasma indivíduos normais) e RNI.

O TTPa foi analisado pelo método de Bell e Alton ⁽¹¹⁹⁾ utilizando como fonte de tromboplastina parcial o reagente *APTT-SP*® (HemosIL®, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) ativado com sílica. Os resultados de TTPa foram expressos em segundos.

3.5.2.3 Tromboelastometria (ROTEM®)

a. Aspectos gerais

Os ensaios do INTEM e HEPTEM foram realizados conforme orientação do fabricante (TEM International®, Munich, Germany) e estão resumidos no procedimento operacional padrão (**Anexo A**), elaborado para uma melhor sistematização da rotina. Tais ensaios foram executados simultaneamente em canais distintos do aparelho, utilizando-se a pipetagem automática (**Figura 16**). Todos os reagentes utilizados nos testes foram conservados sob refrigeração entre 2°C e 8°C e foi respeitado o prazo de estabilidade de cada reagente após a sua primeira utilização: 8 dias (STARTEM e INTEM) e 30 dias (HEPTEM).



Fonte: Adaptado de Görlinger et al. ⁽⁷⁸⁾

Figura 16 – Aparelho para realização do ROTEM ® (tromboelastometria). A pipetagem é automática e existem quatro canais distintos para a realização dos ensaios

Durante a realização do ensaio, inicialmente 300 µL de sangue total citratado são adicionados à cubeta do equipamento, sob temperatura de 37°C, e em seguida pipetados os reagentes específicos de cada teste.

No INTEM, são adicionados 20 μl do reagente STARTEM, composto por CaCl_2 a 0,2 mmol/L e, em seguida, 20 μl do reagente INTEM, composto por ácido elágico e fosfolípidos. No HEPTTEM, as etapas iniciais são as mesmas realizadas no INTEM e, em uma etapa complementar, 10 μl do reagente HEPTTEM (composto por heparinase I) são adicionados ao ensaio. O sistema formado pelo movimento controlado do pino na cubeta detecta as propriedades viscoelásticas do sangue por meio de um detector óptico, que transmite o sinal para conversão gráfica em um computador, gerando a curva exemplificada na **Figura 17**.

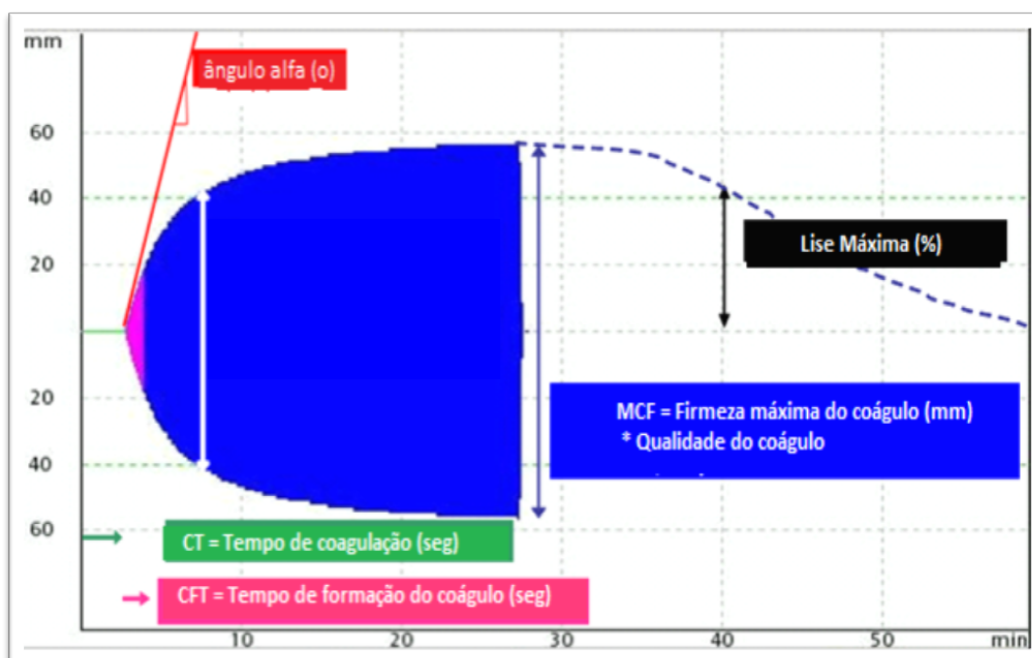


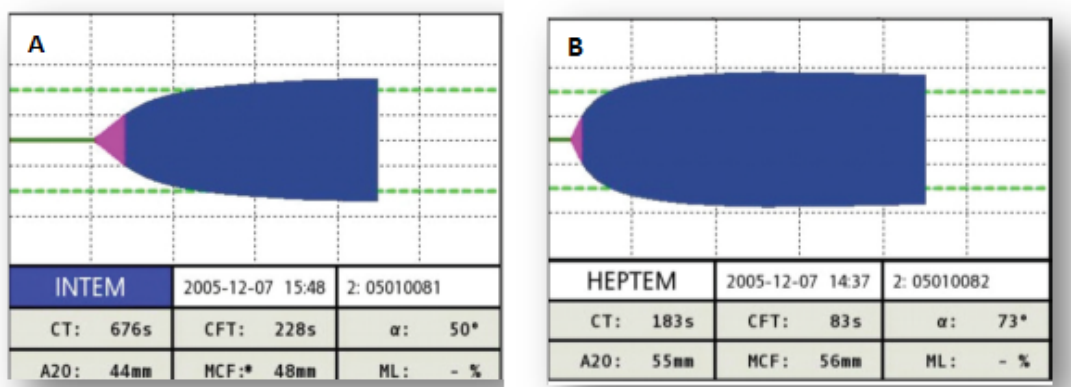
Figura 17 - Principais parâmetros na curva do ROTEM. A presença de heparina ou heparinoides na amostra de sangue interferem no parâmetro inicial da curva (CT) do INTEM e do HEPTTEM, que representa o tempo de formação inicial da fibrina

b. Aspectos relacionados à realização do INTEM e do HEPTTEM

Os ensaios do INTEM e o HEPTTEM foram interrompidos após um período mínimo suficiente para a obtenção dos resultados dos três principais parâmetros iniciais na curva de cada exame: CT, CFT e ângulo alfa (**Figura 18**). Foram analisadas as diferenças entre os parâmetros do INTEM e os

mesmos parâmetros obtidos no ensaio com adição de heparinase I (HEPTEM).

Conforme descrito anteriormente ^(41, 42), consideramos a presença de efeito heparinoide endógeno na amostra de pacientes com cirrose, quando observado um encurtamento significativo ($p < 0,05$) no parâmetro inicial da curva (CT) do teste viscoelástico com heparinase (CT_{HEPTEM}) em relação ao teste sem heparinase (CT_{INTEM}) (**Figura 18**).

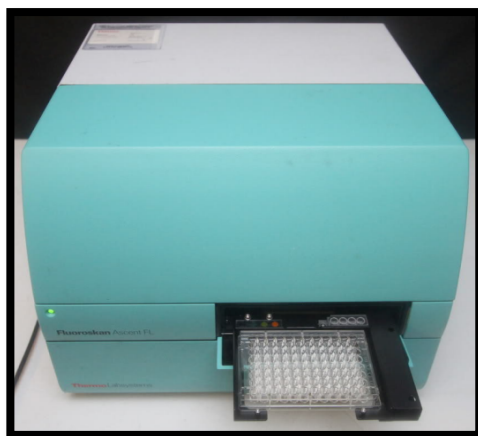


Fonte: Adaptado de Görlinger et al. ⁽⁷⁸⁾

Figura 18 - Curvas representativas da detecção de efeito heparinoide no sangue: prolongamento na duração do CT_{INTEM} (A) e encurtamento na duração do CT_{HEPTEM} (B) quando comparado ao CT_{INTEM}

3.5.2.4 Potencial de geração de trombina

O teste foi realizado de acordo com técnica descrita por Hemker et al. (1995) ⁽¹⁰³⁾ utilizando-se do método fluorogênico calibrado, conhecido como CAT (*The Calibrated Automated Thrombogram*. Thrombinoscope®, Sinapse BV. Maastricht, Holanda).



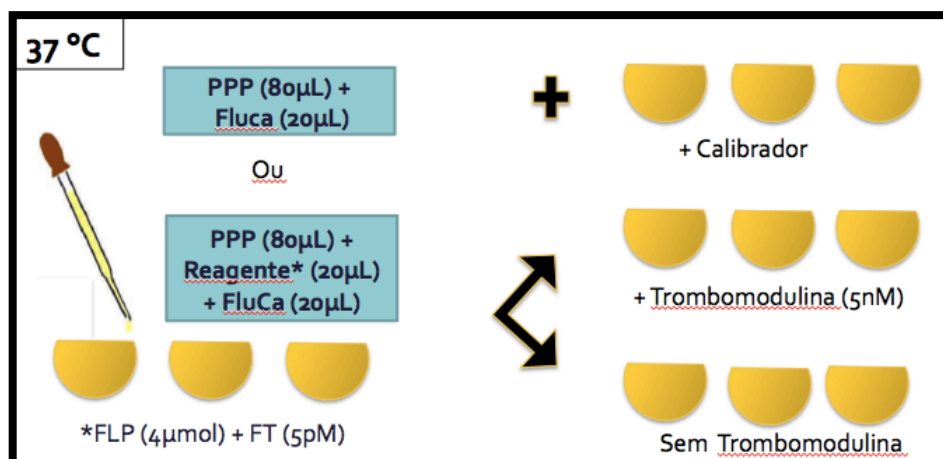
Fonte: Hemker et al. (1995)⁽¹⁰³⁾

Figura 19 – Aparelho utilizado no teste da geração de trombina (GT): CAT (The Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®) e placa de microtitulação de polipropileno, com 96 poços arredondados (Immulon 2Hb, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia)

Imediatamente antes das análises, as amostras de plasma (PPP) foram descongeladas em banho-maria, a 37°C por 5 minutos. A realização do teste ocorreu em uma placa de microtitulação de polipropileno, com 96 poços arredondados (Immulon 2Hb, Thermo Labsystems, Helsinque, Finlândia). Cada poço foi preenchido com 80 µL de PPP do paciente e 20 µL do PPP-*reagent*, constituído de fator tecidual recombinante a uma concentração de 5 pM e fosfolípidos sintéticos à 4 µmol (Stago Group, Maastricht, Holanda).

Conforme esquematizado na **Figura 20**, cada amostra foi preparada em triplicata, sem trombomodulina e com adição de trombomodulina (Sekisui Diagnostics, Massachusetts, EUA) a uma concentração final de 5 nM (totalizando 6 poços). Para controle, foram preenchidos 3 poços adicionais com PPP e o calibrador de trombina (*Thrombin Calibrator*), resultando em um total de 18 poços por paciente incluído no estudo: 9 para a amostra do plasma da inclusão e 9 para a amostra obtida na reavaliação. A utilização do calibrador é indispensável para excluir alterações na geração de trombina

relacionadas a diferentes colorações do plasma de cada paciente (a fluorescência é sensível à cor do plasma), assim como permitir que apenas a trombina gerada durante a reação seja contabilizada. Após 15 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados automaticamente a cada poço 20 µL de FluCa, um substrato fluorogênico diluído em tampão com cálcio.



PPP= Plasma pobre em plaquetas; FLP= fosfolípide; FT= fator tecidual; Fluca: substrato fluorogênico diluído em tampão de Cálcio; TM: trombomodulina

Figura 20 - Técnica de preenchimento dos poços da placa de microtitulação para teste de geração de trombina. Cada paciente teve suas amostras colhidas na inclusão no estudo (sem e com TM) e na reavaliação (sem e com TM) analisadas na mesma placa. Todas as quatro análises foram realizadas em triplicata O teste com calibrador nas fases pré e pós-transfusional também foi realizado em triplicata, totalizando 18 poços por paciente. Todos os poços foram preenchidos com PPP do paciente. Aos poços para análise foram acrescentados reagente contendo FT, FLP e FluCa (com ou sem adição de TM) e aos poços para controle foi adicionado o calibrador

A leitura da reação foi feita com o fluorímetro Fluoroskan Ascent® (ThermoLabsystem, Helsinki, Finlândia), equipado com um conjunto de filtro de excitação de 390 nM e de emissão de 460 nM, a 37°C. O sinal fluorescente é convertido em uma curva de geração de trombina ou trombograma (**Figura 18**), produzida automaticamente pelo software Thrombinoscope® (Sinapse BV. Maastricht, Holanda). Os testes foram

interrompidos após 30 minutos e, após a realização dos experimentos, as curvas de geração de trombina (trombogramas) em triplicata para cada indivíduo, foram avaliadas de maneira cega. As curvas que apresentaram grande variabilidade, sem um traçado típico e homogêneo, foram excluídas da análise. Foram incluídos na análise os resultados com reprodutibilidade do traçado ao menos em duplicata.

Os quatro parâmetros analisados (**Figura 9**) foram medidos sem e com adição de trombomodulina. Para o parâmetro ETP, calculamos também as razões dos seus resultados (ETP com / ETP sem trombomodulina), denominado ETPrazão (ETPr).

Os valores de referência dos parâmetros da GT utilizados no laboratório de hemostasia da instituição foram obtidos de 46 indivíduos saudáveis, testados previamente (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Parâmetros de geração de trombina em indivíduos normais

Parâmetro	Média (dp)	Mediana (min-max)
ETP sem TM (nmol/L*min)	1577,5 (± 362,8)	1515,5 (1113,5-2501,5)
ETP com TM (nmol/L*min)	914,6 (± 457,5)	784,3 (266,3-2169,3)
ETPr	0,57 (± 0,21)	0,56 (0,19-0,93)
LT sem TM (min.)	3,5 (± 0,6)	3,5 (2,1- 4,7)
LT com TM (min.)	4,1 (± 0,7)	4,1 (2,5-6,0)
Pico sem TM (nmol/L)	297,8 (± 54,7)	295,1 (156,1-428,1)
Pico com TM (nmol/L)	202,5 (± 90,1)	188,4 (63,0-425,4)
ttpico sem TM (min.)	6,3 (± 0,9)	6,1 (4,7-8,7)
ttpico com TM (min.)	6,5 (± 0,8)	6,5 (4,6-8,7)

Parâmetros obtidos a partir de 46 indivíduos saudáveis no laboratório de hemostasia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

dp = desvio padrão; ETP: TM: trombomodulina; ETPr= relação entre ETP com TM sobre ETP sem TM; LT: tempo de latência; ttpico: tempo para o pico

3.5.3 Avaliação da atividade do Anti-Xa, Proteína C e Antitrombina

Antes da realização dos ensaios para avaliação da atividade do Anti-Xa, da Proteína C e da Antitrombina, as amostras de plasma foram descongeladas durante 5 minutos a 37°C. Os testes foram realizados de acordo com a padronização preconizada pelo fabricante - resumida a seguir - utilizando-se as técnicas do substrato cromogênico sintético automatizado no equipamento ACL TOP 500 CTS (Instrumentation Laboratory, Miami, USA).

Atividade do anti-Xa - A avaliação da atividade do anti-Xa foi feita com o kit automatizado HemosIL® Liquid anti-XA® (Instrumentation Laboratory, Miami, USA), composto pelo Fator Xa-*reagent*, uma preparação líquida contendo o Fator Xa bovino purificado (aproximadamente 5,5 nkat/mL) e o substrato cromogênico sintético. O princípio do ensaio baseia-se na capacidade do complexo Heparina-AT presente na amostra plasmática do paciente inativar o Fator Xa bovino adicionado ao ensaio. Em seguida, o Fator Xa residual (não inativado pelo complexo heparina-AT) reage com o substrato cromogênico e, portanto, a intensidade da reação cromogênica é inversamente proporcional à quantidade de heparina na amostra do plasma⁽¹²⁰⁾. O resultado de cada amostra é então comparado a um calibrador com curvas de referência para quantidades padrão de heparina de baixo peso molecular (HemosIL® LMW Heparin Controls®, Instrumentation Laboratory, MA, USA). O limite inferior de detecção da amostra é 0,01 unidades/mL e o resultado é considerado positivo quando encontrados níveis de anti-Xa \geq 0,01 unidades/mL.

Dosagem da Proteína C - Na dosagem da Proteína C foi utilizado o kit automatizado HemosIL® Protein C® (Instrumentation Laboratory, Miami, USA). Durante o ensaio, inicialmente o plasma do paciente é incubado com um ativador da Proteína C, composto por derivado do veneno de serpente de *Agkistrodon contortrix contortrix*. Posteriormente, o substrato cromogênico, que contém um inibidor da trombina (0,125 mg/recipiente), é

adicionado ao teste. O alvo do substrato cromogênico sintético neste ensaio é a Proteína C e a intensidade da reação é diretamente proporcional à quantidade de Proteína C na amostra.⁽¹²¹⁾ O resultado de cada amostra é comparado a um calibrador com curvas de referência para quantidades padrão conhecidas de Proteína C (HemosIL® Protein C Controls®, Instrumentation Laboratory, Miami, USA). Os resultados da atividade da Proteína C são expressos em % e são considerados normais valores entre **70 - 140%**.

Dosagem da atividade da Antitrombina - Na dosagem da Antitrombina foi utilizado o kit automatizado HemosIL® Antithrombin® (Instrumentation Laboratory, MA, USA). Na primeira etapa do ensaio, o plasma do paciente é incubado com o Factor Xa-*reagent*, uma solução rica em Fator Xa bovino (40 nkat/recipiente) e heparina. O princípio do ensaio baseia-se na capacidade da Antitrombina presente na amostra plasmática do paciente formar um complexo com a heparina adicionada ao ensaio e em seguida este complexo inativar o Fator Xa bovino. Neste teste, o alvo do substrato cromogênico sintético também é o Fator Xa residual (não inativado pelo complexo heparina-AT) e a intensidade da reação é inversamente proporcional à quantidade de Antitrombina na amostra.⁽¹²²⁾ O resultado de cada amostra é comparado a um calibrador com curva de referência padrão, contendo quantidades conhecidas de Antitrombina. Os resultados da atividade da Antitrombina são expressos em % e são considerados resultados normais valores entre **83 – 128%**.

3.6 Análise estatística

Na análise estatística, as variáveis quantitativas foram apresentadas pela média e desvio padrão ou pela mediana e intervalo quartílico (quartil 25 – quartil 75). As variáveis qualitativas foram demonstradas por frequência absoluta e porcentagem.

Na comparação das características basais entre os grupos (infectados vs não infectados), o teste t de Mann-Whitney ou o teste t de Student foi usado para comparar variáveis contínuas, de acordo com a natureza da distribuição da variável. O teste exato de Fischer foi utilizado na análise das variáveis qualitativas.

Na comparação das variáveis dentro do mesmo grupo (inclusão vs reavaliação), o teste de Wilcoxon ou o teste t de Student pareado foi usado para comparar variáveis contínuas, conforme apropriado. O Mc Nemar foi Fischer foi utilizado na análise das variáveis qualitativas.

As conclusões foram consideradas significativas quando valor de $p < 5\%$. Os cálculos foram realizados através do programa estatístico *SPSS Statistics* versão 25 (IBM SPSS Statistics, Chicago, Illinois, USA) e GraphPad InStat 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Inclusões

Entre os dias 24/05/2015 e 21/01/2019, 362 pacientes foram avaliados quanto à elegibilidade. Cento e vinte pacientes com cirrose foram elegíveis para inclusão no estudo, sendo 82 indivíduos com infecção bacteriana ativa e 38 sem infecção. Dentre os pacientes elegíveis, 39 (47,5%) infectados e 10 (26,3%) não infectados foram excluídos devido à impossibilidade de serem reavaliados pelos motivos listados na **Figura 21**. A casuística final foi formada por 36 pacientes no grupo infectado e 28 pacientes no grupo não infectado. A principal causa de exclusão dos pacientes com cirrose infectados foi o óbito antes da reavaliação, ocorrido em 28 pacientes (34,1%). O intervalo mediano entre a avaliação inicial e exclusão por óbito foi de 11 dias (IC 7,5-29,5 dias) e a maioria deles ocorreu durante a internação hospitalar (n=22). A principal causa de óbito foram as complicações diretamente relacionadas à sepse (n=19). As demais causas de morte relatadas, não diretamente relacionadas à infecção, foram: hemorragia digestiva alta (HDA) varicosa (n=1), HDA não varicosa (n=2), HDA não especificada (n=1), insuficiência respiratória (n=1), isquemia mesentérica (n=1), hipoglicemia (n=1), complicação cirúrgica (n=1) e síndrome hepatorenal (n=1). Outros seis (7,3%) cirróticos infectados foram transplantados antes da reavaliação, cinco deles antes da alta hospitalar, num intervalo entre 6 e 23 dias após a avaliação inicial.

No grupo sem infecção, três (7,9%) pacientes foram excluídos por óbito antes da reavaliação ambulatorial, sendo um óbito por HDA e em dois casos não conseguimos informação sobre a causa do óbito. Neste grupo, dois (5,7%) pacientes foram submetidos ao transplante hepático antes da reavaliação ambulatorial.

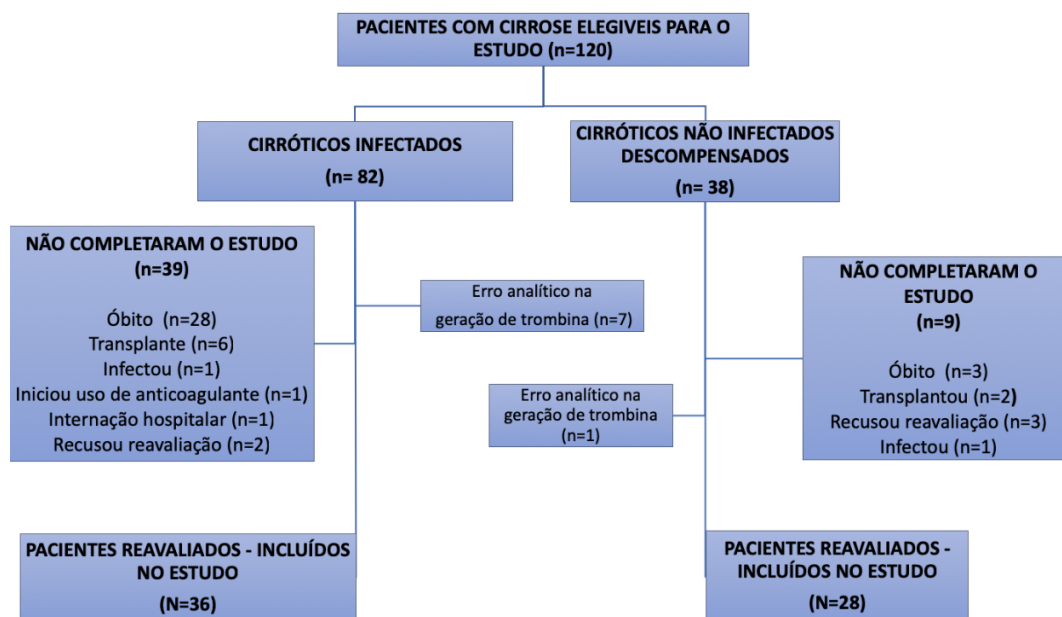


Figura 21 - Fluxograma dos pacientes elegíveis e pacientes que completaram o estudo

4.2 Caracterização da amostra

As características basais dos pacientes incluídos no estudo estão resumidas na **Tabela 3**. A distribuição entre os grupos foi homogênea em relação às variáveis sexo, idade e etiologia da cirrose. Em ambos os grupos prevaleceram etiologias alcoólica e viral. O grupo infectado apresentou maior grau de disfunção hepática, representado pelas variáveis encefalopatia hepática, ascite, bilirrubina total, albumina e creatinina. Entretanto, não houve diferença significativa na frequência de ascite refratária entre os grupos. A frequência de descompensações clínicas relacionadas à cirrose (encefalopatia hepática, HDA varicosa e peritonite bacteriana espontânea), ocorridas previamente à inclusão no estudo, foi semelhante entre os grupos.

Tabela 3- Características basais dos pacientes com cirrose

Variável	Infectado (n =36)	Não Infectado (n =28)	p-valor
Idade (anos)	53 ± 16	57± 10	0,17
Sexo Masculino	26 (72,2)	19 (67,9)	0,79
Etiologia da cirrose			
Álcool	9 (25)	10 (35,7)	0,46
Hepatites virais	14 (38,9)	9 (32,1)	0,47
NASH/criptogênica	8 (22,2)	6 (21,4)	1,00
Cirrose biliar	1 (2,8)	0 (0)	1,00
Hepatite auto-imune	3 (8,3)	1 (3,6)	0,40
Outras etiologias	1 (2,8)	2 (7,1)	0,36
PAM (mmHg)	84 ± 19	87 ± 14	0,05
FC > 90bpm	8 (22,2)	8 (30,8)	0,56
Ascite			0,026
Ausente	5 (13,9)	0 (0)	
Leve/ moderada	17 (47,2)	9 (32,1)	
Volumosa	14 (38,9)	19 (67,9)	
Ascite refratária	11 (30,6)	18 (64,3)	0,29
Encefalopatia hepática			0,002
Ausente	21 (58,3)	27 (96,4)	
Grau I/II	12 (33,3)	1 (3,6)	
Grau III/IV	3 (8,3)	0 (0)	
Complicações prévias da cirrose			
PBE prévia	4 (11,1)	7 (25)	0,19
EH prévia	24 (66,7)	18 (64,3)	1,00
HDA prévia	15 (42,9)	15 (53,6)	0,45
Trombose de veia porta crônica	9 (25,0)	5 (19,2)	0,76
Exames laboratoriais			
Hemoglobina (g/dL)	9,7 ± 2,1	10,5 ± 1,8	0,13
Leucócitos (x 10 ⁹ /L)	6,57 ± 4,44	5,1 ± 2,4	0,11
Albumina (g/dL)	3 ± 0,6	3,3 ± 0,6	0,04
Bilirrubina total (mg/dL)	4,14 ± 3,6	1,7 ± 1,1	<0,01
Creatinina (mg/dL)	1,67 ± 1,11	1,2 ± 0,5	0,02
Proteína C Reativa (mg/dL)	77,6 ± 61,0	15,4 ± 12,3	<0,01

Dados expressos em média ± desvio padrão ou n (%)

NASH = Esteatohepatite não alcoólica; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca; PBE = peritonite bacteriana espontânea; EH = encefalopatia hepática; HDA = hemorragia digestiva alta.

4.2.1 Características basais relacionadas aos testes convencionais da coagulação

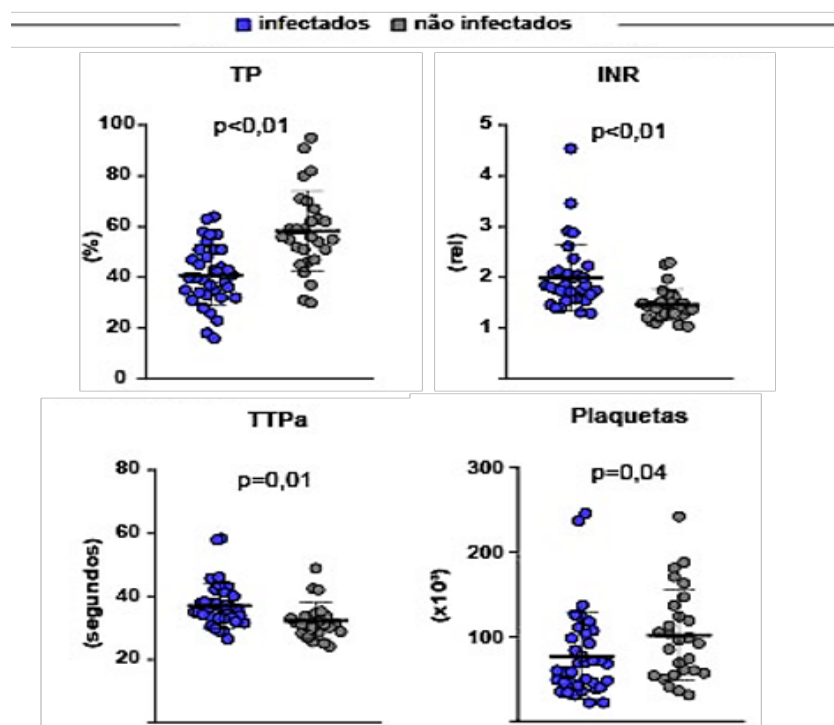
No momento da inclusão, os pacientes com infecção ativa apresentaram coagulopatia mais grave, segundo os valores TP/RNI, TTPa e plaquetas (**Tabela 4 e Figura 22**).

Tabela 4 - Características basais dos testes convencionais de coagulação

Variável	Infectado (n = 36)	Não Infectado (n = 28)	p-valor
TP(%)	41 ± 12	58 ± 16	<0,01
INR	1,99 ± 0,7	1,46 ± 0,31	<0,01
TTPa (seg)	37 ± 7	32,2 ± 5,7	0,01
Plaqueta (x 10 ³ /mm ³)	77 ± 51,1	102 ± 53,3	0,04

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

RNI = razão normalizada internacional; TP = tempo de protrombina; TTPa = tempo de trombina parcial ativado.



RNI = razão normalizada internacional; TP = tempo de protrombina; TTPa = tempo de trombina parcial

Figura 22 - Características basais dos testes de coagulação convencionais

4.2.2 Características basais relacionadas à gravidade da cirrose

O grupo não infectado foi representado exclusivamente por pacientes descompensados (escore de Child Pugh \geq B7). No grupo infectado a gravidade da cirrose, avaliada pelos escores Child-Pugh, MELD e CLIF-C OF (Organ Failure), foi significativamente maior. Não houve diferença com significância estatística no grau de ACLF entre os grupos. Nos vinte e cinco (69,4%) pacientes infectados e 23 (88,5%) pacientes não infectados que não exibiram critérios para ACLF (ACLF grau 0), foram calculados o escore CLIF-C AD (**Tabela 5 e Figura 23**).

Tabela 5 - Características basais dos escores de gravidade da cirrose

Variável	Infectado (n = 36)	Não Infectado (n = 28)	p-valor
Classificação de Child-Pugh			0,003
A	0 (0)	0 (0)	
B	17 (47,2)	23 (85,2)	
C	19 (52,8)	4 (14,8)	
Escore de Child Pugh	9.9 ± 1.7	8.4 ± 1.5	<0,01
Escore de MELD	21.8 ± 6.9	13.8 ± 3.8	<0,01
Escore CLIF-C OF *	8 ± 2	6 ± 1	<0,01
Grau de ACLF			0,12
Ausente	25 (69,4)	23 (88,5)	
Grau 1	9 (25)	3 (11,5)	
Grau 2	1 (2,8)	0 (0)	
Grau 3	1 (2,8)	0 (0)	
Escore CLIF-C AD*	55 ± 12	53 ± 18	0,67

Dados expressos em média ± desvio padrão ou n (%)

* Aplicável somente a pacientes com cirrose descompensada e sem critérios de ACLF (ACLF ausente)

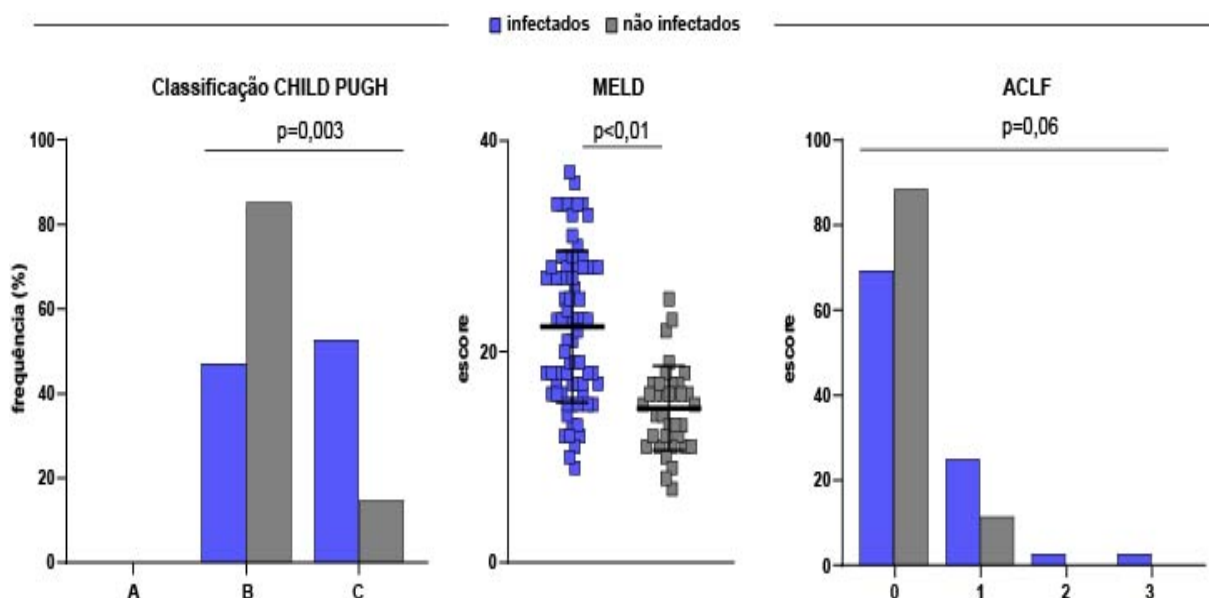


Figura 23 - Escores basais de gravidade da cirrose dos pacientes

4.3 Características relacionadas à Infecção bacteriana

A principal causa de infecção foi peritonite bacteriana espontânea (PBE), observada em 21 (58,3%) pacientes, seguida de infecção do trato urinário (27,8%) e infecção de corrente sanguínea (13,9%) (**Tabela 6**). Os sítios classificados como *outros* correspondem a colangite (n=1) e diarreia infecciosa (n=2). Os dois pacientes com diarreia também foram diagnosticados com PBE. Em seis pacientes (16,6%) foi identificado mais de um sítio infeccioso. Quatro pacientes (11%) encontravam-se em choque ou hipotensão, definida como < 65mmHg, no momento da inclusão.

Tabela 6 - Sítios das infecções bacterianas

Sítio	n (%)
Peritonite Bacteriana Espontânea	21 (58,3)
Urinário	10 (27,8)
Corrente sanguínea	5 (13,9)
Respiratório	2 (5,5)
Cutâneo	2 (5,5)
Outros	3 (8,3)

Dados expressos em no. (%)

4.4 Perfil microbiológico

Em relação às características microbiológicas, 7 (19,4%) pacientes com peritonite bacteriana espontânea apresentaram positividade na cultura do líquido ascítico. *Escherichia coli* (n=4) foi a bactéria mais comumente isolada e os demais germes identificados no líquido ascítico foram: *Klebsiella pneumoniae* (n=2) e *Staphylococcus epidermidis* (n=1). Nos pacientes com infecção urinária, *Escherichia coli* (n=3), seguida de *Proteus mirabilis* (n=2) e *Klebsiella pneumoniae* (n=2) foram as bactérias mais comumente isoladas. Considerando os casos de infecção de corrente sanguínea, *Escherichia coli* (n=2) também foi o agente mais comumente isolado nas hemoculturas, seguido de *Staphylococcus aureus* (n=1), *Salmonella sp* (n=1) e *Streptococcus agalactiae* (n=1).

4.5 Intervalo de reavaliações

Os pacientes do grupo infectado foram reavaliados no mínimo de 5 dias após o término da terapia antibiótica. O intervalo mediano entre a data do término da antibioticoterapia e a data da reavaliação foi de 9 dias (IC 7-14). No grupo infectado a reavaliação também ocorreu no mínimo 5 dias após a inclusão no estudo, sem intervenção entre as avaliações.

4.6 Efeito da infecção na gravidade da cirrose

A resolução da infecção esteve associada a uma melhora significativa dos escores de gravidade da cirrose: MELD (21.8 ± 6.9 vs 17.3 ± 4.9 ; $p < 0,01$), Child Pugh (de 9.9 ± 1.7 vs 8.5 ± 1.8 ; $p < 0,01$), CLIF-C OF (8 ± 2 vs 7 ± 1 ; $p = 0,01$). A contagem de leucócitos, valores da PCR e os parâmetros laboratoriais relacionados à gravidade da disfunção hepática também apresentaram melhora significativa após a resolução da infecção (**Tabela 7**). No grupo sem infecção, nenhum destes parâmetros analisados apresentou diferença significativa entre o momento da inclusão e a reavaliação (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Comparação entre as características clínicas e laboratoriais no momento da inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo

	Infectado (n =36)			Não infectado (n=28)		
	Inclusão	Reavaliação	p valor	Inclusão	Reavaliação	p-valor
Ascite atual			0,67			1
Ausente	5 (13,9)	4 (11,1)		0 (0)	0 (0)	
Leve/ moderada	17 (47,2)	19 (52,8)		9 (32,1)	8 (29,6)	
Volumosa	14 (38,9)	13 (36,1)		19 (67,9)	19 (70,4)	
Encefalopatia hepática			0,04			1
Ausente	21 (58,3)	28 (77,8)		27 (96,4)	25 (96,2)	
Grau I ou II	12 (33,3)	8 (22,2)		1 (3,6)	1 (3,8)	
Grau III ou IV	3 (8,3)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
Classificação de Child-Pugh			0,03			0,64
A	0 (0)	4 (11,1)		0 (0)	2 (8,3)	
B	17 (47,2)	24 (66,7)		23 (85,2)	19 (79,2)	
C	19 (52,8)	8 (22,2)		4 (14,8)	3 (12,5)	
Escore de Child Pugh	9.9 ± 1.7	8.5 ± 1.8	<0,01	8.4 ± 1.5	8.1 ± 1.4	0,36
Escore de MELD	21.8 ± 6.9	17.3 ± 4.9	<0,01	13.8 ± 3.8	14.1 ± 3.9	0,14
Escore CLIF-C OF	8 ± 2	7 ± 1	0,01	6 ± 1	6 ± 1	0,52
Escore CLIF-C AD*	55 ± 12	48 ± 9	0,09	53 ± 18	50 ± 6	1,0
Exames laboratoriais						
Hemoglobina (g/dL)	9,7 ± 2,1	9.7 ± 2	0,94	10,5 ± 1,8	10.7 ± 1.8	0,43
Leucócitos (x 10 ⁹ /L)	6,57 ± 4,44	4.4 ± 1.9	<0,01	5,1 ± 2,4	5.1 ± 2	0,31
Albumina (g/dL)	3 ± 0,6	3.3 ± 0.6	<0,01	3,3 ± 0,6	3.2 ± 0.5	0,86
Bilirrubina total (mg/dL)	4,14 ± 3,6	3.4 ± 4.2	0,01	1,7 ± 1,1	1.7 ± 1.1	0,47
Creatinina (mg/dL)	1,67 ± 1,11	1.2 ± 0.8	<0,01	1,2 ± 0,5	1.2 ± 0.6	0,72
Proteína C Reativa (mg/dL)	77,6 ± 61,0	13.7 ± 12.2	<0,01	15.4 ± 12.3	12.8 ± 11	0,78

Dados expressos em média ± desvio padrão ou n (%)

* Aplicável somente a pacientes com cirrose descompensada e sem critérios de ACLF (ACLF ausente)

4.7 Efeito da infecção nos testes convencionais da coagulação

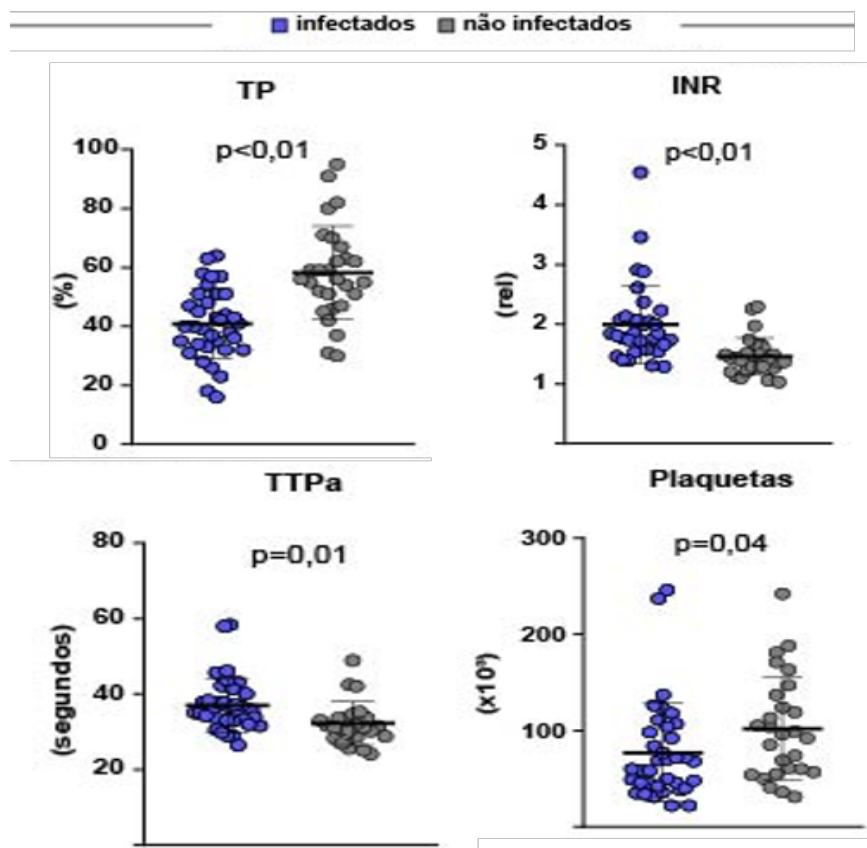
Durante a infecção bacteriana os valores do TP ($41 \pm 12\%$ vs $46 \pm 10\%$, $p = 0,001$), do INR ($1,99 \pm 0,66$ vs $1,71 \pm 0,39$; $p < 0,01$) e do TTPa ($37 \pm 7,0$ s vs $34 \pm 7,0$; $p = 0,031$) indicaram hipocoagulabilidade mais intensa quando comparados aos valores após a resolução da infecção. A infecção não interferiu no grau de plaquetopenia ($77 \pm 51,1 \times 10^3$ vs 78 ± 43 ; $p = 0,95$). No grupo não infectado, somente o TP apresentou diferença significativa entre a inclusão e a reavaliação (**Tabela 8 e Figura 24**).

Tabela 8 - Comparação dos resultados dos testes convencionais da coagulação entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes de cada grupo

	Infectado (n=36)		p-valor	Não Infectado (n=28)		p-valor
	Inclusão	Reavaliação		Inclusão	Reavaliação	
Plaqueta (x 10 ³ /mm ³)	77 ± 51,1	78,4 ± 42,9	0,95	102 ± 53,3	96,2 ± 50,8	0,40
TP(%)	41 ± 12	46 ± 10	0,001	58 ± 16	54 ± 15	0,03
INR	1,99 ± 0,7	1,71 ± 0,39	<0,01	1,46 ± 0,31	1,53 ± 0,33	0,06
TTPa (seg)	37 ± 7	34 ± 7	0,031	32,2 ± 5,7	34 ± 13	0,43

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

RNI = razão normalizada internacional; TP = tempo de protrombina; TTPa = tempo de trombina parcial ativado.



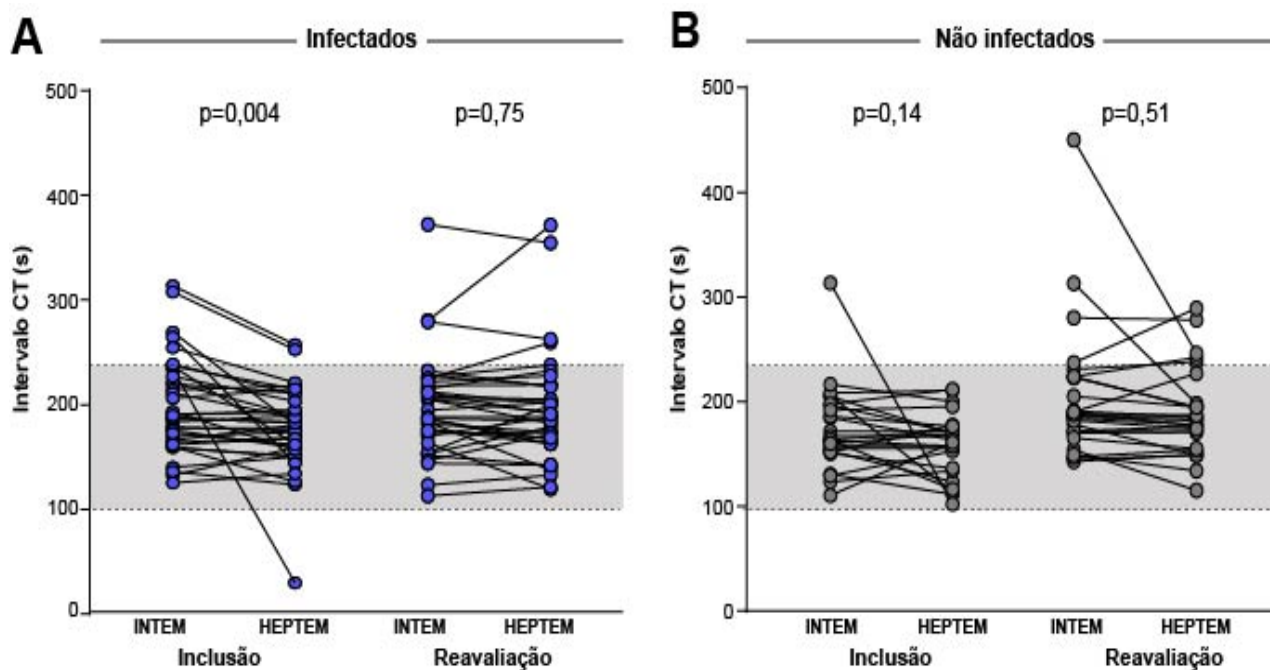
RNI = razão normalizada internacional; TP = tempo de protrombina; TTPa = tempo de trombina parcial ativado.

Figura 24 - Comparação dos testes convencionais da coagulação entre a inclusão e a reavaliação no grupo infectado e no grupo não infectado

4.8 Efeito da infecção na atividade heparinóide na tromboelastometria – ROTEM: INTEM/HEPTEM

Durante a infecção o tempo de formação inicial do coágulo (CT) foi significativamente mais prolongado no INTEM (CT_{INTEM}) que no ensaio com adição de heparinase HEPTEM (CT_{HEPTEM}), sugerindo um efeito heparinoide endógeno durante a infecção ($CT_{INTEM} 200\pm 47$ s e $CT_{HEPTEM} 177\pm 41$ s, $p = 0,004$). Após a resolução da infecção, este fenômeno não foi mais observado ($CT_{INTEM} 195,2\pm 50,9$ e $CT_{HEPTEM} 196\pm 58$, $p = 0,75$) (**Figura 25 e Tabela 9**).

No grupo sem infecção não houve diferença significativa entre a duração do CT_{INTEM} e CT_{HEPTEM} na inclusão ($CT_{INTEM} 189\pm 34$ seg e $CT_{HEPTEM} 176\pm 25$ seg; $p=0,14$) e na reavaliação ($CT_{INTEM} 202,8\pm 62,3$ seg e $CT_{HEPTEM} 189\pm 41$ seg; $p=0,51$) (**Figura 25 e Tabela 9**).



A linha cinza representa os valores normais

Figura 25 - Comparação entre os parâmetros do CT_{INTEM} e CT_{HEPTM} na inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo

Tabela 9 - Comparação entre os parâmetros do INTEM e HEPTM na inclusão e na reavaliação em ambos os grupos

	Inclusão		<i>p</i> -valor	Reavaliação		<i>p</i> -valor
	INTEM	HEPTM		INTEM	HEPTM	
Infectado (n=36)						
CT	200 ± 47	177 ± 41	0,004	195,2 ± 50,9	196 ± 58	0,75
Sem Infecção (n=28)						
CT	189 ± 34	176 ± 25	0,14	202,8 ± 62,3	189 ± 41	0,51

Dados expressos em média ± desvio padrão

Se considerarmos o critério diagnóstico de efeito heparinoide aplicado por outros autores no teste viscoelástico em pacientes com cirrose ^(41, 42) identificamos efeito heparinoide no grupo infectado, embora a maioria (86,1%) tenha apresentado duração do CT_{INTEM} dentro do intervalo da normalidade (**Figura 25**). Entretanto, se considerarmos o critério preconizado no algoritmo terapêutico do ROTEM ⁽⁷⁴⁾ (intervalo $CT_{INTEM} > 240s$ e relação $CT_{HEPTEM}/CT_{INTEM} < 0,8$), somente um paciente do grupo infectado (2,8%) teria efeito atribuível à heparina no momento da inclusão e nenhum na reavaliação ($p=0.98$). No grupo sem infecção, um paciente (3,8%) na inclusão e dois (7,4%) na reavaliação ($p= 1,0$) também preencheriam este critério.

Em relação aos demais parâmetros, em ambos os grupos o ângulo alfa e o tempo de formação do coágulo (CFT) não exibiram diferença significativa nos valores entre os ensaios do INTEM e do HEPTEM, na inclusão e na reavaliação (**Tabelas 10 e 11, Figura 26**).

Tabela 10 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTEM na inclusão e na reavaliação dos pacientes do grupo infectado

	Infectado (n=36)					
	Inclusão		<i>p</i>	Reavaliação		<i>p</i>
	INTEM	HEPTEM		INTEM	HEPTEM	
CFT(seg)	182± 114	179,2± 111,2	0,68	238 ± 218	248 ± 189	0,98
ângulo alfa (°)	64 ± 11	64 ± 12	0,5	60 ± 13	58,5 ± 14,4	0,17
MCF (mm)	51 ± 10	49 ± 11	0,58	45 ± 11	43 ± 10	0,03

Dados expressos em média ± desvio padrão

Tabela 11 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTEM na inclusão e na reavaliação dos pacientes do grupo sem infecção

	Sem Infecção (n=28)					
	Inclusão		<i>p</i>	Reavaliação		<i>p</i>
	INTEM	HEPTEM		INTEM	HEPTEM	
CFT(seg)	158± 95	161,7± 91,6	0,5	170 ± 92	175 ± 103	0,11
ângulo alfa (°)	65,9 ± 10,1	66 ± 9,7	0,5	63,8± 10	64 ± 10,3	0,8
MCF (mm)	50 ± 13	48 ± 14	0,05	48 ± 9	45 ± 11	0,07

Dados expressos em média ± desvio padrão

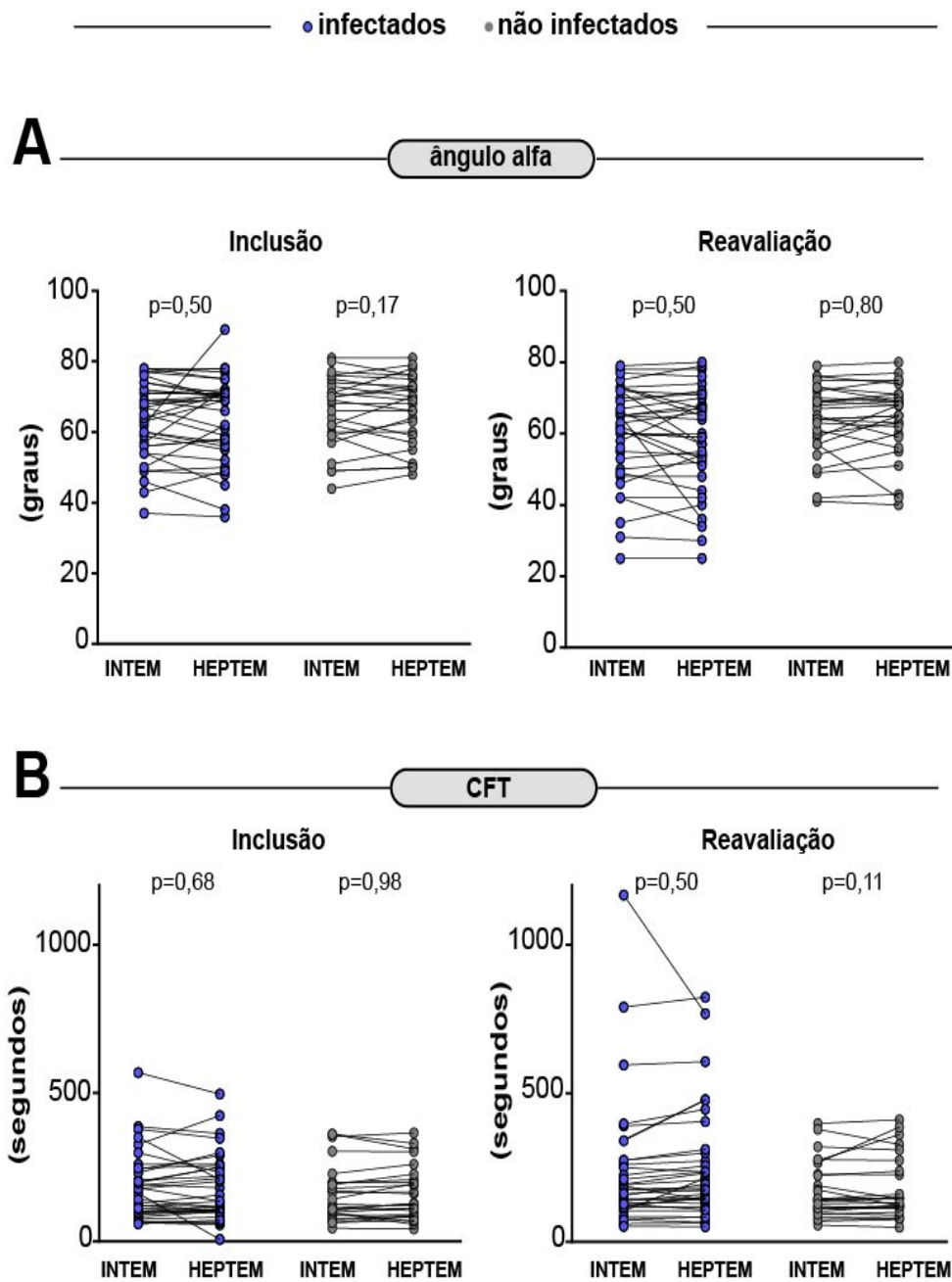


Figura 26 - Comparação entre os demais parâmetros do INTEM e HEPTEM na inclusão e na reavaliação dos pacientes de cada grupo

4.9 Dosagem do Anti Xa

Conforme demonstrado na **Tabela 12**, em ambos os grupos não houve diferença significativa na taxa de detecção e nos níveis séricos médios de anti-Xa no momento da inclusão ou na reavaliação.

Tabela 12 - Comparação dos resultados do Anti-Xa entre a inclusão e a reavaliação de cada grupo

	Infectado (n =36)		p-valor	Não infectado (n=28)		p-valor
	Inclusão	Reavaliação		Inclusão	Reavaliação	
AntiXa (UI/ml)	0,006 ± 0,02	0,004 ± 0,08	0,48	0,003 ± 0,06	0,004 ± 0,01	0,61
AntiXa >0,01 UI/mL	5 (15,6)	6 (17,6)	1,0	6 (24)	4 (16)	0,54

Dados expressos em média ± desvio padrão e n (%)

4.10 Efeito da infecção no teste de geração de trombina

4.10.1 Efeito da infecção no ETP

Durante a infecção, o ETP sem e com TM foram significativamente maiores que após a resolução da infecção (ambos $p < 0,01$). A infecção não interferiu nos valores médios do ETP_r ($0,78 \pm 0,15$ vs $0,77 \pm 0,09$, $p=0,89$). **(Tabela 13, Figura 27).**

No grupo não infectado não houve diferença em nenhum destes parâmetros entre a inclusão e a reavaliação **(Tabela 13, Figura 27).**

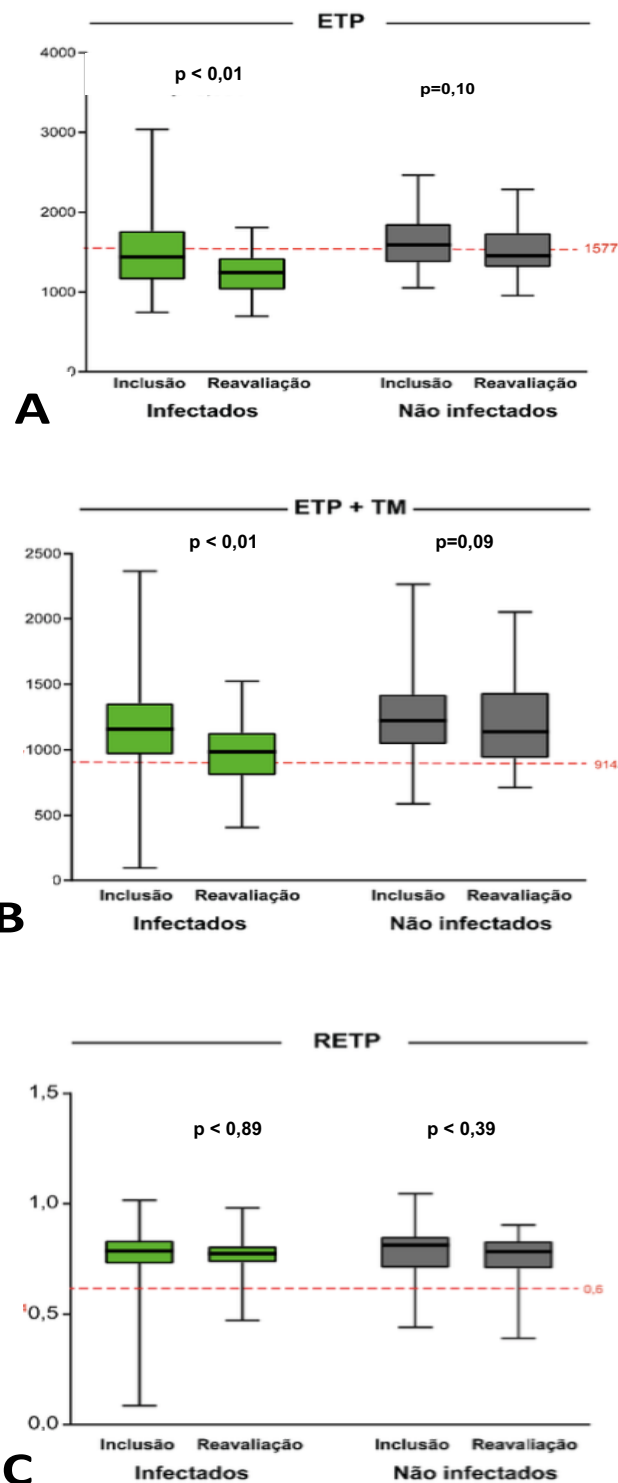


Figura 27 - Comparação dos valores entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo dos parâmetros da geração de trombina. A) geração de trombina sem trombotomodulina (ETP). B) geração de trombina com trombotomodulina (ETP + TM) e C) Razão de ETP (ETPr)

Tabela 13 - Comparação dos valores de geração de trombina entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo

Parâmetro do GT	Infectado (n=36)		p valor	Não infectado (n=28)		p-valor
	Inclusão	Reavaliação		Inclusão	Reavaliação	
LT (min.)						
c/ TM	5,3 ± 2,2	4,6 ± 1,9	0,004	5,8 ± 3,2	5,4 ± 2,3	0,20
s/ TM	3,4 ± 0,9	3,2 ± 0,9	0,09	3,7 ± 1,7	3,9 ± 1,6	0,09
Ttpico (min.)						
c/ TM	7,6 ± 2,7	6,7 ± 1,9	0,02	8 ± 3,3	7,6 ± 2,4	0,21
s/ TM	5,6 ± 1	5,4 ± 1,1	0,11	5,7 ± 0,6	6,2 ± 1,8	0,12
Pico (nmol/L)						
c/ TM	190,3 ± 66	180 ± 45,2	0,32	221,6 ± 51,2	209,6 ± 54,2	0,18
s/ TM	205,7 ± 63,5	197,2 ± 49,6	0,29	246,9 ± 50,7	229,9 ± 56,4	0,02
ETP (nmol/L*min)						
c/ TM	1145,4 ± 360,7	958,1 ± 254,8	< 0,01	1260,9 ± 346,4	1182,6 ± 325,9	0,09
s/ TM	1480,5 ± 414,3	1234,7 ± 268,8	< 0,01	1616,2 ± 324	1550,3 ± 338,1	0,10
razão	0,78 ± 0,15	0,77 ± 0,09	0,89	0,78 ± 0,13	0,76 ± 0,11	0,39

Dados expressos em média ± desvio padrão

GT: geração de trombina; ETP: potencial de trombina endógeno; TM: trombotomodulina; LT: tempo de latência; ttpico: tempo para o pico.

4.10.2 Efeito da infecção no estado de hipercoagulabilidade

Conforme demonstrado na **Tabela 14**, a infecção não interferiu no estado de hipercoagulabilidade dos pacientes com cirrose, pois, seja durante a infecção ou após a resolução do quadro infeccioso, quase toda amostra estudada apresentou resultados normais ou elevados dos parâmetros ETP com TM e ETPr.

No grupo não infectado, em ambos os momentos da avaliação, todos (100%) os pacientes apresentaram ETP com TM e ETPr normal ou hipercoagulável (**Tabela 14**)

Tabela 14 - Comparação entre frequências na inclusão e na reavaliação de pacientes com padrões de normalidade ou hipercoagulabilidade na geração de trombina

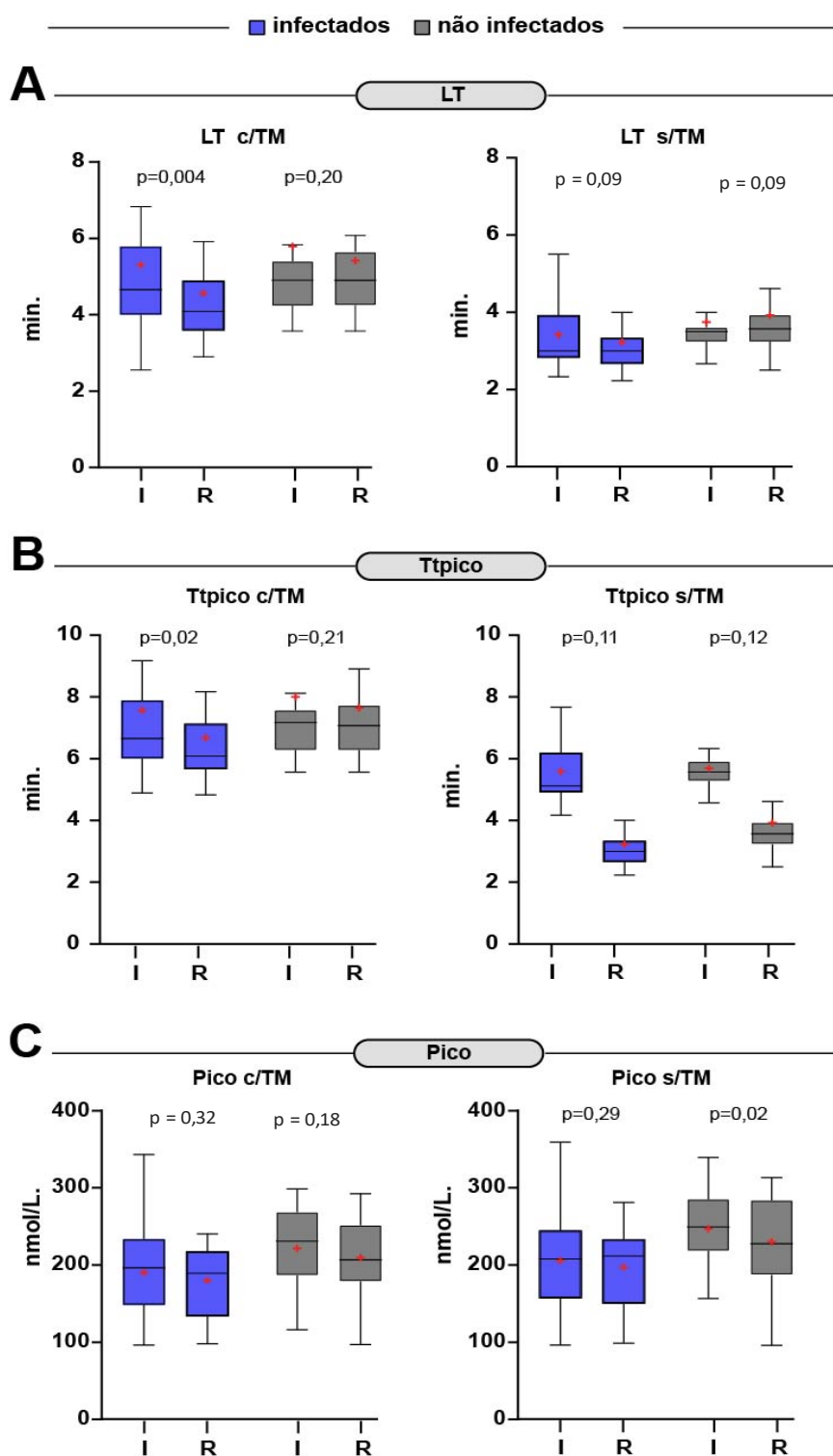
Parâmetro de GT	Infectado (n=36)		p-valor	Não infectado (n=28)		p-valor
	Inclusão n(%)	Reavaliação n(%)		Inclusão n(%)	Reavaliação n(%)	
LT (min.)						
c/ TM	24 (66,7)	27 (75,0)	0,29	22 (81,5)	15 (55,6)	0,04
s/ TM	30 (83,3)	32 (88,9)	1	24 (88,9)	21 (77,8)	0,65
Ttpico (min.)						
c/ TM	26 (72,2)	27 (75,0)	0,87	18 (66,7)	12 (44,4)	0,02
s/ TM	34 (94,4)	34 (94,4)	1	26 (96,3)	24 (88,9)	0,06
Pico (nmol/L)						
c/ TM	31 (86,1)	33 (91,7)	0,44	28 (100)	26 (96,3)	-
s/ TM	9 (25,0)	5 (13,9)	0,04	16 (59,3)	10 (37,0)	0,04
ETP (nmol/L*min)						
c/ TM	35 (97,2)	35 (97,2)	1	28 (100)	28 (100)	-
s/ TM	26 (72,2)	19 (52,8)	0,03	24 (88,9)	24 (88,9)	1
razão	35 (97,2)	36 (100)	-	28 (100)	27 (100)	-

Dados expressos em n (%)

4.10.3 Efeito da infecção dos demais parâmetros da GT

Durante a infecção o tempo de latência (LT) e tempo para o pico (tpico) de geração de trombina nos testes com e sem TM (**Tabela 13, Figura 28**) foram significativamente maiores que após a resolução da infecção, mas a frequência de resultados normais ou hipercoaguláveis não se alterou (**Tabela 14, Figura 28**). A infecção não interferiu nos valores médios do Pico (com e sem TM).

No grupo sem infecção, houve diferença entre a inclusão e a reavaliação somente nos valores do Pico, sem mudança significativa nos demais parâmetros da geração de trombina e na frequência de resultados normais ou hipercoaguláveis (**Tabelas 11 e 12, Figura 28**).



I= inclusão, R= reavaliação.

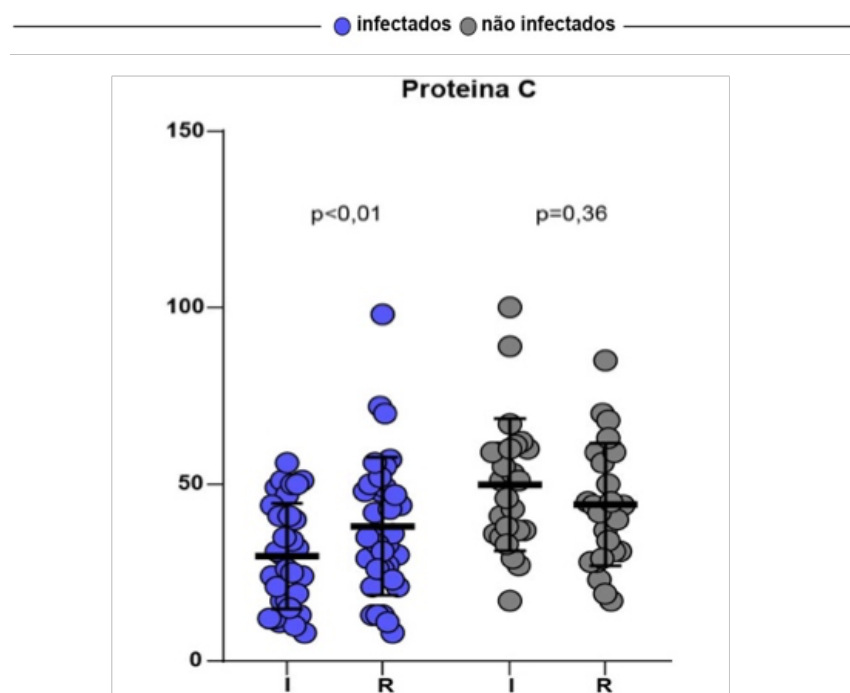
Figura 28 - Comparação dos valores entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo dos demais parâmetros da geração de trombina. A) lag time (LT) B) tempo para o pico (ttpico) e C) pico

4.11 Efeito da infecção na atividade dos anticoagulantes naturais

4.11.1 Atividade da Proteína C

Durante a infecção, a atividade da PC foi significativamente inferior à observada após a resolução da infecção (30 ± 15 vs 38.1 ± 19.5 , $p < 0,01$) (**Figura 29**). Entretanto, em ambos os momentos da avaliação, quase a totalidade dos pacientes exibiu atividade da PC abaixo do valor da normalidade (100% vs 91,2%, $p=0,63$).

No grupo não infectado, não houve diferença na atividade da PC entre a inclusão e reavaliação (50 ± 19 vs 44.2 ± 17.3 , $p=0,36$) (**Figura 29**) e a frequência de pacientes com redução da PC foi a mesma (92%) em ambos os momentos da avaliação.



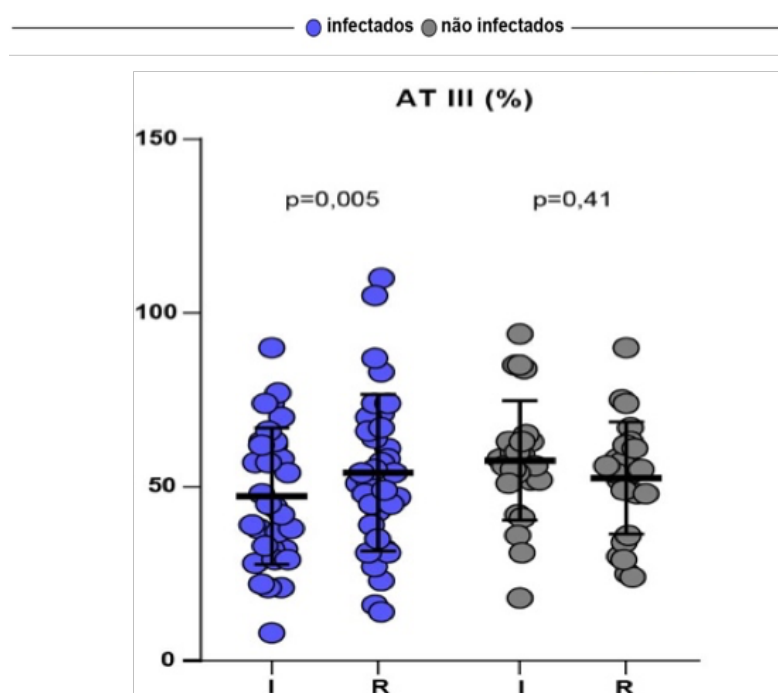
I= inclusão, R= reavaliação

Figura 29 - Comparação dos valores de PC entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo

4.11.2 Atividade da Antitrombina

A atividade da AT durante a infecção foi significativamente inferior à observada após a resolução da infecção (47.3 ± 19.6 vs 54.1 ± 22.5 , $p=0,005$) (**Figura 30**) mas a frequência de pacientes com atividade abaixo da normalidade foi semelhante ($96,9\%$ vs $88,2\%$, $p=1,0$)

No grupo não infectado não houve diferença na atividade da AT entre a inclusão e reavaliação (57.6 ± 17.2 vs 52.5 ± 16.1 , $p=0,41$) (**Figura 30**) e, também em ambos os momentos, a maioria da amostra exibiu atividade da AT reduzida (84% vs 96% , $p=1,0$).



I= inclusão, R= reavaliação

Figura 30 - Comparação dos valores da AT entre a inclusão e a reavaliação dos pacientes em cada grupo

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O entendimento atual sobre a hemostasia na cirrose indica que a geração de trombina encontra-se normal ou aumentada, quando comparada a controles sadios. Esta situação decorre da redução desproporcional do nível dos anticoagulantes naturais em relação aos fatores procoagulantes, gerando um frágil e instável reequilíbrio da hemostasia na cirrose, que favorece uma tendência procoagulante na maior parte dos pacientes.

A infecção bacteriana, uma condição capaz de promover uma coagulopatia complexa, constitui um dos principais fatores que podem romper este reequilíbrio da hemostasia na cirrose. A patogênese da coagulopatia nas infecções está relacionada ao incremento dos mecanismos procoagulantes e à diminuição dos anticoagulantes naturais, podendo clinicamente variar, desde doença tromboembólica a casos de coagulação intravascular disseminada com a concomitância de trombose e hemorragia difusa. No paciente com cirrose, demonstrou-se que durante episódios de infecção bacteriana aguda há liberação endotelial de heparinoides endógenos, cujo efeito é demonstrável por métodos como tromboelastografia (alargamento do parâmetro R). Tal evento seria responsável por manter o paciente funcionalmente anticoagulado, com potenciais riscos de sangramento durante procedimentos invasivos comumente realizados na assistência clínica. Entretanto, poucos dados foram publicados em relação à geração de trombina durante infecções e, em particular, se a liberação de heparinoides interfere na quantidade total de trombina gerada a ponto de tornar o paciente realmente anticoagulado.

Neste estudo prospectivo e observacional, avaliamos o papel da infecção bacteriana na coagulação de pacientes com cirrose, especialmente, seu efeito na geração de trombina e na liberação de heparinoides endógenos. Para esta avaliação, foram utilizados, respectivamente, o teste

da geração de trombina (GT) e os dois ensaios do tromboelastograma (ROTEM) padronizados para avaliação da presença de heparina na amostra (INTEM/HEPTEM). Pacientes com cirrose e infecção bacteriana ativa tiveram amostras sanguíneas coletadas em até 24 horas após o início da antibioticoterapia e, após a resolução do quadro infeccioso e foram comparados a um segundo grupo, composto por pacientes com cirrose descompensada e não infectados, também avaliados em dois momentos. Este é o primeiro estudo a utilizar conjuntamente estes dois testes globais da coagulação, o teste da GT e o ROTEM, para uma melhor compreensão da coagulação em pacientes com cirrose e infecção bacteriana.

Nosso estudo traz como contribuição principal o conhecimento que, durante a infecção bacteriana, a quantidade de trombina gerada é significativamente superior à observada, após a resolução da infecção. Entretanto, o reequilíbrio da hemostasia, representado pela razão do ETP (ETPr), permaneceu inalterado. Isto porque, durante a infecção, o ETPr manteve um padrão de normo ou hipercoagulabilidade semelhante ao observado após a resolução da infecção. Demonstramos também que durante a infecção bacteriana os achados nos ensaios do ROTEM sugerem a presença de um possível efeito heparinoide endógeno.

No presente estudo, durante a infecção ativa, a geração de trombina no ensaio com TM (ETP com TM) foi significativamente superior à observada após a resolução da infecção. Entretanto, em ambas condições clínicas a porcentagem de indivíduos com geração normal ou elevada de trombina foi a mesma (97,2%). O ensaio com TM possibilita avaliar de maneira mais fidedigna a participação das vias anticoagulantes, sobretudo a via da proteína C e, portanto, o reequilíbrio que leva à preservação da geração de trombina ^(20, 32).

Além disso, demonstramos que a atividade da proteína C durante a infecção foi significativamente inferior à observada, após a resolução do quadro infeccioso. Tal achado está em concordância com o aumento da geração de trombina observada durante os episódios infecciosos.

No ensaio sem TM, a geração de trombina (ETP) durante a infecção também foi significativamente superior à observada após a resolução do quadro infeccioso. A porcentagem de pacientes com geração de trombina normal ou elevada na infecção (72,2%) também foi significativamente superior à reavaliação (52,8%) e, em ambos os momentos, esta frequência foi inferior àquela observada no ensaio com TM (97,2%).

Diversos estudos ^(32, 62, 112, 114) realizados em pacientes com cirrose e sem infecção já haviam demonstrado que os resultados do teste com TM, quando comparados aos valores de referência em sadios, exibem um padrão procoagulante. Este achado deve-se à incapacidade do teste sem TM revelar as deficiências nas vias anticoagulantes da cirrose.

Outro achado interessante no presente estudo é que a infecção não alterou os valores da razão de geração de trombina (ETPr), que permaneceram igualmente elevados durante e após a resolução do quadro infeccioso. Nestes dois momentos da avaliação do grupo infectado, quase a totalidade dos pacientes apresentou um padrão de ETPr normal ou aumentado (respectivamente, 97,2% e 100%), quando comparados a controles sadios. O ETPr representa o equilíbrio entre a participação dos sistemas anticoagulantes e procoagulantes na geração da trombina, pois é definido pela razão entre a geração de trombina com e sem TM. Valores aumentados de ETPr sugerem uma resistência à ação da TM com tendência protrombótica⁽¹²³⁾. A utilização deste parâmetro para um melhor entendimento do impacto das deficiências pro e anticoagulantes na hemostasia em pacientes com cirrose foi inicialmente proposta por Tripodi et al., em 2009 ⁽²⁰⁾. Neste trabalho pioneiro, os autores demonstraram valores de ETPr significativamente maiores em um grupo de 134 cirróticos (0,80; 0,51–1,06) que no grupo controle com 132 indivíduos sadios (0,66; 0,17–0,95). Pacientes com doença hepática mais avançada, representada pelo escore de Child-Pugh C, apresentaram um padrão mais hipercoagulável que os demais pacientes (escores de Child-Pugh A e B). O padrão de hipercoagulabilidade nos pacientes com doença hepática avançada foi comparável ao encontrado em pacientes com deficiência congênita de

proteína C. Os autores demonstraram ainda que o estado procoagulante estava associado não só à deficiência dos anticoagulantes naturais proteína C e antitrombina, mas também ao aumento considerável do fator VIII, este último um potente fator procoagulante. A partir de então, a maioria dos trabalhos que estudaram a geração de trombina na cirrose, incluiu o parâmetro ETP_r na análise dos resultados e, em todos eles, os valores foram significativamente maiores na cirrose que nos controles sadios (62, 110, 113, 114). Em nosso estudo, não foram incluídos pacientes Child-Pugh A, e assim, não encontramos padrões distintos de coagulabilidade entre os escores de Child-Pugh B e C, em ambos os grupos estudados.

Os testes convencionais de coagulação no presente estudo foram significativamente piores (hipocoaguláveis) durante a infecção que, após a resolução do quadro infeccioso, em oposição ao padrão de normo e hipercoagulabilidade observado com a geração de trombina, reforçando que estes testes convencionais não reproduzem o real estado da hemostasia na cirrose, um conceito já estabelecido na literatura (64, 124).

Em um estudo publicado recentemente por nosso grupo (109), cujo objetivo principal foi avaliar o efeito da transfusão de plasma fresco congelado (PFC) na geração de trombina em pacientes com cirrose, 41,5% (22 pacientes) da amostra foi representada por pacientes com infecção. Nesta pesquisa, em oposição aos achados do estudo atual, a análise de covariância revelou que a infecção não foi um fator que interferiu na geração de trombina, seja com ou sem TM. Entretanto, o critério para inclusão no estudo foi a necessidade de transfusão de PFC, independentemente do estágio infeccioso no qual o paciente se encontrava, e o intervalo entre o início da antibioticoterapia e a inclusão no estudo não foi uma variável considerada. Por isto, postulamos que a discordância entre os nossos resultados atuais e os publicados recentemente, possivelmente devam-se às fases distintas da infecção em que os pacientes encontravam-se no momento da inclusão no outro estudo. Além disto, no estudo anterior não foi feita a dosagem de procoagulantes ou anticoagulantes naturais, como a proteína C e antitrombina, o que limita a interpretação dos resultados.

Entretanto, em concordância com o citado estudo, observamos que a infecção não interferiu na razão de geração de trombina (ETPr).

O agravamento da deficiência de proteína C durante a infecção na cirrose, possivelmente, decorra de dois principais fatores: i) o primeiro deles é a redução da síntese hepática de proteínas. Este evento está associado à piora da disfunção hepática em consequência do hipofluxo induzido pela liberação de endotelina e aumento da resistência intra-hepática durante a infecção: ii) o segundo fator é a *down-regulation* da TM e seu receptor endotelial em condições de disfunção endotelial e endotoxemia, que levam à redução da capacidade de ativar a proteína C, apesar do aumento da trombina que, ao se ligar a trombomodulina, também ativa a proteína C (17, 54, 113, 114).

Observamos ainda que os níveis de antitrombina, cujos valores já estavam reduzidos em condições basais, tornaram-se menores durante a infecção bacteriana. À semelhança ao observado com a proteína C, este achado possivelmente esteja relacionado à deterioração da função hepática durante a infecção, mas também ao consumo durante a sepse (112, 113).

De acordo com o conhecimento atual da coagulopatia da sepse, independente da etiologia da doença de base do paciente, nas fases precoces existe uma tendência à hipercoagulabilidade que, em alguns pacientes, pode evoluir para a síndrome da coagulação intravascular disseminada (CIVD) (125, 126). A relevância clínica deste conceito motivou em passado não remoto o estudo sobre o benefício do uso de anticoagulantes sistêmicos na sepse grave, como a proteína C ativada recombinante, a antitrombina e a trombomodulina. Todavia, pacientes com cirrose, considerados portadores de distúrbios da hemostasia, foram excluídos dos ensaios clínicos destas drogas (127, 128).

Estudos *in vitro* sobre as interações entre infecção e hemostasia revelam tendência procoagulante, com maior expressão do fator tecidual, elevação de substâncias antifibrinolíticas e redução de anticoagulantes naturais (129). Entretanto, os trabalhos *in vivo* que utilizaram o teste da GT

para avaliar a hemostasia nas fases precoces da sepse, em geral, em estudos não desenhados para pacientes com cirrose, falharam ao demonstrar um estado de hipercoagulabilidade ou maior geração trombina (ETP) nesta condição ^(126, 130-132). Os resultados destes estudos devem ser interpretados com cautela, pois os pacientes infectados não foram submetidos ao ensaio com adição de TM, limitando a análise da participação das vias anticoagulantes na geração da trombina. Além disto, os resultados destes estudos na sepse, em geral, não podem ser estendidos aos pacientes com cirrose, não só por se tratar de uma população com características especiais pelos distúrbios complexos da coagulação, mas também porque alguns trabalhos listaram a doença hepática avançada/cirrose entre os critérios de exclusão.

Em relação aos demais parâmetros do teste da GT no presente estudo, durante a infecção os pacientes com cirrose tiveram um retardo no início da coagulação, representado pelo aumento do tempo de latência (LT com TM), e um tempo até o pico de trombina (representado pelo T_{pico} com TM) maiores que os observados após a resolução do quadro infeccioso. Isso sugere que o atraso no início da geração de trombina não prejudicou a quantidade total de trombina gerada, representada pelo ETP, que foi ainda maior durante a infecção. Achados semelhantes haviam sido reportados em pacientes com sepse, em geral, em pacientes com cirrose descompensada e ACLF (avaliados apenas em seu estado basal) e mais recentemente, publicado pelo nosso grupo, em pacientes com cirrose e choque ^(109, 130, 133).

Fischer et al. ⁽¹³³⁾ sugerem que o tempo de latência aumentado deva-se à queda proporcional de ambos fatores pro e anticoagulantes, retardando o início do processo de coagulação, mas gerando trombina normalmente em um processo equilibrado, mas frágil. É mais provável, porém, que o aumento do tempo de latência deva-se ao decréscimo dos níveis dos fatores VII (o de menor meia vida) e V (único de produção exclusiva hepática), cenário, frequentemente, observado na cirrose. Esta visão está fundamentada em um trabalho que estudou minuciosamente o efeito dos fatores de coagulação no teste de geração da trombina, por meio da depleção seriada de cada

fator de coagulação e dos anticoagulantes naturais. Este trabalho demonstrou que o aumento no tempo de latência está intimamente relacionado ao decréscimo dos fatores VII e V ⁽¹³⁴⁾.

No presente estudo, a infecção não interferiu na magnitude da plaquetopenia e, ainda que houvesse alguma interferência, a contagem de plaquetas *in vitro* não interfere nos resultados do teste da GT, pois utilizamos plasma pobre em plaquetas (PPP). Entretanto, deve-se ressaltar que *in vivo* as plaquetas são relevantes para a geração de quantidades adequadas de trombina ^(4, 9). Em busca de uma melhor compreensão sobre o efeito da plaquetopenia na geração de trombina em pacientes com cirrose, Tripodi et al. ⁽¹⁷⁾ compararam a geração de trombina entre o ensaio realizado com PPP e os ensaios com plasma rico em plaquetas (PRP). O estudo demonstrou que, no ensaio com PPP e no com PRP ajustado para uma contagem padrão de $100 \times 10^9 / L$ plaquetas, adquirido por meio da diluição do PPP com plaquetas autólogas, a geração de trombina nos pacientes com cirrose não diferiu significativamente dos controles sadios. Entretanto, quando as plaquetas foram ajustadas para um valor correspondente à contagem real no sangue total, os pacientes com cirrose geraram significativamente menos trombina que os controles. Embora estes resultados demonstrem que o grau de plaquetopenia interfere na quantidade total de trombina gerada, o mesmo trabalho também acrescentou a informação que uma contagem de plaquetas superior a $56 \times 10^9/L$ é capaz de promover uma geração de trombina adequada em cirróticos. Isto nos sinaliza que os resultados *in vitro* do GT com plasma pobre em plaquetas devam ser interpretados com cautela em pacientes com plaquetopenia abaixo de $60 \times 10^9/L$, pois eles podem não refletir o real estado da hemostasia *in vivo*. Em nosso estudo, a contagem média e mediana das plaquetas na inclusão e reavaliação de ambos os grupos estiveram acima deste valor. Estes achados de Tripodi et al. ⁽¹⁷⁾ sustentam também a recomendação dos protocolos internacionais de manter plaquetas acima de 50.000 antes de procedimentos invasivos em pacientes com cirrose ^(64, 124). Entretanto, este limiar estabelecido para a população cirrótica ainda merece

mais estudos, pois não leva em consideração a maior capacidade de agregação e ativação plaquetárias na cirrose ⁽²⁴⁾. Adicionalmente, em um trabalho também publicado por Tripodi et al. ⁽¹³⁵⁾, foi demonstrado que a transfusão profilática de plaquetas teve impacto modesto na plaquetopenia (pré e pós-infusão: $39 \times 10^9 / L$ vs. $52 \times 10^9 / L$), sem efeito significativo na geração de trombina.

No grupo com cirrose descompensada e sem infecção, quando comparamos os resultados no momento da inclusão e na reavaliação, não foi observada diferença na quantidade de trombina gerada com ou sem TM, no ETPr, na atividade de proteína C e antitrombina, bem como nos testes convencionais da coagulação (INR, TTPa e plaquetas). Neste grupo, em ambos os momentos da avaliação, todos os pacientes apresentaram valores de geração de trombina com TM e ETPr normais ou hipercoaguláveis, quando comparados aos valores de referência em sadios. Estes achados estão em concordância com o padrão descrito nos principais estudos que avaliaram a geração de trombina em cirróticos não infectados ^(20, 32, 62, 63, 109-111).

Quando analisados em conjunto, os resultados do teste de GT em nosso estudo acrescentam um novo paradigma sobre a coagulação em pacientes com cirrose: durante a infecção bacteriana, a quantidade total de trombina gerada (ETP sem e com TM) é significativamente superior à observada, após a resolução do quadro infeccioso, mas o equilíbrio final da coagulação, representado pela ETPr, persiste inalterado, com um padrão de normo ou hipercoagulabilidade preservado. Demonstramos também que a infecção bacteriana está associada a um agravamento na deficiência dos fatores anticoagulantes naturais na cirrose, notadamente, a proteína C e antitrombina. Embora não tenhamos dosado os fatores procoagulantes individualmente, com isso, postulamos que, possivelmente, coexista um agravamento proporcional na deficiência dos fatores procoagulantes, evidenciados pela queda de TP e TTPa, e este fenômeno permitiria a manutenção do reequilíbrio da coagulação, com uma tendência procoagulante idêntica à observada na cirrose sem infecção.

Em relação aos resultados do ROTEM (INTEM/HEPTEM), este é o primeiro estudo a utilizá-lo para investigar o efeito heparinoide endógeno em pacientes com cirrose. Nos demais estudos que avaliaram a presença deste efeito em pacientes com cirrose, seja durante a infecção^(41, 92), na hemorragia digestiva alta varicosa^(99, 136) ou ainda no transplante hepático⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾, foi utilizado o TEG (TEG-Nat/TEG-Hep). Nestas pesquisas, as definições de efeito heparinoide endógeno não são homogêneas, mas, de modo geral, foram considerados presentes quando encontradas diferenças significativas nos parâmetros iniciais da tromboelastografia entre o TEG-Nat/TEG-Hep. Por isto, aplicamos este mesmo critério às nossas avaliações iniciais do parâmetro CT, ao compararmos o INTEM/HEPTEM. Nas análises, identificamos a presença de efeito heparinoide nos cirróticos infectados caracterizada por valores de CT_{INTEM} significativamente maiores que o CT_{HEPTEM} . Este efeito não foi mais observado após a resolução da infecção e também não foi encontrado no grupo não infectado.

Quando aplicamos o critério diagnóstico de heparina / heparinoides na amostra estabelecido pelo fabricante da ROTEM⁽⁷⁹⁾ e utilizado algoritmo *Essener Runde*⁽¹³⁷⁾, definido como um prejuízo no tempo de coagulação inicial no INTEM ($CT_{INTEM} > 240s$), associado a uma melhora deste parâmetro no teste com heparinase ($CT_{INTEM} > CT_{HEPTEM}$), a maioria (86,1%) dos pacientes infectados não exibiu sequer prejuízo na formação da fibrina inicial ($CT_{INTEM} > 240s$). É importante ressaltar que o algoritmo de *Essener Runde*⁽¹³⁷⁾ foi elaborado objetivando auxiliar o manejo do sangramento ativo ou da coagulopatia clinicamente relevante, e não para a detecção subclínica de heparinoides endógenos. Por outro lado, alguns protocolos sobre o tratamento na coagulopatia induzida pelo trauma, condição também comumente associada à liberação de heparinoides endógenos, consideram a presença de heparinoides endógenos na amostra mesmo quando há alterações tênues no ensaio, como um $CT_{INTEM} > CT_{HEPTEM}$ isoladamente^(74, 138).

Ainda no presente estudo, considerando-se as demais variáveis na curva inicial do INTEM (CFT_{INTEM} , ângulo α_{INTEM}), a maioria dos pacientes infectados exibiu prejuízo na formação do coágulo, que não pôde ser

atribuível a um possível efeito heparinoide endógeno, pois não houve diferença significativa no ensaio com heparinase (HEPTTEM). Estes resultados são distintos daqueles que investigaram o efeito heparinoide na cirrose em diversas condições, utilizando o TEG-Nativo e TEG-Hep^(42, 96, 99), os quais encontraram ação significativa da heparinase não só no parâmetro inicial r na curva do ensaio, mas também nos parâmetros k , ângulo alfa e MA, que correspondem, respectivamente, ao CFT, ângulo alfa e MCF no ROTEM. Conclusões a respeito dos resultados do MCF não podem ser feitas, pois em 44% dos pacientes do grupo infectado e 50% do grupo não infectado, o ensaio foi interrompido antes de obtermos os resultados deste parâmetro, uma vez que nosso intento foi analisar a fase plasmática do teste.

Postulamos que os achados mais tênues em nosso estudo, quando comparados aos resultados das pesquisas que utilizaram o TEG-Nat/TEG-Hep, devam-se a limitações nos dois ensaios do ROTEM preconizados para o diagnóstico de heparinoides na amostra (INTEM/HEPTTEM). No ensaio do INTEM/HEPTTEM, utiliza-se o ácido elágico, um ativador da via de contato (ativação pelos fatores XII, XI, IX, VIII, X e V), não utilizado no TEG-Nat/TEG-Hep que, na prática clínica, possui a vantagem de permitir a obtenção de resultados mais imediatos para a tomada de decisões terapêuticas. Isto possui utilidade importante em situações críticas como sangramentos maciços, porém, no âmbito da pesquisa, o uso de ativadores da coagulação nos testes viscoelásticos pode comprometer a sensibilidade do método para o diagnóstico de fenômenos subclínicos^(139, 140). Desta forma, consideramos que limitações relacionadas ao método utilizado em nosso estudo seja um dos fatores contribuintes para algumas diferenças entre nossos resultados e pesquisas que utilizaram o TEG-Nat/TEG-Hep.

Adicionalmente, suscitamos a hipótese que o ensaio do ROTEM sem a adição de ativadores da coagulação, denominado NATEM, associado ao NATEM modificado com heparinase, em analogia ao TEG-Nat e TEG-Hep, seria mais sensível à detecção do efeito heparinoide endógeno. Esta hipótese foi fundamentada em um caso recentemente relatado de paciente não

cirrótico com infecção fúngica (murcomicose) e sangramento ativo grave, cujo efeito heparinoide endógeno foi demonstrado nos ensaios do NATEM (sem e com adição de heparinase), mas não pelos ensaios do INTEM /HEPTEM ⁽¹⁴¹⁾. Propomos que pesquisas futuras elucidem se estes seriam os ensaios do ROTEM de escolha para a detecção do efeito heparinoides endógenos em pacientes com cirrose.

Dois estudos que avaliaram conjuntamente o ROTEM e o teste de GT com plasma pobre em plaquetas em cirróticos não infectados identificaram, assim como o nosso, padrões de hipercoagulabilidade no teste da GT que parecem contrapor o predomínio de hipocoagulabilidade observado no ROTEM ^(142, 143). Entretanto, tais resultados entre os padrões de coagulabilidade nos exames não devem ser interpretados como discordantes. Isto porque o parâmetro do ROTEM que melhor se correlaciona com o teste da GT é o CT, por representar a fase plasmática da formação inicial do coágulo, sem a participação dos elementos celulares. No presente estudo, bem como naqueles que avaliaram conjuntamente o ROTEM e teste de GT, este foi o parâmetro no ROTEM que se manteve dentro da normalidade na maioria dos pacientes com cirrose incluídos nesta pesquisa.

Até o presente momento, não identificamos estudos desenhados especificamente para avaliar o ROTEM em cirróticos infectados. Os dados mais recentes que obtivemos em pacientes com cirrose e infecção advêm de um estudo prospectivo publicado por Blasi et al.⁽¹⁴⁴⁾ que avaliou as características do ROTEM em pacientes com cirrose ACLF (n = 36). Neste trabalho, a infecção bacteriana foi o principal fator precipitante do ACLF, presente em 36% dos pacientes. Os autores encontraram um predomínio de hipocoagulabilidade no CT_{INTEM} e nos demais parâmetros do ROTEM, mas a infecção não esteve associada à piora do ROTEM, em concordância com nossos achados. Os resultados numéricos do subgrupo infectado não foram apresentados separadamente. O CT_{INTEM} representou o único parâmetro que diferiu significativamente nos pacientes que sangraram e representou um preditor independente de mortalidade em 28 dias, assim como o MELD. A

ausência da avaliação da geração de trombina nos limita a concluir se as alterações no CT_{INTEM} estariam associadas a algum prejuízo na geração de trombina.

No presente estudo, a mortalidade no grupo infectado foi elevada (37%) e a maioria dos óbitos ocorreu durante a internação hospitalar, por causas relacionadas a complicações da sepse. Embora os dados na literatura sejam heterogêneos, a mortalidade infecciosa estimada na cirrose semelhante à nossa também foi descrita: 30% após o primeiro mês, podendo alcançar 63% após o primeiro ano de seguimento ⁽¹⁴⁵⁾. No grupo não infectado, a taxa de perdas por óbito ou transplante também foi acima do esperado. Esta evolução, possivelmente, deva-se à gravidade da cirrose neste grupo, composto por pacientes com escores de descompensação da cirrose (Child Pugh e MELD) elevados, ainda que inferiores ao grupo infectado. Além disto, quase totalidade (97,3%) do grupo não infectado foi representada por pacientes com ascite, sendo a maioria deles portadores de ascite volumosa ou refratária.

As características infecciosas de nossa amostra também estão em concordância com os dados disponíveis, pois os principais sítios infecciosos encontrados foram a PBE, seguida de infecção do trato urinário e respiratório ⁽¹⁴⁶⁾ e a bactéria mais frequente isolada foi a *Escherichia coli*. Historicamente, os principais agentes isolados na PBE são as bactérias gram-negativas, notadamente, a *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*, embora nas últimas décadas tenha havido um aumento crescente na prevalência de bactérias gram-positivas. ⁽¹⁴⁷⁾.

As limitações deste estudo devem ser discutidas. A liberação de citocinas inflamatórias na infecção tem papel central no agravamento da disfunção hepática, de modo que infecção e agravamento da cirrose tornam-se condições quase indissociáveis. Por isto, não é possível afirmar se os resultados encontrados devem-se propriamente à infecção ou à disfunção hepática induzida pela infecção. No grupo infectado, não havia pacientes

com escore de Child Pugh A, o que limita afirmarmos se nossos resultados são extensivos a esta população.

A translocação de bactérias intestinais e as infecções subclínicas são eventos frequentes nos pacientes com cirrose avançada ⁽¹⁴⁸⁾. Um rasteio infeccioso completo no grupo não infectado, não realizado no presente estudo, limitou considerarmos nosso segundo grupo como controle para análise comparativa com o grupo infectado. Por isto, os pacientes de cada grupo foram reavaliados horizontalmente, sendo seus próprios controles.

O teste da GT, realizado com plasma pobre em plaquetas, não reflete a contribuição das plaquetas e outras células, como monócitos (expressam fatores teciduais), na geração da trombina. A decisão em usar plasma pobre em plaquetas baseia-se em alguns aspectos: a) os pacientes foram seus próprios controles e o objetivo principal da análise era a mudança na geração de trombina; b) pacientes com cirrose apresentam valores muito variáveis de plaquetopenia, o que poderia resultar em uma amostra não homogênea para a análise inicial; b) a infecção poderia interferir no grau de plaquetopenia, dificultando a interpretação dos resultados de modo paredado (inclusão vs reavaliação); c) o resultado do teste de GT foi comparado ao efeito heparinoide no intervalo CT dos ensaios INTEM/HEPTM, parâmetro que representa a fase plasmática inicial da formação do coágulo, sem a participação das plaquetas e d) facilidade logística, uma vez que as amostras podem ser congeladas, diferente do que ocorreria com o plasma rico em plaquetas.

Não realizamos a dosagem específica de nenhum fator procoagulante, e isto nos impede afirmar que a maior quantidade de trombina gerada durante a infecção deva-se essencialmente à redução mais acentuada dos fatores anticoagulantes (proteína C e antitrombina) associada a uma redução menos proeminente dos fatores anticoagulantes, ou se coexiste o aumento de fatores procoagulantes, como o fator VIII, que habitualmente, encontra-se aumentado nos pacientes com cirrose ⁽²⁰⁾.

O ROTEM é realizado sem TM e não existe padronização para realizá-lo com TM. Por isto, não podemos concluir se, em analogia ao observado no teste de GT, a adição de TM ao ensaio do ROTEM promoveria resultados distintos aos encontrados, quando comparados aos valores de referência em sadios. Não houve oportunidade de caracterizar bioquimicamente os heparinoides endógenos e este fato limitou a compreensão sobre sua relação com os resultados do ROTEM e do anti-Xa.

A principal aplicabilidade clínica de nosso estudo é sinalizar sobre a necessidade de estudos que contribuam para a criação de protocolos transfusionais mais restritivos e seguros em cirróticos infectados. A transfusão profilática indiscriminada de fatores plasmáticos de coagulação ou PFC nos cirróticos infectados, frequentemente, internados e submetidos a procedimentos invasivos, baseada meramente nos testes convencionais de coagulação, além dos altos custos e do risco inerente à saúde, pode aumentar o estado de hipercoagulabilidade ou até piorar a geração de trombina ⁽¹⁰⁹⁾, à medida que estes hemocomponentes também ofertam fatores anticoagulantes. Traduzir as evidências laboratoriais aqui apresentadas em resultados clínicos significativos é o novo desafio. Nossos resultados alinham-se com as recomendações atuais de profilaxia para tromboembolismo venoso em cirróticos internados por infecção bacteriana, que preconizam que pacientes com cirrose internados, que não estejam com sangramento ativo ou admitidos por sangramento, recebam profilaxia para tromboembolismo venoso ⁽⁶⁴⁾. Apesar desta recomendação formal e da elevada incidência de eventos tromboembólicos na cirrose, a disfunção hepática persiste, como uma das principais contraindicações à profilaxia farmacológica em pacientes não cirúrgicos internados ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾.

Em síntese, demonstramos neste estudo que em pacientes com cirrose e infecção bacteriana e evidências de ação de heparinoides endógenos, a quantidade total de trombina gerada é maior que a observada na ausência de quadro infeccioso e esteve associada a um agravamento na deficiência de proteína C e antitrombina. Mesmo durante a infecção, os pacientes com cirrose preservam a capacidade de gerar trombina. Por tratar-

se de um novo reequilíbrio da hemostasia, ainda mais tênue que o descrito na ausência de infecção, sugerimos que a “Teoria das margens estreitas” sobre a hemostasia na cirrose ^(20, 32, 34), durante a infecção bacteriana seja substituída pela “Teoria das margens *ainda mais* estreitas”, indicando que o sistema hemostático é capaz de reduzir ainda mais a ação dos anticoagulantes naturais de modo a preservar a geração de trombina, a despeito da presença de heparinoides endógenos. A hemostasia seria então mantida em um liminar ainda mais baixo.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- 1) Durante a infecção bacteriana em pacientes com cirrose, a quantidade total de trombina gerada foi superior à observada após a resolução da infecção;
- 2) A maior geração de trombina durante a infecção esteve associada a um agravamento na deficiência da atividade de proteína C e da antitrombina;
- 3) Entretanto, o reequilíbrio final entre as vias anticoagulantes e procoagulantes, representado pela razão ETP (com / sem TM), persistiu igualmente elevado durante a infecção e após a resolução da infecção na cirrose;
- 4) Todos os parâmetros de geração de trombina corrigidos pela trombomodulina na cirrose apresentaram predominantemente valores normais ou hipercoaguláveis, seja durante a infecção ou após sua resolução, considerando como normalidade mais ou menos um desvio padrão da média da população de indivíduos saudáveis;
- 5) Os testes de coagulação convencionais (RNI, TP e TTPa) não traduzem a quantidade de trombina gerada em pacientes com

cirrose e apresentaram um padrão significativamente mais hipocoagulável durante a infecção;

- 6) Durante a infecção, foi observado um efeito heparinoide, representado por valores de CT_{INTEM} significativamente maiores que o CT_{HEPTEM} , mas ele não foi capaz de prejudicar a geração de trombina;

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.
2. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature.* 1964;202:498-9.
3. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
4. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17 Suppl 1:S1-5.
5. Hoffman M, Monroe DM. Reversing targeted oral anticoagulants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):518-23.
6. Negrier C, Shima M, Hoffman M. The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev.* 2019;38:100582.
7. RF F. Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. *Medicina, Ribeirao.* 2001;20(34):229–37.
8. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis.* 2003;16(1-2):17-20.
9. Spronk HM, Borisoff JI, ten Cate H. New insights into modulation of thrombin formation. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(11):363.
10. Brummel-Ziedins K. Models for thrombin generation and risk of disease. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1:212-23.
11. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* 2011;365(2):147-56.
12. Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol.* 2004;79(2):109-16.
13. Girolami A, Cosi E, Ferrari S, Girolami B. Heparin, coumarin, protein C, antithrombin, fibrinolysis and other clotting related resistances: old and new concepts in blood coagulation. *J Thromb Thrombolysis.* 2018;45(1):135-41.
14. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(12):2511-8.

15. Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, Macik BG, Northup PG, Reddy KR, et al. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology*. 2006;44(4):1039-46.
16. Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *J Hepatol*. 2002;37(2):280-7.
17. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Clerici M, Dell'Era A, Fabris F, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology*. 2006;44(2):440-5.
18. Ng VL. Liver disease, coagulation testing, and hemostasis. *Clin Lab Med*. 2009;29(2):265-82.
19. Patil AG, Bihari C, Shewade HD, Nigam N, Sarin SK. Decreased protein C function predicts mortality in patients with cirrhosis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(4):466-72.
20. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2105-11.
21. Hugenholtz GC, Macrae F, Adelmeijer J, Dulfer S, Porte RJ, Lisman T, et al. Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen. *J Thromb Haemost*. 2016;14(5):1054-66.
22. Pasche B, Ouimet H, Francis S, Loscalzo J. Structural changes in platelet glycoprotein IIb/IIIa by plasmin: determinants and functional consequences. *Blood*. 1994;83(2):404-14.
23. Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther*. 2001;89(3):273-93.
24. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, Janssen HL, de Maat MP, de Groot PG, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology*. 2006;44(1):53-61.
25. Boks AL, Brommer EJ, Schalm SW, Van Vliet HH. Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology*. 1986;6(1):79-86.
26. Leebeek FW, Klufft C, Knot EA, de Maat MP, Wilson JH. A shift in balance between profibrinolytic and antifibrinolytic factors causes enhanced fibrinolysis in cirrhosis. *Gastroenterology*. 1991;101(5):1382-90.
27. Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, Bouma BN, Meijers JC, Janssen HL, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology*. 2001;121(1):131-9.
28. Gresele P, Binetti BM, Branca G, Clerici C, Ascitti S, Morelli A, et al. TAFI deficiency in liver cirrhosis: relation with plasma fibrinolysis and survival. *Thromb Res*. 2008;121(6):763-8.

29. Rijken DC, Kock EL, Guimaraes AH, Talens S, Darwish Murad S, Janssen HL, et al. Evidence for an enhanced fibrinolytic capacity in cirrhosis as measured with two different global fibrinolysis tests. *J Thromb Haemost*. 2012;10(10):2116-22.
30. Joist JH. AICF and DIC in liver cirrhosis: expressions of a hypercoagulable state. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(10):2801-3.
31. Tripodi A, Primignani M, Mannucci PM, Caldwell SH. Changing Concepts of Cirrhotic Coagulopathy. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(2):274-81.
32. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzaniga M, Primignani M, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41(3):553-8.
33. Potze W, Porte RJ, Lisman T. Management of coagulation abnormalities in liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(1):103-14.
34. Monroe DM, Hoffman M. The coagulation cascade in cirrhosis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):1-9.
35. Ferrarese A, Vitale A, Sgarabotto D, Russo FP, Germani G, Gambato M, et al. Outcome of a First Episode of Bacterial Infection in Candidates for Liver Transplantation. *Liver Transpl*. 2019;25(8):1187-97.
36. Gustot T, Durand F, Lebrec D, Vincent JL, Moreau R. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology*. 2009;50(6):2022-33.
37. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-56, 56.e1-5.
38. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut*. 2005;54(4):556-63.
39. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*. 2010;38(2 Suppl):S26-34.
40. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med*. 2004;30(6):1032-40.
41. Montalto P, Vlachogiannakos J, Cox DJ, Pastacaldi S, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *J Hepatol*. 2002;37(4):463-70.
42. Zambruni A, Thalheimer U, Coppell J, Riddell A, Mancuso A, Leandro G, et al. Endogenous heparin-like activity detected by anti-Xa assay in infected cirrhotic and non-cirrhotic patients. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39(9):830-6.

43. Plessier A, Denninger MH, Consigny Y, Pessione F, Francoz C, Durand F, et al. Coagulation disorders in patients with cirrhosis and severe sepsis. *Liver Int.* 2003;23(6):440-8.
44. Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S313-7.
45. Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica.* 2000;85(9):967-72.
46. Violi F, Lip GY, Cangemi R. Endotoxemia as a trigger of thrombosis in cirrhosis. *Haematologica.* 2016;101(4):e162-3.
47. Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology.* 1999;29(6):1655-61.
48. Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet.* 1999;353(9147):139-42.
49. Vivas S, Rodriguez M, Palacio MA, Linares A, Alonso JL, Rodrigo L. Presence of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients is independently associated with early mortality and failure to control bleeding. *Dig Dis Sci.* 2001;46(12):2752-7.
50. Garcia-Tsao G, Lim JK, Members of Veterans Affairs Hepatitis CRCP. 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. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(7):1802-29.
51. Cardenas A, Mendez-Bocanegra A. Report of the Baveno VI Consensus Workshop. *Ann Hepatol.* 2016;15(2):289-90.
52. Hung A, Garcia-Tsao G. Acute kidney injury, but not sepsis, is associated with higher procedure-related bleeding in patients with decompensated cirrhosis. *Liver Int.* 2018;38(8):1437-41.
53. Tripodi A. The validity of the INR system for patients with liver disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;31(2):209-10.
54. Angus PW. Role of endothelin in systemic and portal resistance in cirrhosis. *Gut.* 2006;55(9):1230-2.
55. Wu H, Nguyen GC. Liver cirrhosis is associated with venous thromboembolism among hospitalized patients in a nationwide US study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(9):800-5.
56. Sogaard KK, Horvath-Puho E, Gronbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sorensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(1):96-101.

-
57. Lee HJ, Kim JE, Lee HY, Lim HS, Kim HK. Significance of local international sensitivity index systems for monitoring warfarin and liver function. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(4):542-50.
58. Bonar RA, Lippi G, Favalaro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. *Methods Mol Biol*. 2017;1646:3-27.
59. Bellest L, Eschwege V, Poupon R, Chazouilleres O, Robert A. A modified international normalized ratio as an effective way of prothrombin time standardization in hepatology. *Hepatology*. 2007;46(2):528-34.
60. Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM. The international normalized ratio to prioritize patients for liver transplantation: problems and possible solutions. *J Thromb Haemost*. 2008;6(2):243-8.
61. Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):4S-10S.
62. Lisman T, Bakhtiari K, Pereboom IT, Hendriks HG, Meijers JC, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *J Hepatol*. 2010;52(3):355-61.
63. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Mannucci PM. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *J Hepatol*. 2013;59(2):265-70.
64. O'Leary JG, Greenberg CS, Patton HM, Caldwell SH. AGA Clinical Practice Update: Coagulation in Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2019;157(1):34-43 e1.
65. Blasi A. Coagulopathy in liver disease: Lack of an assessment tool. *World J Gastroenterol*. 2015;21(35):10062-71.
66. Intagliata NM, Davis JPE, Caldwell SH. Coagulation Pathways, Hemostasis, and Thrombosis in Liver Failure. *Semin Respir Crit Care Med*. 2018;39(5):598-608.
67. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfus Med Rev*. 2012;26(1):1-13.
68. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol*. 2014;89(2):228-32.
69. Afshari A, Wikkelso A, Brok J, Moller AM, Wetterslev J. Thrombelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemotherapy versus usual care in patients with massive transfusion. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(3):CD007871.
70. Wikkelso A, Wetterslev J, Moller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(8):CD007871.

71. Anderson L, Quasim I, Steven M, Moise SF, Shelley B, Schraag S, et al. Interoperator and intraoperator variability of whole blood coagulation assays: a comparison of thromboelastography and rotational thromboelastometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2014;28(6):1550-7.
72. Mallett SV. Clinical Utility of Viscoelastic Tests of Coagulation (TEG/ROTEM) in Patients with Liver Disease and during Liver Transplantation. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(5):527-37.
73. Muller MC, Meijers JC, Vroom MB, Juffermans NP. Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2014;18(1):R30.
74. Görlinger K. DD, Hanke A.A. Rotational Thromboelastometry (ROTEM®). In: Gonzalez E. MH, Moore E., editor. *Trauma Induced Coagulopathy*: Springer, Cham; 2016.
75. Gorlinger K, Perez-Ferrer A, Dirkmann D, Saner F, Maegele M, Calatayud AAP, et al. The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management. *Korean J Anesthesiol*. 2019;72(4):297-322.
76. Winearls J, Reade M, Miles H, Bulmer A, Campbell D, Gorlinger K, et al. Targeted Coagulation Management in Severe Trauma: The Controversies and the Evidence. *Anesth Analg*. 2016;123(4):910-24.
77. Snegovskikh D, Souza D, Walton Z, Dai F, Rachler R, Garay A, et al. Point-of-care viscoelastic testing improves the outcome of pregnancies complicated by severe postpartum hemorrhage. *J Clin Anesth*. 2018;44:50-6.
78. Mehaffey JH, Schubert SA, Gelvin MG, Charles EJ, Hawkins RB, Johnston LE, et al. A New Intraoperative Protocol for Reducing Perioperative Transfusions in Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017;104(1):176-81.
79. Görlinger K ST, Dirkmann D, Planinsic RM, Saner FH. Bleeding related to liver transplant. 2016, . In: *Management of Bleeding Patients* [Internet]. Switzerland: Springer [263-80].
80. Smart L, Mumtaz K, Scharpf D, Gray NO, Traetow D, Black S, et al. Rotational Thromboelastometry or Conventional Coagulation Tests in Liver Transplantation: Comparing Blood Loss, Transfusions, and Cost. *Ann Hepatol*. 2017;16(6):916-23.
81. Stravitz RT, Lisman T, Luketic VA, Sterling RK, Puri P, Fuchs M, et al. Minimal effects of acute liver injury/acute liver failure on hemostasis as assessed by thromboelastography. *J Hepatol*. 2012;56(1):129-36.
82. Haas T, Gorlinger K, Grassetto A, Agostini V, Simioni P, Nardi G, et al. Thromboelastometry for guiding bleeding management of the critically ill patient: a systematic review of the literature. *Minerva Anesthesiol*. 2014;80(12):1320-35.

83. Debernardi Venon W, Ponzo P, Sacco M, Mengozzi G, Raso S, Valpreda A, et al. Usefulness of thromboelastometry in predicting the risk of bleeding in cirrhotics who undergo invasive procedures. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(11):1313-9.
84. Bedreli S, Sowa JP, Gerken G, Saner FH, Canbay A. Management of acute-on-chronic liver failure: rotational thromboelastometry may reduce substitution of coagulation factors in liver cirrhosis. *Gut*. 2016;65(2):357-8.
85. Kang YG, Martin DJ, Marquez J, Lewis JH, Bontempo FA, Shaw BW, Jr., et al. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation. *Anesth Analg*. 1985;64(9):888-96.
86. Coakley M, Reddy K, Mackie I, Mallett S. Transfusion triggers in orthotopic liver transplantation: a comparison of the thromboelastometry analyzer, the thromboelastogram, and conventional coagulation tests. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2006;20(4):548-53.
87. Roulet S, Freyburger G, Cruc M, Quinart A, Stecken L, Audy M, et al. Management of bleeding and transfusion during liver transplantation before and after the introduction of a rotational thromboelastometry-based algorithm. *Liver Transpl*. 2015;21(2):169-79.
88. Tafur LA, Taura P, Blasi A, Beltran J, Martinez-Palli G, Balust J, et al. Rotation thromboelastometry velocity curve predicts blood loss during liver transplantation. *Br J Anaesth*. 2016;117(6):741-8.
89. Blasi A, Beltran J, Pereira A, Martinez-Palli G, Torrents A, Balust J, et al. An assessment of thromboelastometry to monitor blood coagulation and guide transfusion support in liver transplantation. *Transfusion*. 2012;52(9):1989-98.
90. Wang SC, Shieh JF, Chang KY, Chu YC, Liu CS, Loong CC, et al. Thromboelastography-guided transfusion decreases intraoperative blood transfusion during orthotopic liver transplantation: randomized clinical trial. *Transplant Proc*. 2010;42(7):2590-3.
91. Trzebicki J, Flakiewicz E, Kosieradzki M, Blaszczyk B, Kolacz M, Jureczko L, et al. The use of thromboelastometry in the assessment of hemostasis during orthotopic liver transplantation reduces the demand for blood products. *Ann Transplant*. 2010;15(3):19-24.
92. Papatheodoridis GV, Patch D, Webster GJ, Brooker J, Barnes E, Burroughs AK. Infection and hemostasis in decompensated cirrhosis: a prospective study using thrombelastography. *Hepatology*. 1999;29(4):1085-90.
93. Senzolo M, Coppell J, Cholongitas E, Riddell A, Triantos CK, Perry D, et al. The effects of glycosaminoglycans on coagulation: a thromboelastographic study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18(3):227-36.
94. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*. 2008;30(6):623-7.

95. Ostrowski SR, Johansson PI. Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73(1):60-6.
96. Kettner SC, Gonano C, Seebach F, Sitzwohl C, Acimovic S, Stark J, et al. Endogenous heparin-like substances significantly impair coagulation in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg.* 1998;86(4):691-5.
97. Senzolo M, Agarwal S, Zappoli P, Vibhakorn S, Mallett S, Burroughs AK. Heparin-like effect contributes to the coagulopathy in patients with acute liver failure undergoing liver transplantation. *Liver Int.* 2009;29(5):754-9.
98. Senzolo M, Riddell A, Tuddenham E, Burroughs AK. Endogenous heparinoids contribute to coagulopathy in patients with liver disease. *J Hepatol.* 2008;48(2):371-2; author reply 2-3.
99. Thalheimer U, Triantos C, Samonakis D, Patch D, Burroughs AK, Riddell A, et al. Endogenous heparinoids in acute variceal bleeding. *Gut.* 2005;54(2):310-1.
100. Triantos C, Louvros E, Kalafateli M, Riddell A, Thalheimer U, Michailidou M, et al. Endogenous heparinoids detected by anti-Xa activity are present in blood during acute variceal bleeding in cirrhosis. A prospective study. *J Gastrointest Liver Dis.* 2014;23(2):187-94.
101. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica.* 2003;88(5):547-54.
102. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost.* 1986;56(1):9-17.
103. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):134-8.
104. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32(5-6):249-53.
105. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016;62(5):699-707.
106. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.
107. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol.* 2008;142(6):889-903.

108. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem.* 1989;264(9):4743-6.
109. Rassi AB, d'Amico EA, Tripodi A, da Rocha TRF, Migita BY, Ferreira CM, et al. Fresh frozen plasma transfusion in patients with cirrhosis and coagulopathy: Effect on conventional coagulation tests and thrombomodulin-modified thrombin generation. *J Hepatol.* 2020;72(1):85-94.
110. Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, Tuddenham EG, Makris M, Burroughs AK. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *J Thromb Haemost.* 2010;8(9):1994-2000.
111. Groeneveld D, Porte RJ, Lisman T. Thrombomodulin-modified thrombin generation testing detects a hypercoagulable state in patients with cirrhosis regardless of the exact experimental conditions. *Thromb Res.* 2014;134(3):753-6.
112. Chandler WL, Dawson KL, Ruegger MC, Teruya M, Liebl PH, Monsour HP. Patients with cirrhosis show a relative increase in thrombin generation that is correlated with lower antithrombin levels. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014.
113. Lebreton A, Sinegre T, Pereira B, Lamblin G, Duron C, Abergel A. Plasma hypercoagulability in the presence of thrombomodulin but not of activated protein C in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;32(4):916-24.
114. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Dell'Era A, Iannuzzi F, et al. Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method. *Hepatology.* 2010;52(1):249-55.
115. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *BMJ.* 2007;335(7624):806-8.
116. Fernandez J, Acevedo J, Wiest R, Gustot T, Amoros A, Deulofeu C, et al. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut.* 2018;67(10):1870-80.
117. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, et al. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol.* 2000;32(1):142-53.
118. Quick A. The Prothrombin in hemophilia and in Obstructive Jaundice. *J Biol Chem.* 1935;109:73.
119. Bell WN, Alton HG. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature.* 1954;174(4436):880-1.
120. Holm HA, Abildgaard U, Kalvenes S. Heparin assays and bleeding complications in treatment of deep venous thrombosis with particular reference to retroperitoneal bleeding. *Thromb Haemost.* 1985;53(2):278-81.

121. D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Esmon CT, Comp PC. Acquired deficiencies of protein S. Protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1445-54.
122. Demers C, Henderson P, Blajchman MA, Wells MJ, Mitchell L, Johnston M, et al. An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemost.* 1993;69(3):231-5.
123. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34(7):670-82.
124. Intagliata NM, Argo CK, Stine JG, Lisman T, Caldwell SH, Violi F, et al. Concepts and Controversies in Haemostasis and Thrombosis Associated with Liver Disease: Proceedings of the 7th International Coagulation in Liver Disease Conference. *Thromb Haemost.* 2018;118(8):1491-506.
125. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med.* 1999;341(8):586-92.
126. Petros S, Kliem P, Siegemund T, Siegemund R. Thrombin generation in severe sepsis. *Thromb Res.* 2012;129(6):797-800.
127. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.
128. Yasuda N, Goto K, Ohchi Y, Abe T, Koga H, Kitano T. The efficacy and safety of antithrombin and recombinant human thrombomodulin combination therapy in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Crit Care.* 2016;36:29-34.
129. Picoli-Quaino SK, Alves BE, Faiotto VB, Montalvao SA, De Souza CA, Annichino-Bizzacchi JM, et al. Impairment of thrombin generation in the early phases of the host response of sepsis. *J Crit Care.* 2014;29(1):31-6.
130. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, Macartney NJ, Saayman AG, Luddington R, et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol.* 2006;135(2):220-7.
131. Massion PB, Peters P, Ledoux D, Zimmermann V, Canivet JL, Massion PP, et al. Persistent hypocoagulability in patients with septic shock predicts greater hospital mortality: impact of impaired thrombin generation. *Intensive Care Med.* 2012;38(8):1326-35.
132. Seo JW, Kim HK, Kim JE, Park S, Cho HI. Prognostic values of the factor Xa-activated clotting time and endogenous thrombin potential in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2009;123(4):565-72.

133. Fisher C, Patel VC, Stoy SH, Singanayagam A, Adelmeijer J, Wendon J, et al. Balanced haemostasis with both hypo- and hyper-coagulable features in critically ill patients with acute-on-chronic-liver failure. *J Crit Care*. 2018;43:54-60.
134. Duchemin J, Pan-Petesch B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost*. 2008;99(4):767-73.
135. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Lemma L, Jovani M, Rebullà P, et al. Global hemostasis tests in patients with cirrhosis before and after prophylactic platelet transfusion. *Liver Int*. 2013;33(3):362-7.
136. Chau TN, Chan YW, Patch D, Tokunaga S, Greenslade L, Burroughs AK. Thrombelastographic changes and early rebleeding in cirrhotic patients with variceal bleeding. *Gut*. 1998;43(2):267-71.
137. Lier H, Vorweg M, Hanke A, Görlinger K. Thromboelastometry guided therapy of severe bleeding. Essener Runde algorithm. *Hamostaseologie*. 2013;33(1):51-61.
138. Tanaka KA, Bolliger D, Vadlamudi R, Nimmo A. Rotational thromboelastometry (ROTEM)-based coagulation management in cardiac surgery and major trauma. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012;26(6):1083-93.
139. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Zambruni A, Senzolo M, Leandro G, et al. A comparison of kaolin-activated versus nonkaolin-activated thromboelastography in native and citrated blood. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008;19(6):495-501.
140. Caprini JA, Zuckerman L, Cohen E, Vagher JP, Lipp V. The identification of accelerated coagulability. *Thromb Res*. 1976;9(2):167-80.
141. Durila M, Pavlicek P, Hadacova I, Nahlovsky J, Janeckova D. Endogenous Heparinoids May Cause Bleeding in Mucor Infection and can be Detected by Nonactivated Thromboelastometry and Treated by Recombinant Activated Factor VII: A Case Report. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(8):e2933.
142. Kleinegris MC, Bos MH, Roest M, Henskens Y, Ten Cate-Hoek A, Van Deursen C, et al. Cirrhosis patients have a coagulopathy that is associated with decreased clot formation capacity. *J Thromb Haemost*. 2014;12(10):1647-57.
143. Lentschener C, Flaujac C, Ibrahim F, Gouin-Thibault I, Bazin M, Sogni P, et al. Assessment of haemostasis in patients with cirrhosis: Relevance of the ROTEM tests?: A prospective, cross-sectional study. *Eur J Anaesthesiol*. 2016;33(2):126-33.
144. Blasi A, Calvo A, Prado V, Reverter E, Reverter JC, Hernandez-Tejero M, et al. Coagulation Failure in Patients With Acute-on-Chronic Liver Failure and Decompensated Cirrhosis: Beyond the International Normalized Ratio. *Hepatology*. 2018;68(6):2325-37.

145. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-56, 56 e1-5.
146. Shizuma T. Spontaneous bacterial and fungal peritonitis in patients with liver cirrhosis: A literature review. *World J Hepatol*. 2018;10(2):254-66.
147. Marciano S, Diaz JM, Dirchwolf M, Gadano A. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: incidence, outcomes, and treatment strategies. *Hepat Med*. 2019;11:13-22.
148. Moharem HA, Fetouh FA, Darwish HM, Ghaith D, Elayashy M, Hussein A, et al. Effects of bacterial translocation on hemodynamic and coagulation parameters during living-donor liver transplant. *BMC Anesthesiol*. 2018;18(1):46.
149. Gulley D, Teal E, Suvannasankha A, Chalasani N, Liangpunsakul S. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in cirrhosis patients. *Dig Dis Sci*. 2008;53(11):3012-7.
150. Northup PG, McMahon MM, Ruhl AP, Altschuler SE, Volk-Bednarz A, Caldwell SH, et al. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thromboembolism. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(7):1524-8; quiz 680.
151. Ambrosino P, Tarantino L, Di Minno G, Paternoster M, Graziano V, Petitto M, et al. The risk of venous thromboembolism in patients with cirrhosis. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2017;117(1):139-48.

8 ANEXO

ANEXO A

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA COLETA, PROCESSAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

PROCOLO DE PESQUISA - COLETA DE SANGUE VENOSO

MATERIAL NECESSÁRIO

1 - Tubos

04 tubos de citrato de sódio



ROTEM TP E TTPA,

Geração de trombina

2 - Agulha

- Scalp 21 ou 23

OU

- Agulha 21 ou 23 com canhão para coleta a vácuo



3 - Garrote de fita



4 - Álcool 70%



5 - Algodão



TÉCNICA DE COLETA

1. O garroteamento do braço do paciente pode permanecer no **máximo 1 minuto**

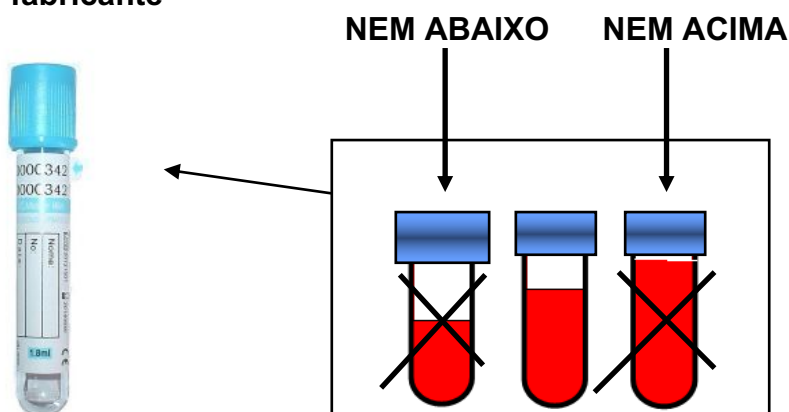


2. Sequência de tubos para coleta: **Primeiro os tubos de tampa azul**



3. **Se a veia do paciente for de difícil acesso, o 1º tubo deve ser descartado e substituído por outro ainda não identificado e, logo após a coleta, identificá-lo.**

4. A coleta deve ser rápida e os tubos devem ser **preenchidos na marca indicada pelo fabricante**



5. **Homogeneizar delicadamente** os tubos imediatamente após a coleta, **sem a formação de espuma e bolhas (por inversão):**



5 vezes o mesmo procedimento

REALIZAÇÃO DO ROTEM

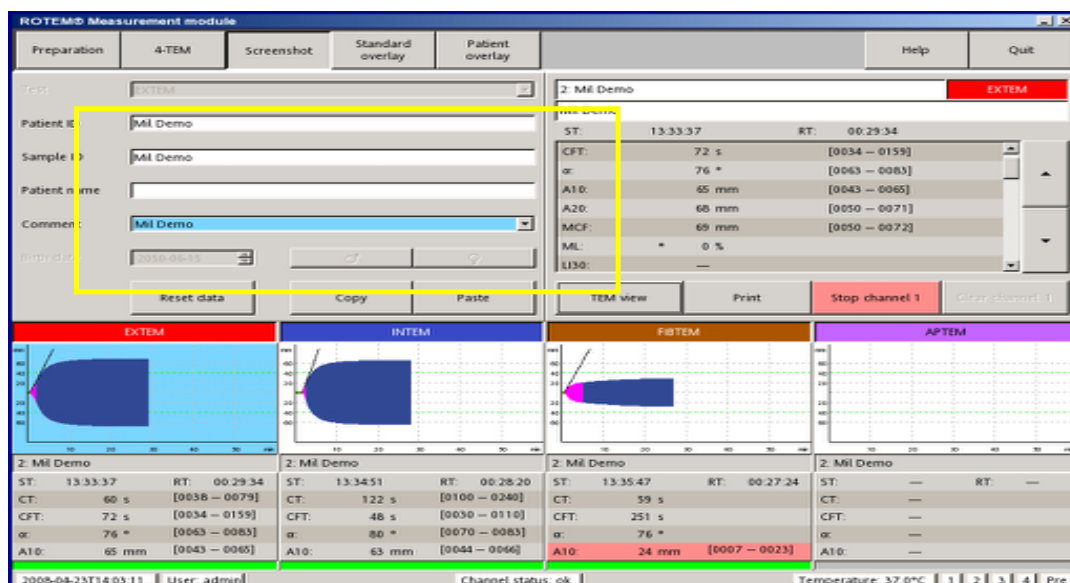
o Tromboelastograma (ROTEM) é o único teste em que não exige rocessamento.



1 tubo azul - destinado à realização do ROTEM (In-tem e Hep-tem)

ROTEM deve ser realizado no sangue total em até 2 horas após a coleta

o curva deve durar no mínimo 30 minutos.



Exemplo: Maria de Jesus dos Santos.
Paciente número 38 no RedCap
Coleta " antes "

Patient ID: MJS
Sample ID: REDCAP_38_ANTES
Last name: SANTOS
First name: MARIA

star-tem®

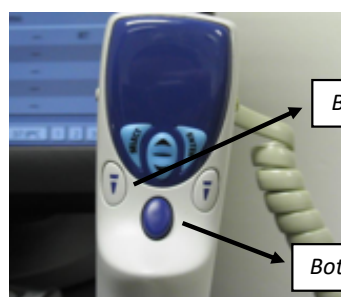
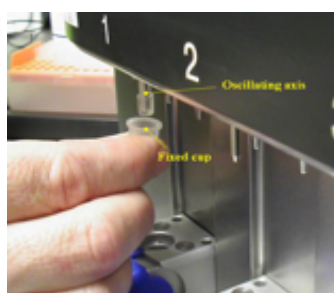
CaCl₂ utilizado para recalcificar extem e intem.
Estabilidade : 8 dias.

in-tem®

No **INTEM**, a coagulação é ativada através da fase de contacto (como na aPTT e TCA). O INTEM é portanto sensível para deficiências de fator do sistema intrínseco (por exemplo FVIII) e para a presença de heparina na amostra.
Estabilidade: 8 dias.

hep-tem®

No **HEPTEM**, a coagulação é ativada como no INTEM. A adição de heparinase no reagente, degrada heparina presente na amostra e portanto, permite a análise Rotem® em amostras heparinizados.
Estabilidade: 30 dias.



Botões para desprezar a pipeta

Botão para pipetagem automática



03 tubos azuis :

02 destinado ao coagulograma (TP, TTPa), dosagem do anti Xa, PC e PS
01 destinado ao teste do potencial geração de trombina

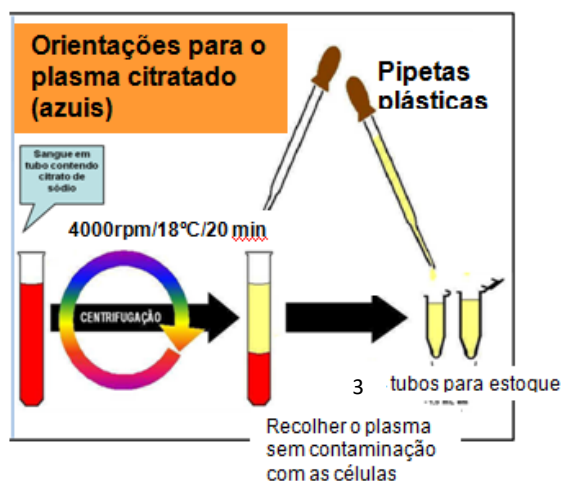
1. Centrifugação para a obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP):

- Os dois tubos de sangue citratado devem ser centrifugados a **3000 rpm por 20 minutos à temperatura de 18°C (centrífuga refrigerada)**

2. Separação de plasma:

- Com o auxílio de uma pipeta de transferência plástica retirar um volume de plasma sem a contaminação de plaquetas, leucócitos e hemácias (**ver a figura 1**)
- Identificar 03 tubos cônicos plásticos (tubos eppendorf)
- Transferir o plasma coletado ($\pm 1,5$ mL) nas condições descritas acima para **03 tubos cônicos plásticos** com tampa de 2 mL

Figura 1 - Processamento das 02 amostras sangue citratado (tubo azul):



OBSERVAÇÕES**TODOS TUBOS EPPENDORF DEVEM ESTAR DEVIDAMENTE IDENTIFICADOS:**

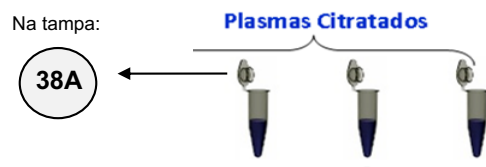
As identificações devem ser feitas por caneta específica para tubo de criopreservação (tipo marcador permanente)

1. Número do paciente no RedCap
2. Iniciais do nome do paciente;
3. Identificação do tipo de teste realizado.

4. Momento de coleta e seguido pela data

A - antes do tratamento da infecção
D - após tratamento da infecção

Exemplo de identificação de amostra:



CONGELAR EM NITROGÊNIO LÍQUIDO E MANTÊ-LOS A -80°C ATÉ A REALIZAÇÃO DOS TESTES

NÃO ESQUECER DE PROTOCOLAR O PACIENTE NO CADERNO AZUL

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

- 1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: POTENCIAL DE GERAÇÃO DE TROMBINA E EFEITO DOS HEPARINÓIDES ENDÓGENOS EM PACIENTES COM CIRROSE ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA INFECÇÃO.**

PESQUISADOR PRINCIPAL: ALBERTO QUEIROZ FARIAS

CARGO/FUNÇÃO: Professor-Associado. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 68.791

DEPARTAMENTO/ INSTITUTO: Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

1- Convite à participação do estudo

Convidamos o(a) Sr(a) para participar desta pesquisa, a qual pretende avaliar se a infecção no paciente com cirrose promove alguma interferência na coagulação do sangue. Através do sistema de coagulação do sangue, o organismo controla os riscos de sangramentos e trombozes, e através do estudo investigaremos se a infecção interfere no funcionamento destes sistemas.

2- Justificativa e objetivos do estudo

Essas informações são fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar se pacientes como o (a) senhor (a), que apresentam cirrose, mantêm preservada a sua capacidade de coagular o sangue normalmente durante a infecção e na ausência de infecção. Os diversos tipos de infecções (infecção urinária, infecção da pele, pneumonia, infecção da corrente sanguínea ou a peritonite bacteriana espontânea, que é a infecção do líquido da barriga) geralmente interferem na

coagulação do sangue, e isso pode aumentar os riscos de complicações ou sangramentos no paciente com cirrose. Por isto, torna-se importante estudar melhor esta condição para identificar quais os distúrbios na coagulação causados pela infecção e planejar o seu tratamento.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da infecção sobre o sistema de coagulação em pacientes com cirrose. Se o (a) senhor (a) tem cirrose mas não está com infecção, nós também te convidamos a participar do estudo, pois queremos comparar a sua coagulação com a coagulação dos pacientes com cirrose e infecção. Para isto, pedimos a sua autorização para consultar o seu prontuário médico e para colheremos um pouco de sangue em dois momentos diferentes, como explicaremos a seguir.

3- Procedimentos que serão realizados na pesquisa e métodos que serão empregados

Os procedimentos rotineiros indicados pelo seu próprio médico, como o tratamento da infecção com antibióticos, a escolha do tipo e tempo de antibiótico, a indicação de realização de paracentese (retirada do líquido acumulado na barriga) e/ou de outros tratamentos auxiliares, não sofrerão interferência da pesquisa. A decisão de realizar estes procedimentos será tomada pelo seu médico e eles serão realizados pelo seu médico independente da sua participação no estudo.

Os procedimentos relacionados à pesquisa são:

- a) **Entrevista para preencher questionários:** duração de cerca de 10 minutos, visando obter dados sobre sua doença e medicações que utiliza.
- b) **Coleta de sangue de uma veia do braço:** com a finalidade de dosar substâncias que mostram alterações da coagulação por causa da cirrose e da infecção. A coleta do sangue será feita em dois momentos diferentes: 1) se o (a) senhor (a) tem infecção, a primeira coleta de sangue será feita em até 24h após o seu médico iniciar o antibiótico para tratar a infecção, e a segunda coleta de sangue será realizada, no mínimo, 1 semana após a resolução da infecção; 2) se o (a) senhor (a) tem cirrose mas não tem infecção, a primeira coleta de sangue será no dia em que você concordar em participar do exame, e a segunda coleta de sangue será realizada, no mínimo, após 1 semana da coleta inicial. Serão retirados 20mL de sangue em cada uma das duas coletas. A segunda coleta é importante, pois os resultados dos testes realizados com a amostra da segunda coleta de sangue serão comparados com os resultados dos testes da primeira coleta de sangue. A segunda coleta de sangue poderá ser realizada durante a sua consulta de retorno ao Hospital das Clínicas ou em data que julgar mais conveniente.
- c) **Consulta ao seu prontuário médico:** Solicitamos sua autorização para consultar as informações que estão em seu prontuário e os resultados de seus exames disponíveis no sistema do hospital.

4- Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

Em relação aos procedimentos do estudo, os desconfortos e os riscos de coleta de sangue são mínimos, como pequenos hematomas, manchas roxas e ardência local. Não é necessário jejum para colher os exames.

A eficácia do tratamento da infecção, indicado pelo seu médico, dependerá do local da infecção, do tipo de bactéria causadora da infecção e das condições clínicas do paciente. O tratamento costuma ser eficiente em muitos casos, porém alguns pacientes podem evoluir com piora clínica devido à própria

infecção, como comprometimento do funcionamento dos rins, necessitando de tratamento em regime de internação prolongada no hospital.

5- Benefícios esperados para o participante

Caso o estudo contribua para o melhor entendimento dos problemas de coagulação que acontecem em pessoas com cirrose, talvez, no futuro próximo, outros pacientes ou talvez até mesmo o (a) Sr (a), que venham a apresentar infecções, sejam poupados de receber desnecessariamente transfusão de sangue para prevenir sangramentos. O estudo também poderá auxiliar o médico a identificar quais os pacientes têm maior risco de sangramentos ou trombozes durante a infecção e a planejar medidas preventivas de forma mais precoce, antes de ocorrerem complicações.

6- Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

Está asseguro o direito do paciente de manter-se atualizado sobre os resultados da pesquisa que já sejam do conhecimento dos pesquisadores na data solicitação. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias. O Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias pode ser encontrado *no Serviço de Gastroenterologia Clínica. Instituto Central, 9 andar, sala 9117. Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar 255, São Paulo.* Telefone(s) 2661-3338/ 2661-3339. Se o(a) Sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – telefone: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br. A pesquisa não trará qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição e fica garantido ao paciente que desistir de participar da pesquisa, o direito de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição.

7- É garantida a plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

8- Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento

O (a) senhor (a) receberá uma via do termo de consentimento livre e esclarecido, devidamente rubricada pelo pesquisador. Em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas

9- Explicação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa. Fica assegurado ao paciente demandar por indenização por eventuais danos à

saúde decorrentes da pesquisa, conforme as leis do país. Os pesquisadores comprometem-se a tratar na instituição eventuais complicações ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa.

10- Armazenamento de amostras em biorrepositório

O material biológico (amostra de sangue) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011. A amostra de sangue congelada será usada somente para eventuais repetições das dosagens no presente estudo, evitando-se novas coletas. Em caso de uso futuro do material armazenado, será pedido novo consentimento. Qualquer nova pesquisa apenas será realizada com aprovação do sistema Comitê de Ética e Pesquisa – Comissão Nacional de Ética e Pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias. A pesquisadora executante é a Dra. Marina Pamponet Motta. Ambos podem ser encontrados no *Serviço de Gastroenterologia Clínica. Instituto Central, 9 andar, sala 9117. Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar 255, São Paulo*. Telefone(s) 2661-3338/ 2661-3339. Se o(a) Sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – telefones: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo **“Potencial de geração de trombina e efeito dos heparinóides endógenos em pacientes com cirrose antes e após o tratamento da infecção”**. Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (.....) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do Paciente / Representante legal

Data: / /

Assinatura do responsável pela obtenção de consentimento

Data: / /

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE.....CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)

RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....