

Evandro de Oliveira Souza

Avaliação funcional das plaquetas em pacientes com cirrose e sua relação com o risco de sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas

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
2017

Evandro de Oliveira Souza

Avaliação funcional das plaquetas em pacientes com cirrose e sua relação com o risco de sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas

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
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Evandro de Oliveira

Avaliação funcional das plaquetas em pacientes com cirrose e sua relação com o risco de sangramento após ligadura elástica de varizes esofágicas / Evandro de Oliveira Souza -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Alberto Queiroz Farias.

Descritores: 1.Cirrose 2.Hemostasia 3.Trombocitopenia 4.Agregação plaquetária 5.Endoscopia 6.Hemorragia

USP/FM/DBD-223/17

Dedicatória

Dedico essa conquista aos meus pais *Antonia Vanderci de Oliveira Souza* e *Itagiba Agnelo de Souza*, que nunca hesitaram em investir tudo o que podiam na educação de seus filhos.

À minha amada companheira *Raquel Delgado Souza*, pelo apoio imensurável e incondicional aos meus sonhos.

Aos meus filhos *Júlia* e *Murilo*, a mais bela personificação do amor.

Ao meu irmão *Diogo*, pelo incentivo.

Agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias, pela confiança, estímulo e exemplo de preciosa aptidão em transmitir seu destacado conhecimento científico.

Aos Profs. Drs. Flair José Carrilho e Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque pela oportunidade.

Aos funcionários do Laboratório de Coagulação do HCFMUSP (Fundação Pró-Sangue), em especial aos Prof. Dr. Élbio Antônio D'Amico e Tânia Rúbia Flores da Rocha, por apoiarem essa linha de pesquisa e viabilizar a execução do estudo.

Ao Prof. Dr. Adávio de Oliveira e Silva, pelo prazer da convivência e por me ensinar muito além de medicina.

Aos médicos da Gastroenterologia e Transplante do Fígado, por compartilharem experiências e informações essenciais para realização da tese.

Às enfermeiras de pesquisa Danusa Ramos, Patrícia Momoyo, Juliana Medeiros e à técnica de enfermagem Beatriz Migita.

À bióloga Caroline Marcondes Ferreira, pelo importante auxílio na execução dos exames laboratoriais.

Aos amigos Fábio Kassab e Ricardo Miyake, pelos ensinamentos e valioso apoio.

Aos funcionários do Departamento de Gastroenterologia, em especial, àqueles que atuam no Centro de Diagnóstico da Gastroenterologia.

Aos colegas que de alguma forma participaram do longo caminho dessa tese: Evandra Rocha, Valdinélia Sposeto, Priscila Néspoli, Walnei Barbosa, Odilson Silvestre, Rafael Ximenes e Mary Ellen Dias.

Aos amigos Daniel Ferraz de Campos Mazo, Roque Gabriel Rezende de Lima, Betânia da Silva Rocha, Renée Mignolo Tanaka Ferreira, Raul Carlos Wahle e Verônica Desiree Cardozo.

Aos participantes da banca de qualificação pelas valiosas críticas e sugestões: Prof. Dr. Daniel Ferraz de Campos Mazo, Prof. Dr. Wellington Andraus e Prof. Dr. Roberto José de Carvalho Filho.

Aos pacientes que diante da hostilidade de sua doença depositam esperança e confiança na ciência.

“A ciência prospera com seus erros, eliminando-os um a um”.

(Carl Sagan)

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 Anneliesie Carneiro da Cunha, Maria Júlia 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. Fisiologia da coagulação: visão geral do modelo celular..... | 1 |
| 1.2. Conceitos atuais da coagulação na cirrose..... | 3 |
| 1.3. Plaquetas na cirrose..... | 5 |
| 1.4. Testes de avaliação das plaquetas..... | 7 |
| 1.5. Risco de sangramento na cirrose..... | 9 |
| 1.6. Risco de sangramento após LE de varizes esofagianas..... | 9 |
| 1.7. Hipótese do estudo | 10 |
| 2. OBJETIVO..... | 13 |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1. Casuística..... | 15 |
| 3.1.1. Critérios de inclusão..... | 15 |
| 3.1.2. Critérios de exclusão..... | 15 |
| 3.2. Métodos..... | 15 |
| 3.2.1. Desenho do estudo | 15 |
| 3.2.2. Período e local do estudo..... | 16 |
| 3.2.3. Testes relacionados à função plaquetária..... | 16 |
| 3.2.4. Técnica de realização do tratamento endoscópico..... | 19 |
| 3.2.5. Tratamentos concomitantes..... | 20 |
| 3.2.6. Avaliação dos pacientes..... | 20 |
| 3.2.7. Avaliação do desfecho..... | 21 |
| 3.2.8. Seguimento ambulatorial..... | 21 |
| 3.2.9. Análise estatística..... | 21 |
| 3.2.10. Aspectos éticos..... | 21 |
| 4. RESULTADOS..... | 23 |
| 4.1. Inclusões e característica basais dos pacientes..... | 23 |
| 4.2. Etiologia da cirrose | 25 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.3. | Gravidade da cirrose..... | 25 |
| 4.4. | Parâmetros hematológicos e bioquímicos..... | 26 |
| 4.5. | Testes relacionados à função plaquetária..... | 27 |
| 4.6. | Características das varizes, tipo de profilaxia e sangramento após LE..... | 30 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 42 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |

Abreviaturas e Siglas

| | |
|----------|--|
| ADAMTS13 | <i>A Disintegrin-like And Metalloproteinase with ThromboSpondin type-1 motifs 13</i> |
| AP | Atividade de protrombina |
| AS | <i>Aggregate size</i> |
| DP | Desvio padrão |
| CDG | Centro de Diagnóstico em Gastroenterologia |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay</i> |
| FWW | Fator de von Willebrand |
| IC | Intervalo de Confiança |
| INR | <i>International Normalized Ratio</i> |
| LE | Ligadura Elástica |
| NASH | <i>Non Alcoholic Steatohepatitis</i> |
| OR | <i>Odds Ratio</i> |
| SC | <i>Surface coverage</i> |
| TIPS | <i>Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt</i> |
| TP | Tempo de Protrombina |
| TTPA | Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada |

Lista de Figuras

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Modelo celular da coagulação..... | 3 |
| Figura 2 - | Aparelho Diamed Impact-R®..... | 17 |
| Figura 3 - | Cones e placas..... | 17 |
| Figura 4 - | Esquema cone e placa..... | 18 |
| Figura 5 - | Representação do resultado e histograma do teste de função plaquetária..... | 18 |
| Figura 6 - | Fluxograma de inclusão..... | 23 |
| Figura 7 - | Distribuição percentual dos pacientes de acordo com a classificação Child-Pugh nas diferentes faixas de número de plaquetas..... | 25 |
| Figura 8 - | Resultado do MELD comparando-se entre os pacientes sem e com sangramento após a LE..... | 26 |
| Figura 9 - | Resultado do SC e AS de acordo com os grupos divididos pelo número de plaquetas..... | 28 |
| Figura 10 - | Ocorrência de sangramento nos grupos divididos pelo número de plaquetas..... | 31 |

Lista de Tabelas

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Características basais dos pacientes, etiologia e grau de disfunção hepática..... | 24 |
| Tabela 2 - | Características laboratoriais dos pacientes..... | 27 |
| Tabela 3 - | Resultados dos testes relacionados à função plaquetária de acordo com os grupos divididos pelo número de plaquetas..... | 28 |
| Tabela 4 - | Resultados dos testes relacionados à função plaquetária de acordo com o corte no número de plaquetas de $56 \times 10^3/\text{mm}^3$ | 29 |
| Tabela 5 - | Características das varizes, indicação de LE, número de sessões e ocorrência de sangramento após tratamento endoscópico..... | 30 |
| Tabela 6 - | Resultados dos testes relacionados à função plaquetária nos pacientes sem e com sangramento..... | 31 |

Souza EO. Avaliação funcional das plaquetas em pacientes com cirrose e sua relação com o risco de sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: O sangramento por queda de escara é uma complicação potencialmente letal da ligadura elástica (LE) de varizes de esôfago. Os fatores relacionados a esse evento são pouco explorados na literatura, porém a coagulopatia, principalmente a plaquetopenia, do paciente com cirrose poderia estar implicada. O número e a função plaquetária têm particular relevância na manutenção da hemostasia, uma vez que a geração de trombina depende fortemente desses parâmetros. Entretanto, dados demonstram a preservação da função plaquetária como consequência de mecanismos compensatórios representados, principalmente, pelo aumento dos níveis do fator de von Willebrand (FVW) e diminuição de ADAMTS13. Deste modo, os pontos de corte para contagem plaquetária utilizados na prática clínica não refletiriam o risco de sangramento após procedimentos.

Objetivos: O objetivo desse estudo foi descrever a função plaquetária em pacientes com cirrose e a sua influência no sangramento após LE de varizes de esôfago.

Pacientes e Métodos: 1) Casuística. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de cirrose, de diferentes etiologias, encaminhados para realização de LE como profilaxia primária ou secundária de sangramento por varizes de esôfago. Os critérios de inclusão foram: a) idade acima de 18 anos; b) pacientes com cirrose e varizes de esôfago com indicação de ligadura elástica eletiva e c) concordância em participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: a) doenças pulmonares e cardíacas graves; b) carcinoma hepatocelular; c) insuficiência renal com uremia ou dialítica; d) uso de qualquer droga que interfere na coagulação. 2) Métodos. Imediatamente antes da realização da endoscopia digestiva com LE, foi coletada amostra de sangue de cada paciente para a realização dos seguintes testes: contagem de plaquetas, testes relacionados à função plaquetária (adesão e agregação medida pela superfície coberta (SC) com valor de referência: >7,5% e tamanho do agregado (AS) com valor de referência: >25 μ m² pela tecnologia Impact-R[®]), antígeno de FVW (referência: 40-157%), atividade de FVW (referência: 38-176%), proteinase ADAMTS13 (referência: 40-130%), P-selectina por citometria (34,9 \pm 2,32%) e P-selectina solúvel (92-212ng/mL). Os pacientes foram estratificados de acordo com número de plaquetas. O grau de comprometimento da função

hepática foi avaliado pelos estadiamentos de Child-Pugh e MELD. O desfecho primário do estudo foi a ocorrência do sangramento atribuído à queda da escara da LE. **Resultados:** Foram incluídos 111 pacientes, divididos em três grupos: A) plaquetas $<50 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 38; 34,2%); B) plaquetas entre $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 47; 42,4%) e C) plaquetas $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 26; 23,4%). Os três grupos não diferiram significativamente em relação aos seguintes parâmetros: gênero, etiologia e grau de disfunção hepática. Na comparação entre os grupos, os parâmetros hemoglobina e bilirrubina foram significativamente maior no grupo B (p=0,04 e p=0,009, respectivamente). Nos testes relacionados à função plaquetária, encontramos no Impact-R[®], SC de $7 \pm 4\%$ e AS de $52 \pm 24 \mu\text{m}^2$. Na avaliação do FVW o valor encontrado foi de $369 \pm 157\%$ para o antígeno e $336 \pm 149\%$ para atividade. ADAMTS13 apresentou resultado $73 \pm 24\%$. Na comparação entre os grupos: o parâmetro Impact-R[®] SC foi no grupo A: $4,9 \pm 3\%$, no grupo B: $7,7 \pm 4,6\%$ e $9,1 \pm 3,6$ no grupo C (p<0,005). O AS foi de $49,9 \pm 22,4\%$ no grupo A, no grupo B foi $55,1 \pm 26,6\%$ e $51,3 \pm 20$ no grupo C (p=0,599). Os outros parâmetros específicos relacionados à função plaquetária não foram significantes: o antígeno do FVW com p=0,926, a atividade do FVW com p=0,870 e ADAMTS13 com p=0,080. O resultado da P-selectina por citometria de fluxo foi de $37,8 \pm 23\%$ e P-selectina solúvel foi $182,3 \pm 86$ ng/mL. A maioria dos pacientes (58,5%) realizaram LE como profilaxia primária. A presença de sinais vermelhos ocorreu em 74% e a gastropatia hipertensiva foi vista em 95% dos pacientes. Houve sangramento após LE em seis (5,4%) pacientes, sendo duas ocorrências no grupo A, uma no grupo B e três no grupo C (p=0,316). O valor médio do MELD foi $13 \pm 3,6$, sendo $12,6 \pm 3,3$ no grupo sem sangramento e $16 \pm 5,9$ no grupo com sangramento (p=0,025). Quando comparados os pacientes sem e com sangramento não encontramos diferença estatisticamente significativa em nenhum parâmetro de função plaquetária. **Conclusões:** Os resultados dos testes de adesão e agregação plaquetária: SC e AS; FVW e ADAMTS13 demonstraram compensação funcional a despeito da plaquetopenia e não se correlacionaram com o risco de sangramento após LE de varizes de esôfago. O MELD foi significativamente maior nos pacientes que sangraram.

Descritores: cirrose; hemostasia; trombocitopenia; agregação plaquetária; endoscopia; hemorragia.

ABSTRACT

Souza EO. Platelet function assessment and the relationship with bleeding risk following band ligation of esophageal varices in patients with cirrhosis [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Bleeding caused by ulceration after band ligation of esophageal varices is a potentially fatal complication. Contributing factors to this event are little explored in the literature, although coagulopathy, principally thrombocytopenia, in patients with cirrhosis could be implicated. The number and function of platelets has particular relevance to the maintenance of hemostasis, since thrombin generation depends heavily on these parameters. However, data show that the preservation of platelet function is a consequence of compensatory mechanisms represented principally by an increase in von Willebrand factor (VWF) levels and a reduction in ADAMTS13. Because of this, the cutoff points for platelet count used in routine clinical practice do not reflect the risk of bleeding following invasive procedures.

Objective: The aim of this study was to describe platelet function in patients with cirrhosis and its influence on the bleeding following band ligation of esophageal varices. **Methodology:** 1) Inclusion. Patients with cirrhosis of different etiologies, referred for band ligation as primary or secondary prophylaxis of bleeding from esophageal varices were included. Inclusion criteria were: a) age > 18 years; b) patients with cirrhosis and esophageal varices eligible for elective band ligation; c) agreement to participate in the study. The exclusion criteria were: severe pulmonary or cardiovascular disease; b) hepatocellular carcinoma; c) renal dysfunction with uremia or requiring dialysis; d) use of any medication that could interfere with coagulation. 2) Methods. Immediately prior to digestive endoscopy with band ligation, a blood sample was taken from each patient to carry out the following coagulation tests: platelet count, platelet function test (adhesion and aggregation measured as surface coverage (SC) with normal range: >7.5% and aggregate size (AS) with normal range: >25 μm^2 by Impact-R[®] technology), antigen of VWF (normal range: 40-157%), activity of VWF (normal range: 38-176%), protease ADAMTS13 (normal range: 40–130%), P-Selectin by cytometry (34.9 \pm 2.32%) and soluble P-Selectin (92–212ng/mL). The degree of hepatic function was staged according to Child-Pugh and MELD. The principal clinical event assessed by the study was the occurrence of post-banding bleeding. **Results:** 111 patients were included in the study, divided into three groups: A) platelet count <50 $\times 10^3/\text{mm}^3$ (n=38; 34.2%); B) platelet count

between $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ and $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($n=47$; 42.4%); and C) platelet count $>100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($n=26$; 23.4%). The three groups did not differ significantly in relation to the following parameters: gender, cirrhosis etiology and degree of hepatic dysfunction. The comparison among groups showed that the parameters hemoglobin and bilirubin were significantly higher in group B ($p=0.04$ and $p=0.009$, respectively). With regards to platelet function, in Impact-R[®] the mean SC was $7 \pm 4\%$; in group A was $4.9 \pm 3\%$, in group B was $7.7 \pm 4.6\%$ and 9.1 ± 3.6 in group C ($p<0.005$). The AS was $52 \pm 24\mu\text{m}^2$; in group A was $49.9 \pm 22.4\%$, in group B was $55.1 \pm 26.6\%$ and 51.3 ± 20 in group C ($p=0.599$). The mean VWF value was $369 \pm 157\%$ for antigen and $336 \pm 149\%$ for activity. ADAMTS13 activity values were $73 \pm 24\%$. The comparison among groups showed that the other specific parameters for platelet function were not significant: VWF antigen with $p=0.926$, VWF activity with $p=0.870$ and ADAMTS13 with $p=0.080$. The result of P-Selectin by flow cytometry was $37.8 \pm 23\%$ and soluble P-Selectin was $182.3 \pm 86\text{ng/mL}$. The majority of patients (58.5%) underwent band ligation as primary prophylaxis. Red signs appeared in 74%, and hypertensive gastropathy was seen in 95% of patients. There was bleeding following band ligation in 6 (5.4%) of patients, with 2 occurring in group A, 1 in group B, and 3 in group C ($p=0.316$). The mean MELD score was 13 ± 3.6 , with 12.6 ± 3.3 in the group without bleeding, and 16 ± 5.9 in the group with bleeding ($p=0.025$). When patients with bleeding were compared with those without, there was no statistically significant difference in any parameter for platelet function. **Conclusions:** The results of the platelet function test SC and AS; VWF and ADAMTS13 tests showed functional compensation for thrombocytopenia, and did not correlate with the risk of bleeding following band ligation of esophageal varices. The MELD score was significantly higher in patients who suffered bleeding.

Descriptors: cirrhosis; hemostasis; thrombocytopenia; platelet aggregation; endoscopy; hemorrhage.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia da coagulação: visão geral do modelo celular

Em meados da década de sessenta do século vinte foi proposto o modelo de explicação da hemostasia baseado numa sequência de eventos que resultava na geração de trombina e consequente formação do trombo¹. Este modelo, apresentado como “cascata” da coagulação, era explicado através das vias intrínseca e extrínseca iniciados pelo fator XII (FXII) e fator tecidual FT/FVIIa, respectivamente². Esse modelo não foi proposto como uma hipótese fidedigna da hemostasia *in vivo*, mas sim como um conjunto de interação bioquímica dos fatores de coagulação identificados *in vitro*². Isto fez com que muitos pesquisadores reconhecessem que a “cascata” apresentava falhas graves como modelo da coagulação fisiológica, e que os sistemas intrínsecos e extrínsecos não poderiam funcionar como vias independentes, como sugerido². Além disso, não havia qualquer destaque ao papel das plaquetas na hemostasia³.

Em substituição a “cascata da coagulação”, foi proposto o modelo celular, em que o processo de hemostasia é descrito em fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação^{3,4}.

Iniciação - A coagulação sanguínea inicia-se com a exposição do fluxo sanguíneo a células que expressam fator tecidual (FT). A expressão do FT ocorre por lesão vascular ou por ativação endotelial através de substâncias químicas, citocinas ou processos inflamatórios³. A partir da interação com o FT, ocorre ativação de maior quantidade do fator VII (FVIIa), juntando-se a uma pequena alíquota que já circula ativada. O complexo FT/FVIIa ativa o fator X e fator IX, tornando-os fator Xa e fator IXa. O fator Xa pode dissociar-se da superfície celular, e neste caso é inativado pela antitrombina e pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI), por outro lado se o fator Xa, permanecer na superfície celular com o fator V, ele converte uma pequena quantidade de protrombina em trombina, que participa fundamentalmente da fase de amplificação⁴.

Amplificação - A adesão de plaquetas no colágeno subendotelial ocorre devido a ação do receptor de colágeno plaquetário específico (glicoproteína Ia/IIa) e do fator de von Willebrand (FVW), os quais formam ligações entre plaquetas e fibras de

colágeno para ativar as plaquetas³. A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação proporcionando ativação de outras plaquetas, aumentando a sua adesão e ativando os fatores V, VIII e XI. Plaquetas ativadas liberam fator V na sua forma parcialmente ativada que é então completamente ativada pela trombina ou fator Xa. O complexo FVW é partido pela trombina para liberar o fator VIIIa. Plaquetas ativadas têm agora fatores ativados Va, VIIIa e IXa em sua superfície^{3,4}.

Propagação - A fase de propagação é caracterizada pela produção de complexos tenases e protrombinases que são agrupados na superfície das plaquetas ativadas. O complexo tenase, fator VIIIa e fator IXa, é formado quando o fator IXa move-se da célula apresentadora do FT, onde é ativado, para ligar-se ao receptor expressado nas plaquetas ativadas³. O complexo fator VIIIa/IXa ativa o fator X que juntamente com o fator Va formam o complexo protrombinase. O complexo protrombinase intensifica em muito a produção de trombina que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e também ativa o fator estabilizador da fibrina, fator XIII, para formar o coágulo de fibrina hemostático^{3,4}.

Controle da ativação da hemostasia no modelo celular - O sistema de coagulação é contido e inibido por anticoagulantes específicos que incluem inibidor da via do fator tecidual, proteína C, proteína S e antitrombina⁴. Para impedir que a produção de trombina escape do controle, a fase de iniciação é controlada pelo inibidor da via do fator tecidual, cujo maior sítio de produção é a célula endotelial e que atua inibindo o complexo FT/FVIIa⁴. A ativação da proteína C ocorre na superfície da célula endotelial pela trombina juntamente com um receptor da célula endotelial, trombosmodulina³. A proteína C ativada (PCA), em combinação com a proteína S, degrada os fatores Va e VIIIa que são necessários para sustentar a formação de trombina na coagulação. A PCA também exerce atividade antiinflamatória, atividade citoprotetora e de proteção endotelial, atua também com papel fundamental na prevenção da inflamação e trombose microvascular que ocorrem após contato com endotoxinas⁴. A antitrombina é a maior inibidora dos fatores de coagulação incluindo trombina, fator IXa e Xa. As fases de amplificação e propagação são controladas, principalmente, pela ação da antitrombina^{3,4}.

Figura 1 - Modelo celular da coagulação

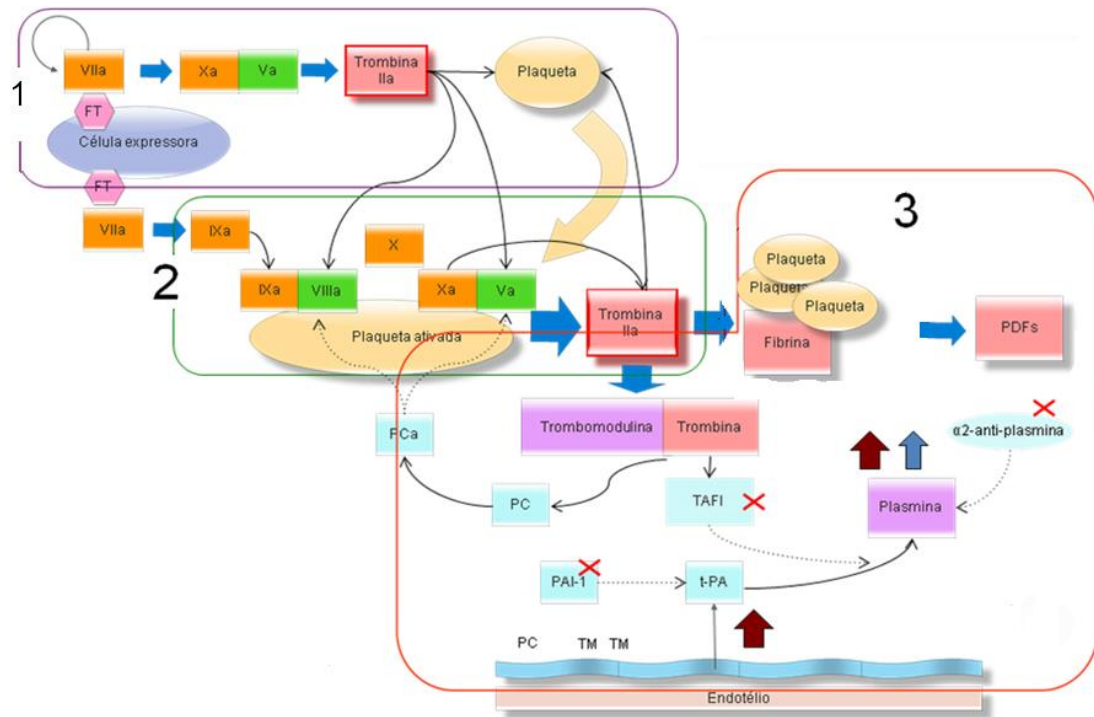


Figura1 - Esquema mostrando o modelo celular da coagulação com destaque para o papel das plaquetas em cada fase. 1-iniciação: interação do FT com o fator VII resultando na geração de trombina em quantidade suficiente como substrato para a amplificação; 2-amplificação: com a mediação do FVW ocorre importante aumento da taxa de ativação de plaquetas e conseqüente expressão de fatores ativados em sua superfície; e 3-propagação: produção de complexos tenases e protrombinases na superfície da plaqueta ativada resultando em fibrina além dos mecanismos controladores para que a coagulação não escape do controle. Modificado de *A Cell-based Model of Hemostasis*. Hoffman M, Monroe DM.^{3,4}

1.2. Conceitos atuais de coagulação na cirrose

O fígado é o órgão responsável pela síntese da maioria dos fatores de coagulação e fibrinólise⁵. Em pacientes com doença hepática encontramos alterações substanciais nos elementos participantes do sistema hemostático. Estas alterações incluem plaquetopenia e defeitos da função plaquetária, diminuição da circulação e níveis de fatores ativadores ou inibidores da coagulação, além de diminuição dos níveis de proteínas envolvidas na fibrinólise⁶.

A disfunção plaquetária tem sido relatada em uma série de estudos e pode se traduzir como deficiência de adesão e agregação plaquetária. Estas alterações foram consideradas, por muito tempo, contribuintes das hemorragias^{6,7}. Entretanto, esses conceitos tradicionais sobre as conseqüências clínicas do distúrbio hemostático em pacientes com doença hepática têm mudado dramaticamente⁷.

Atualmente postula-se que nos pacientes com doença hepática os testes de rotina de coagulação anormais não têm necessariamente um aumento da tendência ao sangramento, e que podem apresentar ainda eventos trombóticos⁷⁻⁹.

Um emblemático estudo da adesão de plaquetas em cirróticos, com sua avaliação em condição de fluxo, considera que altos níveis de FVW, que é uma característica típica dos pacientes com cirrose, contribuem para a indução da hemostasia primária levando à conclusão que o aumento do nível do FVW pode compensar o defeito do número de plaquetas^{10,11}.

O nível de FVW no sangue é regulado pela proteinase ADAMTS13, que é produzida pelo fígado¹². Na cirrose, a diminuição da quantidade e atividade dessa proteinase favorece a ação fisiológica do FVW. O resultado é um evidente aumento do estímulo à adesão e agragação plaquetária em testes *in vitro*¹³.

Pesquisas recentes apontam elevação do valor da P-selectina sérica nos pacientes com cirrose¹⁴. A P-selectina é uma proteína de membrana localizada nos grânulos alfa intraplaquetário que se expressa na superfície quando ela está ativada, permitindo interação com monócitos e neutrófilos, levando à migração dessas células para o local que o trombo está sendo formado^{14,15}. A elevação sérica dessa proteína poderia indicar maior quantidade de plaquetas ativadas¹⁵.

A coagulopatia em pacientes com doença hepática crônica é historicamente documentada por meio da quantificação individual dos fatores de coagulação, ou através do prolongamento dos testes globais, como o tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)¹⁶. É, no entanto, sabido que os testes globais não são preditivos de sangramento em pacientes com cirrose¹⁷. Evidências indicam que o TP e TTPA são insuficientes para refletir o equilíbrio que ocorre *in vivo*, especialmente nas condições caracterizadas por um distúrbio de coagulação como na cirrose em que anticoagulantes como proteína C, proteína S e antitrombina são reduzidos em paralelo com os fatores pró-coagulantes^{16,17}.

Embora a rotina de testes convencionais de coagulação como a contagem de plaquetas e do TP / TTPA ainda sejam utilizados para indicar uma tendência a hemorragia, encontramos evidências que o sistema hemostático está em um estado de "reequilíbrio", já que as mudanças na via pró-coagulante são acompanhadas por mudanças na via anticoagulante^{17,18}.

A fibrinólise é o mecanismo de degradação de fibrina através de um complexo envolvimento de pró e antiativadores, que regulamentam a geração de plasmina.

Acredita-se que a cirrose é caracterizada por hiperfibrinólise¹⁷. Os resultados da literatura são conflitantes a partir de estudos baseados na quantificação de componentes individuais dessa fase e parecem não ser representativos da fibrinólise, uma vez que, *in vivo*, há uma complexa interação entre ativadores e antiativadores, que regulam a conversão do plasminogênio em plasmina¹². Alguns dados mostram que pacientes cirróticos podem ter aumento relativo dos níveis do ativador tecidual do plasminogênio e seus inibidores, mas também ocorre a diminuição dos níveis de plasminogênio, antiplasmina e fator XIII. Com isso, observa-se que o papel da hiperfibrinólise na ocorrência de sangramento em pacientes cirróticos, embora plausível, ainda não está claro¹⁷.

O resultado final de todas as alterações hemostáticas do paciente com cirrose é um sistema potencialmente instável em relação ao equilíbrio hemostático de indivíduos saudáveis, o que explicatanto o potencial de sangramentos como de complicações trombóticas em pacientes com cirrose^{8,9}.

1.3. Plaquetas na cirrose

O processo hemostático depende da correta interação entre a hemostasia primária, coagulação e fibrinólise. Alterações em qualquer uma destas fases podem gerar hemorragia e/ou trombose. A hemostasia primária inicia-se a partir da adesão de plaquetas circulantes ao subendotélio lesionado através da mediação do FVW e receptores específicos das plaquetas. Plaquetas ativadas dentro do agregado primário expressam em suas membranas fosfolípídios de maior carga negativa que se ligam a fatores de coagulação vitamina K dependentes, iniciando a cadeia de eventos que leva à geração de trombina e, finalmente, a conversão do fibrinogênio em fibrina, que por sua vez é estabilizado por fator XIII ativado¹⁷.

No paciente com cirrose a plaquetopenia parece estar compensada pela presença de níveis anormalmente elevados do FVW no plasma¹². Esta elevação pode acontecer como consequência de perturbações endoteliais próprias da doença ou resultante de infecções bacterianas, por exemplo. Embora esteja estabelecido que o FVW encontra-se em níveis aumentados em pacientes com cirrose, pouco se sabe sobre a capacidade funcional desta proteína¹³. Um aspecto qualitativo muito importante do FVW é sua composição multimérica. Os múltimeros de alto peso molecular são substancialmente mais potentes e eficazes na indução da

hemostasia. A quantidade de multímeros de alto peso molecular é parcialmente regulada pela proteinase ADAMTS13 que cliva o FVW em frações menores com menor capacidade funcional¹⁹.

A redução dos níveis de ADAMTS13 é encontrada em pacientes com doença hepática, sugerindo que com isso, maior quantidade de multímeros de alto peso molecular do FVW podem ser encontrados nestes pacientes¹³. A dosagem sérica destes dois fatores em pacientes cirróticos pode indicar com maior clareza a interação cinética entre eles, além da interferência exercida na hemostasia²⁰.

Tripodi e colaboradores mostraram que a funcionalidade de plaquetas, medida pela sua capacidade de participar da geração de trombina, não é diminuída em pacientes que têm cirrose compensada, apesar da redução do seu número no sangue circulante²¹. Outros estudos também indicam que os defeitos da função plaquetária não parecem ser importantes, quando testado em condições de fluxo⁷.

Plaquetopenia moderada geralmente não resulta em hemorragia nesses pacientes²¹. O papel da disfunção plaquetária, provavelmente é menos importante do que esperado. Novas tecnologias melhoraram o estudo das plaquetas *in vitro*, pois a sua função pode ser melhor avaliada em condições mais fiéis das fisiológicas²⁰.

A avaliação do risco de sangramento e refinamento da interpretação das alterações da coagulação nesses pacientes tem particular importância no balizamento de condutas profiláticas em eventuais subgrupos de pacientes que possuem elevado risco de hemorragia.

O uso de transfusão profilática de plaquetas durante a execução de procedimentos invasivos em pacientes que têm a doença hepática é questionável em consequência da ausência de dados que apoiam essa prática, e também pela experiência obtida na evolução do transplante hepático, em que a contagem de plaquetas não é rotineiramente e indiscriminadamente corrigida^{16,18}. As exceções incluem os procedimentos de alto risco em que o sangramento é pouco provável que seja detectado antes que ocorram danos irreversíveis como por exemplo, a colocação, de um monitor de pressão intracraniana em um paciente com hepatopatia¹⁷.

1.4. Testes de avaliação das plaquetas

A partir dos dados disponíveis, surgem dúvidas quanto à causalidade entre as alterações dos testes de coagulação e as complicações hemorrágicas na doença hepática crônica. Apesar do seu uso corrente, os testes disponíveis apresentam limitações na estratificação do risco de sangramento que merecem ser consideradas¹⁹.

Detalhamos a seguir as particularidades dos principais testes relacionados à avaliação das plaquetas.

a) Contagem de plaquetas

Consiste na contagem do número de plaquetas por mm^3 de sangue. As plaquetas contribuem para a geração de trombina, assim, a ocorrência de plaquetopenia nestes pacientes pode (pelo menos em princípio) influenciar geração de trombina. Dados *in vitro* sugerem que a contagem de plaquetas deve estar acima de $56.000/\text{mm}^3$ para haver geração normal de trombina. Entretanto, não se conhece quais os valores críticos *in vivo*. Isso se explica pela ação variável dos mecanismos compensatórios representados pela interação entre o FVW e ADAMTS13. Portanto, *in vivo*, o risco de sangramento em doentes com cirrose deve ser baseado em julgamento clínicos, e não apenas pelo critério laboratorial^{14,16,19}.

b) Tempo de sangramento

O tempo de sangramento, desenvolvido por Duke em 1910, foi o primeiro ensaio *in vivo* da função plaquetária, era considerado teste global para a hemostasia primária e o mais útil da função plaquetária até a década de 90¹⁶. O teste consiste na observação do tempo necessário para estancar a hemorragia depois que é feita uma incisão na pele, geralmente em a face anterior do antebraço. O teste utiliza um dispositivo para padronizar o tamanho dos cortes na pele. Tempos normais variam entre 2 e 10 min, enquanto que os defeitos graves de plaquetas podem resultar em valores acima de 30 minutos. No entanto, apesar sua aparente simplicidade, o teste é pouco reprodutível¹⁶.

O tempo de sangramento pode estar prolongado em até 40% dos hepatopatas. No entanto, várias observações decorrentes da prática clínica e da literatura questionam se este prolongamento é motivo de preocupação do ponto de vista prático. Apesar dos defeitos de hemostasia primária terem um papel causal na

ocorrência de sangramento em pacientes cirróticos, já que se relacionam à geração de trombina, o tempo de sangramento, provavelmente não reflete o reequilíbrio da coagulação nesses pacientes, não havendo dados que justifiquem seu uso rotineiro como teste preditivo de sangramento^{13,16}.

c) Teste de função plaquetária

A avaliação da agregação plaquetária foi desenvolvida no início da década de sessenta e logo foi considerada como “padrão ouro”¹⁶. É o teste mais utilizado para identificar e diagnosticar defeitos da função plaquetária e pode ser realizado com aparelhos comercialmente disponíveis²². Os parâmetros medidos permitem avaliar a agregação e adesão plaquetária^{21,23}. Os testes de primeira geração eram amplamente baseado na avaliação das plaquetas em condições estáticas. A tecnologia atual permite avaliar as condições funcionais das plaquetas mimetizando fluxo turbilhonado (*high shear stress*), o que seria mais próximo das condições fisiológicas. Para esse tipo de avaliação plaquetária temos diversos sistemas disponíveis, sendo as tecnologias *Platelet Function Analyzer – PFA-100* e *Impact R®* as mais conhecidas^{22,23}.

O equipamento *Impact-R® - cone and plate(let) analyzer (CPA) Technology* é um dispositivo que testa plaquetas de sangue total quanto à adesão e à agregação em uma placa revestida com matriz extracelular (MEC). O CPA foi desenvolvido em uma forma comercial chamada *Impact-R®* da companhia *Diamed* (Suíça). É um teste que utiliza sangue total submetendo-o a condições similares ao fluxo arterial, analisando a adesão e agregação plaquetária. A aderência plaquetária é marcada e quantificada pela porcentagem de superfície coberta (*SC - surface covered*) e pelo tamanho do agregado de plaquetas (*AS - aggregate size*)^{22,23}.

d) Dosagem de fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica, sintetizada pelos megacariócitos e células endoteliais, que circula na forma de multímeros e apresenta importantes funções como, por exemplo, mediação da adesão plaquetária nos locais de lesão vascular, levando à ativação da GPIIb-IIIa e à conseqüente agregação plaquetária. A interação entre o FVW e as plaquetas configura o primeiro passo da adesão plaquetária. A complexidade desta grande glicoproteína multimérica é que lhe confere diferentes funções. Nas plaquetas, ela está contida

nos grânulos, sendo secretado após estimulação e ligando-se em seguida ao complexo glicoprotéico IIb/IIIa das plaquetas ativadas^{12,14}.

e) Proteinase ADAMTS13

A ADAMTS13 (*A Disintegrin-like And Metalloproteinase with ThromboSpondin type-1 motifs 13*) é uma proteinase específica produzida no fígado que cliva o FVW²¹. Uma baixa produção de ADAMTS13, como na deficiência genética, está relacionada a um aumento dos níveis circulantes de FVW. Em pacientes cirróticos sua produção parece estar diminuída, favorecendo a ação do FVW^{13,20}.

f) P-selectina

É uma proteína de membrana presente nos grânulos alfa intracitoplasmáticos até o momento que ocorre a ativação plaquetária¹⁵. Com isso passa para o meio extracelular sendo então possível sua identificação através da citometria de fluxo utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD62P que se une especificamente a P-selectina e também pela dosagem da P-selectina solúvel por ELISA²⁴.

1.5. Risco de sangramento na cirrose

A partir do conhecimento do modelo celular de coagulação evidenciou-se o papel central das plaquetas na hemostasia na cirrose. Tradicionalmente, a plaquetopenia tem sido aceita como fator de risco aumentado de complicações hemorrágicas após procedimentos. No entanto, esse risco não está bem determinado pela literatura atual, pois há evidências crescentes de que mecanismos compensadores da função plaquetária poderiam atenuar esse risco de sangramento *in vivo*. Não está claro se o comprometimento da função plaquetária contribui com a ocorrência de sangramento como complicação após um procedimento invasivo.

1.6. Risco de sangramento após LE de varizes esofagianas

A hemorragia varicosa é a causa mais freqüente de sangramento em pacientes com cirrose e está relacionada ao grau de hipertensão portal, intensidade da disfunção hepática e da coagulopatia²⁵. A LE de varizes esofágicas e o uso de β -bloqueadores não seletivos constituem opções de primeira linha para a profilaxia secundária de ressangramento varicoso²⁵. Para a profilaxia primária naqueles pacientes que apresentam intolerância ou contraindicação ao uso de agentes β -

bloqueadores a ligadura torna-se a primeira opção. A LE também é recomendada para o tratamento do sangramento agudo^{26,27}.

Uma das preocupações com a utilização da LE para tratamento das varizes refere-se à ocorrência de sangramento por queda da escara resultante da colocação da banda elástica. Essa complicação tem sido relatada em 5% a 10% dos casos e geralmente ocorre nas duas primeiras semanas após o procedimento²⁸. Os fatores de risco para essa complicação são pouco conhecidos na literatura. Dados sugerem que não há relação entre anormalidades demonstráveis da coagulação e o risco de sangramento após o procedimento^{25,26}. No estudo de Rocha et al, testes convencionais e expandidos da coagulação não se correlacionaram com sangramento após ligadura elástica e varizes esofágicas em pacientes cirróticos²⁹. Na análise da frequência de sangramento em função dos valores de corte dos testes convencionais de coagulação (AP < ou > 50% e contagem de plaquetas < ou > $50 \times 10^3 \text{mm}^3$), observou-se que a hemorragia ocorreu em 5/77 daqueles com *cutt-off* seguro e em 2/18 daqueles com *cutt-off* de risco, diferença que não foi estatisticamente significativa²⁹.

Como a geração de trombina depende da contagem de plaquetas, tornam-se necessários dados relativos ao risco de sangramento de acordo com diferentes valores de corte da contagem de plaquetas, bem como da sua função, aspectos que não foram avaliados no citado estudo.

Nesse sentido, não há definição quanto à melhor opção terapêutica para pacientes com cirrose descompensada e coagulopatia. De fato, em todas as versões dos consensos de Baveno, não se mencionam dados acerca dos valores dos parâmetros de coagulação que seriam mais seguros para a realização do tratamento endoscópico²⁵. Os dados disponíveis na literatura são insuficientes para estabelecer qualquer recomendação²⁶.

1.7. Hipótese do estudo

O sangramento pela queda da escara após LE é considerado baixo, no entanto quando ocorre possui alta letalidade. Esse risco pode ser atribuído ao grau de disfunção hepática, à magnitude da hipertensão portal e aos distúrbios de coagulação presentes na cirrose. Existe controvérsia sobre a participação da coagulopatia, particularmente a plaquetopenia, no risco de sangramento. A principal razão fisiopatológica para isso refere-se a preservação da capacidade funcional das

plaquetas devido o aumento dos níveis circulantes do FVW e diminuição da proteinase ADAMTS13, que o degrada. No entanto, esses dados se referem ao comportamento das plaquetas em testes *in vitro*, não estando claro se haveria manutenção dessa compensação em condições *in vivo*.

No presente estudo caracterizamos a capacidade de adesão e agregação das plaquetas em condições que simulam o fluxo sanguíneo e correlacionamos esses resultados como risco de sangramento após LE. Nossa hipótese foi que mesmo pacientes com plaquetopenia grave apresentariam preservação da capacidade funcional das plaquetas e por isso não haveria aumento significativo do risco de sangramento.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Descrever a função plaquetária em pacientes com cirrose e a relação com a ocorrência do sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Critérios de inclusão

- Idade acima de 18 anos;
- Pacientes com cirrose e varizes de esôfago com indicação de ligadura elástica eletiva;
- Concordância em participar do estudo.

3.1.2. Critérios de exclusão

- Insuficiência renal aguda ou crônica com uremia ou necessidade de diálise;
- Carcinoma hepatocelular;
- Sangramento por varizes gástricas ou de outras etiologias;
- Antecedente de mais de duas sessões de tratamento endoscópico (ligadura ou esclerose);
- Portadores de TIPS;
- Pacientes em uso de drogas anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários ou qualquer droga que interfira com a coagulação;
- Doenças pulmonares e cardíacas graves que contra-indiquem a endoscopia;
- Gestação.

3.2. Métodos

3.2.1. Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo prospectivo em que pacientes com cirrose foram avaliados quanto aos parâmetros relacionados à função plaquetária: número de plaquetas, adesão e agregação plaquetária (SC e AS), antígeno e atividade do FVW, proteinase ADAMTS13, P-selectina por citometria e P-selectina solúvel; quando tinham indicação de ligadura elástica de varizes de esôfago por profilaxia primária ou secundária de sangramento.

3.2.2. Período e local do estudo

A inclusão dos pacientes foi realizada no período de fevereiro de 2013 a maio de 2015 na Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. As dosagens foram executadas no Laboratório de Hemostasia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2.3. Testes relacionados à função plaquetária

A rigor, o termo teste de função plaquetária refere-se apenas aos exames que analisam a adesão e agregação das plaquetas, porém, para facilitação do entendimento no contexto desse estudo, optamos englobar também nessa designação os fatores plasmáticos que interferem na atuação das plaquetas (FVW, ADAMTS13 e P-selectina).

À exceção do teste de número de plaquetas, cujo resultado foi obtido na rotina laboratorial clínica de acompanhamento do paciente, todos os outros testes foram realizados a partir de uma coleta específica para essa finalidade. As amostras de sangue foram coletadas no momento da sessão inicial de ligadura elástica através de uma venopunção antecubital. Utilizamos o tubo de coleta siliconizado contendo citrato de sódio 3,2% tamponado. A proporção sangue/anticoagulante foi 9/1. Houve especial cuidado para a coleta não ser traumática e o garroteamento não ultrapassar um minuto. A amostra foi encaminhada ao laboratório no prazo máximo de uma hora.

- a) Contagem de plaquetas - método automatizado por impedanciometria ou densidade óptica de sangue coletado em tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).
- b) Teste de função plaquetária (Impact-R[®]) – O equipamento Impact-R[®] - *cone and plate(let) analyzer (CPA) Technology*, Diamed (Cressier, Suíça) é um dispositivo que analisa a adesão e agregação plaquetária.

Figura 2 - Aparelho Diamed Impact-R®

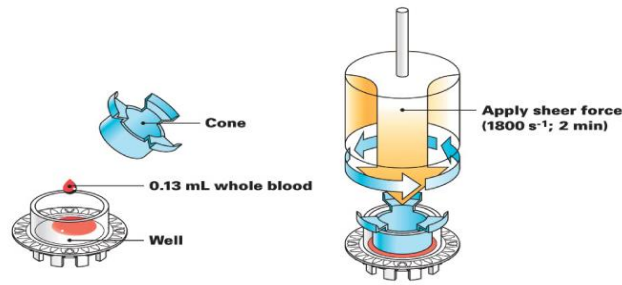


Técnica - Teste totalmente automatizado, rápido (seis minutos), que utiliza 0,13 mL de sangue de sangue total citratado. A amostra é colocada no poço de poliestireno e o aparelho de cone e placa induz o fluxo laminar com uma taxa de cisalhamento aplicada de 720rpm por 120s uniforme sobre a superfície da placa coberta pelo cone rotativo que mimetiza o fluxo sanguíneo arterial. As proteínas plasmáticas são imediatamente imobilizadas na superfície inferior do cone e formam uma superfície sobre a qual apenas as plaquetas se aderem e agregam. Após a retirada do excesso de sangue realiza-se a coloração, por um minuto, com solução azul de metileno de May Grunwald, com a retirada de excesso em seguida.

Figura 3 - Cones e placas



Figura 4 - Esquema cone e placa.



Quando a placa encontra-se seca, o equipamento realiza uma sequência de captação de imagens para a análise da adesão e agregação de plaquetas. O *software* permite o armazenamento das imagens de cada análise e registros de uma série de parâmetros, como cobertura da superfície, incluindo, tamanho médio e um histograma de distribuição das plaquetas aderidas.

Interpretação dos resultados – Os valores de referência são: maior que 7,5% para a superfície coberta (SC) e maior que $25\mu\text{m}^2$ para o tamanho da área coberta (AS)¹⁹.

Figura 5 - Representação do resultado e histograma do teste de função plaquetária

Impact-R

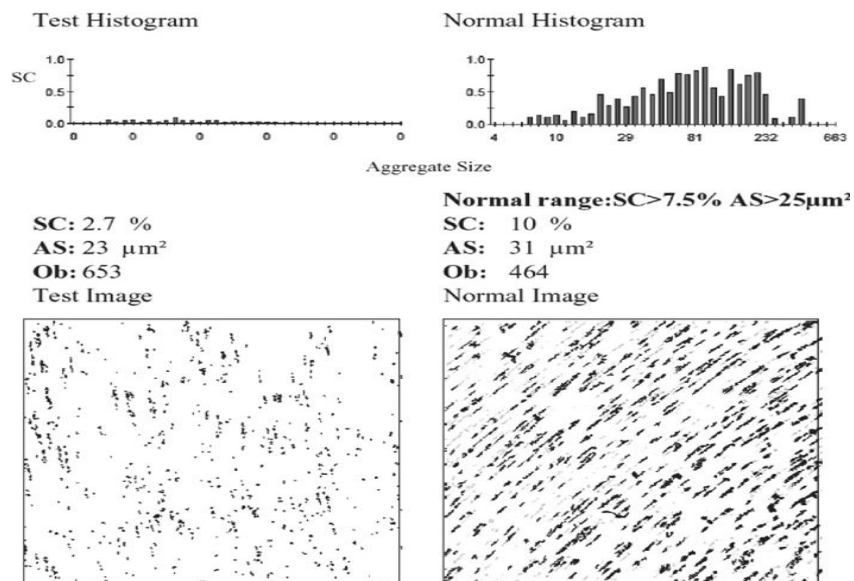


Figura 5 - Modelo do resultado do exame Impact-R em que temos à esquerda a representação da amostra testada apresentando os valores obtidos após o cálculo efetuado pelo *software* a partir da imagem obtida pelo aparelho representada na porção inferior. À direita mostra-se um exame controle com valores e imagem consideradas normais.

- c) Dosagem do fator de von Willebrand - Antígeno: Foi utilizado o método de imunoensaio automatizado pelo Sistema de Coagulação de IL (*Instrumentation Laboratory*) - *HemosIL® Werfen Company* (Lexington, Massachusetts, EUA) para determinação quantitativa do antígeno do FVW em plasma citratado por turbidimetria de partículas de látex. São considerados valores normais: FVWag: 42 - 176%.

- d) Dosagem do fator de von Willebrand - Atividade: Imunoensaio automatizado pelo Sistema de Coagulação de IL (*Instrumentation Laboratory*) - *HemosIL® Werfen Company* (Lexington, Massachusetts, EUA) para determinação quantitativa da atividade do FVW em plasma citratado por turbidimetria de partículas de látex. São considerados valores normais: FVWativ: 40 - 165%.

- e) Dosagem de ADAMTS13: utilizamos o teste *Technozym® ADAMTS13 activity ELISA* da Technoclone (Viena, Áustria) que determina a atividade do ADAMTS13 no plasma humano citratado. Valor de referência: 40 -130%.

- f) Dosagem da P-Selectina: utilizamos a técnica de citometria de fluxo utilizando teste *CD62P (P-selectina) PE (Phytoeritrina) mouse anti-human* BD Pharmingen (BD Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) para determinação do percentual de P-selectina ativada. Valor de referência: $34,9 \pm 2,32\%$ em indivíduos não cirróticos.

- g) Dosagem de P-selectina solúvel: realizado através da técnica de imunoensaio ELISA *Kit Humans P-selectin* da Invitrogen® Corporation (Carlsbad, Califórnia, EUA) que determina quantitativamente o nível de P-selectina no plasma humano. Considera-se valor normal resultados entre 92 – 212ng/mL.

3.2.4. Técnica de realização do tratamento endoscópico

As sessões de ligadura foram repetidas a cada duas a quatro semanas até a erradicação das varizes de esôfago conforme rotina do serviço e o consenso internacional de Baveno V.

A ligadura elástica foi realizada utilizando kit de seis anéis elásticos, fabricado pela companhia Cook Medical® (Bloomington, Indiana, EUA). Os anéis foram aplicados nas varizes, a partir de dois centímetros acima da transição esôfago-gástrica, segundo a técnica convencional.

3.2.5. Tratamentos concomitantes

Foram permitidos todos os tratamentos concomitantes ou adicionais necessários do ponto de vista clínico (p.ex. laxantes, antibióticos, insulina, diuréticos), conforme julgamento do médico assistente do paciente.

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

3.2.6. Avaliação dos pacientes

Todos os pacientes foram submetidos a uma entrevista com o preenchimento de um formulário de caracterização clínica precedendo a coleta da amostra de sangue. Os prontuários de cada paciente foram revisados para caracterização dos seguintes aspectos:

- a) Idade;
- b) Sexo;
- c) Etiologia da doença hepática;
- d) Estadiamento de Child-Pugh;
- e) MELD;
- f) Profilaxia primária ou secundária;
- g) Características endoscópicas das varizes (tamanho e sinais vermelhos);
- h) Parâmetros laboratoriais gerais: plaquetas, hemoglobina, hematócrito, creatinina, aminotransferases, bilirrubina, albumina e INR;
- i) Ocorrência de sangramento nos 30 dias subsequentes à ligadura.

3.2.7. Avaliação do desfecho

Sangramento varicoso decorrente da queda da escara da ligadura em até quatro semanas após o procedimento, confirmado por endoscopia digestiva alta.

3.2.8. Seguimento ambulatorial

O paciente manteve seu acompanhamento clínico de rotina durante o período de seguimento sendo especificamente avaliado quanto à ocorrência de sangramento digestivo.

3.2.9. Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas e estudos de associação (teste de independência qui-quadrado para as variáveis categóricas e teste de correlação para as contínuas). Foram consideradas diferenças significantes p-valor menor do que 0,05. A *odds ratio*, bem como o intervalo de confiança de 95% foram calculados.

Utilizamos como ferramenta para confecção do banco de dados a planilha *Microsoft Excel*[®], versão 2010 (Redmond, Washington, EUA). Para a análise estatística utilizamos os programas estatísticos *GraphPad InStat*, versão 3.06 e *GraphPad Prism*, versão 4.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, California, EUA).

3.2.10. Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki e após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq com o número 248.035 de 17/04/2013.

Cada paciente recebeu explicações claras sobre o estudo. Obtivemos a assinatura do consentimento informado de cada paciente, por escrito, antes da inclusão.

4. RESULTADOS

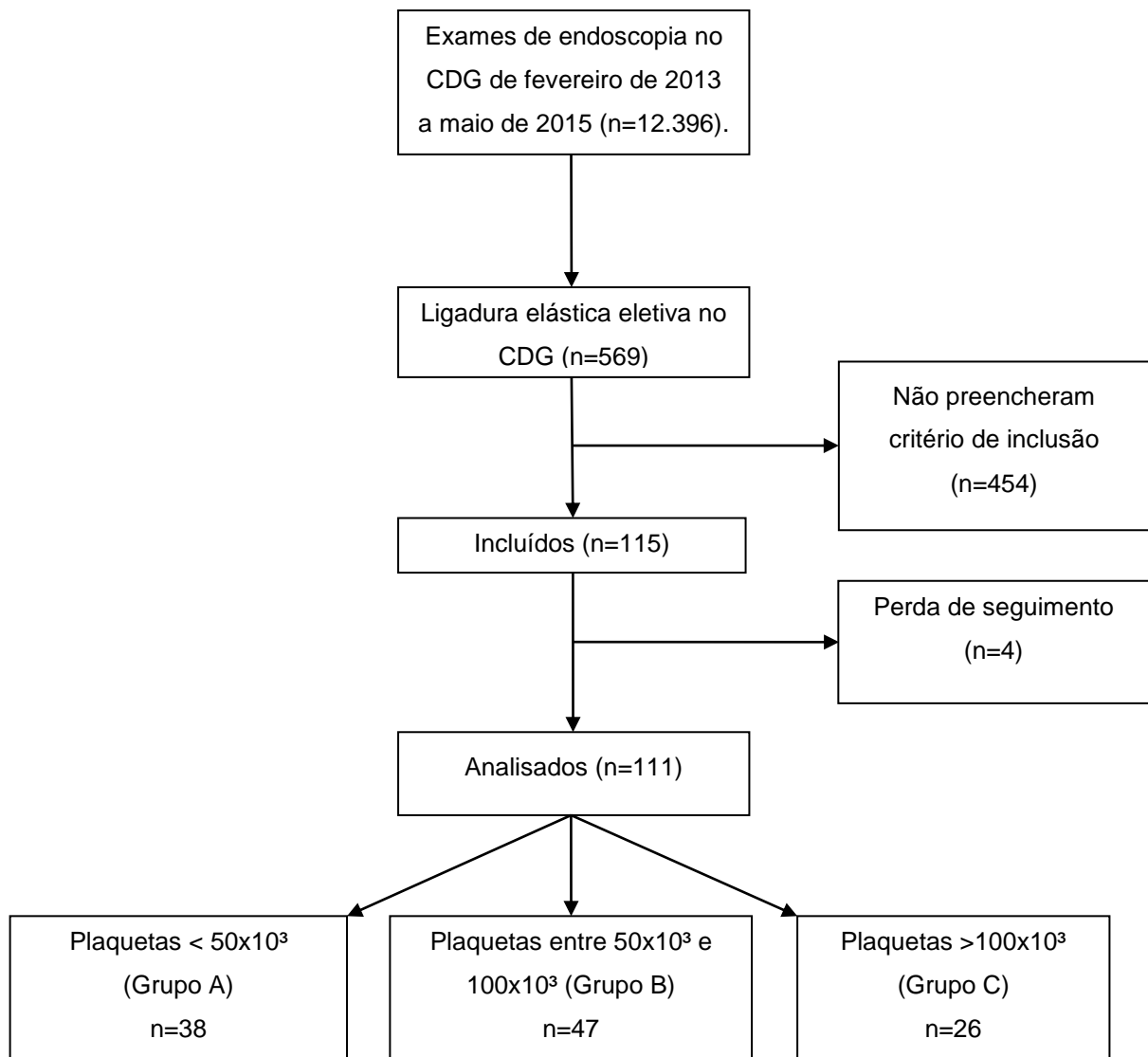
4. RESULTADOS

4.1. Inclusões e características basais dos pacientes

No período de 2013 a 2015 foram selecionados 111 pacientes e divididos em grupos de acordo com a contagem de plaquetas, conforme discriminado a seguir:

- Grupo A - pacientes com plaquetas abaixo de $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 38; 34,2%);
- Grupo B - pacientes com plaquetas entre $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 47; 42,4%);
- Grupo C - pacientes plaquetas acima de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$ (n = 26; 23,4%).

Figura 6 - Fluxograma de inclusão



Na avaliação das características basais dos pacientes, os três grupos não diferiram significativamente em relação ao sexo, etiologia da doença hepática e grau de disfunção hepática. Os dados estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Características basais dos pacientes, etiologia e grau de disfunção hepática

| | Total n=111 (%) | Grupo A Plaquetas <50x10 ³ n = 38 | Grupo B Plaquetas entre 50 e 100x10 ³ n = 47 | Grupo C Plaquetas >100x10 ³ n = 26 | p |
|-------------------------|-----------------------------|---|---|--|-------|
| Sexo masculino | 66 (59,4) | 27 (71,0) | 24 (51,0) | 15 (57,7) | 0,172 |
| Idade (média em anos) | 54,1 ± 9,8 [52,3 - 55,9] | 52,3 ± 11,8 [48 - 56] | 55,7 ± 8,6 [53 - 58] | 53,8 ± 7,9 [50 - 57] | 0,041 |
| Etiologia: | | | | | |
| Alcoólica | 25 (22,5) | 10 (26,3) | 9 (19,2) | 6 (23,0) | |
| Viral | 40(36,0) | 10 (26,3) | 22 (46,8) | 8 (30,8) | 0,376 |
| Não alcoólica/não viral | 46 (41,5) | 18 (47,4) | 16 (34,0) | 12 (46,2) | |
| Child-Pugh | | | | | |
| A | 60 (54,0) | 17 (44,7) | 25 (53,2) | 18 (69,2) | |
| B | 40 (36,0) | 15 (39,5) | 19 (40,4) | 6 (23,1) | 0,270 |
| C | 11 (10,0) | 6 (15,8) | 3 (6,4) | 2 (7,8) | |
| MELD | 13 ± 3,6 [12-14] | 13,4 ± 3,7 [12 - 14] | 12,9 ± 3,2 [12-14] | 11,9 ± 3,9 [10-13] | 0,120 |

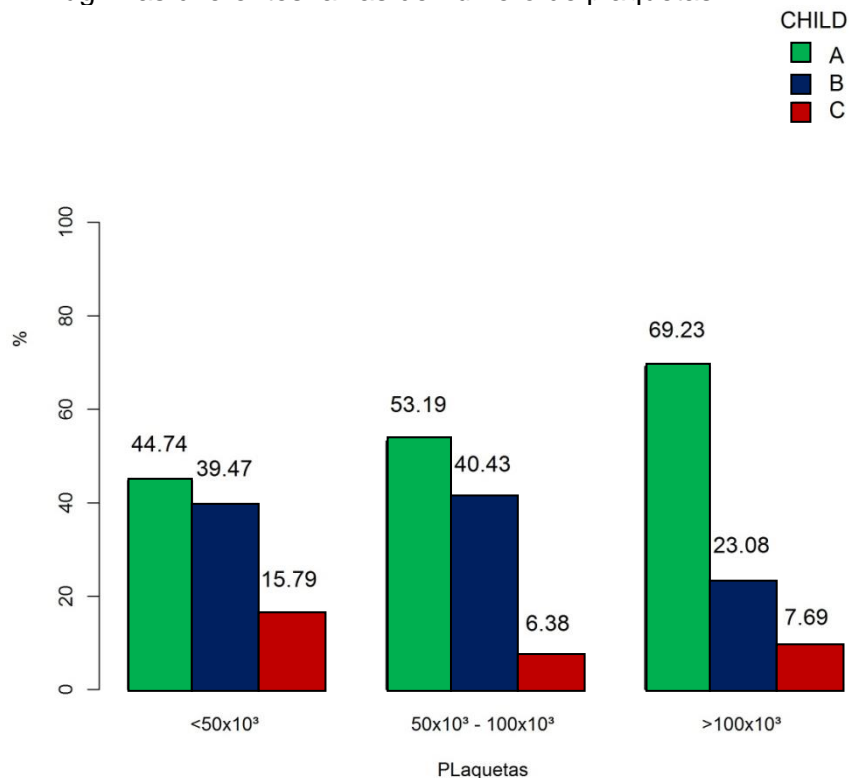
4.2. Etiologia da cirrose

A distribuição da etiologia da cirrose foi: infecção pelo vírus C (n = 34; 30,6%), criptogênica (n = 32; 28,8%), alcoólica (n = 25; 22,6%), doença hepática gordurosa não alcoólica (n = 7; 6,3%), infecção pelo vírus B (n = 4; 3,6%), cirrose biliar secundária (n = 3; 2,7%), coinfeção B e C (n = 2; 1,8%), colangite biliar primária (n = 2; 1,8%), colangite esclerosante primária (n = 1; 0,9%) e hepatite autoimune (n = 1; 0,9%).

4.3. Gravidade da cirrose

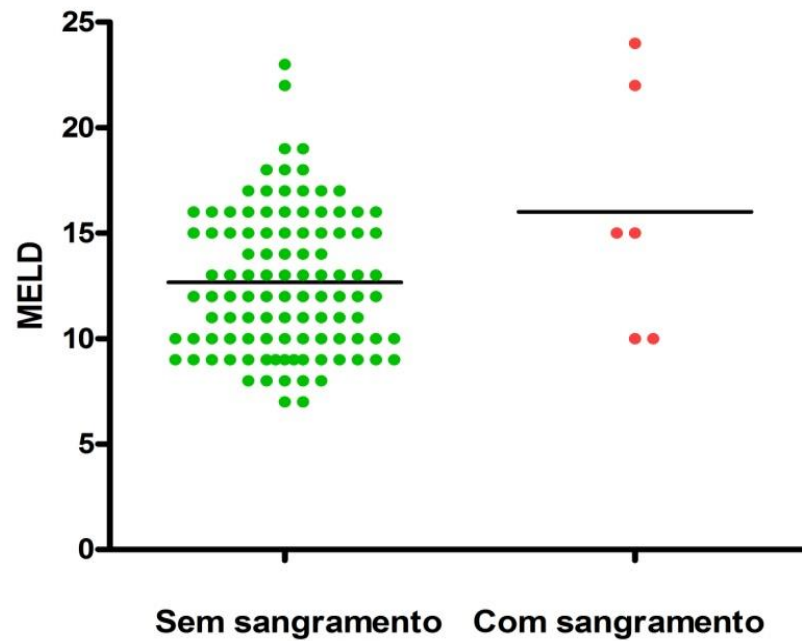
De acordo com o grau de disfunção hepática, nossa causística foi composta por: Child A (n = 60; 54%), Child B (n = 40; 36%) e Child C (n = 11; 10%). Comparando-se os grupos em relação ao grau de disfunção hepática através da classificação Child-Pugh e MELD, não encontramos diferença estatisticamente significativa. Na figura 7 encontramos a distribuição de acordo com o Child nos grupos divididos pelo número de plaquetas.

Figura 7 - Distribuição percentual dos pacientes de acordo com a classificação Child-Pugh nas diferentes faixas de número de plaquetas



O valor médio do MELD global foi $13 \pm 3,6$ e quando comparamos os pacientes entre aqueles sem ($n = 105$) e com sangramento ($n = 6$) encontramos diferença significativa ($12,6 \pm 3,3$ versus $16 \pm 5,9$, $p = 0,025$), representada na figura 8.

Figura 8 - Resultado do MELD comparando-se entre os pacientes sem e com sangramento após a LE



4.4. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Em relação aos exames laboratoriais houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros hemoglobina ($p = 0,04$) e bilirrubinas ($p = 0,009$), como observamos na tabela 2.

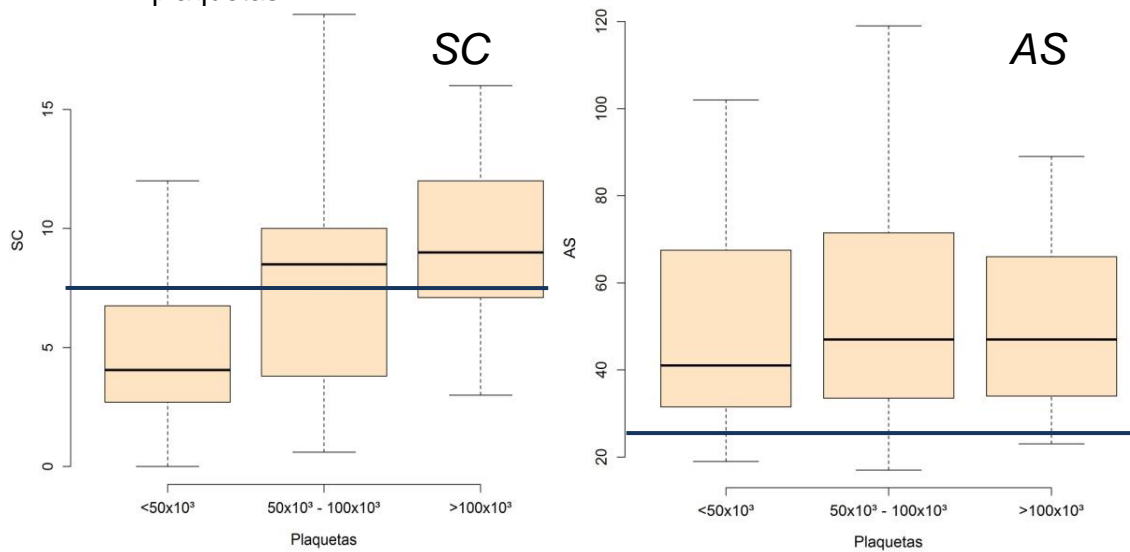
Tabela 2 - Características laboratoriais dos pacientes

| | Total n=111 | Grupo A Plaquetas <50x10 ³ n = 38 | Grupo B Plaquetas entre 50 e 100x10 ³ n = 47 | Grupo C Plaquetas >100x10 ³ n = 26 | p |
|--------------|---------------------------|---|---|--|-------|
| Hemoglobina | 12,5 ± 2,1 [12,1-12,9] | 12,7 ± 1,9 [12,1 - 13,3] | 12,9 ± 2,1 [12,2 - 13,4] | 11,6 ± 2,2 [10,7 - 12,5] | 0,04 |
| Hematócrito | 37 ± 6 [36 - 38] | 36,9 ± 4,8 [35,3 - 38,5] | 37,9 ± 5,4 [36,3 - 39,5] | 35,0 ± 6,4 [32,4 - 37,6] | 0,10 |
| Creatinina | 0,91 ± 0,3 [0,85-0,97] | 0,89 ± 0,3 [0,80 - 0,99] | 0,87 ± 0,3 [0,79 - 0,95] | 1,0 ± 0,4 [0,82 - 1,1] | 0,47 |
| Albumina | 3,6 ± 0,6 [3,5 - 3,8] | 3,6 ± 0,5 [3,4 - 3,7] | 3,7 ± 0,6 [3,5 - 3,8] | 3,7 ± 0,6 [3,4 - 3,9] | 0,61 |
| INR | 1,4 ± 0,22 [1,3 - 1,4] | 1,4 ± 0,26 [1,3 - 1,5] | 1,34 ± 0,19 [1,3 - 1,8] | 1,37 ± 0,21 [1,2 - 1,8] | 0,05 |
| Bilirrubinas | 2,0 ± 1,5 [1,7 - 2,3] | 2,1 ± 1,6 [1,6 - 2,6] | 2,2 ± 1,4 [1,7 - 2,6] | 1,5 ± 1,4 [0,9 - 2,1] | 0,009 |

4.5. Testes de relacionados à função plaquetária

Na análise dos exames relacionados à função plaquetária encontramos no teste de adesão e agregação plaquetária (Impact-R®) que a superfície de adesão (SC) foi de $7 \pm 4\%$ e tamanho do agregado (AS) de $52 \pm 24\mu\text{m}^2$, representados na figura 9. Valor de referência: SC = 7,5% e AS = $25\mu\text{m}^2$. Na avaliação do FVW o valor encontrado foi de $369 \pm 157\%$ para o antígeno e $336 \pm 149\%$ para atividade. Referência: atividade: 38-176% e antígeno: 40-157%. O valor da ADAMTS13 foi $73 \pm 24\%$ (valor normal: 40 - 130%). Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação aos resultados dos testes relacionados à função plaquetária, conforme detalhadamente descritos na tabela 3.

Figura 9 - Resultado do SC e AS de acordo com os grupos divididos pelo número de plaquetas



A dosagem do antígeno e atividade do FVW mostraram-se acima do valor de referência em todos os grupos e na comparação entre eles não houve diferença significativa (antígeno $p = 0,926$; atividade $p = 0,870$).

Tabela 3 - Resultados dos testes relacionados à função plaquetária de acordo com os grupos divididos pelo número de plaquetas

| | Grupo A Plaquetas <50x10 ³ n = 38 | Grupo B Plaquetas entre 50 e 100x10 ³ n = 47 | Grupo C Plaquetas >100x10 ³ n = 26 | p |
|---|---|--|---|--------|
| Superfície de adesão (%) | 4,9 ± 3 [3,9-5,9] | 7,7 ± 4,6 [6,3-9,1] | 9,1 ± 3,6 [7,6-10,6] | 0,0002 |
| Tamanho do agregado plaquetários (µm ²) | 49,9 ± 22,4 [42,3-57,5] | 55,1 ± 26,6 [47,1-59,9] | 51,3 ± 20 [42,8-59,9] | 0,599 |
| Antígeno do FVW (%) | 365 ± 151 [311-420] | 365 ± 132 [325-405] | 379 ± 203 [295-464] | 0,926 |
| Atividade do FVW (%) | 329 ± 151 [279 -379] | 333 ± 134 [293-373] | 349 ± 175 [276-421] | 0,870 |
| ADAMTS13 (%) | 65 ± 23,8 [56,9-74,4] | 77,9 ± 22 [70,8-85] | 67,2 ± 29 [54,4-80] | 0,080 |

Em 19 pacientes selecionados aleatoriamente, avaliamos a P-selectina por citometria (CD62P). Os valores médios foram $37,8 \pm 23\%$ (variação: 26 – 49), sendo a referência normal: $34,9 \pm 2,32$. A dosagem de P-selectina solúvel foi realizada em 22 pacientes cujo resultado foi $182,3 \pm 86$ ng/mL (variação: 144 – 220), o valor de referência é 92 - 212ng/mL. Nenhum desses pacientes apresentou sangramento após ligadura.

Como a geração de trombina é crítica quando as plaquetas estão abaixo de $56 \times 10^3/\text{mm}^3$, utilizamos este ponto de corte para comparar os testes funcionais das plaquetas. Cinquenta e dois (46,8%) pacientes apresentavam plaquetas menores que $56 \times 10^3/\text{mm}^3$ e 59 (53,2%) pacientes, valores maiores que $56 \times 10^3/\text{mm}^3$. Esses pacientes foram comparados em relação aos parâmetros funcionais das plaquetas.

Não encontramos diferenças significativas nos parâmetros: agregado plaquetário ($p = 0,294$), antígeno e atividade do FVW ($p = 0,880$ e $0,499$, respectivamente) e atividade do ADAMTS13 ($p = 0,372$). Como esperado houve diferença estatisticamente significativa apenas em relação à superfície de adesão ($5,6 \pm 3,9$ versus $8,4 \pm 4,0$, $p = 0,0004$), parâmetro que reflete diretamente a contagem de plaquetas. Esses dados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados dos testes relacionados à função plaquetária de acordo com o corte no número de plaquetas de $56 \times 10^3/\text{mm}^3$

| | Plaquetas $<56 \times 10^3/\text{mm}^3$ n=52 | Plaquetas $>56 \times 10^3/\text{mm}^3$ n=59 | p |
|---|---|---|--------|
| Superfície de adesão (%) | $5,6 \pm 3,9$ [4,5 - 6,7] | $8,4 \pm 4,0$ [7,3 - 9,5] | 0,0004 |
| Tamanho do agregado plaquetário (μm^2) | $49,9 \pm 23,1$ [46,3 - 56,5] | $54,8 \pm 24,3$ [48,2 - 61,4] | 0,294 |
| Antígeno do FVW (%) | 366 ± 140 [324 - 408] | 371 ± 169 [325 - 416] | 0,880 |
| Atividade do FVW (%) | 325 ± 140 [286 - 364] | 344 ± 157 [303 - 386] | 0,499 |
| ADAMTS13 (%) | $68,8 \pm 23,3$ [61,6 - 76,0] | $73,5 \pm 26,2$ [66,0 - 80,9] | 0,372 |

4.6. Características das varizes, tipo de profilaxia e sangramento após LE

A presença de sinais vermelhos à endoscopia ocorreu em 83 (74%) do total de pacientes. Na distribuição entre os grupos observamos: grupo A: 27 (71%), grupo B: 34 (72%) e no grupo C: 22 (85%), com $p = 0,418$.

A gastropatia hipertensiva foi observada em 106 (95%) pacientes. Estava presente em todos os seis pacientes que tiveram sangramento e em todos do grupo C. O grupo A apresentou 92,1% dos pacientes com gastropatia hipertensiva e o grupo B: 95,7%.

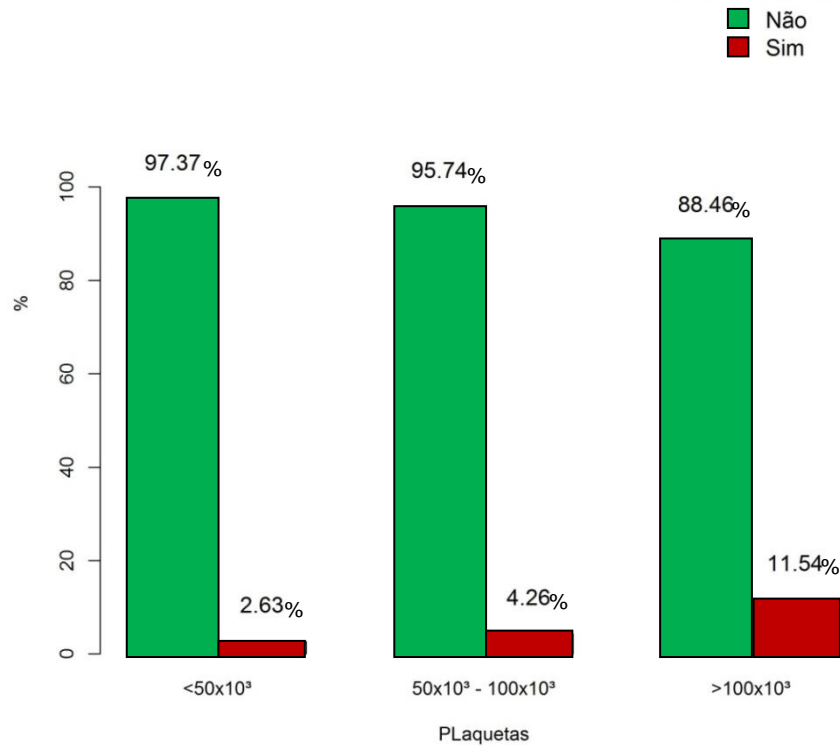
A maioria dos pacientes (58,5%) foi submetida à LE para profilaxia primária de sangramento de varizes, sendo 24 (63,1%) no grupo A, 27 (57,4%) no grupo B e 14 (53,9%) no grupo C. A média do número de sessões de endoscopia com ligadura elástica até erradicação das varizes foi de $2,4 \pm 1,7$. Dados apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Características das varizes, indicação de LE, número de sessões e ocorrência de sangramento após tratamento endoscópico.

| | Total n=111 (%) | Grupo A Plaquetas <50x10 ³ n = 38 | Grupo B Plaquetas entre 50 e 100x10 ³ n = 47 | Grupo C Plaquetas >100x10 ³ n = 26 | p |
|---------------------------|------------------------|---|---|--|-------|
| Sinais vermelhos | 83 (74) | 27 (71) | 34 (72) | 22 (85) | 0,418 |
| Gastropatia hipertensiva | 106 (95) | 35 (92,1) | 45 (95,7) | 26 (100) | 0,279 |
| Profilaxia Primária | 65 (58,5) | 24 (63,1) | 27 (57,4) | 14 (53,9) | 0,743 |
| Profilaxia Secundária | 46 (41,5) | 14 (36,9) | 20 (42,6) | 12 (46,1) | 0,743 |
| Número de sessões | 2,4 ± 1,7 [2 - 2,7] | 1,9 ± 0,9 [1,6 - 2,2] | 2,5 ± 1,4 [2,1 - 2,9] | 2,6 ± 2,5 [1,5 - 3,5] | 0,226 |
| Ocorrência de sangramento | 6 (5,4) | 1 (2,6) | 2 (4,3) | 3 (11,5) | 0,316 |

Ocorreu sangramento após ligadura elástica de varizes esofagianas em seis (5,4%) pacientes, sendo duas ocorrências no grupo A, uma no grupo B e três no grupo C ($p = 0,31$). Representado em porcentagem na figura 10.

Figura 10 - Ocorrência de sangramento nos grupos divididos pelo número de plaquetas



Quando analisamos os achados dos exames relacionados a função plaquetária em relação à ocorrência de sangramento após LE, não encontramos diferença significativa em nenhum dos parâmetros estudados, conforme descrito na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados dos testes relacionados à função plaquetária nos pacientes sem e com sangramento

| | Total n=111 | Sem sangramento n=105 | Com sangramento n=6 | p |
|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|
| Superfície de adesão (%) | 7,0 ± 4,0 [6,0 - 8,0] | 7,1 ± 4,0 [6,3 - 7,9] | 7,2 ± 6,2 [0,6 - 13,7] | 0,967 |
| Tamanho do agregado plaquetário (μm^2) | 52,0 ± 24,0 [48,0 - 57,0] | 52,7 ± 23,7 [47,9 - 57,4] | 48,5 ± 26,2 [20,9 - 76,0] | 0,678 |
| Antígeno do FVW (%) | 369 ± 157 [338 - 400] | 371 ± 160 [339 - 403] | 331 ± 69 [245 - 416] | 0,577 |
| Atividade do FVW (%) | 336 ± 149 [307 - 364] | 338 ± 153 [308 - 368] | 298 ± 69 [225 - 371] | 0,527 |
| ADAMTS13 (%) | 73 ± 24 [68 - 79] | 71 ± 25 [66 - 77] | 70 ± 17 [43 - 97] | 0,929 |

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO:

No presente estudo tivemos a intenção de descrever e analisar uma situação rotineira do acompanhamento clínico de pacientes com cirrose, que é a necessidade de avaliar o risco de sangramento após procedimentos invasivos. Escolhemos pacientes candidatos à ligadura elástica eletiva como tema do estudo. Nesses pacientes o risco de sangramento estaria relacionado à combinação da gravidade da insuficiência hepática, grau de hipertensão portal e a presença de coagulopatia.

Nesse trabalho caracterizamos a capacidade de adesão e agregação das plaquetas e relacionamos esses resultados com o risco de sangramento após LE. Quando os pacientes foram estratificados segundo o número de plaquetas, não encontramos diferença significativa nos parâmetros funcionais plaquetários, indicando preservação da capacidade hemostática.

Quando avaliamos o parâmetro SC encontramos valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) nos grupos estudados. Esses resultados são esperados e compatíveis com a plaquetopenia, já que esse parâmetro representa uma forma de descrever quantitativamente as plaquetas, uma vez que a SC é diretamente proporcional à contagem de plaquetas. Deste modo, pacientes com baixa contagem de plaquetas apresentam valores menores na superfície em que ocorre a adesão.

Na análise do tamanho do agregado plaquetário (AS) observamos valores dentro da faixa de normalidade independente do nível da plaquetopenia, além de não haver diferença estatística entre os grupos. Tal resultado indica que apesar da plaquetopenia, a adesão e agregação plaquetária está mantida na população estudada, provavelmente resultado da eficácia dos mecanismos compensatórios e consequente manutenção do funcionamento normal das plaquetas na hemostasia. Esse resultado nos faz refletir sobre a dificuldade em prever distúrbios hemorrágicos com a simples observação do número absoluto de plaquetas do sangue periférico.

A manutenção da capacidade de agregação plaquetária na cirrose e a dinâmica relação entre o FVW e ADAMTS13 foi demonstrada por Lisman *et al* em 2006. Em uma coorte de 54 pacientes com cirrose de diversas etiologias, o autor descreveu os níveis elevados de FVW e a redução do ADAMTS13 nas diferentes faixas de gravidade da doença. Ainda nesse estudo foi realizado um importante experimento de adesão plaquetária utilizando três pacientes e três controles

saudáveis. O pesquisador isolou o plasma e plaquetas desses pacientes e reconstituiu os elementos sanguíneos em combinações específicas para submetê-los ao exame de adesão plaquetária em situação que mimetiza o fluxo sanguíneo. Com isso, demonstrou que a adesão plaquetária foi significativamente maior quando esse elemento figurado foi tratado com plasma de paciente com cirrose. Concluiu que a adesão, além de preservada, estava fortemente relacionada ao valor elevado do FVW. Apesar de utilizar um método diferente do que utilizamos em nosso trabalho para avaliação da adesão plaquetária, o autor encontrou preservação da função plaquetária com importante correlação com altos níveis de FVW, demonstrando ser esse um dos principais fatores de compensação da plaquetopenia. Além disso, seu resultado demonstrou que o FVW estava globalmente elevado e progressivamente mais altos à medida da severidade da doença hepática (FVW antígeno: Child A: 380%; Child B: 500%; Child C: 760%; controle: 107%; $p < 0,001$)¹⁰.

Nossos resultados demonstraram que tanto o antígeno quanto a atividade do FVW foram elevados nos três grupos de pacientes. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre eles, sinalizando que independente do nível de plaquetopenia esse mecanismo de compensação foi presente uniformemente nessa população estudada. Esse resultado corrobora estudos anteriores que demonstraram a elevação do FVW em pacientes com cirrose. Em 1996 Ferro *et al* publicou um experimento no qual relacionou a elevação dos níveis de FVW com endotoxinas e concluiu que o aumento do FVW está fortemente atribuído às perturbações endoteliais e endotoxemia presentes nesses doentes³¹.

O ADAMTS13 é uma proteinase que cliva o FVW em múltiplos de menor potencial de indução da agregação e adesão plaquetária. Em nossa casuística encontramos a sua dosagem sérica dentro da faixa de normalidade em todos os grupos e não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Quando dividimos a coorte em faixas de plaquetas menor e maior que $56 \times 10^3 / \text{mm}^3$, encontramos valores menores naqueles com plaquetopenia mais intensa, porém ainda dentro da faixa de normalidade. Houve variação dos resultados quando analisadas nos grupos de acordo com o número de plaquetas, em que o grupo B apresentou valores superiores ao grupo A e C. Não encontramos uma justificativa técnica plausível para esse resultado, mas tal observação também foi feita no estudo de Lisman citado anteriormente. Há na literatura controvérsia sobre a validade da

dosagem de ADAMTS13 para prática clínica, já que há discrepância de resultados entre os testes disponíveis. Alterações leves a moderadas do seu nível sérico parecem não ser bem detectadas ao teste disponível³².

A P-selectina, dosada em alguns pacientes selecionados aleatoriamente, resultou em valor ligeiramente acima da referência naqueles casos avaliados por citometria de fluxo, denotando maior taxa de ativação plaquetária. A P-selectina solúvel, que é dosada por ensaio ELISA, resultou em valor dentro da faixa normal de referência para controles saudáveis. Existem múltiplos fatores que influenciam a quantidade de P-selectina e as informações sobre a relação entre doença hepática e P-selectina são escassas. Em 2003, Tacke *et al* dosou a P-selectina em 111 pacientes com doenças hepáticas crônicas e encontrou valores significativamente elevados nos doentes (mediana: 56 ng/ml) em comparação com os controles (n = 38, mediana: 20ng/ml, intervalo, p < 0,001), entretanto, não relacionou esse achado à eventos hemorrágicos ou trombóticos³³. Em 2007 Verdareli *et al* encontrou valores de P-selectina solúvel significativamente mais elevados (p < 0,01) em 40 pacientes com cirrose em relação aos 10 pacientes controles, além disso detectou que aqueles com plaquetopenia mais grave tinham maiores valores de P-selectina solúvel³⁴. Na mesma linha de pesquisa, Xianghong *et al* comparou 32 pacientes com cirrose ao grupo controle com 20 indivíduos. A P-selectina (CD62P) dosada por citometria de fluxo foi significativamente mais elevada nos pacientes com cirrose (CD62P = 11,8% versus 2,74; p < 0,05). Estratificados pelo Child-Pugh, o resultado demonstrou valores progressivamente mais altos à medida que a doença hepática tornou-se mais grave (Child A, n = 12: 6,68%; Child B, n = 10: 9,2%; Child C, n = 10: 20,6%; p < 0,05). Ainda nesse estudo, comparou-se pacientes que não apresentaram sangramento (n = 26; CD62P: 24,79%) com aqueles que sangraram do trato digestivo superior (n = 6; CD62P: 8,85%) com p < 0,05³⁵.

Quando comparamos os pacientes sem e com sangramento após LE, encontramos diferença estatisticamente significante no escore MELD (média: 12,6 versus 16, p = 0,025). Informações da literatura sugerem que a gravidade da doença influencia na probabilidade de sangramento de varizes esofagianas^{36,37}. No estudo de Sinclair *et al* de 2015, o MELD foi o fator que mais se relacionou ao risco de sangramento após LE tanto profilática como na vigência de sangramento agudo²⁸. Nossos resultados sugerem que o MELD também pode predizer o risco de sangramento por queda da escara após LE eletiva. Entretanto, não fica claro qual é

o peso desse achado frente às alterações hemostáticas na composição do risco de sangramento. Além disso, sabemos que há fatores que comprovadamente interferem no desequilíbrio da hemostasia e na chance global de fenômenos hemorrágicos como a uremia e infecção³⁸⁻⁴¹. Para evitar a interferência desses aspectos na avaliação da nossa população, colocamos nos critérios de exclusão a uremia e infecção bacteriana vigente.

Em relação a classificação Child-Pugh encontramos 60 pacientes (54%) classificados como Child A e 51 (46%) como Child B ou C. Encontramos no grupo com plaquetas $< 50 \times 10^3$, uma maior proporção de pacientes Child B e C (55,3%), ao contrário dos grupos com plaquetas $> 50 \times 10^3$ em que havia maior proporção de pacientes Child A. Esse achado é previsível e pode ser explicado pelo fato que a plaquetopenia tende a ser mais acentuada com a maior gravidade da doença hepática e intensidade da hipertensão portal.

A relação da gravidade da doença hepática e o risco de sangramento por ruptura de varizes é um fato embasado por importantes estudos. Em 1985 Garcia-Tsao *et al* avaliou 93 pacientes com cirrose de etiologia alcoólica e demonstrou que 15 pacientes sem varizes apresentavam o gradiente significativamente menor que aqueles com varizes (15.1 ± 6.8 mmHg versus 19.3 ± 4.8 mmHg; $p < 0.01$). Além disso, mostrou que o gradiente de pressão portal era maior nos 44 pacientes que tiveram sangramento varicoso ($20,4 \pm 5,1$ versus $16,0 \pm 5,2$; $p < 0,001$), e que em todos que sangraram o gradiente portal era maior que 12mmHg. Outro dado relevante desse estudo foi a relação positiva entre a presença de varizes de grosso calibre e o sangramento. A maioria dos pacientes que sangraram tinham varizes de grande volume (72%) ao contrário daqueles que não sangraram ($p < 0,01$)³⁶.

Mais recentemente, Wadhawan *et al* correlacionou o gradiente portal com o tamanho das varizes, Child e etiologia do doença hepática. Incluiu 176 pacientes e encontrou resultados semelhantes ao trabalho de Garcia-Tsao quanto ao tamanho da variz e ocorrência de sangramento naqueles com varizes de grande volume e com gradiente mais elevado. No entanto a informação adicional desse estudo é a correlação com o Child, um clássico parâmetro de classificação da gravidade da doença hepática. Comparando o gradiente de pressão portal entre aqueles classificados como Child A, B e C foram encontrados os valores $12,2 \pm 5,9$ mmHg; $17,4 \pm 6,9$ mmHg e $19,0 \pm 5,7$ mmHg ($p < 0,001$), respectivamente. Ainda nesse

estudo não foi encontrada uma diferença no gradiente portal relacionado à etiologia da hepatopatia³⁷.

Os parâmetros laboratoriais gerais mostraram-se semelhantes entre os grupos divididos pelo número de plaquetas. Apenas houve diferença significativa no valor da bilirrubina, que é um item relevante na caracterização da função hepática. Mesmo assim, a variação dos resultados foi pequena e não linear em relação ao nível da plaquetopenia. Podemos interpretar tal achado como resultante das características muito homogêneas dessa coorte.

A presença de sinais vermelhos e gastropatia hipertensiva em variados graus foi vista na maioria dos indivíduos e muito parecidos entre os grupos estudados. Esses achados são tipicamente encontrados nos pacientes com cirrose e hipertensão portal que apresentam varizes de maior volume. São tidos como indicadores de maior risco de sangramento por questões hemodinâmicas (grau de hipertensão portal) e o fato da nossa coorte ser homogênea em relação a esse parâmetro nos dá maior segurança em avaliar que o risco de sangramento é também homogêneo pelas características das varizes e hemodinâmicas⁴².

Em 2015 Sinclair *et al* revisou retrospectivamente 749 pacientes submetidos à LE, em que 609 foram exames para profilaxia de hemorragia e 140 em episódios de sangramento agudo. Encontrou o ressangramento por queda da escara em 21 indivíduos (2,8%) com mortalidade de 28% e em sua análise multivariada o único preditor significativo de sangramento foi a realização do procedimento por hemorragia aguda, além disso demonstrou que dentre aqueles que fizeram LE por profilaxia o MELD e a esofagite de refluxo puderam ser associadas ao risco de sangramento²⁸. Em um trabalho chinês de 2011, Liang *et al* estudou 342 pacientes submetidos à LE por profilaxia, encontrou uma taxa de hemorragia após LE de 7,6% e com a maioria ocorrendo entre o 7° e 13° dia. Nessa situação a mortalidade foi de 26,9%. Destacamos o fato de que houve mais sangramento entre os classificados com Child C, particularmente naqueles com ascite volumosa e com encefalopatia. Com relação às plaquetas, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,118$) entre aqueles sem sangramento ($n = 316; 121 \pm 77 \times 10^3/\text{mm}^3$) e com sangramento ($n = 26; 96 \pm 99 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os pesquisadores encontraram fatores independentes de aumento do risco de sangramento diferentes dos descritos anteriormente na literatura, destacando o volume da ascite, número de bandas elásticas aplicadas, variz de risco (grosso calibre e sinais vermelhos) e o

prolongamento do tempo de protrombina como fatores que merecem atenção na avaliação de risco de hemorragia⁴³.

No presente estudo tivemos sangramento após LE em apenas seis pacientes (5,4%), resultado compatível com dados de literatura^{28,44}. Apesar do número baixo de ocorrências limitar as conclusões sobre os fatores de risco, temos considerações interessantes. A primeira é que metade dos episódios de sangramento ocorreu no grupo com plaquetas acima de $100 \times 10^3/\text{mm}^3$, contrariando a expectativa que a plaquetopenia menos intensa protegeria o paciente do sangramento. Provavelmente fatores não ligados à atuação das plaquetas foram determinantes para a hemorragia. Outra questão importante a ser ressaltada é que quando analisamos os achados dos exames relacionados a função plaquetária realizados em nosso estudo entre os pacientes sem e com sangramento encontramos resultados compatíveis com atuação dos mecanismos compensatórios da hemostasia, mesmo na ausência de resultados estatisticamente significantes. No grupo sem sangramento obtivemos valores elevados de SC, AS, antígeno e atividade do FVW. Sendo o contrário, ou seja, valores mais baixos no grupo com sangramento. Tal achado reforça a observação que fatores não ligados à plaquetas foram contribuintes do sangramento. Entendemos que os mecanismos compensatórios da hemostasia são eficazes, e que o risco de evento hemorrágico é mais influenciado pela gravidade da doença hepática do que pelas alterações hemostáticas, em particular a função plaquetária.

Ressaltamos que o presente estudo avalia um cenário habitual do acompanhamento de um paciente com cirrose. As decisões clínicas acerca do risco de complicações nessa situação ainda são pouco discutidas na literatura. O cenário de intervenção eletiva, num paciente estável, com gravidade intermediária e exames moderadamente alterados, desperta muitas dúvidas sobre a estratificação do risco de sangramento após o procedimento.

Os nossos resultados permitem inferir que os testes analisados são pobres em fornecer informações relevantes para tomada de decisões terapêuticas acerca do risco de sangramento após procedimentos. Eles demonstram o estado de reequilíbrio hemostático, mas falham em apontar fatores ligados a coagulação que realmente poderiam impactar no risco de sangramento.

Por outro lado devemos discutir as limitações do presente estudo. Houve poucos casos de sangramento após LE, dificultando análises estatísticas robustas.

Se considerarmos que fatores não ligados à coagulopatia influenciam importantemente o risco de sangramento, a realização de medidas hemodinâmicas poderia ter ajudado a esclarecer alguns desses aspectos. Teria sido importante correlacionar nossos resultados com medidas objetivas de avaliação do grau de hipertensão portal e insuficiência hepática como valores do gradiente venoso portal e teste de função hepática de depuração de verde de indocianina. Outro ponto de dificuldade foi a impossibilidade de comparar exames de P-selectina em relação ao sangramento. Há pouca informação sobre a real relevância desse parâmetro no contexto da hepatologia, e por isso achamos que essa temática deverá ser mais explorada em trabalhos futuros.

Reconhecemos a importante evolução na tecnologia de avaliação e interpretação da dinâmica fisiológica da hemostasia, particularmente nos pacientes com doença hepática. Tivemos especial interesse na metodologia do Impact-R® para avaliação da função plaquetária por se tratar de exame rápido e de fácil realização, com utilização de pequena quantidade de sangue total e em condição de fluxo com maior fidedignidade ao cenário *in vivo*. No entanto, sua disponibilidade restrita a poucos laboratórios dificulta a aplicação dessa ferramenta no contexto clínico diário dos pacientes.

A tromboelastografia e o teste de geração de trombina também são exames em evidência atualmente³⁰. A tromboelastografia é um exame de interpretação instantânea da hemostasia que pode ser realizado e interpretado para tomada de decisões e intervenções para corrigir o distúrbio de imediato^{16,45}. No entanto é controversa a sua aplicabilidade para estimar o risco de sangramentos em procedimentos eletivos. Recentemente, um estudo de De Pietri *et al* encontrou importante correlação entre uso da tromboelastografia e uma conduta restritiva e otimizada do uso de hemoderivados. O benefício foi evidente na diminuição de efeitos colaterais ao uso de hemoderivados e também na relação de custo-efetividade. No entanto, não ficou claro sua validade em predizer o risco de sangramento⁴⁵. Outro estudo de 2015, sugere que a tromboelastografia pode até ser útil avaliar o risco de sangramento, mas foi eficaz apenas em guiar uma conduta menos agressiva de transfusão de plaquetas, além disso, esse mesmo estudo falhou em demonstrar que o teste de agregação plaquetária pode estimar o risco de sangramento, resultado muito semelhante aos nossos⁴⁶.

O exame de geração de trombina nos dá uma informação global se a hemostasia é funcional a ponto de produzir o elemento fundamental da coagulação que é a trombina. Pode ser útil para avaliar as situações em que há perda do reequilíbrio hemostático^{21,47,48}. Entretanto é limitado para compreensão global da dinâmica da coagulação ou para determinar em que fase a geração de trombina se torna deficiente. Além disso, o método não foi validado em cenários clínicos, tendo como desfecho prever risco de sangramento após procedimentos invasivos.

Conceitos atuais apontam que o INR, apesar de ser um bom indicador de insuficiência hepática, é impróprio para avaliação da coagulação em pacientes com hepatopatia. Vários estudos corroboram a dissociação entre INR alterado e aumento do risco de sangramento^{21,49}. Com isso, sua utilização como indicador de distúrbio de coagulação no paciente com cirrose é bastante questionável. Por outro lado, observamos que a contagem de plaquetas continua sendo um importante método para avaliação de risco, já que seu nível sérico é o principal indicador de capacidade de geração de trombina no paciente com cirrose²¹. O estudo de Tripodi demonstrou que *in vitro*, a geração de trombina está relacionada a quantidade de plaquetas, e que a geração de trombina estaria deficiente na plaquetopenia mais severa ($< 56 \times 10^3 / \text{mm}^3$)³⁰. No entanto, tal conclusão refere-se a uma observação de um ensaio que mimetiza uma situação fisiológica. Especulamos a possibilidade de que, *in vivo*, mesmo na vigência de plaquetopenia mais severa o risco de sangramento mantém-se baixo em procedimentos classificados como de baixo risco.

Dada as considerações apresentadas, achamos que os testes atualmente disponíveis de avaliação da coagulopatia são pouco úteis na estratificação de risco para sangramento em procedimentos eletivos em pacientes com cirrose. A conjunção de insuficiência hepática, hipertensão portal e coagulopatia continua sendo muito desafiadora na avaliação de risco de sangramento no hepatopata. Permanece sendo fundamental a avaliação em conjunto de aspectos clínicos e laboratoriais para tomada de decisões profiláticas e terapêuticas⁵⁰.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- 1- Não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados dos testes de adesão e agregação plaquetária (SC e AS), FVW e ADAMTS13 quando analisados por diferentes faixas de plaquetas.
- 2- Não encontramos relação dos achados dos parâmetros SC, AS, antígeno e atividade do FVW e ADAMTS13 com o risco de sangramento após LE de varizes de esôfago.
- 3- O MELD foi significativamente maior nos pacientes que tiveram sangramento após LE.
- 4- A P-selectina por citometria mostrou-se elevada, denotando maior taxa de ativação plaquetária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVIE EW, RATNOFF OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science*. 1964;145(3638):1310-1312.
2. MACFARLANE RG. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature*. 1964;202:498-499.
3. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis*. 2003;16(1-2):17-20.
4. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-965.
5. Caldwell SH, Sanyal AJ. *Coagulation and Hemostasis in Liver Disease: Controversies and Advances*. Vol 13: Clinics in Liver Diseases; 2009.
6. Monroe DM, Hoffman M. The coagulation cascade in cirrhosis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):1-9.
7. Ordinas A, Escolar G, Cirera I, et al. Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions. *Hepatology*. 1996;24(5):1137-1142.
8. Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *J Hepatol*. 2002;37(2):280-287.
9. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2105-2111.
10. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology*. 2006;44(1):53-61.
11. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med*. 2011;365(2):147-156.
12. Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm M, et al. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J Thromb Haemost*. 2004;2(9):1601-1609.
13. Liu L, Choi H, Bernardo A, et al. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*. 2005;3(11):2536-2544.

14. R H, EJ BJ, SJ S, B F, LE S, P M. *Hematology: basic principles and practice*. 4th4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
15. Ferroni P, Martini F, Riondino S, et al. Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. *Clin Chim Acta*. 2009;399(1-2):88-91.
16. Tripodi A. Tests of coagulation in liver disease. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):55-61.
17. Lisman T, Leebeek FW. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Dig Surg*. 2007;24(4):250-258.
18. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *J Hepatol*. 2010;53(2):362-371.
19. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev*. 2005;19(2):111-123.
20. Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. *Int J Hematol*. 2010;91(1):20-29.
21. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41(3):553-558.
22. Morrison A, Hornsey VS, Prowse CV, Macgregor IR. Use of the DiaMed Impact R to test platelet function in stored platelet concentrates. *Vox Sang*. 2007;93(2):166-172.
23. Savion N, Varon D. Impact--the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35(1-2):83-88.
24. Silva PHd, Alves HB, Comar SR, Henneberg R, Merlin JC, Stinghen ST. *Hematologia Laboratorial: teoria e procedimentos*. Porto Alegre: Artmed; 2016.
25. de Franchis R, Faculty BV. Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*. 2010;53(4):762-768.
26. de Franchis R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*. 2005;43(1):167-176.
27. de Franchis R, Faculty BV. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol*. 2015;63(3):743-752.

28. Sinclair M, Vaughan R, Angus PW, et al. Risk factors for band-induced ulcer bleeding after prophylactic and therapeutic endoscopic variceal band ligation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(8):928-932.
29. Vieira da Rocha EC, D'Amico EA, Caldwell SH, et al. A prospective study of conventional and expanded coagulation indices in predicting ulcer bleeding after variceal band ligation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(9):988-993.
30. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology*. 2006;44(2):440-445.
31. Ferro D, Quintarelli C, Lattuada A, et al. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*. 1996;23(6):1377-1383.
32. Studt JD, Böhm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lämmle B. Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost*. 2003;1(9):1882-1887.
33. Tacke F, Schöffski P, Trautwein C, et al. Plasma P-selectin levels are elevated in patients with chronic liver disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14(4):319-325.
34. Vardareli E, Saricam T, Demirustu C, Gulbas Z. Soluble P selectin levels in chronic liver disease: relationship to disease severity. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(74):466-469.
35. Xianghong G, Guanping C, Fenghua Y, Jiayin W. Changes in platelet functional parameters and CD62 P expression in liver cirrhosis. *Afr Health Sci*. 2013;13(4):1079-1083.
36. Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology*. 1985;5(3):419-424.
37. Wadhawan M, Dubey S, Sharma BC, Sarin SK. Hepatic venous pressure gradient in cirrhosis: correlation with the size of varices, bleeding, ascites, and child's status. *Dig Dis Sci*. 2006;51(12):2264-2269.
38. Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet*. 1999;353(9147):139-142.
39. 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):463-470.

40. Noris M, Remuzzi G. Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood*. 1999;94(8):2569-2574.
41. Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(5):579-589.
42. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W, Diseases PGCotAAftSoL, Gastroenterology PPCotACo. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;46(3):922-938.
43. Xu L, Ji F, Xu QW, Zhang MQ. Risk factors for predicting early variceal rebleeding after endoscopic variceal ligation. *World J Gastroenterol*. 2011;17(28):3347-3352.
44. Vanbiervliet G, Giudicelli-Bornard S, Piche T, et al. Predictive factors of bleeding related to post-banding ulcer following endoscopic variceal ligation in cirrhotic patients: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(2):225-232.
45. De Pietri L, Bianchini M, Montalti R, et al. Thrombelastography-guided blood product use before invasive procedures in cirrhosis with severe coagulopathy: A randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2016;63(2):566-573.
46. Debernardi Venon W, Ponzo P, Sacco M, et al. Usefulness of thromboelastometry in predicting the risk of bleeding in cirrhotics who undergo invasive procedures. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(11):1313-1319.
47. Kalambokis GN, Oikonomou A, Baltayiannis G, Christou L, Kolaitis NI, Tsianos EV. Thrombin generation measured as thrombin-antithrombin complexes predicts clinical outcomes in patients with cirrhosis. *Hepatol Res*. 2016;46(3):E36-44.
48. 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.
49. Hshieh TT, Kaung A, Hussain S, Curry MP, Sundaram V. The international normalized ratio does not reflect bleeding risk in esophageal variceal hemorrhage. *Saudi J Gastroenterol*. 2015;21(4):254-258.
50. Weeder PD, Porte RJ, Lisman T. Hemostasis in liver disease: implications of new concepts for perioperative management. *Transfus Med Rev*. 2014;28(3):107-113.