

Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudante:

José Ricardo Cancela Oliveira
Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina
Nº Aluno: 200901299
Endereço Eletrónico: jrcoliveira91@gmail.com

Orientador:

Isabel Maria Teixeira de Carvalho Pedroto
Grau académico: Licenciada em Medicina
Título profissional: Professora Auxiliar Convidada do ICBAS

Coorientador:

Manuel César Santos Araújo de Campos
Grau académico: Licenciado em Medicina
Título profissional: Professor Auxiliar Convidado do ICBAS

Afiliação:

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto
Rua de Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313 Porto, Portugal

ABSTRACT

The liver plays a central role in each phase of the clotting process, as it synthesizes the majority of coagulation factors, anticoagulants and proteins involved in fibrinolysis as well as thrombopoeitin. Cirrhosis is characterized by decreased levels of most procoagulants factors, with the exceptions of factor VIII and von Willebrand factor, which are elevated. Decreased levels of the procoagulants are, however, accompanied by decreases in levels of such naturally occurring anticoagulants as antithrombin and protein C. In physiologic conditions, the coagulation system is balanced by these two opposing drivers.

Conventional coagulation tests such as prothrombin time and activated partial thromboplastin time don't reflect the coagulation status of these patients, because they are only responsive to procoagulants factors.

The thrombin generation test is a global test that measures the overall tendency of a plasma sample to form thrombin after initiation of coagulation. The endogenous thrombin potential may be considered a measure of the amount of thrombin that a given plasma sample may generate under the specified experimental conditions and represents the balance between the pro- and anticoagulant proteins operating in plasma. This test mimics more closely than any other what occurs in vivo.

Several studies have used this test to investigate the coagulation function in patients with cirrhosis. They concluded that generation of thrombin is normal or increased in cirrhosis. Severe thrombocytopenia may limit thrombin generation in these patients. The bleeding events frequently observed in patients with end-stage liver disease are mainly due to hemodynamic alterations secondary to portal hypertension and the derangement of coagulation may not play a major role.

In the future, it is expected that prospective clinical trials will be able to relate the results of thrombin generation with bleeding events and generate new guidelines for the prophylactic and therapeutic use of blood products in cirrhosis.

RESUMO

O fígado desempenha um papel fundamental em cada etapa do processo de coagulação, uma vez que sintetiza a maioria dos fatores de coagulação, anti-coagulantes e proteínas envolvidas na fibrinólise, assim como a trombopoietina. A cirrose hepática é caracterizada por uma diminuição da maioria dos fatores pró-coagulantes, com a exceção do fator VIII e fator de von Willebrand, que se encontram elevados. A diminuição dos níveis de fatores pró-coagulantes é, no entanto, acompanhada por uma diminuição nos níveis dos fatores anticoagulantes como a antitrombina e a proteína C. Em condições fisiológicas, o sistema de coagulação encontra-se balanceado, com diminuição simultânea de fatores pró- e anticoagulantes.

Os testes de coagulação convencionais, tais como o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada, não refletem o equilíbrio hemostático destes doentes, visto serem apenas influenciados por fatores pró-coagulantes.

O teste de geração de trombina é um teste global que mede a aptidão de uma amostra de plasma para formar trombina após a iniciação da coagulação. O potencial de trombina endógeno consiste numa medição da quantidade de trombina que uma dada amostra de plasma pode formar, em condições experimentais específicas, e representa o equilíbrio entre fatores pró- e anticoagulantes no plasma. Este teste é o que mais se aproxima das condições que ocorrem *in vivo*.

Vários estudos avaliaram a hemostase em doentes cirróticos através da utilização deste teste. Eles concluíram que doentes cirróticos produzem uma quantidade normal ou aumentada de trombina. A trombocitopenia grave pode limitar a produção de trombina nestes doentes. Os eventos hemorrágicos frequentemente observados em doentes hepáticos crónicos são devidos a alterações hemodinâmicas secundárias à hipertensão portal e o grau de coagulopatia não parece desempenhar um papel importante.

No futuro, é expectável que ensaios clínicos prospetivos sejam capazes de relacionar os resultados dos testes de geração de trombina com eventos hemorrágicos e conduzam a novas diretrizes para o uso profilático e terapêutico dos produtos sanguíneos na cirrose.

Conteúdos:

Lista de Abreviaturas.....	1
Introdução.....	3
Hemostase no doente cirrótico	4
Alterações do Número e Função das Plaquetas	4
Infeção e Heparinoides endógenos	6
Fibrinólise.....	6
Distúrbios da coagulação	7
Avaliação Laboratorial da Coagulação.....	10
Tempo de Protrombina (PT).....	10
Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)	10
Validade Clínica do Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	11
Tromboelastografia (TEG)	12
Teste de Geração de Trombina e Potencial de Trombina Endógeno.....	14
Trombografia Automática Calibrada (CAT)	14
ETP no Doente Cirrótico	18
Conclusão	23
Bibliografia.....	24

Lista de Abreviaturas

- FVIII – Fator VIII
- FvW - Fator de von Willebrand
- PC – Proteína C
- PS – Proteína S
- t-PA - Ativador do Plasminogénio Tecidual
- PAI-1 - Inibidor do Ativador do Plasminogénio Tipo I
- u-PA - Ativador do Plasminogénio de Urocinase
- TAFI - Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina
- FVIIa – Fator VII ativado
- TF – Fator Tecidual
- FXa – Fator X ativado
- FV – Fator V
- FVa – Fator V ativado
- FIXa – Fator IX ativado
- FVII – Fator VII
- FVIIIa – Fator VIII ativado
- FXI – Fator XI
- FXIa – Fator XI ativado
- FXII – Fator XII ativado
- TFPI – Inibidor da Via do Fator Tecidual
- TM – Trombomodulina
- APC – Proteína C ativada
- PT – Tempo de Protrombina
- INR – Índice Internacional Normalizado
- ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
- aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
- MELD - Modelo para Doença Hepática Terminal
- TEG – Tromboelastografia
- CAT - Trombografia Automática Calibrada

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

CTI - Inibidor da Tripsina do Milho

ETP - Potencial de Trombina Endógeno

Introdução

A cirrose hepática representa um estadio avançado de fibrose hepática progressiva como resposta a uma lesão hepática crónica, por vezes complicada pelo síndrome de hipertensão portal ou por insuficiência hepática de gravidade variável.

O fígado é essencial na hemostase através da produção da maioria dos fatores de coagulação (todos exceto o Fator de von Willebrand e Fator VIII), das proteínas anticoagulantes naturais (proteínas C e S), proteínas relacionadas com a fibrinólise e trombopoietina, responsável pela produção de plaquetas.

Os doentes cirróticos desenvolvem alterações hemostáticas complexas, secundárias à sua doença. A insuficiência hepática é responsável por um maior risco de hemorragia por alterações hemodinâmicas (hipertensão portal) ou devido à coagulopatia secundária. Contudo, estudos recentes têm demonstrado um estado de hipercoagulabilidade em doentes cirróticos que aumentam o risco de complicações trombóticas nestes doentes. Os doentes cirróticos têm assim um distúrbio complexo da hemostase, com diminuição de fatores pró-coagulantes e anticoagulantes, o que acarreta um risco acrescido de eventos hemorrágicos, mas também, de eventos trombóticos.

Os testes laboratoriais convencionais (Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) não refletem o balanço da coagulação da mesma forma que ela ocorre *in vivo*, sendo maus preditores do risco hemorrágico/trombótico. O desenvolvimento de testes laboratoriais que permitam avaliar de uma forma global a hemostase neste grupo de doentes é de extrema importância para a sua monitorização, profilaxia e tratamento. Existem agora novos exames que poderão ser usados para este fim, como a Tromboelastografia e os Testes de Geração de Trombina.

Esta revisão temática tem como objetivo rever os distúrbios hemostáticos no doente cirrótico, a utilização dos testes convencionais e as conclusões de vários estudos relativas ao uso do Teste de Geração de Trombina, e consequentemente do Potencial de Trombina Endógeno, no doente cirrótico.

Hemostase no doente cirrótico

A coagulação é um processo complexo que envolve um conjunto dinâmico e interligado de múltiplas etapas que podem ser resumidas em quatro fases.

1. Iniciação e formação do tampão plaquetário;
2. Propagação do processo de coagulação para a cascata da coagulação;
3. Cessação da coagulação por meio de mecanismos de controlo anti-trombóticos;
4. Remoção do coágulo por fibrinólise.

Os indivíduos saudáveis possuem quantidades adequadas de fatores de coagulação, proteínas reguladoras e plaquetas de forma a poderem iniciar a formação de um coágulo quando necessário, assim como, limitarem o seu crescimento a locais de dano vascular e promoverem a sua dissolução. O fígado desempenha um papel fundamental no sistema hemostático e doentes com cirrose apresentam diminuição dos níveis da maioria dos fatores pro-coagulantes, com exceção do fator VIII (FVIII) e do fator de von Willebrand (FvW), que se encontram elevados. Contudo, verifica-se também uma diminuição dos níveis de fatores anticoagulantes naturais, como a antitrombina e a proteína C (PC). Desta forma, o sistema de coagulação encontra-se balanceado, com diminuição simultânea de fatores pró- e anticoagulantes. Apesar disso, muitos livros ainda referem a doença hepática crónica como um epítome de distúrbios hemorrágicos adquiridos.[1]–[4]

Alterações do Número e Função das Plaquetas

Existem três fases da coagulação nas quais as plaquetas desempenham um papel crucial: hemostase primária (interações entre as plaquetas e paredes endoteliais), coagulação (geração de trombina), e fibrinólise (dissolução do coágulo).[5] As plaquetas aderem às paredes dos vasos danificados através de uma interação com uma proteína multimérica (FvW), promovendo assim a agregação e, posteriormente, a formação de um tampão hemostático primário. As plaquetas também suportam a geração de trombina pela ligação de fatores de coagulação ativados às suas superfícies.[1]

A trombocitopenia é definida como qualquer diminuição do número de plaquetas abaixo do limite normal, geralmente $140 \times 10^9/L$, e pode estar presente em até 76% dos doentes cirróticos.[6]

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

Apesar da trombocitopenia não estar associada a uma aumento do risco hemorrágico por varizes esofágicas ou por outros locais, ela está associada a perda sanguínea em procedimentos cirúrgicos.[7] Trombocitopenia moderada ($50-75 \times 10^9/L$) é observada em aproximadamente 13% dos doentes, enquanto que a trombocitopenia grave ($<50 \times 10^9/L$) ocorre em apenas 1 % dos doentes.[8] Este valor ($50 \times 10^9/L$) é muitas vezes usado como *cut-off* para procedimentos invasivos em doentes cirróticos devido ao risco comprovado de hemorragia. Isto por sua vez interfere com intervenções diagnósticas e terapêuticas como a biopsia hepática, terapia antivírica e cirurgia eletiva.[9]–[12]

Várias teorias têm tentado explicar a gênese da trombocitopenia nestes doentes. A diminuição da produção de trombopoietina e/ou aumento da sua destruição, sequestro esplênico devido à hipertensão portal, destruição de plaquetas mediada por auto-anticorpos, aumento do consumo plaquetário devido a um baixo grau de coagulação intravascular disseminada e supressão da medula óssea devida à doença hepática subjacente são algumas das explicações possíveis, contudo, a causa exata ainda é desconhecida, sendo provavelmente multifatorial.[13]–[16]

A disfunção plaquetária também pode contribuir para um estado de hipocoagulabilidade. Estes defeitos qualitativos plaquetários são dinâmicos e refletem o estado de saúde geral do doente.[5] Eles podem manifestar-se em qualquer fase da interação plaqueta-parede vascular: adesão, agregação e ativação. Tem-se verificado que a aderência de plaquetas ao subendotélio de vasos lesados se encontra alterada em doentes cirróticos.[17] Este defeito é parcialmente compensado pelo aumento concomitante do FvW. Os níveis de ADAMTS 13, uma metaloprotease plasmática que limita a função *in vivo* do fator de von Willebrand, estão também reduzidos nos doentes cirróticos. Este facto pode contribuir para o retorno da função plaquetária.[18] Desta forma, existe apenas uma fraca relação entre a contagem de plaquetas e o tempo de hemorragia.[19] A agregação plaquetária, que pode ocorrer como resposta a uma grande variedade de estímulos (ADP, trombina, colagénio, epinefrina ou ristocetina), encontra-se também reduzida em doentes cirróticos.[20] As plaquetas de doentes cirróticos exibem uma reduzida sinalização transmembranar e uma progressiva incapacidade de ativação em resposta a estímulos adequados, o que lhes confere um estado irresponsivo. As razões que explicam este fenómeno são as seguintes: 1) défice de armazenamento com uma concentração de grânulos densos, que contêm moléculas sinalizadoras pro-trombóticas (por exemplo, fator plaquetário 4, beta-tromboglobulina e serotonina), anormalmente baixa; 2) secreção de níveis desproporcionadamente altos de ATP que antagoniza

a ativação do recetor P2Y₁₂ pelo ADP e dessensibiliza o recetor P2Y₁, resultando em baixos níveis de cálcio ionizado intraplaquetário;[21], [22] 3) acumulação intraplaquetária de mensageiros inibitórios (nucleótidos cíclicos), que limitam extensivamente a atividade da fosfolipase, resultando em concentrações menores de fosfatidilinositol e cálcio.[23] O resultado final é uma menor produção de tromboxano e serotonina, o que resulta por sua vez em defeitos na agregação plaquetária.[21] A produção de inibidores plaquetários derivados do endotélio, principalmente o óxido nítrico e a prostaciclina, podem também contribuir para uma ativação plaquetária defeituosa nestes doentes.[24]

Para além de todos os fatores acima mencionados que diminuem a função plaquetária, existem também fatores que promovem a ativação plaquetária, como a bilirrubina não conjugada que constitui um potente indutor da agregação plaquetária em plaquetas isoladas.[25], [26]

Infeção e Heparinoides endógenos

A sepsis ou os baixos níveis de endotoxemia podem afetar a função, produção e adesão plaquetária nos cirróticos. A infeção está também associada a um aumento dos heparinoides, glicosaminoglicanos, que ajudam a manter o equilíbrio hemostático ao prevenir a formação de coágulos e facilitando o fluxo sanguíneo. Este aumento é devido à disfunção endotelial e às alterações no glicocálice associadas, causadas por alterações no metabolismo do óxido nítrico.[27] Existem dois glicosaminoglicanos específicos, sulfato de heparina e sulfato de dermatan, que se encontram aumentados em doentes cirróticos e concentrações ainda maiores são detetadas em doentes com cirrose e hemorragia ou infeção ativa.[28]

Fibrinólise

O sistema fibrinolítico é um sistema altamente integrado que inclui uma proenzima (plasminogénio) que quando convertida na sua forma ativa (plasmina) consegue degradar a fibrina em vários produtos de degradação. Este sistema só opera quando ocorre deposição de fibrina.[29]

A degradação do coágulo e da fibrina é determinada pela libertação endotelial do ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) e a sua subsequente inibição pelo inibidor do ativador do plasminogénio tipo I (PAI-1), que forma um complexo com o anterior, diminuindo a sua atividade livre. A conversão do plasminogénio pode ainda ser regulada pelo ativador do plasminogénio de

urocinase (u-PA) e fator XII ativado, existindo ainda um inibidor direto da plasmina (α_1 -antiplasmina). Foi ainda identificado um outro inibidor, denominado inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que consiste numa pro-carboxipeptidase sintetizada pelo fígado e ativada pela trombina e outras enzimas (plasmina, tripsina e elastase neutrofílica). Esta enzima inibe a fibrinólise pela remoção de resíduos de lisina na fibrina, prevenindo assim a ligação e ativação do plasminogénio que ocorre na sua superfície.[1], [29], [30]

Para o normal balanço fibrinolítico, um aumento na concentração plasmática de t-PA é acompanhado por um aumento da concentração plasmática de PAI-1. Em doentes com cirrose, a atividade do t-PA é cerca de sete vezes superior e é proporcional ao grau de cirrose. Este aumento contribui para o risco de hemorragia por varizes esofágicas.[31] Os níveis de α_1 -antiplasmina e fator XIII encontram-se também reduzidos nestes doentes, componentes estes que atuam no sentido da degradação do coágulo. [3]

Tem-se constatado ainda que doentes hepáticos crónicos possuem níveis baixos de TAFI e o grau de deficiência é proporcional à severidade da doença. Advogou-se que este défice estaria provavelmente relacionado com o aumento da fibrinólise. Vários estudos foram realizados para testar esta hipótese tendo chegado a conclusões diferentes.[30], [32], [33]

Evidências de fibrinólise sistémica podem ser detetadas em 30 a 60% dos doentes e existe uma relação com o grau de disfunção hepática. Contudo, a prevalência de hiperfibrinólise clinicamente evidente é menor, ocorrendo em 5-10% dos doentes com cirrose descompensada.[34]–[36] A hiperfibrinólise promove a dissolução prematura do coágulo, interfere com a sua formação devido ao consumo dos fatores de coagulação, e diminui a agregação plaquetária pela degradação do FvW e dos recetores plaquetários do fibrinogénio.[35]

Existem ainda alterações consistentes com um estado hipofibrinolítico, como os níveis reduzidos de plasminogénio e níveis aumentados de PAI-1.[3] Desta forma, serão necessários mais dados e novos exames para uma avaliação global da fibrinólise que não tenham apenas em consideração componentes individuais e que possam ser usados no futuro na prática clínica.

Distúrbios da coagulação

A coagulação é definida por uma cadeia de eventos que, pela ativação de proteínas

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

plasmáticas pró-coagulantes, resulta na produção de trombina. Esta enzima por sua vez converte fibrinogénio em fibrina que é posteriormente estabilizada pelo fator XIII. Este processo é iniciado quando o fator VII ativado (FVIIa) entra em contacto com o fator tecidual (TF) exposto nas superfícies celulares nos locais onde ocorreu dano vascular. Este complexo VIIa-TF é então capaz de ativar o Fator X (FXa) que converte a protrombina em trombina em conjugação com o fator V ativado (FVa). O complexo VIIa-TF é também capaz de ativar o fator IX (FIXa), que então interage com o FVIII ativado (FVIIIa) na superfície das plaquetas para produzir quantidades adicionais de FXa, ampliando assim a produção de trombina. A participação do fator XI (FXI) na hemostase não depende da sua ativação pelo fator XII ativado (FXIIa), mas sim da ativação por *feedback* positivo pela trombina. Sendo assim, este fator não tem uma função de ativação da cascata da coagulação, mas sim de propagação e amplificação.

A produção de trombina é também regulada por fatores anticoagulantes como a antitrombina, proteína C e S e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI). A PC é ativada *in vivo* pela trombina em cooperação com o seu recetor endotelial, a trombomodulina (TM). A proteína C ativada (APC) é um potente anticoagulante que, em combinação com o seu cofator proteína S (PS), inibe a produção de trombina através da inativação do FVIIIa e FVa. A antitrombina também necessita de ser ativada por glicosaminoglicanos, como o sulfato de heparina e outros, localizados nas células endoteliais. Esta enzima inibe diretamente a trombina através da formação de um complexo equimolar e indiretamente através da inativação do FXIa, FIXa e FXa. O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio que inibe especificamente o complexo VIIa-TF. O balanço entre os fatores pró e anticoagulantes previne a produção de trombina e a deposição de fibrina não desejada, contudo, o seu desequilíbrio pode resultar num estado de hipo ou hipercoagulabilidade.[29], [37]–[39]

A maioria dos fatores da cascata da coagulação (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII) é sintetizada no fígado. A cirrose é caracterizada por uma síntese alterada destes fatores da coagulação (exceto o FVIII) e ainda de pré-caliceína e cininogénio.[29], [40] O Fator V e o fator VII têm a semi-vida mais curta e são os mais afetados.[41]

Os doentes com cirrose têm deficiência de vitamina K devido à má nutrição, ou má-absorção causada pela diminuição da produção de bile ou obstrução biliar, pela diminuição da massa hepática e pelos distúrbios de armazenamento. Desta forma, os fatores que dependem desta vitamina (protrombina, VII, IX e X) apresentam-se reduzidos[31]

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

Os níveis de fibrinogénio podem estar diminuídos em doentes com cirrose avançada, porém, os seus níveis encontram-se dentro da faixa normal em doentes estáveis. O fibrinogénio é muitas vezes anormal devido ao conteúdo excessivo de ácido siálico (disfibrinogenemia).[42]

Apesar dos níveis de muitos fatores pró-coagulantes se mostrarem baixos em doentes cirróticos, existem também condições associadas a este grupo de doentes que podem justificar um estado pro-coagulante. Os níveis de FVIII estão muitas vezes aumentados.[43] Proteínas anticoagulantes como a PC, a PS, inibidor da protéase dependente da proteína Z, antitrombina, cofator da heparina 2 e α -2-macroglobulina, que são sintetizadas no fígado, encontram-se diminuídas nestes doentes.[3], [44], [45] Tem-se constatado também que a concentração de TFPI encontra-se normal ou reduzida em doentes com insuficiência hepática.[46]

Avaliação Laboratorial da Coagulação

Como constatado anteriormente, a cirrose é caracterizada por um defeito hemostático complexo, incluindo alterações ao nível da hemostase primária, cascata da coagulação e fibrinólise. Este defeito relaciona-se com a ocorrência de distúrbios hemorrágicos e trombóticos e a relação causal entre a ocorrência de distúrbios hemorrágicos e testes de coagulação anormais tem sido debatida ao longo dos últimos anos.

Tempo de Protrombina (PT)

O PT, também chamado “tempo de coagulação induzido pelo fator-tecidual”, foi desenvolvido em 1935 por Armand Quick com o objetivo de investigar doentes hepáticos.[47] O resultado do teste consiste no tempo necessário para o plasma pobre em plaquetas coagular após a adição de extratos teciduais (tromboplastina) e cloreto de cálcio. Este teste é usado para avaliar a integridade da via extrínseca e comum, sendo sensível a deficiências congénitas ou adquiridas dos fatores VII, X, V, II e fibrinogénio. O tipo de tromboplastina é o principal determinante da capacidade de resposta do teste ao defeito da coagulação. Os resultados podem ser expressos como simples tempos de coagulação (segundos) ou como atividades percentuais. Uma outra forma de expressar os resultados é o índice internacional normalizado (INR). O INR foi introduzido em 1983, corresponde a uma escala de valores para o PT e foi desenvolvido para uniformizar os resultados de diferentes laboratórios. O seu valor pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$INR = \left[\frac{PT_{doente}}{PT_{normal}} \right]^{ISI}$$

O ISI corresponde ao índice de sensibilidade internacional do sistema de medição usado no teste. O INR regular apenas pode ser usado em doentes que tomam antagonistas da vitamina K, visto que o ISI necessário para converter os resultados é determinado a partir de plasma de doentes que tomam esta medicação.[48] O uso da escala de INR para doentes hepáticos requer a determinação do valor ISI relevante para esta categoria de doentes.[49], [50]

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)

O aPTT foi desenvolvido em 1953 e modificado posteriormente em 1961.[51], [52]

Corresponde ao tempo (segundos) necessário para o plasma pobre em plaquetas coagular após ser misturado com ativadores de contacto dos fatores de coagulação (fator XII, pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular) e fosfolípidos carregados negativamente, que atuam como substitutos das plaquetas. O aPTT analisa a via intrínseca e comum, sendo capaz de detetar deficiências congénitas ou adquiridas de todos os fatores de coagulação, exceto o fator VII e XIII. O tipo, concentração, e combinação de ativadores e fosfolípidos determina a capacidade de resposta do teste. Os resultados, que geralmente são expressos como tempos de coagulação (valor de referência é de 30 segundos) ou razão (tempo de coagulação doente/normal), variam de acordo com o sistema comercial de medição usado para a realização do teste. Nenhum esquema foi desenvolvido para uniformizar os resultados entre diferentes laboratórios.[48]

Validade Clínica do Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

Os testes mais usados para avaliação da coagulação em doentes cirróticos são o PT e o aPTT, sendo também utilizados há vários anos em conjugação com outros parâmetros clínicos e laboratoriais para calcular índices de prognóstico como o Child-Pugh e o Modelo para Doença Hepática Terminal (MELD). Doentes com PT moderadamente e severamente prolongado têm uma taxa de mortalidade 5-10 vezes superior comparativamente a doentes com PT normal, porém, este risco acrescido pode refletir apenas uma diminuição da função hepática, e não estar relacionada com o grau de coagulopatia.[53] Vários estudos chegaram á conclusão que estes testes são maus preditores de eventos hemorrágicos em doentes cirróticos.[54]–[56] Tem-se constatado que o PT e o aPTT não refletem o balanço da coagulação da mesma forma que ela ocorre *in vivo*, especialmente em doentes cirróticos nos quais se observa uma diminuição equivalente de fatores anticoagulantes e fatores pró-coagulantes, como já referido. É de realçar que a PC e a antitrombina necessitam, respetivamente, de TM e glicosaminoglicanos para serem ativadas. Como o plasma e os reagentes usados para a realização do PT e a PTT não contém quantidades suficientes de TM e glicosaminoglicanos, a ativação da PC e antitrombina é limitada, e desta forma não conseguem exercer toda a sua atividade anticoagulante.[57] Sendo assim, podemos assumir que os testes convencionais refletem apenas a produção de trombina mediada por fatores pró-coagulantes, mas são muito menos influenciados por fatores anticoagulantes. Uma outra limitação dos testes convencionais é que o plasma começa a coagular quando apenas 5% de toda a trombina é produzida, não detetando os restantes 95%.[58] O seu uso é adequado para investigar deficiências congénitas de fatores pro-coagulantes, contudo não são uteis em deficiências congénitas de fatores anticoagulantes ou deficiências adquiridas de fatores pro- e anticoagulantes, como ocorre na

cirrose.[57] Podemos assim concluir que estes exames são maus preditores de eventos hemorrágicos nos cirróticos. Desta forma, possuem pouca utilidade na profilaxia de eventos hemorrágicos ou na abordagem e orientação clínica. Os testes que refletem a produção de trombina na presença de trombomodulina aparentam ter uma maior validade clínica, como será discutido mais adiante para o Potencial de Trombina Endógeno.

Tromboelastografia (TEG)

A TEG é um ensaio *in vitro* que permite uma observação e um registo contínuo de todas as funções hemostáticas que resultam na formação e dissolução de um coágulo. Este teste foi pela primeira vez introduzido em 1948 para investigar doentes que possuíam doenças hemorrágicas e pode ser considerado como um protótipo de um teste global da hemostase, visto que, alegadamente, ele reflete a contribuição da hemostase primária, cascata da coagulação e fibrinólise. No passado o uso desta técnica era limitado devido a uma baixa uniformização de resultados, baixa reprodutividade e dificuldade de interpretação. Contudo, o conceito desta técnica foi revisto recentemente e acoplado a novas tecnologias computadorizadas.[48] Esta combinação, em associação com novos materiais e equipamentos, tornou esta técnica mais popular, sendo especialmente usada em intervenções cirúrgicas major como o transplante de fígado e procedimentos cardiovasculares.[59] Existem dois dispositivos disponíveis comercialmente: “Thrombelastograph Haemostasis Analyzer 5000” e o “ROTEG”. [60]

Existem 5 parâmetros que são registados numa TEG. O tempo de reação (r), em minutos, representa a latência de formação do coágulo desde o início da cascata de coagulação até à formação inicial de fibrina (amplitude de 2mm). O tempo r corresponde ao INR e aPTT.[61] O tempo cinético (k), em minutos, equivale ao tempo requerido desde a formação inicial de fibrina (2mm) até o coágulo alcançar uma firmeza específica (amplitude de 20mm). O ângulo a , em graus, equivale à cinética da formação do coágulo. Este valor é calculado através de uma linha tangente à curva do traçado no final do tempo r com ponto de partida na linha basal. Este valor reflete a taxa de formação de fibrina e a ligação cruzada de plaquetas, sendo maioritariamente influenciado pela concentração de fibrinogénio e número de plaquetas. A amplitude máxima, em milímetros, mede a tensão máxima do coágulo, sendo influenciada pelo número/função das plaquetas e concentração de fibrinogénio. Por último, a lise do coágulo após 30 minutos, em percentagem, corresponde à dissolução do coágulo após 30 minutos de ter alcançado a amplitude máxima. Este parâmetro é uma medida da fibrinólise. A TEG pode ainda detetar os efeitos de heparinoides

endógenos e exógenos, antagonistas da vitamina K, e agentes antiplaquetários, dependendo de detalhes específicos da técnica usada.[60], [62]

A primeira utilização da TEG na doença hepática foi para encaminhar a reposição de fatores pro--hemostáticos em doentes submetidos a transplante hepático, tendo reduzido as necessidades transfusionais.[63] Alguns estudos realizados nos últimos anos têm avaliado a TEG no contexto da cirrose hepática. Doentes cirróticos têm frequentemente parâmetros da TEG normais. Num grupo de 273 doentes com cirrose estável, os parâmetros médios e medianos da TEG estavam dentro dos limites normais, embora a amplitude máxima diminuísse em proporção com o grau de trombocitopenia. Pelo contrário, num grupo de 48 doentes com cirrose estável, porém mais descompensada ($\text{INR} \geq 1.5$), o valor da amplitude máxima média encontrava-se abaixo dos limites normais, provavelmente devido ao baixo número de plaquetas. O ângulo α também apresentava valores inferiores ao normal em doentes com cirrose descompensada e hipofibrinogenemia.[60] Foi também constatado, através do uso da TEG, que doentes com cirrose secundária a doença hepática colestatia (cirrose biliar primária ou colangite esclerosante primária) se encontravam hipercoagulados relativamente a indivíduos sem doença hepática colestatia e indivíduos saudáveis. Em contraste, o INR e outros testes laboratoriais usados frequentemente não conseguiram diferenciar este grupo dos restantes.[64] Um outro estudo constatou um estado de hipercoagulabilidade nos indivíduos com doença hepática colestatia. Este estudo atribui as diferenças observadas à maior concentração de fibrinogénio e à melhor função plaquetária nesta população de doentes.[65]

A TEG demonstrou utilidade clínica como preditor de complicações de doença hepática, como a hemorragia gastrointestinal e a infeção.[60] Constatou-se que a TEG é superior ao INR e ao número de plaquetas para estimar o risco de re-hemorragia por varizes esofágicas.[66]

Apesar de todas as aparentes vantagens associadas ao uso clínico deste teste, são necessários dados mais robustos para a sua validação clínica no futuro.

Teste de Geração de Trombina e Potencial de Trombina Endógeno

O teste de geração de trombina mede a capacidade de produção de trombina de uma amostra de plasma através da ativação *in vitro* da coagulação com fator tecidual ou outro *trigger*. Ao contrário dos testes de coagulação clássicos (PT e aPTT), que apenas exploram a fase inicial da coagulação, estes testes exploram também a fase de propagação (quando a maior proporção de trombina é produzida por mecanismos de retroalimentação que ocorrem ao nível dos fatores V, VIII e XI) e a fase de cessação (quando a formação de trombina termina por vias anti-coagulantes e toda a atividade da trombina é inibida por inibidores da protéase plasmática). A curva de geração de trombina resultante reflete e integra todas as reações pro- e anticoagulantes que regulam a formação e inibição de trombina. Tendo em consideração que a trombina é a enzima final e o principal interveniente do processo de coagulação, os testes de geração de trombina mostram um elevado potencial como testes globais da coagulação.[67]

O primeiro teste de geração de trombina foi introduzido em 1953. Este ensaio era de difícil realização e constituía uma técnica imprecisa. Ao longo do tempo, surgiram sucessivas melhorias e diferentes métodos para medição da produção de trombina foram desenvolvidos e usados em diferentes estudos. De seguida será descrito a técnica do método mais frequentemente usado: Trombografia Automática Calibrada (CAT).

Trombografia Automática Calibrada (CAT)

A CAT depende da utilização de um substrato fluorogénico de baixa afinidade (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) para monitorizar continuamente a atividade da trombina no plasma. Visto que a fluorescência não sofre influência das alterações provocadas pela turbulência associada à formação do coágulo, este teste pode ser realizado com plasma completo rico ou pobre em plaquetas, em condições semelhantes às que ocorrem *in vivo*. Contudo, uma calibração apropriada é necessária para corrigir efeitos inerentes ao filtro, isto é, a supressão do sinal fluorescente por moléculas do substrato que já teriam sido convertidas e pela cor do plasma, que difere entre amostras de plasma individuais. Este teste é realizado numa placa de microtitulação e as leituras do sinal fluorescente são convertidas automaticamente em curvas de geração de trombina por programas especializados.[67]

Cada CAT requiere duas medições do sinal de fluorescência da mesma amostra. Numa célula da placa de microtitulação, a célula de medição, é adicionado ao plasma TF e vesículas de fosfolípidos sintéticos para iniciar a coagulação e induzir a formação de trombina. Numa segunda célula, a célula de calibração, uma quantidade apropriada de substrato (o “calibrador de trombina”) é adicionada ao plasma sem ativação da coagulação. O calibrador de trombina consiste em trombina ligada à α_2 -macroglobulina (α_2 M-trombina), uma forma de trombina que não pode ser inibida pelos inibidores da protéase plasmática. Uma mistura de CaCl_2 e substrato fluorogénico é posteriormente adicionada a ambas as células e o sinal fluorescente produzido é registado em tempo real por um fluorómetro. A fluorescência registada na célula de medição é produzida pela trombina gerada no plasma após a iniciação da coagulação e, após correções apropriadas, forma a base para o cálculo da curva de geração de trombina. Na célula de calibração o substrato fluorogénico é convertido a um ritmo constante pelo calibrador de trombina. Obtém-se desta forma um traçado fluorescente linear, cuja inclinação equivale ao fator de calibração necessário para converter as unidades de fluorescência em unidades de concentração de trombina (nM). Há medida que mais substrato é convertido, o traçado fluorescente na célula de calibração diminui a sua inclinação devido aos efeitos inerentes ao filtro e ao consumo de substrato. O desvio da linearidade é quantificado por programas especializados e usado para corrigir o registo fluorescente da célula de medição. Além disso, o sinal produzido resultante da conversão do substrato pela α_2 M-trombina é subtraído por meio de um algoritmo matemático. A curva de geração de trombina é então calculada através da primeira derivação do traçado fluorescente totalmente corrigido.[67]

A curva de geração de trombina é caracterizada por uma curta fase de iniciação (*lag phase*), seguida por uma produção exponencial de trombina (propagação) que posteriormente desaparece devido à inibição causada pela atuação da antitrombina. Vários parâmetros podem ser obtidos a partir de uma curva de geração de trombina, incluindo o tempo de iniciação (*lag time*), tempo para atingir o pico de concentração de trombina (*peak time*), concentração máxima de trombina (*peak height*) e área sob a curva (Potencial de Trombina Endógeno – ETP). O *lag time* é definido como o tempo necessário para a concentração de trombina alcançar 1/6 da concentração máxima e mostra uma boa correlação com o PT. O ETP representa todo o trabalho enzimático desempenhado pela trombina durante o tempo em que está ativa e é considerado o parâmetro mais preditivo do risco hemorrágico/trombótico. Tempos de iniciação prolongados e ETP/*Peak height* diminuídos sugerem um estado hipocoagulado, com maior risco hemorrágico. Pelo contrário, tempos de

iniciação diminuídos e ETP/*Peak height* aumentados indicam um estado hipercoagulado, com maior risco trombótico.[67] Os testes de geração de trombina apresentam uma variabilidade intra- e inter-teste inferior a 10% para todos os parâmetros avaliados, o que torna este teste reproduzível.[68], [69]

As condições experimentais do exame podem ser facilmente modificadas para propósitos específicos, o que constitui uma vantagem relativamente a outros exames. Por exemplo, a coagulação pode ser iniciada com diferentes concentrações de TF (ou mesmo um outro iniciador) e a concentração e composição dos lípidos adicionados pode ser alterada. O inibidor da tripsina do milho (CTI – *Corn Trypsin Inhibitor*), um inibidor específico do FXIIa pode ser adicionado para bloquear a ativação de contacto. A trombomodulina solúvel (TM) ou a proteína C ativada (APC) podem ser incluídos no ensaio de forma a alterar a via anticoagulante da PC. As condições experimentais devem ser determinadas rigorosamente, visto que elas determinam quais as vias pro- e anti-coagulantes contribuem para a produção de trombina e, conseqüentemente, influenciam o resultado final. Por exemplo, a concentração de TF irá determinar a contribuição da coagulação intrínseca no processo de geração de trombina e qual o papel desempenhado pelo TFPI ou PS na inibição da formação de trombina. De maneira semelhante, a adição de TM ou APC aumenta a sensibilidade do exame para a via anticoagulante desempenhada pela PC. Sendo assim, os fatores de coagulação e inibidores que atualmente contribuem para a modulação da curva de geração de trombina, os fatores determinantes do teste, sofrem alterações de acordo com as condições experimentais utilizadas. Vários estudos, realizados sob diferentes condições experimentais avaliaram a influência de diferentes determinantes na formação de trombina. Constatou-se que os principais determinantes são o fibrinogénio e TFPI quando são usadas baixas concentrações de TF, contudo, quando são usadas altas concentrações, os principais determinantes são a protrombina e antitrombina. Também foi demonstrado que a função plaquetária exerce uma forte influência quando é utilizado plasma rico em plaquetas. A geração de trombina é também influenciada por variantes biológicas como a idade, sexo, índice de massa corporal, fatores genéticos e condições adquiridas (p.e. gravidez, contraceção oral, etc.), os quais influenciam os níveis de certos fatores de coagulação e inibidores. Esta variabilidade de resultados sob diferentes condições experimentais pode ser usada para identificar processos ou proteínas específicas da coagulação que sejam responsáveis pelo fenótipo de um doente.[67]

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

Os testes de geração de trombina são cada vez mais utilizados, sendo atualmente realizados em vários laboratórios em todo o mundo. Embora o seu uso tenha principalmente um fim investigacional, a sua potencial utilização clínica como preditor de risco hemorrágico/trombótico tem sido explorada por vários estudos. No futuro, estes testes poderão ser usados em decisões clínicas relacionadas com a prevenção e tratamento de distúrbios da coagulação. Contudo, existem ainda alguns problemas. A diferença de protocolos e condições experimentais, com uso de diferentes reagentes a concentrações desiguais, torna difícil o estabelecimento de intervalos de referência para os parâmetros avaliados e a sua comparação entre diferentes laboratórios. Existem ainda questões relacionadas com a colheita da amostra, a preparação do plasma e outras variáveis pré-analíticas que podem influenciar o resultado final.

ETP no Doente Cirrótico

Nos últimos anos vários estudos realizados avaliaram a hemostase no doente cirrótico através da utilização de testes de geração de trombina, partindo do pressuposto que os testes convencionais eram incapazes de refletir um balanço global da coagulação, sendo maioritariamente influenciados por fatores pró-coagulantes, não refletindo alterações nos fatores anti-coagulantes, que estão presentes na maioria dos doentes.

Um estudo publicado em 2005 por Tripodi *et al.* avaliou a função hemostática em doentes cirróticos através de um teste de geração de trombina em plasma sem plaquetas. Constatou-se que a produção de trombina se encontrava diminuída quando o teste era realizado sem TM, o que é consistente com os níveis reduzidos de protrombina que são frequentemente encontrados nestes doentes. Contudo, quando o exame era realizado com a adição de TM, de forma a ocorrer uma ativação completa da PC, os doentes com cirrose produziam quantidades semelhantes de trombina relativamente ao grupo controlo, apesar de possuírem um TP e aPTT superior. Isto sugere que a redução de protrombina é compensada pela redução de PC, mantendo o equilíbrio da hemostase inalterado. Constatou-se mesmo que a redução da PC era superior à da protrombina, o que poderia explicar a baixa frequência de hemorragias em outros locais além do trato gastro-intestinal. Existem ainda outros fatores que podem ser responsáveis pela normal produção de trombina. O FVIII está aumentado em doentes cirróticos comparativamente a indivíduos normais, e constatou-se previamente que elevados níveis deste fator estão associados a marcadores bioquímicos de formação de trombina – fragmento 1+2 de protrombina. Os baixos níveis de antitrombina e TFPI podem também ajudar a restaurar o balanço hemostático e evitar a ocorrência de hemorragias. Estes resultados sugerem que a ocorrência de eventos hemorrágicos se deve principalmente a alterações hemodinâmicas, como a hipertensão portal, e não é dependente de alterações do sistema hemostático. Eles também ajudam a explicar a baixa eficácia clínica de agentes pró-coagulantes como o fator VII recombinante ativo no controlo da hemorragia por varizes esofágicas. Outra implicação clínica destes resultados consiste no facto do PT e aPTT serem inadequados para prever o verdadeiro risco hemorrágico em doentes que serão submetidos a procedimentos invasivos como a biopsia hepática ou cirurgia de transplante.[57]

A formação de trombina *in vivo* é também dependente da função plaquetária, o que sugere que certos graus de trombocitopenia ou trombocitopenia possam afetar a produção de trombina nos

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

doentes cirróticos. Um estudo realizado em 2006 Tripodi *et al.* avaliou esta hipótese através de um teste de geração de trombina. Os investigadores tentaram usar um exame com condições experimentais que mimetizassem o melhor possível as condições que ocorrem *in vivo*, isto é, a presença de fatores de coagulação, a presença de TM para uma ativação ótima da PC e a presença de plaquetas. O número de plaquetas das amostras foi ajustado para corresponder a uma contagem padronizada (i.e., $100 \times 10^9/L$) e também para a contagem de plaquetas do doente. Os resultados mostraram que a produção de trombina se encontrava normal quando eram usadas amostras de plasma ricas em plaquetas com o ajuste prévio da contagem de plaquetas para $100 \times 10^9/L$. Concluiu-se então que as plaquetas de doentes cirróticos são capazes de suportar uma produção adequada de trombina. Contudo, quando o número de plaquetas foi ajustada para a contagem de plaquetas do doente, refletindo a presença de trombocitopenia, as diferenças entre doentes e grupo controlo foi estatisticamente diferente, e houve doentes que produziram baixos níveis de trombina. Curiosamente, estes doentes eram os que apresentavam as contagens de plaquetas mais baixas, o que sugere que o número de plaquetas tenha um papel chave na produção de trombina e na tendência para eventos hemorrágicos. Esta conclusão é suportada por 3 linhas de evidência. Primeiro, houve diferença estatisticamente significativa entre doentes (baixo número de plaquetas) e grupo controlo (normal número de plaquetas). Segundo, a quantidade de trombina formada correlacionava-se com o número de plaquetas. Terceiro, a quantidade de trombina gerada aumentou significativamente quando o número de plaquetas foi ajustado para $100 \times 10^9/L$. Este aumento é estatisticamente significativo, contudo, a sua relevância *in vivo* ainda não foi estabelecida. Estas conclusões poderiam justificar a transfusão plaquetária ou o tratamento com trombopoietina recombinante humana naqueles doentes com trombocitopenia severa quando têm hemorragias espontâneas ou antes de serem submetidos a uma cirurgia ou biopsia hepática. As plaquetas transfundidas poderiam proporcionar as superfícies fosfolipídicas adequadas para complementar a produção normal de trombina. Embora a sobrevivência das plaquetas esteja reduzida em doentes cirróticos, o que poderá limitar a transfusão plaquetária como medida terapêutica, o mesmo não se passa para o uso de trombopoietina. Ensaios clínicos serão necessários para determinar o valor clínico destas medidas terapêuticas no controlo e profilaxia de eventos hemorrágicos, mesmo como alternativa ao fator VII recombinante ativo.[70]

Um outro estudo realizado em 2010 por Gatt *et al.* teve como objetivo demonstrar a utilidade de um teste de geração de trombina, o CAT, em doentes com cirrose hepática, especialmente aqueles com coagulopatia evidenciada por um INR aumentado. Os autores quiseram verificar as

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

conclusões do estudo realizado em 2005 por Tripodi *et al.*, que, segundo eles, poderiam ter sido influenciadas pela ativação de contacto, um fenómeno que resulta num aumento na produção de trombina como resultado da ativação do FXII, especialmente quando se usam baixas concentrações de TF, ou pelo viés existente devido ao facto de alguns doentes possuírem um PT normal. Os investigadores referiram ainda que apesar do ETP ser normal, podem ocorrer defeitos em outros momentos da produção de trombina que podem ser demonstrados por alterações dos parâmetros da curva de geração de trombina. Para evitar o fenómeno de ativação de contacto foi usado neste estudo o CTI. Foram registados, tanto para o grupo controlo como para o grupo de doentes, os seguintes parâmetros do teste de geração de trombina: *lag time*, *peak time*, *peak height*, ETP e *start tail time* (tempo decorrido entre o início e o fim da reação). Foi também calculada a velocidade máxima de produção de trombina pela divisão entre o *peak time* e a *lag time*. A taxa de inibição de trombina foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{peak height}(nM)}{STT - \text{peak time (min)}}$$

Neste estudo foi usado um extrato de veneno de cobra, o Protac®, como substituto da TM recombinante solúvel, que demonstrou em outros estudos ser adequado para ativação da PC. O rácio de ETP foi calculado pela divisão do ETP com Protac® pelo ETP sem Protac®. Foi calculado o PT e INR para todas as amostras assim como os níveis de FVIII, antitrombina, PC, PS livre, FII e FV, TFPI e fibrinogénio.

Os resultados do estudo mostraram que doentes com cirrose e INR aumentando têm um perfil hipercoagulante de produção de trombina com uma velocidade máxima de geração de trombina aumentada, taxa de inibição de trombina diminuída, ETP aumentado após a adição de Protac® e rácios de ETP aumentados. Este foi o primeiro estudo a demonstrar um estado hipercoagulante no doente cirrótico. Verificou-se também que a fase inicial de formação de trombina, representada pelo *lag time*, é normal neste grupo de doentes. Os níveis de antitrombina estavam correlacionados positivamente com o *lag time*. O TFPI demonstrou ser uma variável independente do *lag time*. O rácio de ETP aumentado demonstra uma maior resistência ao veneno de cobra por parte do grupo de doentes, que produzem mais trombina quando este extrato é adicionado. Esta resistência aumentada pode ser explicada pela redução dos níveis de PC, mas também pela redução dos níveis de FV e pelo aumento dos níveis de FVIII, que por sua vez dificultam a ativação da PC, visto que o FV atua como um cofator da PC na inativação do FVIIIa. Os resultados obtidos são consistentes com outros estudos que demonstraram que os doentes

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
Potencial de Trombina Endógeno no Doente Cirrótico

hepáticos não estão protegidos de eventos trombóticos apesar de terem um INR aumentado, e tinham um risco trombótico aumentado quando comparados com o grupo controlo. Verificou-se também que a maioria dos doentes com INRs superiores a 1.2 são resistentes ao Protac® mas os doentes com INRs entre 1.21 e 2.0 também demonstraram uma aumento na velocidade de produção de trombina, possivelmente devido a uma estado pro-coagulante. Mais estudos serão necessários para investigar um maior grupo de doentes com INRs superiores a 2.5, de forma a determinar se este fenómeno apenas se verifica para doentes com coagulopatia ligeira a moderada. Existiram ainda algumas limitações associadas a este estudo que devem ser mencionadas. Os autores não usaram plasma rico em plaquetas, da mesma forma que o estudo realizado em 2005, o que torna este exame menos sensível à presença de trombocitopenia. Outra limitação refere-se às diferenças de idade e de género entre o grupo de doentes e o grupo controlo. Apesar destas limitações, pode-se concluir que o balanço hemostático nos doentes cirróticos favorece a ocorrência de eventos trombóticos, ao contrário do que se acreditava antigamente. Mais uma vez, constatou-se que os testes convencionais (PT/INR) não devem ser usados para avaliar o risco hemorrágico e na maioria dos casos, a transfusão profilática de fatores de coagulação não é justificada e pode mesmo ser perigosa por aumentar o risco trombótico e atrasar procedimentos terapêuticos e diagnósticos clinicamente importantes. Os autores defendem mesmo que estes resultados justificam a realização de mais estudos de forma a criarem-se novas orientações clínicas para o uso profilático ou terapêutico de produtos sanguíneos e que o uso de testes de geração de trombina poderá ser a melhor alternativa para a avaliação da hemostasia e orientação do uso de agentes hemostáticos neste grupo de doentes.[71]

Por fim, um último estudo realizado em 2012 por Nam Youngwon *et al.* investigou a relação entre os diferentes fatores pro-coagulantes e anticoagulantes e os testes convencionais (PT e aPTT) e o teste de geração de trombina, numa amostra de doentes cirróticos. Os autores também usaram o teste de geração de trombina com duas concentrações diferentes de TF (1 e 5pM) para investigar se os doentes com cirrose exibiam um estado hipo- ou hipercoagulante. Os parâmetros registados para o teste de geração de trombina foram o *lag time*, o ETP e o *peak height*. Neste estudo foi utilizado TM recombinante solúvel e o rácio de ETP foi calculado dividindo o ETP com TM pelo ETP sem TM. Foi também calculado o PT e o aPTT, níveis de fibrinogénio, níveis de fatores de coagulação (II, V, VII, VIII, IX e X), níveis de antitrombina, PC e PS.

Os resultados demonstraram que os níveis de FII, FV, FVII e FIX influenciam significativamente o PT. Como o fígado produz a grande maioria dos fatores de coagulação, o

prolongamento do PT é esperado neste grupo de doentes. Contudo, nunca foi constatado se as proteínas anticoagulantes, como a PC e a PS, influenciavam o PT. Curiosamente, constatou-se que a PC tem um papel chave no prolongamento do PT. O aPTT foi principalmente dependente dos níveis de FII, FIX e FX, não sendo influenciado por fatores anticoagulantes. Conclui-se então que o aPTT não é um teste adequado para avaliar globalmente a coagulação nestes doentes. No que diz respeito ao teste de geração de trombina, o *lag time* foi positivamente determinado pelos níveis de fibrinogénio e anticoagulantes, incluindo a PC e PS. Pensa-se que o fibrinogénio possa reduzir o *lag time*, contudo, tal facto não foi verificado neste estudo. O *peak height* foi significativamente dependente dos níveis de FIX e PC. O ETP foi altamente dependente dos níveis de PC. Como podemos constatar, a PC afeta significativamente todos os parâmetros avaliados no teste de geração de trombina, o que demonstra que este exame é altamente sensível aos níveis de PC. Desta forma, espera-se que o teste de geração de trombina seja um bom exame, que permita estimar uma atividade global da coagulação, com especial destaque para situações clínicas associadas a défices de PC, como a cirrose. O rácio de ETP ratio foi calculado para ambas as concentrações de TF, verificando-se um aumento do rácio de ETP em doentes com cirrose relativamente ao grupo controlo para uma concentração de TF de 1pM, o que é consistente com uma resistência aumentada à ação da TM, contudo, não se verificaram alterações entre os dois grupos com concentrações de TF de 5pM. O uso de uma concentração de TF mais baixa (1pM), torna o exame mais sensível ao FVIII, FIX e FXI. Se tivermos em conta que o estado hipercoagulante em doentes cirróticos se deve a um aumento dos níveis de FVIII e diminuição dos níveis de PC, o rácio de ETP encontra-se naturalmente aumentado para estas condições experimentais. Pelo contrário, o uso de uma concentração de TF maior (5pM) torna o exame menos sensível às concentrações de FVIII, portanto, não deve ser usado para detetar um estado pro-coagulante em doentes cirróticos. Demonstrou-se também que o rácio de ETP com concentração de TF de 1pM aumentava gradualmente em função do MELD, até uma pontuação de 25. Contudo, doentes com MELD>25 não possuíam rácios de ETP superior a outros doentes com MELD inferior. Mais estudos com maiores amostras que contenham doentes com MELD>25 são necessários para verificar se os estados de hipercoagulabilidade são principalmente observados em doentes com MELD baixo a moderado. As limitações deste estudo incluíram o uso de amostras de plasma pobre em plaquetas e a não utilização de CTI de forma a inibir a ativação por contacto.[72]

Conclusão

A cirrose hepática está associada a um distúrbio complexo da hemostase. A diminuição equivalente de fatores pro- e anticoagulantes parece manter o equilíbrio hemostático inalterado.

A evidência de que os testes convencionais (PT e aPTT) são maus preditores de eventos hemorrágicos, pelo fato de serem apenas sensíveis a fatores pro-coagulantes, levou ao desenvolvimento de novos exames que permitam uma avaliação global da hemostase. A TEG e os Testes de Geração de Trombina são dois testes cada vez mais utilizados na avaliação deste grupo de doentes. O teste de geração de trombina, com o ETP, é um teste que permite avaliar a capacidade de produção de trombina numa amostra de plasma após a ativação da coagulação *in vitro*. Este teste, ao contrário dos testes convencionais, reflete a interação entre forças pro- e anticoagulantes, permitindo desta forma uma avaliação global da hemostase. Ao longo dos últimos anos vários estudos avaliaram a hemostase no doente cirrótico através da utilização destes testes. Estes estudos concluíram que este grupo de doentes produz uma quantidade de trombina semelhante ou mesmo superior relativamente ao grupo controlo, o que sugere que o sistema hemostático se encontra equilibrado ou mesmo hipercoagulado e que a ocorrência de eventos hemorrágicos deve-se principalmente a alterações hemodinâmicas, como a hipertensão portal, e não são dependentes do nível de coagulopatia. Constatou-se mais uma vez que os testes convencionais não prediziam o risco hemorrágico em doentes que serão submetidos a procedimentos invasivos como a biópsia hepática ou cirurgia de transplante. O uso do teste de geração de trombina permitiu também concluir que o número de plaquetas tem um papel chave na produção de trombina e na tendência para eventos hemorrágicos. Através das alterações das condições experimentais, foi possível ainda determinar quais os principais determinantes da produção de trombina.

No futuro, é expectável que os ensaios clínicos prospetivos sejam capazes de relacionar os resultados deste teste com os eventos hemorrágicos e conduzam a novas orientações clínicas para o uso profilático ou terapêutico de produtos sanguíneos.

Bibliografia

- [1] A. Tripodi and P. M. Mannucci, “The coagulopathy of chronic liver disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 2, pp. 147–156, Jul. 2011.
- [2] T. Lisman and R. J. Porte, “Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences,” *Blood*, vol. 116, no. 6, pp. 878–885, Aug. 2010.
- [3] S. H. Caldwell, M. Hoffman, T. Lisman, B. G. Macik, P. G. Northup, K. R. Reddy, A. Tripodi, A. J. Sanyal, and Coagulation in Liver Disease Group, “Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management,” *Hepatology*, vol. 44, no. 4, pp. 1039–1046, Oct. 2006.
- [4] A. Tripodi, Q. M. Anstee, K. K. Sogaard, M. Primignani, and D. C. Valla, “Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 9, no. 9, pp. 1713–1723, Sep. 2011.
- [5] E. B. Tapper, S. C. Robson, and R. Malik, “Coagulopathy in cirrhosis – The role of the platelet in hemostasis,” *J. Hepatology*, vol. 59, no. 4, pp. 889–890, Oct. 2013.
- [6] E. Giannini, F. Botta, P. Borro, D. Risso, P. Romagnoli, A. Fasoli, M. R. Mele, E. Testa, C. Mansi, V. Savarino, and R. Testa, “Platelet count/spleen diameter ratio: proposal and validation of a non-invasive parameter to predict the presence of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis,” *Gut*, vol. 52, no. 8, pp. 1200–1205, Aug. 2003.
- [7] P. A. Clavien, C. A. Camargo, R. Croxford, B. Langer, G. A. Levy, and P. D. Greig, “Definition and classification of negative outcomes in solid organ transplantation. Application in liver transplantation,” *Ann. Surg.*, vol. 220, no. 2, pp. 109–120, Aug. 1994.
- [8] N. Afdhal, J. McHutchison, R. Brown, I. Jacobson, M. Manns, F. Poordad, B. Weksler, and R. Esteban, “Thrombocytopenia associated with chronic liver disease,” *J. Hepatology*, vol. 48, no. 6, pp. 1000–1007, Jun. 2008.
- [9] P. A. McVay and P. T. Toy, “Lack of increased bleeding after liver biopsy in patients with mild hemostatic abnormalities,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 94, no. 6, pp. 747–753, Dec. 1990.
- [10] P. A. McVay and P. T. Toy, “Lack of increased bleeding after paracentesis and thoracentesis in patients with mild coagulation abnormalities,” *Transfusion (Paris)*, vol. 31, no. 2, pp. 164–171, Feb. 1991.
- [11] M. J. Wallace, A. Narvios, B. Lichtiger, K. Ahrar, F. A. Morello, S. Gupta, D. C. Madoff, and M. E. Hicks, “Transjugular liver biopsy in patients with hematologic malignancy and severe thrombocytopenia,” *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR*, vol. 14, no. 3, pp. 323–327, Mar. 2003.
- [12] A. De Gottardi, T. Thévenot, L. Spahr, I. Morard, S. Bresson-Hadni, F. Torres, E. Giostra, and A. Hadengue, “Risk of complications after abdominal paracentesis in cirrhotic patients: a prospective study,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.*, vol. 7, no. 8, pp. 906–909, Aug. 2009.
- [13] D. M. Monroe and M. Hoffman, “The coagulation cascade in cirrhosis,” *Clin. Liver Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2009.
- [14] G. G. C. Hugenholtz, R. J. Porte, and T. Lisman, “The platelet and platelet function testing in liver disease,” *Clin. Liver Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 11–20, Feb. 2009.
- [15] M. Kajihara, Y. Okazaki, S. Kato, H. Ishii, Y. Kawakami, Y. Ikeda, and M. Kuwana, “Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 22, no. 1, pp. 112–118, Jan. 2007.
- [16] J. Goulis, T. N. Chau, S. Jordan, A. B. Mehta, A. Watkinson, K. Rolles, and A. K. Burroughs, “Thrombopoietin concentrations are low in patients with cirrhosis and thrombocytopenia and are restored after orthotopic liver transplantation,” *Gut*, vol. 44, no. 5, pp.

754–758, May 1999.

- [17] A. Ordinas, G. Escolar, I. Cirera, M. Viñas, F. Cobo, J. Bosch, J. Terés, and J. Rodés, “Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 24, no. 5, pp. 1137–1142, Nov. 1996.
- [18] T. Lisman, T. N. Bongers, J. Adelmeijer, H. L. A. Janssen, M. P. M. de Maat, P. G. de Groot, and F. W. G. Leebeek, “Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 44, no. 1, pp. 53–61, Jul. 2006.
- [19] J. C. Blake, D. Sprengers, P. Grech, P. A. McCormick, N. McIntyre, and A. K. Burroughs, “Bleeding time in patients with hepatic cirrhosis,” *BMJ*, vol. 301, no. 6742, pp. 12–15, Jul. 1990.
- [20] D. P. Thomas, V. J. Ream, and R. K. Stuart, “Platelet aggregation in patients with Laennec’s cirrhosis of the liver,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 276, no. 24, pp. 1344–1348, Jun. 1967.
- [21] P. Witters, K. Freson, C. Verslype, K. Peerlinck, M. Hoylaerts, F. Nevens, C. Van Geet, and D. Cassiman, “Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 27, no. 11, pp. 1017–1029, Jun. 2008.
- [22] K. Enyoji, J. Sévigny, Y. Lin, P. S. Frenette, P. D. Christie, J. S. Esch, M. Imai, J. M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D. L. Beeler, E. Csizmadia, D. D. Wagner, S. C. Robson, and R. D. Rosenberg, “Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation,” *Nat. Med.*, vol. 5, no. 9, pp. 1010–1017, Sep. 1999.
- [23] G. Laffi, F. Marra, P. Failli, M. Ruggiero, E. Cecchi, V. Carloni, A. Giotti, and P. Gentilini, “Defective signal transduction in platelets from cirrhotics is associated with increased cyclic nucleotides,” *Gastroenterology*, vol. 105, no. 1, pp. 148–156, Jul. 1993.
- [24] P. A. Cahill, E. M. Redmond, and J. V. Sitzmann, “Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 89, no. 3, pp. 273–293, Mar. 2001.
- [25] H. M. Maurer, J. Caul, and W. E. Laupus, “Bilirubin-induced Platelet Staining, Aggregation, and Adenine Nucleotide Release,” *Pediatr. Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 465–465, Sep. 1970.
- [26] G. Moïny, A. Thirion, and C. Deby, “Bilirubin induces platelet aggregation,” *Thromb. Res.*, vol. 59, no. 2, pp. 413–416, Jul. 1990.
- [27] M. Senzolo, J. Coppell, E. Cholongitas, A. Riddell, C. K. Triantos, D. Perry, and A. K. Burroughs, “The effects of glycosaminoglycans on coagulation: a thromboelastographic study,” *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, vol. 18, no. 3, pp. 227–236, Apr. 2007.
- [28] R. F. McKee, S. Hodson, J. Dawes, O. J. Garden, and D. C. Carter, “Plasma concentrations of endogenous heparinoids in portal hypertension,” *Gut*, vol. 33, no. 11, pp. 1549–1552, Nov. 1992.
- [29] A. Tripodi and P. M. Mannucci, “Abnormalities of hemostasis in chronic liver disease: Reappraisal of their clinical significance and need for clinical and laboratory research,” *J. Hepatol.*, vol. 46, no. 4, pp. 727–733, Apr. 2007.
- [30] P. Gresele, B. M. Binetti, G. Branca, C. Clerici, S. Ascitti, A. Morelli, N. Semeraro, and M. Colucci, “TAFI deficiency in liver cirrhosis: relation with plasma fibrinolysis and survival,” *Thromb. Res.*, vol. 121, no. 6, pp. 763–768, 2008.
- [31] J. Muciño-Bermejo, R. Carrillo-Esper, M. Uribe, and N. Méndez-Sánchez, “Coagulation abnormalities in the cirrhotic patient,” *Ann. Hepatol.*, vol. 12, no. 5, pp. 713–724, Oct. 2013.
- [32] M. Colucci, B. M. Binetti, M. G. Branca, C. Clerici, A. Morelli, N. Semeraro, and P. Gresele, “Deficiency of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in cirrhosis is associated with increased plasma fibrinolysis,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 38, no. 1, pp. 230–237, Jul. 2003.
- [33] T. Lisman, F. W. Leebeek, L. O. Mosnier, B. N. Bouma, J. C. Meijers, H. L. Janssen, H. K. Nieuwenhuis, and P. G. De Groot, “Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis,” *Gastroenterology*, vol. 121, no. 1,

pp. 131–139, Jul. 2001.

[34] J. L. Kujovich, “Hemostatic defects in end stage liver disease,” *Crit. Care Clin.*, vol. 21, no. 3, pp. 563–587, Jul. 2005.

[35] D. Ferro, A. Celestini, and F. Violi, “Hyperfibrinolysis in liver disease,” *Clin. Liver Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 21–31, Feb. 2009.

[36] N. Bennani-Baiti and H. A. Daw, “Primary hyperfibrinolysis in liver disease: a critical review,” *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO*, vol. 9, no. 3, pp. 250–252, Mar. 2011.

[37] J. A. Huntington, “Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 1, no. 7, pp. 1535–1549, Jul. 2003.

[38] M. S. Bajaj, J. J. Birktoft, S. A. Steer, and S. P. Bajaj, “Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor,” *Thromb. Haemost.*, vol. 86, no. 4, pp. 959–972, Oct. 2001.

[39] B. Dahlbäck, “Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway,” *Int. J. Hematol.*, vol. 79, no. 2, pp. 109–116, Feb. 2004.

[40] H. Wada, M. Usui, and N. Sakuragawa, “Hemostatic abnormalities and liver diseases,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 34, no. 8, pp. 772–778, Nov. 2008.

[41] V. L. Ng, “Liver disease, coagulation testing, and hemostasis,” *Clin. Lab. Med.*, vol. 29, no. 2, pp. 265–282, Jun. 2009.

[42] J. L. Francis and D. J. Armstrong, “Acquired dysfibrinogenaemia in liver disease,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 35, no. 6, pp. 667–672, Jun. 1982.

[43] M. J. Hollestelle, H. G. M. Geertzen, I. H. Straatsburg, T. M. van Gulik, and J. A. van Mourik, “Factor VIII expression in liver disease,” *Thromb. Haemost.*, vol. 91, no. 2, pp. 267–275, Feb. 2004.

[44] A. Tripodi, M. Primignani, V. Chantarangkul, A. Dell’Era, M. Clerici, R. de Franchis, M. Colombo, and P. M. Mannucci, “An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis,” *Gastroenterology*, vol. 137, no. 6, pp. 2105–2111, Dec. 2009.

[45] A. Tripodi, M. Primignani, L. Lemma, V. Chantarangkul, A. Dell’Era, F. Iannuzzi, A. Aghemo, and P. M. Mannucci, “Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 52, no. 1, pp. 249–255, Jul. 2010.

[46] G. Oksüzöğlü, H. Simsek, I. C. Haznedaroğlu, and S. Kirazli, “Tissue factor pathway inhibitor concentrations in cirrhotic patients with and without portal vein thrombosis,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 92, no. 2, pp. 303–306, Feb. 1997.

[47] “The Prothrombin in hemophilia and in Obstructive Jaundice. by Quick, AJ: - Brainbooks.” [Online]. Available: <http://www.abebooks.com/Prothrombin-hemophilia-Obstructive-Jaundice-Quick-AJ/1304204435/bd>. [Accessed: 18-May-2015].

[48] A. Tripodi, “Tests of coagulation in liver disease,” *Clin. Liver Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 55–61, Feb. 2009.

[49] A. Tripodi, V. Chantarangkul, M. Primignani, F. Fabris, A. Dell’Era, C. Sei, and P. M. Mannucci, “The international normalized ratio calibrated for cirrhosis (INR(liver)) normalizes prothrombin time results for model for end-stage liver disease calculation,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 46, no. 2, pp. 520–527, Aug. 2007.

[50] L. Bellest, V. Eschwège, R. Poupon, O. Chazouillères, and A. Robert, “A modified international normalized ratio as an effective way of prothrombin time standardization in hepatology,” *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 46, no. 2, pp. 528–534, Aug. 2007.

[51] R. D. Langdell, R. H. Wagner, and K. M. Brinkhous, “Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 41, no. 4, pp. 637–647, Apr. 1953.

[52] R. R. Proctor and S. I. Rapaport, “The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 36, pp. 212–219, Sep. 1961.

- [53] R. N. Garrison, H. M. Cryer, D. A. Howard, and H. C. Polk, "Clarification of risk factors for abdominal operations in patients with hepatic cirrhosis," *Ann. Surg.*, vol. 199, no. 6, pp. 648–655, Jun. 1984.
- [54] J. F. Dillon, K. J. Simpson, and P. C. Hayes, "Liver biopsy bleeding time: an unpredictable event," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 9, no. 3, pp. 269–271, Jun. 1994.
- [55] K. Ewe, "Bleeding after liver biopsy does not correlate with indices of peripheral coagulation," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 26, no. 5, pp. 388–393, May 1981.
- [56] P. Schemmer, F. Decker, G. Dei-Anane, V. Henschel, K. Buhl, C. Herfarth, and S. Riedl, "The vital threat of an upper gastrointestinal bleeding: Risk factor analysis of 121 consecutive patients," *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 12, no. 22, pp. 3597–3601, Jun. 2006.
- [57] A. Tripodi, F. Salerno, V. Chantarangkul, M. Clerici, M. Cazzaniga, M. Primignani, and P. Mannuccio Mannucci, "Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests," *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 41, no. 3, pp. 553–558, Mar. 2005.
- [58] K. G. Mann, K. Brummel, and S. Butenas, "What is all that thrombin for?," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 1, no. 7, pp. 1504–1514, Jul. 2003.
- [59] M. B. C. Koh and B. J. Hunt, "The management of perioperative bleeding," *Blood Rev.*, vol. 17, no. 3, pp. 179–185, Sep. 2003.
- [60] R. T. Stravitz, "Potential Applications of Thromboelastography in Patients with Acute and Chronic Liver Disease," *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 8, no. 8, pp. 513–520, Aug. 2012.
- [61] L. Zuckerman, E. Cohen, J. P. Vagher, E. Woodward, and J. A. Caprini, "Comparison of thrombelastography with common coagulation tests," *Thromb. Haemost.*, vol. 46, no. 4, pp. 752–756, Dec. 1981.
- [62] P. Montalto, J. Vlachogiannakos, D. J. Cox, S. Pastacaldi, D. Patch, and A. K. Burroughs, "Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study," *J. Hepatol.*, vol. 37, no. 4, pp. 463–470, Oct. 2002.
- [63] Y. G. Kang, D. J. Martin, J. Marquez, J. H. Lewis, F. A. Bontempo, B. W. Shaw, T. E. Starzl, and P. M. Winter, "Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation," *Anesth. Analg.*, vol. 64, no. 9, pp. 888–896, Sep. 1985.
- [64] Z. Ben-Ari, M. Panagou, D. Patch, S. Bates, E. Osman, J. Pasi, and A. Burroughs, "Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis evaluated by thrombelastography," *J. Hepatol.*, vol. 26, no. 3, pp. 554–559, Mar. 1997.
- [65] R. Pihusch, A. Rank, P. Göhring, M. Pihusch, E. Hiller, and U. Beuers, "Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease," *J. Hepatol.*, vol. 37, no. 5, pp. 548–555, Nov. 2002.
- [66] T. N. Chau, Y. W. Chan, D. Patch, S. Tokunaga, L. Greenslade, and A. K. Burroughs, "Thrombelastographic changes and early rebleeding in cirrhotic patients with variceal bleeding," *Gut*, vol. 43, no. 2, pp. 267–271, Aug. 1998.
- [67] E. Castoldi and J. Rosing, "Thrombin generation tests," *Thromb. Res.*, vol. 127 Suppl 3, pp. S21–25, Feb. 2011.
- [68] H. M. H. Spronk, A. W. J. H. Dielis, E. De Smedt, R. van Oerle, D. Fens, M. H. Prins, K. Hamulyák, and H. ten Cate, "Assessment of thrombin generation II: Validation of the Calibrated Automated Thrombogram in platelet-poor plasma in a clinical laboratory," *Thromb. Haemost.*, vol. 100, no. 2, pp. 362–364, Aug. 2008.
- [69] G. T. Gerotziakas, F. Depasse, J. Busson, L. Leflem, I. Elalamy, and M. M. Samama, "Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thromboscope assay," *Thromb. J.*, vol. 3, p. 16, Oct. 2005.
- [70] A. Tripodi, M. Primignani, V. Chantarangkul, M. Clerici, A. Dell'Era, F. Fabris, F. Salerno, and P. M. Mannucci, "Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets," *Hepatol. Baltim. Md*, vol. 44, no. 2, pp. 440–445, Aug. 2006.

- [71] A. Gatt, A. Riddell, V. Calvaruso, E. G. Tuddenham, M. Makris, and A. K. Burroughs, “Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy,” *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 8, no. 9, pp. 1994–2000, Sep. 2010.
- [72] N. Youngwon, J.-E. Kim, H. S. Lim, K.-S. Han, and H. K. Kim, “Coagulation proteins influencing global coagulation assays in cirrhosis: hypercoagulability in cirrhosis assessed by thrombomodulin-induced thrombin generation assay,” *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 856754, 2013.