Felipe Maia de Toledo Piza

**Papel da tromboelastometria em pacientes com
dengue e trombocitopenia**

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

Programa de Anestesiologia
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Biasi
Cavalcanti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Piza, Felipe Maia de Toledo
Papel da tromboelastometria em pacientes com dengue e trombocitopenia /
Felipe Maia de Toledo Piza. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.

Orientador: Alexandre Biasi Cavalcanti.

Descritores: 1.Tromboelastografia/métodos 2.Dengue 3.Trombocitopenia
4.Testes de coagulação sanguínea 5.Transtornos da coagulação sanguínea
6.Estudo observacional 7.Estudos transversais

USP/FM/DBD-170/16

DEDICATÓRIA

À minha eterna parceira e inspiradora esposa, Polyana. Batalhadora nata, determinada e iluminada. Este trabalho só foi possível graças ao seu suporte. Obrigado por ser minha mulher, manter a essência da vida e prover meus maiores presentes.

Aos meus filhos Bruna e Thiago fontes de carinho, energia, motivação e vida.

Aos meus pais Sílvio e Ana por me incentivarem sempre ao caminho da educação como transformação e exemplos de caráter retilíneo.

Aos meus irmãos Mariana, Judith e Joaquim que me ensinam a compartilhar os valores da vida.

À minha avó Petra (*in memoriam*), sabedoria constante que costumava dizer: “O homem caminha, mas Deus encaminha”.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que humildemente participaram deste estudo e contribuíram com a ciência por meio de seu mais nobre material: a vida.

Aos funcionários do Hospital Israelita Albert Einstein que trabalharam incessantemente durante a epidemia de dengue em São Paulo de 2015.

À professora Dra. Maria José Carmona, mulher visionária à frente de seu tempo. Agradeço a oportunidade e confiança em mim depositada.

Ao Dr. Thiago Domingos Corrêa, incessante colaborador desse projeto. Incansável na busca do rigor científico em consonância com os aspectos éticos em todos os momentos. Um exemplo de conduta retilínea e amizade.

À Dra. Roseny dos Reis Rodrigues, grande estimuladora e entusiasta da ciência e das aplicabilidades da tromboelastometria. Obrigado por semear em mim este projeto.

Ao Dr. Alexandre Biasi Cavalcanti, orientador que aceitou o desafio deste estudo, ajudando superar dificuldades e limitações constantes.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues Marra, grande mentor de todo atendimento dados aos pacientes com dengue. Exímio colaborador deste estudo.

À Andréa Aparecida Rocco Villarinho, exemplo de funcionária e de pessoa, mantendo seu auxílio extenuante em todos os momentos desse estudo.

Ao Dr. João Carlos Campos Guerra, incentivador constante deste trabalho com inúmeras contribuições.

Ao Valdir Fernandes de Aranda, pelo apoio laboratorial intenso durante a campanha.

À Sandra Christina Pereira Lima Shiramizo, presente em todo suporte logístico deste estudo.

À Maria Roza de Jesus de Lima, pelo grande apoio operacional durante o atendimento dos pacientes.

À Ana Paula Barbosa Venâncio, pela ajuda com as figuras deste estudo e carinho com o projeto.

Ao prof. Dr. Esper Georges Kallas, pesquisador nato, que generosamente nos concedeu a oportunidade do trabalho conjunto em sua linha de pesquisa.

À secretaria de Pós-Graduação de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio em manter prazos e fluxos institucionais.

Não há maior oportunidade ou obrigação para um ser humano do que ser médico. No cuidado do sofrimento, ele precisa de habilidade técnica, conhecimento científico e compreensão humana. Quem usa tais princípios com humildade, coragem e sabedoria prestará um serviço exclusivo para seus pacientes e vai construir um edifício de carácter permanente dentro de si. O médico deve exigir-se não mais do que isso e contentar-se com nada menos.

Dr. Tinsley Harrison
(Princípios de Medicina Interna - 1ª edição)

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Histórico.....	16
1.2 Epidemiologia.....	17
1.3 Agente infeccioso.....	18
1.4 Fisiopatologia.....	20
1.5 Classificação DENV.....	22
1.6 Manifestações clínicas.....	23
1.7 Manejo da coagulopatia em pacientes com DENV.....	24
1.8 Coagulograma.....	24
1.9 Testes viscoelásticos.....	25
1.10 Modelo de coagulação.....	26
1.11 Tromboelastografia.....	30
1.12 Tromboelastometria.....	30
1.13 Justificativa para o estudo.....	32
2 OBJETIVO.....	34
3 MÉTODOS.....	36
3.1 Desenho do estudo e participantes.....	37
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	38
3.3 Procedimentos.....	39
3.4 Canais variáveis para análise tromboelastométrica.....	41
3.5 Seguimento clínico.....	43
3.6 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS.....	45
5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÃO.....	73
7 ANEXOS.....	75
8 REFERÊNCIAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA	<i>Aedes albopictus</i>
AE	<i>Aedes aegypti</i>
Ab	anticorpos
ADP	Adenosina-difosfato
Alpha ⁰	<i>Alpha angle</i>
APTEM	<i>Aprotinin thromboelastometry</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisas
CIVD	coagulação intravascular disseminada
CFT	<i>Clot Formation Time</i>
CT	<i>Clotting Time</i>
DDAVP	Desmopressina
DENV	Vírus da dengue
DS	Dengue severa
Da	Distribuição anormal
Dn	Distribuição normal
DDI	d-dímero
DP	Desvio Padrão
EC	Células endoteliais
EUA	Estados Unidos da América
EXTEM	<i>Extrinsic thromboelastometry</i>
FC	Frequência Cardíaca
FcyR	Receptores de imunoglobulina
Fib	Fibrinogênio
FIBTEM	<i>Fibrinogen thromboelastometry</i>
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FI-XII	Fatores de coagulação de I a XII
FvW	Fator de Von Willebrand
Hb	Hemoglobina
HEPTTEM	<i>Heparinase thromboelastometry</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ht	Hematócrito
IgG	Imunoglobulina tipo G
IgM	Imunoglobulina tipo M
INR	<i>International normalized ratio</i>
IFN γ	Interferon gama
INTEM	<i>Intrinsic thromboelastometry</i>
IQR	intervalo interquartil
MCF	<i>Maximum Clot Firmness</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ML	<i>Maximum lysis</i>
Mo	Monócitos

MS	Ministério da Saúde
Neut	Neutrófilos
NS1	<i>Non structural antigen 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PDFs	Produtos de degradação da fibrina
PF3	Fator plaquetário 3
POCT	<i>Point of Care Test</i>
PFC	Plasma Fresco Congelado
PLT	Plaqueta
ROTEM	<i>Rotational thromboelastometry</i>
ROTEG	<i>Rotational thromboelastogram</i>
SCD	Síndrome do choque da dengue
SER	Sistema retículo endotelial
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
TT	Tempo de trombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
TRALI	<i>Transfusion Related Acute Lung Injury</i>
TACO	<i>Transfusion Associated Cardiac Overload</i>
TXA2	Tromboxane A2
VPM	Volume Plaquetário Médio
WBC	<i>White Blood Cells</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição mundial de prevalência do DENV.....	18
Figura 2 -	Representação esquemática da fisiopatogenia do DENV.....	21
Figura 3 -	Representação esquemática cronológica da sequência de eventos ocorridos no DENV.....	23
Figura 4 -	ROTEM®; Pentapharm Co., Munich, Germany.....	26
Figura 5 -	Novo modelo celular da coagulação.....	29
Figura 6 -	Representação gráfica do processo de polimerização da fibrina com ROTEM®.....	31
Figura 7 -	Representação gráfica do papel dos fatores de coagulação e suas interações no processo gráfico tromboelastométrico da gênese da fibrina.....	32
Figura 8 -	Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo.....	38
Figura 9 -	Realização da Tromboelastometria no laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein através do ROTEM® (Pentapharm Co., Munich, Germany)	40
Figura 10 -	Fluxograma de atendimento de pacientes durante surto de DENV.....	40
Figura 11 -	Tromboelastometria sobre canal INTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group)	54
Figura 12 -	Tromboelastometria sobre canal EXTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group).....	55
Figura 13 -	Tromboelastometria sobre canal FIBTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group)	55
Figura 14 -	Tromboelastometria de um paciente do grupo DENV com alteração nos canais INTEM e EXTEM.....	56
Figura 15 -	Tromboelastometria de um paciente do grupo controle sem alteração nos canais INTEM e EXTEM.....	56
Figura 16 -	Tromboelastometria de um paciente do grupo DENV sem alteração no canal FIBTEM.....	56
Figura 17 -	Tromboelastometria de um paciente do grupo controle sem alteração no canal FIBTEM.....	57
Figura 18 -	Modelo de muro ilustrativo mostrando interação entre plaquetas (tijolos) e fibrinogênio (cimento) na manutenção do coágulo.....	63
Figura 19 -	Fatores de coagulação e suas proporções no plasma sanguíneo.....	66
Figura 20 -	Fluxograma guiado pelo ROTEM® para manejo individualizado de pacientes com sangramento ativo.....	68
Figura 21 -	Imagem de coágulo sanguíneo em microscopia eletrônica ampliadas em 2000 vezes.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais características dos participantes. Valores representam % (n/total n) ou mediana (intervalo interquartil [IQR]) quando indicado.....	51
Tabela 2 -	Variações laboratoriais com valores normais de referência. Valores expressos em medianas com intervalo interquartil.....	52
Tabela 3 -	Sumário ROTEM®. Valores representados em % (n/total n).....	52
Tabela 4 -	Sumário ROTEM® analisado com variáveis laboratoriais. Valores representam medianas com intervalo interquartil.....	53
Tabela 5 -	Seguimento telefônico dos pacientes com DENV incluídos no estudo.....	53

RESUMO

Piza FMT. *Papel da tromboelastometria em pacientes com dengue e trombocitopenia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: Dengue é uma doença viral prevalente e potencialmente fatal associada à alteração da permeabilidade capilar e coagulopatia. Entretanto, não há estudos concernentes aos achados tromboelastométricos nesta doença. Realizamos o presente estudo para analisar pacientes com dengue e plaquetopenia por meio de um exame rápido, efetivo e a beira leito comparando com os exames convencionais de coagulação. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo observacional e transversal conduzido entre os dias 6 de abril a 5 de maio de 2015, em São Paulo, Brasil, durante epidemia de dengue. Foi realizado tromboelastometria ROTEM® em 53 pacientes com dengue e trombocitopenia em associação com exames convencionais de coagulação: tempo de protrombina (TP), *international normalized ratio* (INR), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), tempo de trombina (TT), contagem de plaquetas, fibrinogênio e d-dímero. Um grupo controle de pacientes foi estabelecido para comparação do *status* tromboelastométrico. **RESULTADOS:** Um total de 38 pacientes de 53 (71,7%) apresentaram anormalidades no INTEM e 29/53 (57,4%) no EXTEM. Em contrapartida, alterações no FIBTEM foram encontradas apenas em 3/53 (5,7%). Houve significância estatística em pacientes correlacionando alterações tromboelastométricas no EXTEM e INTEM e contagem de plaquetas ($p=0,052$) e ($p=0,005$), respectivamente; assim como os valores de fibrinogênio ($p=0,006$) e ($p=0,021$), respectivamente. O grupo controle (GC) apresentou *status* tromboelastométrico normal em 10/10 (100%) na análise do INTEM, EXTEM, FIBTEM. Avaliação do EXTEM demonstrou significância estatística entre o GC e o grupo Dengue: CT ($p=0,044$); CFT ($p<0,001$); MCF ($p<0,001$) e Alpha ($p<0,001$). Foram observados níveis normais de fibrinogênio (mediana: 290) e altos níveis de d-dímero (mediana: 1330) com IQR (800-1840). Todos os pacientes (53/53) apresentavam trombocitopenia abaixo de $100 \times 10^9/L$ (mediana $77 \times 10^9/L$) IQR (63-88). Exames convencionais de coagulação revelaram-se completamente normais: TP (mediana: 100%) IQR (90-100); INR (mediana: 1,0) IQR (1,0-1,1); TTPa (mediana: 28,9 segundos) IQR (26,0-32,5) e TT (mediana: 18,2 segundos) IQR (17,0-19,5). Apenas (7/49) 14,3% pacientes apresentaram sangramento e (3/52) 5,8% necessitou de hospitalização. Não houve associação entre alterações tromboelastométricas com sangramento ou hospitalização. **CONCLUSÕES:** Dengue representa um processo inflamatório intenso, mantendo níveis normais de fibrinogênio. Portanto, FIBTEM mantém-se normal promovendo boa formação do coágulo sem risco imediato de sangramento. Não houve correlação entre os achados tromboelastométricos com os exames convencionais de coagulação, sugerindo que testes viscoelásticos são exames mais sensíveis para análise de coagulopatia precoce nessa população.

Descritores: tromboelastografia/métodos; dengue; trombocitopenia; testes de coagulação sanguínea; transtornos da coagulação sanguínea; estudo observacional; estudos transversais.

ABSTRACT

Piza FMT. *Thromboelastometry role in patients with dengue and thrombocytopenia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Dengue is a prevalent and potentially fatal viral disease associated with plasma leakage and coagulopathy, though no information is available on thromboelastometric profile. We performed this study to analyze dengue fever patients with thrombocytopenia clot changes through point-of-care thromboelastometry tests and standard coagulation tests. **METHODS:** This was an observational, transversal and cross sectional study conducted between April 6th and May 5th 2015 in São Paulo, Brazil, during a dengue outbreak. Thromboelastometry ROTEM® was performed in 53 patients with dengue and thrombocytopenia, in association with conventional coagulation tests: prothrombin time (PT), international normalized ratio (INR), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT); platelet count, fibrinogen level, and d-dimer. A control group of 10 patients was established to compare thromboelastometry profiles. **RESULTS:** A total of 38 patients in 53 (71,7%) had abnormalities in INTEM, 29 in 53 (57,4%) in EXTEM. Conversely, FIBTEM was abnormal in 3/53 (5,7%). Statistical analysis revealed significant relation in those patients with impairment EXTEM and INTEM with lowered platelet ($p=0,052$) and ($p=0,005$) respectively and lowered fibrinogen levels ($p=0,006$) and ($p=0,021$) respectively. Control group (CG) had normal status in 10/10 (100%) of INTEM, EXTEM, FIBTEM analysis. EXTEM analysis demonstrated statistical differences between CG and dengue group: CT ($p=0,044$); CFT ($p<0,001$); MCF ($p<0,001$) and Alpha ($p<0,001$). Normal levels of fibrinogen (median: 290) and high levels of d-dimer (median: 1330) IQR (800-1840) were found. All patients (53/53) had platelet under $100 \times 10^9/L$ (median $77 \times 10^9/L$) IQR (63-88). Standard coagulation tests were completely normal: PT (median: 100%) IQR (90-100); INR (median: 1,0) IQR (1,0-1,1); aPTT (median: 28,9 seconds) IQR (26,0-32,5) and TT (median: 18,2 seconds) IQR (17,0-19,5). Only (7/49) 14,3% patients had bleeding manifestations and (3/52) 5,8% needed hospitalization. There was no association between altered thromboelastometry with bleeding manifestations or hospitalization. **CONCLUSIONS:** Dengue represents an intense inflammatory process, maintaining normal levels of fibrinogen. FIBTEM remains normal providing good clot strength without immediate bleeding risk. There were no correlation between thromboelastometry findings and standard coagulation exams, suggesting that viscoelastic tests are more sensible method to analyze early coagulation impairments in this population.

Descriptors: thrombelastography/methods; dengue; thrombocytopenia; blood coagulation tests; blood coagulation disorders; observational study; cross-sectional studies.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Etimologicamente dengue deriva do termo *Ka-Dinga pepo* no idioma africano suaíli que descreve a doença como sendo causada por um “espírito do mal”^{1,2}. Posteriormente, a epidemia que afetou o comércio das Índias ocidentais de colonização espanhola foi definida pela forma que muitos pacientes se expressavam – como dengoso, melindroso, tihoso –, traduzindo a manifestação sintomática intensa imposta pela doença³. Na língua inglesa ela também é frequentemente nomeada como *break-bone fever*, febre que quebra ossos em mesma referência clínica^{2,4}.

As primeiras descrições de dengue feitas por Benjamin Rush datam de surto ocorrido na Filadélfia em meados de 1780, sendo nomeada de *break-bone fever*³. Posteriormente, diversos surtos ocorreram. Epidemias com complicações hemorrágicas, choque e morte foram reportados na Austrália em 1897, na Grécia em 1928, e Formosa em 1931¹. A demonstração de transmissão por picada de mosquito foi evidenciada em 1903⁴, e a etiologia viral em 1906¹. Sabin isolou o vírus em 1944 e estabeleceu a existência de 2 sorotipos³. Mais tarde, em 1956, Hammon identificou a existência de outros 2 sorotipos⁴. Após a II Guerra Mundial, a disseminação da doença se estabeleceu a partir do sudeste da Ásia com pandemia impressa no restante do planeta, impactando em surtos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e mortes^{4,5}. Nas últimas décadas, com fenômenos de crescimento populacional, urbanização não planejada em países emergentes, clima

propício, múltiplos criadouros, os focos para o mosquito *Aedes sp* mantêm-se ativos, e o controle da doença está longe do ideal^{5,6}.

1.2 Epidemiologia

Dengue é a doença causada por arbovírus mais prevalente do mundo⁵. Mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas com alto risco de transmissibilidade³. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a cada ano, 390 milhões de pessoas se infectem com o vírus da dengue (DENV) resultando em 500.000 hospitalizações e 20.000 mortes⁷. A dengue é transmitida sobretudo nos trópicos em uma área de abrangência entre as latitudes de 35 graus de latitude norte e 35 graus de latitude sul, correspondendo à distribuição do mosquito *Aedes aegypti* (AE), vetor da doença^{5,8,9}, conforme demonstra a Figura 1.

FONTE: Adaptado de Maria G Guzman EH, 2015⁹.
Figura 1 - Distribuição mundial de prevalência do DENV

1.3 Agente infeccioso

AE é o principal mosquito envolvido na transmissão da doença¹. Tem hábitos diurnos (picada geralmente entre às 08h-18h) e habitualmente é silencioso em sua jornada diária, pois sua picada é muitas vezes imperceptível em virtude de propriedades anestésicas³. Outro possível vetor é o *Aedes albopictus* (AA), que também pode transmitir o vírus da dengue (DENV)¹⁰. Ele é capaz de tolerar temperaturas mais amenas e desta forma pode ampliar a abrangência geográfica da doença. Alguns surtos do DENV nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa foram atribuídos ao AA^{1,11}. Fortuitamente não é um grande vetor e não depende da picada de seres

humanos para sua sobrevivência. Outras espécies que transmitem a dengue de menor relevância são o *A. polynesiensis* e o *A. scutellaris*⁵.

O AE usa o homem como parte de seu ciclo reprodutivo. É capaz de sobreviver e depositar seus ovos em água parada, sobretudo após períodos de chuvas do final do verão e início do outono em qualquer objeto que acumule água. Entretanto, em regiões endêmicas e de clima propício para o mosquito, a dengue pode circular por todo ano^{1,10}. Basta uma residência na vizinhança ter um foco para o *Aedes sp* que muitas famílias estarão suscetíveis ao DENV, pois o mosquito tem uma capacidade de voo de até 50 a 80 metros⁴. De tal sorte que medidas para o combate ao vetor devem ser encaradas de forma integral, homogênea e agressiva, uma vez que o AE além de transmitir o DENV também dissemina outras doenças como Chikungunya, Zika vírus e Febre Amarela¹.

A infecção pode ser adquirida através de uma única picada da fêmea do mosquito, que se alimenta do sangue de uma pessoa contaminada com dengue durante a viremia (2 a 10 dias), infectando as células que revestem seu intestino¹. Cerca de 8 a 10 dias depois, o vírus propaga-se para outros tecidos do inseto, como a glândula salivar, e assim é subsequentemente liberado em sua saliva na próxima picada³. O vírus parece não ter efeito negativo sobre o inseto, que se mantém infectado por toda a vida (6-8 semanas) sem apresentar sintomas¹. Nesse processo ele transmite e propaga em larga escala a doença⁵. Um mosquito é capaz de contaminar vários indivíduos em um só dia⁴. Só a fêmea pica, pois a hematofagia é necessária para o desenvolvimento completo dos ovos². Uma única fêmea é capaz de dar origem a 1.500 mosquitos durante sua vida¹².

1.4 Fisiopatologia

O DENV é um flavírus da família *Flaviridae*¹. Ele possui 4 sorotipos: DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4⁵. A doença prévia confere imunidade apenas específica ao sorotipo contaminante (autóloga)⁴. Como não há imunidade heteróloga com outros sorotipos, a reinfeção pode existir e não é incomum em muitos locais¹³. Porém, a segunda infecção pelo DENV tende a ser mais grave⁴. Na reinfeção, anticorpos anti-DENV não específicos do sorotipo da doença prévia, mas já existentes e linfócitos T, facilitando viremia mais precoce e mais intensa, impactando em resposta inflamatória mais exacerbada¹⁴. Desta forma, alguns pacientes podem evoluir com dengue com sinais de alarme ou DENV severa, também anteriormente reconhecida como febre hemorrágica dengue (FHD) traduzida por alteração da permeabilidade capilar e coagulopatia¹³. Crianças menores de um ano também podem ser vítimas da manifestação mais severa do DENV. Isso ocorre porque elas ainda podem carregar anticorpos circulantes passados pela mãe, sendo capazes da mesma forma de ativar a via imunológica de memória e desenvolver manifestações mais severas¹⁵. Embora qualquer sorotipo possa estar envolvido com dengue severa, o DENV 2 é o mais comumente associado¹³.

Monócitos (Mo) parecem ser o primeiro alvo do DENV. Anticorpos (Ac) de reação cruzada por infecção anterior, presentes na reinfeção, ligam-se ao vírus mas sem neutralizá-lo e então aumentam a entrada do vírus dentro dos Mo, expressando receptores de imunoglobulina (FcγR)¹³. Células T de

memória, presentes na reinfecção, reconhecem antígenos virais através de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e II¹⁵. Essas células T produzem citocinas como interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) promovendo lise de monócitos infectados pelo DENV^{13,16}. Essas citocinas têm efeito direto em células endoteliais (EC) e também liberam toxinas como C3a e C5a impactando em extravasamento plasmático^{14,15}, como ilustra a Figura 2.

FONTE: Adaptado de Rigau-Pérez JG, 2006¹⁷.

Figura 2 - Representação esquemática da fisiopatogenia do DENV

NOTA: Ac: Anticorpos; IFN: Interferon; TNF: Fator de necrose tumoral; IL: CE: Célula endotelial; C3a/5a: Complemento 3 ativado / 5 ativado; MHC: Complexo de histocompatibilidade principal.

1.5 Classificação DENV

A OMS redefiniu em 2009 a classificação da dengue¹⁸. Historicamente a dengue era classificada como febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD)¹⁵. Esta classificação foi questionada por estudiosos, pois a conotação hemorrágica da FHD poderia dar mais relevância à desordem hemorrágica do que ao extravasamento plasmático, que é a principal complicação fisiopatológica da doença^{17,18}. Manifestações hemorrágicas leves como epistaxe, gengivorragia e prova do laço positiva podem estar presentes em casos triviais da dengue sem configurar necessariamente gravidade⁵. O que define gravidade na FHD é sua apresentação completa sobre os 4 aspectos a seguir¹⁵:

1. Alteração da permeabilidade capilar (aumento do hematócrito em 20% ou serosite como derrame pleural, ascite, derrame pericárdico).
2. Trombocitopenia menor ou igual a $100 \times 10^9/L$.
3. Manifestações hemorrágicas como prova do laço positiva, epistaxe, gengivorragia, etc.
4. Febre nos últimos 2 a 7 dias.

Entretanto, com a nova classificação a dengue passa a ser dividida em dengue e dengue severa (DS) com sinais de alarme¹⁸. Embora tenha sido estabelecida pela OMS, essa classificação não é consenso entre autores e muitos artigos e livros ainda fazem referência à denominação prévia a 2009.

1.6 Manifestações clínicas

A dengue sem sinais de alarme fortuitamente é a forma mais comum da doença, sendo responsável por manifestações como: febre, mialgia, cefaleia, artralgia, conjuntivite, náusea, vômitos, diarreia, exantema, prurido com ou sem manifestações hemorrágicas leves como epistaxe ou gengivorragia⁵.

A DS é a manifestação grave da DENV caracterizada por extravasamento plasmático e coagulopatia^{3,14}. Uma ampliação na cascata de citocinas e ativação do sistema complemento provocam disfunção endotelial, destruição plaquetária, consumo de fatores da coagulação, vasculopatia, disfunção plaquetária podendo levar pacientes à coagulação intravascular disseminada (CIVD), choque e óbito^{4,8,19} Figura 3.

FONTE: Adaptado de Kurane I, 2007¹⁴.

Figura 3 - Representação esquemática cronológica da sequência de eventos ocorridos no DENV

NOTA: INF: interferon; NK: *natural killer*.

1.7 Manejo da coagulopatia em pacientes com DENV

Muitos estudos acessam e recomendam o manejo de pacientes com coagulopatia induzidas pelo DENV com testes convencionais da coagulação como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), tempo de trombina (TT), *international nationalized ratio* (INR)^{15,20}. O próprio Ministério da Saúde (MS) do Brasil recomenda administrar soluções de plasma fresco congelado e vitamina K até que o INR esteja abaixo de 1,5²¹.

1.8 Coagulograma

Os testes de coagulação convencionais foram desenvolvidos no momento em que a cascata de coagulação estava sendo descrita e estandardizados para monitorizar pacientes que faziam uso de antagonistas de vitamina K e heparina²². Apesar destes testes não terem propósito terapêutico para manejo hemorrágico e *trigger* transfusional, ainda são utilizados para esse fim. Eles requerem um tempo maior para processamento e leitura e não refletem a complexidade e precocidade de distúrbios hemostáticos em muitos casos²³.

1.9 Testes viscoelásticos

Diferentemente dos exames convencionais de coagulação, a tromboelastometria, ROTEM®, é uma metodologia para avaliação de coagulopatia de primeira linha. O fato de ela ser portátil permite que seja levada ao leito com rápido resultado, pois entre 5 e 30 minutos de processamento do exame já é possível ter informações sobre a dinâmica da formação do coágulo, estabilização e fibrinólise²⁴. Desta forma, reflete a hemostasia em *vivo*, sendo capaz de promover informações de maior utilidade clínica do que exames tradicionais da coagulação. São chamados de testes viscoelásticos porque promovem uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina, com avaliação funcional do fibrinogênio, plaqueta e fibrinólise demonstrando de forma singular a iniciação, formação e estabilização do coágulo²⁵.

A tromboelastografia (TEG), descrita em 1948 por Hellmut Hartert, permite a avaliação global do processo de geração da trombina²⁶. Método laboratorial que demonstra as interações entre as diferentes células do sangue e suas características bioquímicas, por meio de uma representação gráfica²⁷. A tromboelastografia (TEG®; Haemoscope Corporation, IL, EUA) ou tromboelastometria (ROTEM®; Pentapharm Co., Munich, Germany) permite uma rápida e robusta avaliação do coágulo, usando quantidade ínfima de sangue total²⁸, como mostra a Figura 4.

FONTE: arquivo pessoal, 2016.

Figura 4 - ROTEM®; Pentapharm Co., Munich, Germany

NOTA: Aparelho utilizado no laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein.

1.10 Modelo de coagulação

O mecanismo hemostático inclui três processos: hemostasia primária, coagulação (hemostasia secundária) e fibrinólise²². Estes processos têm em conjunto a finalidade de manter a fluidez necessária do sangue, sem haver extravasamento pelos vasos ou obstrução do fluxo pela presença de trombos²⁹.

Na hemostasia primária as plaquetas têm papel fundamental²⁹. A adesão plaquetária na presença do fator de Von Willebrand (FvW) e fator VIII (FVIII) é ativada no momento da lesão ou disfunção endotelial, pois expõe o sangue em contato com o colágeno da região subendotelial³⁰. Quando isto ocorre, as plaquetas tornam-se ativadas e liberam o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos³². Entre outras substâncias estes grânulos contêm adenosina-difosfato (ADP), serotonina e tromboxane A2 (TXA2)³¹. O ADP é responsável pela ativação de outras plaquetas e pela modificação da sua forma, que passa de discoide para esférica com aparecimento de pseudopodes³⁰. Estas plaquetas ativadas se agregam umas às outras formando um tampão que fornecerá a superfície adequada ao processo de coagulação do sangue, produzindo um coágulo resistente. Neste estágio, as plaquetas exteriorizam uma lipoproteína denominada fator plaquetário 3 (PF3)³¹, que desempenha papel de superfície fosfolipídica (superfície ativadora) e participa de inúmeras reações da cascata de coagulação³².

A coagulação sanguínea consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio, em um polímero insolúvel, a fibrina, por ação de uma enzima denominada trombina³³. A fibrina forma uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático³⁰. A coagulação é uma série de reações químicas entre várias proteínas que convertem pró-enzimas (zimógenos) em enzimas (proteases). Essas pró-enzimas e enzimas são denominadas fatores de coagulação²⁴. A ativação destes fatores é provavelmente iniciada pelo endotélio ativado e finalizado na superfície das plaquetas ativadas e tem como produto essencial a formação de trombina que promoverá modificações

na molécula de fibrinogênio liberando monômeros de fibrina na circulação³⁴. Estes últimos vão unindo suas terminações e formando um polímero solúvel (fibrina S) que, sob a ação do fator XIIIa (fator XIII ativado pela trombina) e íons cálcio, produz o alicerce de fibras que mantém estável o agregado de plaquetas previamente formado³⁰.

Por fim, a fibrinólise (última etapa do processo hemostático, após hemostasia primária e coagulação) remove a fibrina formada em excesso e o sangue volta a fluir normalmente no interior do vaso restaurado²⁴. A plasmina, proteína que lisa a rede de fibrina, é derivada do plasminogênio que está ligado internamente à rede de fibrina³². O ativador tecidual do plasminogênio, liberado pelo endotélio que circunda a área da lesão é responsável pelo desencadeamento do processo que limita a progressão desnecessária da trombose³⁵. A antiplasmina, presente no plasma, combina-se com o excesso de plasmina liberada, impedindo o aparecimento de fibrinólise generalizada. Esta proteína está presente na circulação em concentração plasmática 10 vezes maior do que a plasmina³¹.

A plasmina não restringe sua ação apenas sobre a fibrina. Também é capaz de quebrar o fibrinogênio ou agir diretamente sobre a fibrina, quer seja polimerizada ou não, formando os produtos de degradação da fibrina (PDFs)³⁶. Os PDFs são removidos da circulação principal pelo fígado e pelo sistema retículo endotelial (SRE)³⁵. Entretanto, se a produção de PDFs superar a capacidade de clareamento, ocorre acúmulo do excedente produzido, podendo atingir níveis tais que passam a inibir a coagulação normal, através da interferência com a polimerização da fibrina e induzindo alteração funcional das plaquetas³⁷.

Novo modelo celular da coagulação traz uma visão mais realista e prática desse complexo mecanismo homeostático entre hemostasia primária (plaquetas), coagulação (fibrinogênio) e fibrinólise (PDFs), segundo apresentado na Figura 5.

FONTE: Adaptado de Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS, 2014³⁰.

Figura 5 - Novo modelo celular da coagulação

Para análise pormenorizada do complexo sistema de coagulação, sobretudo em pacientes com tendências hemorrágicas ou pró-trombóticas, devemos lançar mão da tecnologia que melhor analisa essa interface dos processos hemostáticos: tromboelastografia ou tromboelastometria²⁷. É considerado *exame point of care* (POCT) para análise da formação, consistência e lise do coágulo de forma rápida e a beira leito²⁵.

1.11 Tromboelastografia

O princípio da tromboelastografia, TEG®, envolve a incubação de 360 µl de sangue total a 37 °C em um copo cilíndrico aquecido³⁷. O copo oscila durante 10 segundos através de um ângulo de 4°45' com um pino suspenso livremente em uma taça por um fio de torção³⁸.

Ocorre então alterações bioquímicas de pH, eletrólitos e temperatura promovendo interatividade entre células do sangue e subsequente ligação entre fibrinas e plaquetas que através do movimento rotativo do copo transmite para o pino imerso uma cadência de movimento³⁸. Deste modo, a magnitude da expressão gráfica expressa está diretamente relacionada com a resistência do coágulo formado³⁷. Após a retração do coágulo, ocorre a sua lise. As ligações são quebradas e a transferência do movimento do copo é reduzida³⁸. O movimento de rotação do pino através do transdutor mecânico é convertido a um sinal elétrico, então, graficamente manifesto³³.

1.12 Tromboelastometria

Com o ROTEM®, ao contrário do TEG®, é o pino de aço que faz uma rotação em 4,75° em relação ao copo³⁷. Essa movimentação transmite através de uma leitura óptica para um *software* uma representação gráfica de amplitude em relação ao tempo de todo o processo de formação do coágulo,

desde a iniciação, a máxima formação, até a sua lise²⁷. A vantagem que o ROTEM® oferece é sua capacidade de apresentar resultados entre 5 a 30 minutos em virtude de reagentes aceleradores e inibidores do processo de coagulação²⁸ (Figura 6).

FONTE: Adaptado de Whiting D, DiNardo JA, 2014²⁸.

Figura 6 - Representação gráfica do processo de polimerização da fibrina com ROTEM®

O perfil resultante da hemostasia é uma medida de tempo que leva para as primeiras cadeias de fibrina a serem formadas, a cinética de formação do coágulo, a resistência do coágulo e, por fim, sua dissolução³². Propriedades físicas do coágulo são dependentes da relação entre fibrinogênio, plaquetas e proteínas do plasma³⁰. Este processo produz uma representação gráfica característica que reflete as diferentes fases da coagulação, permitindo sua avaliação qualitativa³³, como detalha a Figura 7.

FONTE: Adaptado de Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC, 2012³².

Figura 7 - Representação gráfica do papel dos fatores de coagulação e suas interações no processo gráfico tromboelastométrico da gênese da fibrina

A tromboelastometria (ROTEM®) é a expressão gráfica da formação viscoelástica da polimerização da fibrina. Suas variáveis são tempo, dinâmica, tamanho e firmeza do coágulo; da formação à lise²⁸, de acordo com a Figura 7.

1.13 Justificativa para o estudo

Embora a dengue tenha em sua fisiopatologia a evolução para complicações hemorrágicas já consolidadas¹⁴, não encontramos estudos na literatura de pacientes com dengue que foram avaliados com testes viscoelásticos. Nesse estudo conseguimos avaliar os principais componentes do processo hemostático: plaquetas, fibrinogênio e PDFs (d-dímero) através

de testes viscoelásticos em pacientes com DENV e trombocitopenia³⁰. Nossa hipótese para esse estudo é de a tromboelastometria ser uma ferramenta útil para a beira do leito, que traduza informações novas e precoces concernentes à coagulação dos pacientes com dengue e trombocitopenia.

2 OBJETIVO

Descrever o papel tromboelastométrico de pacientes com DENV e trombocitopenia comparando com os testes convencionais de coagulação e sua importância clínica de associação com sinais hemorrágicos e hospitalização.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e participantes

Nosso estudo foi observacional e transversal com amostras coletadas de forma sequencial não aleatória conduzido durante o período de surto de dengue em São Paulo nos meses de abril e maio de 2015, por 28 dias. Embora o atendimento aos pacientes tenha durado 28 dias, o estudo em si ocorreu em 15 dias. A partir do momento em que conseguimos aprovação do estudo e suporte financeiro (Anexo A), já havíamos iniciado o atendimento da epidemia. Graças à parceria entre a prefeitura do município de São Paulo e o Hospital Israelita Albert Einstein foram montadas tendas de atendimento aos pacientes com suspeita de dengue, no bairro paulista da Brasilândia, local com alto índice de casos confirmados (Figura 8).

Estabeleceu-se um grupo controle (GC) com 10 pacientes sem DENV que foram admitidos no Hospital Israelita Albert Einstein por diferentes motivos para análise e comparação com o grupo DENV e trombocitopenia. Selecionamos o GC aleatoriamente de nosso banco de dados. Critérios de inclusão: admissão hospitalar sem coagulopatia conhecida. Critérios de exclusão: os mesmos usados para o grupo DENV (detalhado mais adiante).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisas (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número de aprovação CAEE 0652/09. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 8 - Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

A inclusão de pacientes no estudo levou em consideração os seguintes critérios:

1. Teste positivo para DENV com NS1 (*non structural antigen 1*) e/ou IgM/IgG teste rápido (DENGUE DUO Bioesy®, Kyonggi-Do, South Korea).
2. Febre ou febre recente nos últimos 2-7 dias.
3. Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100 x 10⁹/L) processado no XS1000i (Sysmex Roche®, Kobe, Japan). (Figuras 8 e 9).

Com relação aos critérios de exclusão no estudo (os mesmos usados para o grupo controle) foram considerados: gestação, pacientes onco-hematológicos, transplantados de medula óssea ou órgãos sólidos, trombocitopenia secundária conhecida, pacientes em uso de antiagregantes plaquetários ou antagonistas da vitamina K, coagulopatia previamente conhecida, portadores de hepatites B e/ou C e injúria renal crônica.

Realizamos testes tromboelastométricos com ROTEM® (Pentapharm Co., Munich, Germany) e testes convencionais da coagulação foram processados após centrifugação no STA – Compact (Stago®, Asnières-sur-Seine, France), para obtenção do INR, TP, TT, TTPa. Nível sérico de fibrinogênio foi utilizado metodologia de *Clauss*; d-dímero (ELISA) e hemograma com plaquetas com uso do XS1000i (Sysmex Roche®, Kobe, Japan).

3.3 Procedimentos

Coletamos amostras de sangue periférico para o estudo dos pacientes que preenchiam todos os critérios de inclusão. O grupo de pacientes com DENV incluídos no estudo havia sido selecionado previamente pelos médicos de plantão na tenda para tratamento endovenoso de fluídos e/ou medicações (Figuras 8 e 10). Portanto, não era necessário realizar punções venosas adicionais. Imediatamente antes da instalação da terapêutica endovenosa coletou-se um tubo citratado 3,2% (Sarsted®, Wedel, Germany) com 3 ml de sangue que foi processado (Figuras 4 e 9) em até 3 horas após o procedimento, conforme orientação das diretrizes do ROTEM®³⁷.

FONTE: arquivo pessoal, 2016.

Figura 9 - Realização da Tromboelastometria no laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein através do ROTEM® (Pentapharm Co., Munich, Germany)

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 10 - Fluxograma de atendimento de pacientes durante surto de DENV

NOTA: Alterações em sinais vitais: PAS < 90 mmHg, FC > 100/minuto, febre (Temperatura > 37,8 °C); laboratoriais: hemoconcentração (Hematócrito > 50% para homens ou > 48% para mulheres).

3.4 Canais e variáveis para análise tromboelastométrica

Descrição das variáveis utilizadas no ROTEM®:

intervalos (INTEM CT: 137–246 sec, CFT: 40–100 sec, alpha angle: 70–83° and MCF: 52–72 mm; EXTEM CT: 42–74 sec, CFT: 46–148 sec, alpha angle: 63–83° and MCF: 49–71 mm; FIBTEM MCF: 9–25 mm) [15, 16].

- CT (*Clotting Time*): 137–246 seg e 0-2 mm de espessura gráfica. Corresponde à iniciação do coágulo, geração de trombina. Avalia os fatores de coagulação e o efeito da heparina²⁸.
- CFT (*Clot Formation Time*): 40–100 seg e 2 a 20 mm de espessura gráfica. Período subsequente ao CT representa a cinética da formação de trombina, polimerização da fibrina e estabilização do coágulo através do envolvimento das plaquetas, fibrinogênio e fator XIII²⁸.
- Ângulo alfa: 70–83° representa a angulação descrita pelo estado de coagulabilidade do paciente. Quanto mais agudo mais hipocoagulável, quanto mais obtuso maior a tendência em hipercoagular²⁸.
- MCF (*Maximum Clot Firmness*): 20 a 30 mm. Período subsequente ao CFT consiste na amplitude máxima do gráfico²⁸. Maior estabilização do coágulo pela polimerização da fibrina. Envolve a interação entre plaquetas, fibrinogênio e fator XIII²⁷. Indica a consistência ou qualidade do coágulo, caracterizando o estado de coagulabilidade do paciente³⁷.
- A05-A30: Representa a firmeza pela amplitude do coágulo nos tempos de 05 e 30 minutos²⁸.

- ML (*Maximum Lysis*): Redução da firmeza do coágulo após o MCF. Coágulo estável se a ML for menor que 15% ou hiperfibrinólise quando maior que 15%³⁷.

A aplicabilidade das variáveis anteriormente descritas nos cinco testes disponíveis para análise inicial em tempo rápido da coagulação do ROTEM®: INTEM, EXTEM, FIBTEM, HEPTM, APTM²⁷.

- INTEM: A ativação ocorre através da fase de contato pelo ácido elágico; é sensível aos fatores da via intrínseca. Avalia os fatores: XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I e FvW. O CT é mais sensível à heparina que o CFT e o MCF. Quando estiver prolongado; CT > 246 segundos sugere que haja HNF (heparina não fracionada) no sangue²⁶.
- EXTEM: Ativação pela tromboplastina ou fator tissular (cérebro de coelho). Início da formação do coágulo em 70 segundos. É mais sensível à fibrinólise. Teste de triagem da via extrínseca: TP (fatores vitamina K-dependentes: II, VII, IX, X). O CT do EXTEM é ligeiramente menos sensível à presença de heparina (> 4U/ml de HNF no sangue) em comparação ao INTEM²⁹.
- FIBTEM: Ativação similar ao EXTEM. A adição de citocalasina D inibe a função plaquetária, permitindo a avaliação isolada do fibrinogênio e Fator XIII. O coágulo resultante é dependente, sobretudo da formação e polimerização da fibrina²⁷.
- HEPTM: Ativação semelhante ao INTEM. A adição de heparinase degrada a heparina presente na amostra. Quando o teste de HEPTM corrige alteração do CT, em relação ao INTEM, define-se como sangue heparinizado ou presença de heparinóides endógenos; caso contrário,

configura-se deficiência de fatores de coagulação²⁸.

- APTTEM: Ativação conforme sugestão de hiperfibrinólise no EXTEM. Pela adição de aprotinina ao reagente, ocorre inibição da fibrinólise. Caso haja correção da hiperfibrinólise em relação ao EXTEM, caracteriza-se hiperfibrinólise verdadeira (ML > 15%)³⁷.

Os valores de referência para o teste foram testados em voluntários sadios e reproduzidos pelo ROTEM®, com reprodutibilidade e aplicabilidade do método em outros estudos²⁸. Consideramos tromboelastometria normal quando os parâmetros do CT, CFT, Ângulo alfa, MCF estavam dentro dos valores de referência ROTEM® para os canais INTEM, EXTEM e FIBTEM.

Range normal para o INTEM: CT (100–240 s); CFT (30–110 s); Ângulo alfa (70–83°); MCF (50–72 mm)^{26,27}.

Range normal EXTEM: CT (38–79 s); CFT (34–159 s); Ângulo alfa (63–83°); MCF (50 – 72 mm)^{26,27}.

Range normal FIBTEM: MCF (9–25 mm)²⁷.

Em nosso estudo utilizamos os três principais testes iniciais para avaliação viscoelástica do coágulo: EXTEM, INTEM e FIBTEM²⁷.

3.5 Seguimento clínico

Para acessarmos o desfecho clínico dos pacientes entramos em contato com os mesmos via ligação telefônica (número informado na ficha de coleta de dados e TCLE – Anexo C – quando do atendimento clínico inicial). Perguntas sobre internação, sangramento e retorno à tenda foram ativamente indagadas para avaliação de desfecho.

3.6 Análise estatística

Duas variáveis fazem parte das análises: categóricas e contínuas. A primeira delas está apresentada como frequências absolutas e relativas. A segunda, como valores em média e desvio padrão (DP) ou valores em mediana com intervalo interquartil (IQR) em caso de distribuição não normal (teste de the Kolmogorov-Smirnov).

O levantamento contou com a inclusão e coleta de 53 pacientes com dengue e trombocitopenia. Mais casos não puderam ser adicionados em virtude da estrutura logística e das restrições financeiras enfrentadas. Trata-se de um estudo realizado em um hospital de campanha (tendas improvisadas para atendimento) na periferia de São Paulo (Vila Brasilândia), em um momento epidêmico crítico com alto fluxo de pacientes, com logística complexa para transporte do material (amostras de sangue) que deveriam ser processados em ambiente hospitalar em até 3 horas após a coleta (Figuras 8, 9 e 10).

Testes bicaudais fizeram parte das análises, sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Para realizar as análises estatísticas contamos com o suporte do SPSS™ (IBM™ *Statistical Package for the Social Science version 21.0*) e GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4 RESULTADOS

Durante a epidemia de dengue realizamos 4.641 atendimentos de pacientes com suspeita de DENV. Deste universo, 3.003 eram casos novos e mais da metade 54,5% (1638/3003) necessitou de retorno para seguimento clínico e laboratorial (Figura 8). Os testes foram positivos para DENV em 68,9% (2069/3003) dos pacientes. Já os testes para DENV com resultado negativo representou 934 pacientes, ou seja, 31,1% (934/3003). Estes pacientes foram excluídos do estudo (Figura 8). DENV confirmada e trombocitopenia (plaquetas $< 100 \times 10^9/L$) foram encontradas em 10,8% (224/2069) dos pacientes. Incluímos em nosso estudo 53 pacientes com DENV e trombocitopenia, perfazendo 23,6% (53/224) (Figura 8).

As características principais dos 53 pacientes que participaram do estudo e os 10 pacientes do grupo controle (GC) estão expostos na Tabela 1. A maioria dos pacientes no grupo DENV não tinha nenhuma doença prévia 73,8% (31/42). O GC foi estabelecido em 10 pacientes sem coagulopatia prévia conhecida, hospitalizados por motivos distintos: 30% (3/10) cirurgia eletiva; 20% (2/10) sepse; 20% (2/10) acidente vascular encefálico; 10% (1/10) convulsão; 10% (1/10) arritmia e 10% (1/10) insuficiência respiratória.

A maioria dos pacientes do grupo DENV era formada por jovens, mediana de 32 anos de idade e predominantemente homens 60,4% (32/53), como detalha a Tabela 1. O GC também contava com maioria masculina 60% (6/10), sendo mais velhos que o grupo DENV com mediana de 48 anos de idade (Tabela 1).

Os pacientes com DENV apresentavam história de febre ou estavam febris no momento do atendimento médico em 100% (53/53) e com cefaleia 83% (44/53). O grupo também se apresentava estável hemodinamicamente

com Pressão Arterial Sistólica (PAS) mediana de 127 mmHg com taquicardia discreta (mediana de 93/min), como mostra a Tabela 1.

Sintomas agudos foram observados pela predominância de testes NS1 positivos 96,2% (51/53) com mediana de 4 dias de sintomas para os pacientes buscarem atendimento médico (Tabela 1). Encontramos poucos pacientes com histórico positivo para DENV prévia 9,8% (5/51), detalhes na Tabela 1. Manifestações hemorrágicas foram encontradas em 14,3% (7/49) como epistaxe, gengivorragia, hematêmese, hematúria ou melena, porém com baixas taxas de hospitalização 5,8% (3/52), como mostra a Tabela 1.

Não houve associação entre alterações tromboelastométricas e manifestações hemorrágicas ($p=0,28$), bem como hospitalização ($p=0,82$).

As principais alterações laboratoriais do grupo DENV estão descritas na Tabela 2. Vale ressaltar que os pacientes com DENV e plaquetopenia apresentavam testes convencionais de coagulação (INR, PT, TT, TTPa) absolutamente normais. A dosagem de fibrinogênio pelo método de *Clauss* mostrou valores dentro da faixa de referência, mediana de 290g/dl. Entretanto, os níveis de d-dímero encontravam-se aumentados, mediana de 1330ng/ml com IQR (800-1840) sugerindo atividade fibrinolítica e/ou resposta inflamatória induzida pela DENV (Tabela 2). O GC também está destacado na Tabela 2. Os pacientes no GC 100% (10/10) também não apresentavam alterações em exames de coagulação (Tabela 2). O GC apresentava contagem de plaquetas significativamente maior que o grupo DENV ($p<0.001$) e níveis mais baixos de d-dímero ($p<0.001$) em relação ao grupo DENV. Valores de TT, INR, TTPa não evidenciavam significância estatística entre os dois grupos (Tabela 2).

Os resultados dos testes viscoelásticos sob a análise dos canais INTEM e EXTEM revelaram que mais da metade dos pacientes tiveram hipocoagulabilidade (Tabela 3). Nos canais EXTEM havia 54,7% (29/53) casos com alterações; enquanto no INTEM ainda mais prevalentes as alterações ocorreram em 71,7% (38/53), como detalha a Tabela 3. No entanto, o canal FIBTEM mostrou normalidade em quase todos os pacientes da amostra (50/53), ou seja, 94,3% (Tabela 3).

Análise estatística entre testes viscoelásticos e exames laboratoriais revelam significância estatística na análise de pacientes com alteração (hipocoagulabilidade) no EXTEM e no INTEM com níveis mais baixos de plaquetas ($p=0,052$) e ($p=0,005$), respectivamente (Tabela 4). Níveis mais baixos de fibrinogênio também foram estatisticamente significantes em pacientes que tinham prejuízos no EXTEM e INTEM ($p=0,006$) e ($p=0,021$), respectivamente (Tabela 4). Níveis mais altos de d-dímero foram encontrados de forma significativa em pacientes com hipocoagulabilidade no EXTEM ($p=0,008$), como detalha a Tabela 4. As análises nos canais FIBTEM eram majoritariamente normais em 94,3% (50/53) dos pacientes com DENV sem correlações estatisticamente significativas com níveis de plaquetas, fibrinogênio ou d-dímero (Tabela 4).

Comparamos o grupo DENV com o GC através da análise tromboelastométrica. Os resultados desta comparação estão nas Figuras 11, 12, 13 e 14. GC foi considerado normal por apresentar *status* viscoelástico dentro dos valores padronizados e validados pelo ROTEM® (referência de range normal em métodos). O grupo DENV foi considerado com hipocoagulabilidade (alterado) por justamente apresentar prejuízo na maioria

dos pacientes com DENV nos canais INTEM e EXTEM (Figuras 11 e 12). Análises no INTEM revelaram diferenças estatísticas entre os dois grupos. CFT ($p<0,001$); MCF ($p<0,001$) e Alpha ($p<0,001$), como ilustra a Figura 11. Análise no EXTEM revelaram alterações estatisticamente significativas entre os dois grupos GC (normal) e DENV (alterado) em duas variáveis tromboelastométricas: CFT ($p<0.001$) e MCF ($p<0.001$), como traz a Figura 12.

Por fim, a análise dos canais FIBTEM não revelou diferenças estatísticas entre os dois grupos. Apresentava-se majoritariamente normal em ambos os grupos (Figuras 13, 16 e 17). O perfil tromboelastométrico nos canais FIBTEM dos pacientes com DENV *versus* grupo controle está destacado na Figura 13.

Os principais achados gráficos tromboelastométricos encontrados no estudo em pacientes com DENV, trombocitopenia e hipocoagulabilidade puderam ser observados no canal INTEM e EXTEM (Figuras 11 e 12). Exemplificamos na Figura 14 o resultado gráfico viscoelástico de um paciente e assim representar os achados mais comuns nos pacientes com hipocoagulabilidade induzida pelo DENV nos canais INTEM e EXTEM.

Entretanto, o GC não apresentava coagulopatia e as análises tromboelastométricas produzidas através do ROTEM® podem ser visualizadas nas Figuras 11, 12, 13 e 15. Ilustramos a polimerização da fibrina nos canais INTEM e EXTEM de um paciente do GC no estudo. A exemplificação de um paciente do GC para análise gráfica consta na Figura 15.

Os canais FIBTEM em ambos os grupos (DENV e GC) eram majoritariamente normais (Tabela 3). Graficamente o que pudemos observar foram curvas bastante similares (Figuras 13, 16 e 17). Essas figuras representam resultados gráficos do teste viscoelástico nos dois grupos. Estas duas últimas figuras (16 e 17) trazem também um paciente em cada grupo (grupo DENV, GC) sob análise do ROTEM®.

O resultado das ligações telefônicas feitas para os pacientes (conforme telefone autorizado em ficha clínica e TCLE – Anexo B e C), no que se refere à internação hospitalar, sangramento e retorno à tenda, está expresso de forma numérica na Tabela 5. A maioria dos pacientes não necessitou de internação nos dias subsequentes. Apenas 8,1% (4/49) dos pacientes precisaram ser hospitalizados ou sangraram (epistaxe, gengivorragia, hematêmese, hematúria e/ou melena) no referido seguimento. Destes, 4 pacientes que necessitaram de internação, 75% (3/4) já haviam sido encaminhados para hospitalização durante atendimento inicial na tenda da dengue. Apenas 1 paciente requereu internação que não fora diretamente encaminhada a partir do primeiro atendimento, mas sim do atendimento subsequente (retorno).

A maioria dos pacientes atendidos durante surto epidêmico, 83,6% (41/49) necessitaram regressar à tenda para nova contagem de plaquetas (a pedido da equipe médica) e/ou tratamento sintomático. Houve perda de seguimento em 7,5% (4/53) dos casos incluídos no estudo. Não foi possível contato telefônico com esses pacientes (Tabela 5).

Tabela 1 - Principais características dos participantes. Valores representam % (n/total n) ou mediana (intervalo interquartil [IQR]) quando indicado

Características	Grupo Dengue	Grupo Controle
Idade, anos (mediana [IQR])	32 (21–43)	48 (41–65)
Gênero, masculino	60,4 (32/53)	60,0 (6/10)
Comorbidades		
Hipertensão	16,7 (7/42)	
HIV	2,4 (1/42)	
Nenhuma	73,8 (31/42)	
Hiperplasia Prostática	4,8 (2/42)	
Dispepsia	2,4 (1/42)	
Apresentação clínica		
Febre	100,0 (53/53)	
Cefaleia	83,0 (44/53)	
Rash cutâneo	36,8 (14/38)	
Vômito	25,5 (13/51)	
Manifestação hemorrágica*	14,3 (7/49)	
Desidratação**	11,3 (6/53)	
Temperatura***, (mediana [IQR])	37,0 (36,1-37,7)	
PAS, (mediana [IQR])	127 (115-133)	
PAD, (mediana [IQR])	80 (73-86)	
FC, (mediana [IQR])	93 (82-102)	
Diagnóstico DENV		
NS1	96,2 (51/53)	
IgM	20,8 (11/53)	
IgG	3,8 (2/53)	
Dengue prévia****	9,8 (5/51)	
Vacina de Febre Amarela prévia*****	18,9 (7/37)	
Dias de sintomas (mediana [IQR])	4 (2-5)	
Hospitalização	5,8 (3/52)	

* Manifestação hemorrágica: epistaxe, gengivorragia, hematêmese, hematúria e melena.

** Desidratação: sinais clínicos em mucosa e pele considerados durante atendimento médico.

*** Temperatura = Axilar.

****DENV prévia: considerada se o paciente respondia assertivamente a esse diagnóstico definido durante atendimento médico anterior.

*****Vacinação de Febre Amarela: considerada se o paciente respondia assertivamente conhecer seu *status* vacinal prévio referente à Febre Amarela.

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

NOTA: HIV: *Human Immunodeficiency Virus*; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; FC: Frequência Cardíaca; NS1: *nonstructural antigen 1*; IgM: Imunoglobulina M; IgG: Imunoglobulina.

Tabela 2 - Variações laboratoriais com valores normais de referência. Valores expressos em medianas com intervalo interquartil

Características	Grupo DENV	Grupo Controle	P valor
Hemoglobina (g/dL)	15,1(14,2-16,1)		
Hematócrito (%)	42,9 (40,6-45,6)		
Leucócitos (x10 ³ /uL)	3,1 (2,7-4,5)		
Neutrófilos (%)	42,3 (31,0-48,0)		
Neutrófilos (x10 ³ /uL)	1,4 (1,0-1,8)		
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	76 (62-88)	213 (153-246)	< 0,001 ^a
Volume Plaquetário Médio (fl)	11,2 (10,5-11,9)		
Tempo de Protrombina (%)	100 (90-100)		
INR	1,0 (1,0-1,1)	1,2 (1,0-1,2)	0,079 ^b
TTPa (s)	28,9 (26,0-32,5)	33,0 (30,3-36,1)	0,012 ^b
TTPa (R)	0,9 (0,9-1,1)		
Tempo de Trombina (s)	18,2 (17,0-19,5)	17,9 (16,9-19,1)	0,452 ^b
Fibrinogênio (g/dl)	290 (267-323)	291 (271-356)	0,823 ^a
D-dímero (ng/ml)	1330 (800-1840)	361 (278-580)	< 0,001 ^b

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

NOTA: INR: *international normalized ratio*; TTPa: tempo de tromboplastina ativado; R: relação; s: segundos; TT: Tempo de Trombina; IQR: interquartile ranges; a: independente T-teste e b: Mann-Whitney teste.

Tabela 3 - Sumário ROTEM®. Valores representados em % (n/total n)

Canal ROTEM®	% (n/total n)
EXTEM	
Normal	45,3 (24/53)
Alterado	54,7 (29/53)
INTEM	
Normal	28,3 (15/53)
Alterado	71,7 (38/53)
FIBTEM	
Normal	94,3 (50/53)
Alterado	5,7 (3/53)

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

NOTA: Normal e alterado foram considerados de acordo com as variações do manual do ROTEM® e suas validações. Normal era considerado se todos os parâmetros: CT, CFT, MCF e Alfa estavam dentro das variações consideradas normais no ROTEM®. Range normal INTEM: CT (100–240 s); CFT (30–110 s); Ângulo alfa (70–83°); MCF (50–72 mm). Range normal EXTEM: CT (38–79 s); CFT (34–159 s); Ângulo alfa (63–83°); MCF (50–72 mm). Range normal FIBTEM: MCF (9–25 mm).

Tabela 4 - Sumário ROTEM® analisado com variáveis laboratoriais. Valores representam medianas com intervalo interquartil

Características	Normal	Alterado	P valor
EXTEM			
% (n/total)	45,3 (24/53)	54,7 (29/53)	
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	82 (68-91)	69 (57-83)	0,052 ^a
INR	1,0 (1,0-1,1)	1,0 (1,0-1,1)	0,390 ^b
TTPa (s)	30,3 (25,0-32,2)	28,1 (26,6-32,8)	0,816 ^b
Fibrinogênio (g/dl)	308 (278-354)	278 (264-300)	0,006 ^a
D-dímero (ng/ml)	950 (705-1500)	1600 (1220-1990)	0,008 ^b
INTEM			
% (n/total)	28,3 (15/53)	71,7 (38/53)	
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	90 (77-94)	70 (57-84)	0,005 ^a
INR	1,1 (1,0-1,3)	1,0 (1,0-1,1)	0,034 ^b
TTPa (s)	28,2 (26,0-31,8)	29,0 (26,0-33,3)	0,867 ^b
Fibrinogênio (g/dl)	321 (290-355)	278 (267-311)	0,021 ^b
D-dímero (ng/ml)	950 (320-1510)	1410 (950-1900)	0,076 ^b
FIBTEM			
% (n/total)	94,3 (50/53)	5,7 (3/53)	
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	77 (62-88)	71 (64-95)	0,758 ^b
INR	1,0 (1,0-1,1)	1,1 (1,0-1,1)	0,427 ^b
TTPa (s)	28,5 (26,0-31,8)	33,3 (26,7-33,4)	0,254 ^b
Fibrinogênio (g/dl)	291 (267-323)	278 (214-315)	0,520 ^b
D-dímero (ng/ml)	1295 (790-1820)	1840 (1500-1980)	0,223 ^b

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

NOTA: Normal e alterado foram considerados de acordo com as variações do manual do ROTEM® e suas validações. Normal era considerado se todos os parâmetros: CT, CFT, MCF ou Alfa estavam dentro das variações consideradas normais no ROTEM®. INR: *international normalized ratio*; TTPa: tempo de tromboplastina ativado; s: segundos.

Tabela 5 - Seguimento telefônico dos pacientes com DENV incluídos no estudo

Seguimento	Grupo Dengue
Admissão Hospitalar	8,1% (4/49)
Retorno à tenda	83,6% (41/49)
Manifestação hemorrágica	8,1% (4/49)

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

NOTA: Houve perda de seguimento de 4 pacientes.

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 11 - Tromboelastometria sobre canal INTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group)

NOTA: ROTEM® considerado normal ou alterado de acordo com seu manual e validação de amostras. Normal foi considerado quando todos os parâmetros: CT, CFT, MCF e Alfa estavam dentro dos valores padronizados pelo ROTEM®. CT: *Clotting Time*; CFT: *Clot Formation Time*; Alpha: Ângulo alfa; MCF: *Maximum Clot Firmness*. Range normal INTEM: CT (100–240 s); CFT (30–110 s); Ângulo alfa (70–83°); MCF (50–72 mm).

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 12 - Tromboelastometria sobre canal EXTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group)

NOTA: ROTEM® considerado normal ou alterado de acordo com seu manual e validação de amostras. Normal foi considerado quando todos os parâmetros – CT, CFT, MCF e Alfa – estavam dentro dos valores padronizados pelo ROTEM®. CT: *Clotting Time*; CFT: *Clot Formation Time*; Alpha: Ângulo alfa; MCF: *Maximum Clot Firmness*. Range normal EXTEM: CT (38–79 s); CFT (34–159 s); Ângulo alfa (63–83°); MCF (50–72 mm).

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 13 - Tromboelastometria sobre canal FIBTEM entre grupo do vírus da dengue (DVI Group) e grupo controle (Control Group)

NOTA: MCF: *Maximum Clot Firmness*. Valores de referência FIBTEM: MCF (9–25 mm).

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 14 - Tromboelastometria de um paciente do grupo DENV com alteração nos canais INTEM e EXTEM

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 15 - Tromboelastometria de um paciente do grupo controle sem alteração nos canais INTEM e EXTEM

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 16 - Tromboelastometria de um paciente do grupo DENV sem alteração no canal FIBTEM

FONTE: elaborada pelo autor, 2016.

Figura 17 - Tromboelastometria de um paciente do grupo controle sem alteração no canal FIBTEM

5 DISCUSSÃO

Nós demonstramos em nosso estudo que pacientes com DENV e trombocitopenia frequentemente evidenciaram hipocoagulabilidade acessada pela tromboelastometria, ao passo que, os testes convencionais de coagulação (TP, INR, TT, TTPa) e níveis séricos de fibrinogênio permaneceram com valores normais e variação dentro do range habitual.

Nosso estudo se contrapõe a alguns estudos prévios da literatura que demonstram que pacientes com DENV e trombocitopenia apresentam testes de coagulação prolongados^{39,40} e com aqueles que mostram forte associação entre plaquetopenia e sangramento^{40,41,42}. Possivelmente por termos em nossa amostra predominantemente pacientes menos graves se comparado a esses outros estudos.

Além disso os testes de coagulação, como TP e TTPa, refletem pobre e tardiamente a hemostasia *in vivo*, pois se alteram quando os fatores de coagulação apresentam um déficit maior do que 50%²⁹. O INR habitualmente usado em pacientes críticos, teste de *screening* e *trigger* para transfusão de hemocomponentes ou hemoderivados, foi validado para controle e manejo da terapia de medicações inibidoras da vitamina K⁴³.

A ausência de trombomodulina, expressa pelas células endoteliais, responsável pela ativação da via da proteína C, inibidor natural da coagulação, limita a avaliação dos testes convencionais²⁹. Avalia apenas a geração de trombina determinada pelos fatores pró-coagulantes, sendo incapaz de demonstrar o equilíbrio hemostático entre fatores ativadores e inibidores da coagulação^{38,43}.

Esses exames convencionais de coagulação não levam em conta a interação dos fatores de coagulação com as plaquetas, elementos celulares

do sangue total e o endotélio vascular³⁰. A influência da hipotermia não é mensurada, pois esses testes são realizados a uma temperatura de 37 °C²⁶.

Portanto, distúrbios hemostáticos complexos e multifatoriais, como vistos em hemorragia por trauma, pós-parto, hepatopatas e pós-operatórios, são difíceis de serem analisados com os testes clássicos da coagulação de forma isolada^{36,44,45}. Os *point of care tests* (POCT) tornaram-se fundamentais para o diagnóstico e manejo dos pacientes com doença hemorrágica grave e o controle das medicações anticoagulantes e antifibrinolíticas³⁷. Possivelmente os pacientes com DENV que evoluam para CIVD com déficit de fibrinogênio, sangramento maciço e choque talvez possam também se beneficiar de um manejo guiado por metas tromboelastométricas.

As principais alterações coagulométricas em nosso estudo, analisadas através da tromboelastometria e identificadas em pacientes com DENV e trombocitopenia, foram alterações nos canais INTEM e EXTEM da tromboelastometria. FIBTEM manteve-se predominantemente normal nessa população.

A trombocitopenia acompanhou as alterações tromboelastométricas nos canais INTEM e EXTEM. Entretanto, os exames convencionais de coagulação estavam inalterados mesmo com coagulopatia vigente. Esses achados reforçam a ideia de que a tromboelastometria é uma ferramenta mais sensível e com maior acurácia na precocidade da disfunção da coagulação³⁷. Não encontramos na literatura estudos que avaliassem o perfil da coagulação de pacientes com DENV por meio de testes viscoelásticos como a tromboelastometria.

Observamos também que a maioria dos pacientes apresentavam altos valores de d-dímero. D-dímero é um produto de degradação da fibrina podendo estar aumentado na fase aguda de processos inflamatórios e infecciosos e/ou fibrinólise^{43,46}. Estes achados são compatíveis com estudos que descrevem disfunção endotelial e coagulopatia induzidas na dengue⁴⁷. A viremia intensa e resposta imunológica promove tempestade de citocinas que alteram a função do endotélio e promovem maior liberação de produtos de degradação da fibrina, e fibrinólise como o d-dímero¹⁴. Entretanto, outra valiosa informação tromboelastométrica é que embora possivelmente haja fibrinólise expressiva, não há maior incidência de hiperfibrinólise. Os testes viscoelásticos no canal EXTEM são sensíveis na identificação de hiperfibrinólise quando o índice máximo de lise (ML) ultrapassa 15%³⁴. Observamos hiperfibrinólise em apenas um paciente (1/53) representando 1,8% da amostra. Porém, para esse caso em especial, e na eventualidade de haver sangramentos, ele poderia se beneficiar de terapêutica antifibrinolítica específica guiada por tromboelastometria – como ácido tranexâmico ou ácido aminocapróico – e interromper o processo de lise precoce do coágulo com melhora instantânea da coagulopatia²⁵.

Muitos estudiosos avaliaram o uso de drogas antifibrinolíticas em pacientes com trauma, hemorragia pós-parto, cirurgia cardíaca com impacto e desfecho positivo^{24,3}. Em pacientes com DENV não há descrições de uso dessas drogas mesmo em casos dramáticos. Possivelmente um grupo de pacientes com hiperfibrinólise verdadeira se beneficiasse. A partir de um ponto onde há desequilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes pode ser que alguns pacientes com DENV evoluam de

fibrinólise para hiperfibrinólise. Um estudo revela que 100% dos pacientes com FHD apresentavam CIVD⁴⁸.

Nosso estudo, assim como outros na literatura, sugere que o fato de pacientes terem DENV e trombocitopenia não necessariamente apresentem maior índice de sangramento e hospitalização^{13,48,49}. Alguns autores chegam a afirmar que mesmo pacientes com DENV e contagem de plaquetas inferior a $20 \times 10^9/L$ não apresentam maior tendência hemorrágica^{40,51}. É bastante intrigante esse paradoxo pois as plaquetas em pacientes com DENV não estão apenas diminutas numericamente mas também qualitativamente⁵². As plaquetas são fundamentais para hemostasia primária por contribuírem para formação do coágulo⁴⁸.

Entretanto, outros estudos analisados em revisão sistemática sugerem a trombocitopenia como preditor para manifestações hemorrágicas e dengue severa⁴⁶. Uma coorte prospectiva com 729 pacientes mostrou que níveis plaquetários baixos eram fatores preditores independentes para sangramento^{51,41,42}. Wills e colaboradores demonstraram em crianças Vietnãmitas com FHD, TTPa > 30 segundos e plaquetas inferiores a $50 \times 10^9/L$ apresentavam aumentado risco para sangramento. Eles também sugeriram que a trombocitopenia é um preditor de mortalidade nessa população⁴⁰.

Autores discorrem sobre a plaquetopenia na DENV como um mecanismo complexo e multifatorial⁵². Ocorre aumento da destruição de plaquetas e formação de anticorpos antiplaquetas^{48,52}. Plaquetas em pacientes com DENV apresentam sinais de apoptose como exposição de fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e ativação de caspase-9 e 3⁵⁴.

O que este estudo traz de diferente é a análise qualitativa da função do fibrinogênio, fator I da coagulação e um elemento fundamental para a conversão em seu produto ativo, a fibrina³⁰. Através da tromboelastometria, nos canais FIBTEM, notamos que a grande maioria dos pacientes tem fibrinogênio qualitativamente bom. Essa informação é fundamental porque a relação entre fibrinogênio e plaqueta é a base da sustentação de um coágulo suficientemente firme⁵⁵, como mostra a Figura 18. Portanto, podemos sugerir que pacientes com disfunção plaquetária numérica e funcional com DENV não sangram desde que os níveis de fibrinogênio no FIBTEM compensem.

FONTE: Adaptado de Fries D, Martini WZ, 2010⁵⁵.

Figura 18 - Modelo de muro ilustrativo mostrando interação entre plaquetas (tijolos) e fibrinogênio (cimento) na manutenção do coágulo

NOTA: A) Concentrações normais de plaquetas e fibrinogênio. B) Baixa concentração de plaquetas com níveis adequados de fibrinogênio. C) Baixa concentração de fibrinogênio com níveis adequados de plaquetas.

Ainda não está claro quando e como é o gatilho exato para o desenvolvimento de alterações habituais nos exames de coagulação culminando com DENV severa, sangramentos intensos, hospitalização e

óbito. Manifestações hemorrágicas em pacientes com DENV possivelmente estão associadas à combinação de trombocitopenia, redução da geração de trombina e aumento da fibrinólise⁴.

Possivelmente, após um período de compensação inicial, alguns pacientes perdem essa tênue homeostasia entre fibrinogênio e plaqueta; entram em coagulopatia de consumo e evoluem com dengue severa, alteração da permeabilidade capilar e síndrome do choque da dengue. Pacientes com FHD tendem a apresentar CIVD^{4,5,48}. Por definição, pacientes com CIVD têm fibrinogênio baixo, plaquetopenia, alteração do TP e aumento dos produtos de degradação da fibrina (PDFs) como o d-dímero⁴⁶. Como dito anteriormente, alteração do TP pode ocorrer tardiamente em pacientes com coagulopatia²³ mesmo com as demais alterações já presentes como plaquetopenia e aumento dos PDFs no início do quadro de DENV. Cabe ressaltar que os pacientes que fizeram parte deste estudo foram vistos precocemente; tempo de doença curto e predominância de diagnóstico com NS1 (positivo nos primeiros dias de doença). Tabela 1.

Portanto, possivelmente o fibrinogênio desempenhe papel importante na manutenção da homeostasia da coagulação em pacientes com DENV nos primeiros dias da doença e enquanto estão clínica e laboratorialmente (coagulograma) compensados. Fibrinogênio é o Fator I do sistema de coagulação e o mais importante numérica e funcionalmente. Fibrinogênio representa 85-90% do total de fatores de coagulação encontrados no plasma, sendo o primeiro a cair abaixo de um valor crítico durante sangramentos e hemodiluição^{30,55}, segundo demonstra a Figura 19. Trombocitopenia afeta primariamente a firmeza do coágulo, porém é compensada pela atividade e

funcionalidade do fibrinogênio como visto nos canais FIBTEM³⁴. Fibrinogênio é o substrato final da coagulação e o ligante de receptores de glicoproteína IIb/IIIa, otimizando a função plaquetária²⁴.

Achados interessantes na literatura revelam que pacientes com DENV com ou sem sangramento têm maiores níveis de FvW (Fator de Von Willebrand)⁴⁸. FvW são liberados pelo endotélio vascular frente à coagulopatia, uremia e ativa o Fator VIII (FVIII), formando um complexo FvW/FVIII³⁰. Essa combinação de fatores de coagulação servem de estímulo importante para melhora da função plaquetária e atenuação da coagulopatia³⁷. Relato de 4 casos de pacientes com DENV severa associadas à trombocitopenia, e que foram submetidos à terapêutica que melhora a função plaquetária, mostraram um campo que merece ser considerado em pesquisas futuras. Um grupo de médicos administrou doses baixas de desmopressina (DDAVP) para 4 pacientes com coagulopatia grave relacionada à DENV com melhora no desfecho clínico^{31,48,53}. O DDAVP, embora seja um hormônio antidiurético, tem efeitos na ampliação da expressão e liberação de FvW a partir do endotélio e, desta forma, melhora a agregação plaquetária³⁰.

Esses dados corroboram como sendo mecanismos alternativos, multifacetados e complexos que sustentam a coagulação na dengue até certo limite, mesmo com plaquetopenia por vezes intensas. O que nos parece, em tese, um pouco menos efetivo que o papel do fibrinogênio, pois este último tem representatividade em maior escala e função em relação a outros fatores da coagulação. Porém, abrem espaço para rediscutir outras estratégias em

pacientes com DENV severa além de suporte clínico e infusão de fluidos para futuros estudos.

FONTE: Adaptado de Kenneth A. Baue, 1999³⁵.

Figura 19 - Fatores de coagulação e suas proporções no plasma sanguíneo

Este estudo traz a discussão uma abordagem diferente em pacientes com DENV, plaquetopenia e coagulopatia: testes tromboelastométricos. Até o momento não temos terapêutica específica para pacientes com DENV e protocolos transfusionais não parecem racionais¹⁵. A transfusão de plaquetas profilática não mostrou benefício (presença de anticorpos contra plaquetas e risco transfusional) e deve ser indicada apenas para pacientes com DENV e sangramento intenso e/ou trombocitopenia inferior a $20 \times 10^9/L$ ²⁰. Provavelmente a transfusão preventiva e precoce de plaquetas não apresente vantagens, pois como observamos anteriormente pacientes

compensam a plaquetopenia com a presença de fibrinogênio, fator de fase aguda que pode estar aumentado no início do processo inflamatório.

A diretriz para correção da coagulopatia da DENV é com plasma fresco congelado (PFC) e vitamina K até que o INR esteja abaixo de 1,5 e transfusão de plaquetas em caso de sangramento significativo²⁰. O PFC apresenta níveis variáveis de concentração de fibrinogênio e demais fatores da coagulação, leva tempo para ser descongelado, necessita de provas de compatibilidade sanguínea, volume alto de pelo menos 30 ml/kg para se obter ganho incerto na reposição de fatores de coagulação⁴³. Além da exposição a inúmeras reações transfusionais como hemólise, infecção, TRALI (*Transfusion Related Acute Lung Injury*), TRIM (*Transfusion Related Immunomodulation*), TACO (*Transfusion Acute Cardiac Overload*), pois o PFC é um volume adicional de no mínimo 2000 ml em adulto jovem de 70 kg⁴⁶. Pacientes que já receberam fluídos para correção dos distúrbios hemodinâmicos e alteração da permeabilidade capilar podem eventualmente não tolerar excesso de líquidos^{5,14}. A recomendação de vitamina K também pode ser questionada, pois foca na reposição de fatores II, VII, IX e X, dependentes da vitamina K²⁴. Esses fatores se alteram em pacientes que tomam drogas cumarínicas e seu *déficit* não faz parte da fisiopatogenia principal da coagulopatia DENV induzida. Por fim, o INR, como já explicitado anteriormente, não deve ser encarado como marcador para *trigger* transfusional, pois sua validação é justamente para pacientes que tomam antagonistas da vitamina K³⁰.

A tromboelastografia ou tromboelastometria é o único exame que fornece informações globais sobre a cinética e estrutura do coágulo e avalia o

sistema fibrinolítico²⁵. Testes viscoelásticos do sangue (ROTEM® ou TEG®) permitem a detecção precoce e assertiva do distúrbio de coagulação, possibilitando terapia alvo-dirigida com agentes hemostáticos específicos e individualizados²⁸, segundo ilustra a Figura 20.

FONTE: Adaptado de Stensballe J, Ostrowski SR, Johansson PI, 2014⁵⁶.

Figura 20 - Fluxograma guiado pelo ROTEM® para manejo individualizado de pacientes com sangramento ativo

A essência do tratamento da DENV é baseada na terapia de reposição de fluídos. Recomenda-se até 80ml/kg/dia mesmo em pacientes com baixo risco de desenvolvimento de dengue severa²⁰.

Existe inclusive a recomendação para uso de coloides em pacientes que não respondem a uso inicial de cristaloides²⁰. Estudos compararam a infusão de tipos diferentes de fluídos com desfecho clínico. Não houve

alteração significativa, apenas reações anafiláticas maiores no grupo que usou coloide⁵⁷.

Por outro lado, é preciso estar alerta sobre a existência real da coagulopatia dilucional, induzida tanto por coloides como por cristaloides. Estudo recente realizou análise tromboelastográfica após reposição volêmica, revelando alterações significativas que prejudicam a polimerização da fibrina⁵⁸. Detalhes na Figura 21. Dessa forma, a reposição volêmica deve ser encarada com parcimônia não apenas pelo aspecto do excesso de volume com sequestro para o 3º espaço, em pacientes que já apresentam alteração da permeabilidade dos vasos, como também de possível piora da coagulopatia^{5,58}.

FONTE: Adaptado de Kozek-Langenecker SA, 2015⁵⁸.

Figura 21 - Imagem de coágulo sanguíneo em microscopia eletrônica ampliadas em 2000 vezes

NOTA: Primeira imagem (superior): coágulo sem hemodiluição. Imagem de centro: coágulo após infusão de 65% de gelatina. Imagem inferior: coágulo após infusão de concentrado de fibrinogênio para compensar coagulopatia dilucional.

Estas considerações reforçam a importância de termos o manejo de alguns pacientes de forma mais assertiva, segura e precoce com os testes viscoelásticos. Possivelmente em alguns pacientes pode ser mais prejudicial oferecer fluídos e plaquetas, se a análise tromboelastométrica conduzir para o sentido de reposição de estoques de fibrinogênio e/ou antifibrinolíticos. É bem provável que no futuro chegaremos a um ponto de mudança do paradigma da condução de casos de dengue severa guiando por tromboelastometria, como ocorreu na hemorragia pós-parto, trauma, cirurgias cardíacas, transplantes, entre outros casos^{36,45}.

Evidências atuais reforçam que a terapia dirigida por tromboelastométrica além de custo efetiva é eficaz²⁷. Os exames de ROTEM® podem ser realizados a um custo médio de U\$ 100,00 por teste. Em momentos de surto epidemiológico, hospitais de campanha, os recursos são limitados e devem ser priorizados. Portanto, testes tromboelastométricos talvez possam ser sugeridos aos pacientes com dengue severa, com sinais de alerta, FHD, CIVD, choque e plaquetopenia muito exuberante ($PLT < 10 \times 10^9/L$). Embora tenham um custo inicial elevado, o manejo possivelmente será mais racional e econômico tanto na introdução de medicamentos como concentrado de fibrinogênio, DDAVP, ácido tranexâmico, complexo protrombínico como também na suspensão de transfusões desnecessárias de hemocomponentes. Estas transfusões, por sua vez, apresentam altos custos para extração e conservação em seu processo e contam com a possibilidade de reações transfusionais que por si só podem aumentar a morbimortalidade de alguns pacientes⁵⁶. Além de evitar hiper-hidratação

impactando no acúmulo de fluídos nos tecidos e indução da coagulopatia dilucional⁵⁸.

Este trabalho tem varias limitações no que concerne à amostra pequena de pacientes (n=53); pacientes em fase inicial do DENV onde manifestações mais severas são improváveis. Deve, sobretudo, levar em consideração que a amostra contou com pacientes, em sua maioria, na primo infecção pela dengue, que também tende a ser mais benigna. Não analisamos pacientes extremamente graves com FHD, CIVD e choque para que pudéssemos assegurar as suposições prévias. Também não foi possível dispor de um grupo controle de pacientes com DENV com plaquetas normais para fazer analogias mais contundentes.

Estudos futuros com um número maior de pacientes, sobretudo em pacientes mais graves, são necessários para uma melhor compreensão da complexa interação que há entre plaquetas, fibrinogênio, FvW/FVIII, outros fatores de coagulação e fibrinólise. Possivelmente protocolos específicos para estes pacientes possam ser sugeridos. Análises da função plaquetária, como agregometria, provavelmente poderão fornecer informações adicionais. É importante que haja uma busca focada para obtenção de manejo mais individualizado que interrompa o sangramento em pacientes críticos⁴⁶. Conduzir pacientes com DENV severa apenas com testes convencionais da coagulação possivelmente não será a melhor medicina disponível futuramente⁵⁹.

6 CONCLUSÃO

A maioria dos pacientes com DENV e trombocitopenia tem alteração nos testes viscoelásticos INTEM e EXTEM, mesmo com exames convencionais da coagulação (INR, TP, TTPa) normais, sugerindo a tromboelastometria como um método mais sensível para análise de coagulopatia precoce nessa população. FIBTEM mantém-se predominantemente normal, sugerindo boa função do fibrinogênio no momento do estudo.

Não houve maior tendência a manifestações hemorrágicas ou internação hospitalar a despeito das alterações tromboelastométricas.

7 ANEXOS

Anexo A – Suporte financeiro

Esse estudo recebeu os reagentes para realização do perfil tromboelastométrico nos canais INTEM, EXTEM, FIBTEM para 53 pacientes da MedLine®, representante da TEM® no estado de São Paulo, Brasil.

Anexo B - Ficha clínica para coleta de dados

Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença Versão 4.1 (03-Mar-2014)			
FICHA CLÍNICA INICIAL			
Nº de Inclusão: _____		Data da Visita: ____/____/____	
Nome: _____			
Data de Nascimento: _____		Sexo: ( ) Fem ( ) Masc	
Endereço: _____		Contatos: _____	
Raça: ( ) Amarela ( ) Branco ( ) Indígena ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Outro			
PREENCHIMENTO MÉDICO		Preenchido por: _____ (iniciais/data)	
Doenças Prévias: _____			
Já teve Dengue? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe Quantas vezes? ( )			
Em que anos? _____			
Já foi vacinado com a vacina da Febre Amarela? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe Em que ano? _____			
Número de dias com sintomas: ( ) Com base no número de dias com sintomas, identificar a primeira vista			
Data de início dos sintomas: ____/____/____			
VISITA:	D2( ) (1-2d)	D4( ) (3-5d)	D6( ) (6-8d)
	D10( ) (9-10d)	D14( ) (13-15d)	D30-80 ( )
Febre: ( ) Sim ( ) Não Quantos dias: ( )		Dor de Cabeça: ( ) Sim ( ) Não	
Dor Muscular: ( ) Sim ( ) Não		Calafrios: ( ) Sim ( ) Não	
Coriza Recente: ( ) Sim ( ) Não		Dor de Garganta: ( ) Sim ( ) Não	
Náusea: ( ) Sim ( ) Não		Sonolência: ( ) Sim ( ) Não	
Dor abdominal: ( ) Sim ( ) Não		Dor nas articulações: ( ) Sim ( ) Não	
Dor atrás dos olhos: ( ) Sim ( ) Não		Letargia: ( ) Sim ( ) Não	
Tosse: ( ) Sim ( ) Não		Diarreia: ( ) Sim ( ) Não	
Vômito: ( ) Sim ( ) Não		Agitação: ( ) Sim ( ) Não	
Sangramento: ( ) Sim ( ) Não Se sim, assinalar:		Extravasamento plasmático: ( ) Sim ( ) Não	
( ) Gengiva ( ) Nariz ( ) Urina ( ) Petequia		( ) Peritoneal ( ) Pleural ( ) Pericárdio	
( ) Trato gastro intestinal ( ) Hematemese		Confirmado por RX ou USG? ( ) Sim ( ) Não	
( ) Melena ( ) Enterorragia		Rash: ( ) Sim ( ) Não	
( ) Outro local: _____		Nenhum sintoma ( )	
Outros Sintomas:			
Internação: ( ) Sim ( ) Não		Data da Internação: _____	
Motivo da internação: _____			
Dispneia: ( ) Sim ( ) Não		Sangramento grave: ( ) Sim ( ) Não	
Choque: ( ) Sim ( ) Não			
PREENCHIMENTO ENFERMAGEM		Preenchido por: _____ (iniciais/data)	
		Data da Coleta: ____/____/____	
Pressão arterial: ____/____/____ mmHg			
FC: ____ bpm			
Peso: ____ Kg		Altura: ____ m IMC: _____	
Temperatura: ____ °C			
Prova do Laço: ____ Positivo ____ Negativo			
Resultado Teste Rápido Dengue Duo: ( ) Não Reagente ( ) Reagente ( ) Indeterminado			
IGg: ( ) Não Reagente ( ) Reagente		IGm: ( ) Não Reagente ( ) Reagente	
NS1: ( ) Não Reagente ( ) Reagente			
TCLE:			
1. Houve tempo para perguntas sobre o TCLE? ( ) Sim ( ) Não			
2. Foram discutidos os riscos sobre a participação do voluntário? ( ) Sim ( ) Não			
3. Foi entregue uma cópia assinada do TCLE para o voluntário? ( ) Sim ( ) Não			
4. O TCLE foi assinado antes de qualquer outro procedimento do estudo? ( ) Sim ( ) Não			

Versão 2.1 (04-Abril-2014)

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parte 1)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HCFMUSP									
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Versão 2.1 datada de 03 de março de 2014									
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL									
1. NOME: ..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: ☒ M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: ..... CIDADE ..... CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....)									
2. RESPONSÁVEL LEGAL ..... NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) ..... DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: ..... CIDADE: ..... CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....)									
DADOS SOBRE A PESQUISA									
1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença" PESQUISADOR: DR. ESPER GEORGES KALLÁS CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM/SP 67395 UNIDADE DO HCFMUSP: LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA LIM-60									
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">RISCO MÍNIMO</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">☒</td> <td style="width: 30%;">RISCO MÉDIO</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td>RISCO BAIXO</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>RISCO MAIOR</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> </table>		RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐	RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐						
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐						
3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 5 ANOS 1 – Desenho do Estudo e Objetivo O objetivo deste estudo é identificar quais e quantas células são infectadas pelo vírus da Dengue e a quantidade de vírus que esta infecção produz. Também faz parte dos objetivos a análise genética dos vírus isolados dos pacientes, visto que a infecção por diferentes sorotipos e/ou genótipos podem resultar em diferentes padrões de resposta imunológica. Os vírus da dengue são transmitidos pela picada de mosquitos causando febre e, em alguns casos, hemorragia. Neste estudo, utilizaremos amostras de sangue periférico de pacientes voluntários com dengue clássica e/ou dengue grave.									
Rubrica do Pesquisador	Rubrica do voluntário ou responsável								
"Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença"									
TCLE versão 2.1 de 03-mar-2014									

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parte 2)

2 – Procedimentos de Pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se você/seu filho(a) deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. A sua participação ou a do seu filho ≥ 14 anos consistirá de seis visitas onde será realizada uma consulta médica para obter dados clínicos (informações de tudo o que você está sentindo) e que serão analisados conjuntamente com os resultados dos testes laboratoriais realizados com a amostra de sangue periférico. Participantes com menos de 18 anos também serão solicitados a assinar o Termo de Assentimento.

3 – Relação dos Procedimentos

Após a assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias (uma será entregue a você e a outra ficará nos arquivos do estudo), os procedimentos da pesquisa incluirão, coleta de sangue, exames laboratoriais (hemograma, bioquímica, sorologia para HIV e hepatites, teste rápido para Dengue e análises das células de defesa), exame médico e visitas ambulatoriais para os voluntários que têm 14 anos ou mais. Amostras de sangue de, no máximo 57 mL (que corresponde aproximadamente a 3½ colher de sopa), serão coletadas no primeiro dia do estudo, no 4º, 6º, 10º, 14º dias após o início dos sintomas de dengue, e na visita entre o 30º e 80º dia após o início dos sintomas.

Se o seu filho(a) tem entre 6 meses e 18 meses, será realizada apenas a primeira visita do estudo e será coletada uma única amostra de 8 mL de sangue (que corresponde a 1 colher de sobremesa) para exames laboratoriais.

A retirada do sangue será feita por uma agulha esterilizada descartável, que será introduzida na veia do braço (procedimento rotineiro).

4 - Desconfortos e Riscos Esperados

Os riscos relacionados com sua/do seu filho(a) participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5 - Benefícios para o Participante

Não existe nenhum benefício direto a você/seu filho(a) por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua/seu filho(a) participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas dependendo das conclusões do estudo.

6 – Procedimentos Alternativos e/ou Experimentais

Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7 – Garantia de Acesso aos Pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador do estudo é o Dr. Esper Georges Kallás, que pode ser encontrado na Av. Dr. Arnaldo, 455 3º andar, SP. Tel: 3061-8314 e 3061-8315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225-5º andar, tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18, FAX 2661-6442 ramal 26, São Paulo - SP e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8 – Voluntariedade

Rubrica do Pesquisador _____ Rubrica do voluntário ou responsável _____

"Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença"

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parte 3)

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu/do seu filho(a) tratamento na Instituição.

09 – Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua/do seu filho(a) participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo e o Comitê de Ética em Pesquisa poderão ter acesso direto.

10 - Direito de atualização

Você/seu filho(a) tem o direito garantido de saber sobre os resultados parcial ou total de conhecimento dos pesquisadores.

11 - Direito à Assistência e Indenização

Caso você/seu filho(a) venha a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação no protocolo, você/seu filho(a) terá direito à assistência assumidos pelo pesquisador e pela instituição.

12 - Despesas e ressarcimento

A participação neste estudo é voluntária e não haverá despesas pessoais em qualquer fase, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira pela sua participação. Entretanto, você/seu filho(a) receberá auxílio para o transporte público, nos dias em que precisar de deslocamento para participação neste estudo clínico.

CONSENTIMENTO PARA O ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE NÃO UTILIZADAS

Durante o estudo teremos que fazer exames laboratoriais para monitorar seu/do seu filho(a) estado de saúde. Se os exames puderem ser feitos satisfatoriamente sem necessidade de repetição sobrar uma quantidade do sangue colhido. Você decide se podemos manter armazenadas as amostras não utilizadas após o final da pesquisa. Se você aceitar, nenhuma amostra extra de sangue terá que ser colhida. O sangue será armazenado, por 5 anos, período que poderá ser prorrogado por mais 5 anos com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa. As amostras armazenadas ficarão sob a responsabilidade do Dr. Esper Georges Kallás, no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60).

Nós poderemos usar as amostras armazenadas para saber mais sobre a infecção pelo vírus da Dengue, para saber mais sobre sua prevenção ou ainda para validar testes diagnósticos. Os avanços médicos baseados em pesquisas futuras poderão beneficiar a você/seu filho(a) ou a outras pessoas no futuro. Seu sangue não será vendido nem usado para a produção comercial de produtos derivados. Nenhum tipo de pesquisa será feita com as amostras armazenadas de seu/do seu filho(a) sangue sem que haja revisão e autorização por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

A decisão de nos autorizar a armazenar o sangue não utilizado para pesquisas futuras é voluntária. Se você decidir não armazenar nós destruiremos suas amostras ao final do estudo. A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores e pedir que seu/do seu filho(a) sangue não seja usado para pesquisas; neste caso, todas as suas amostras identificáveis que forem encontradas em nossos laboratórios serão destruídas.

Para fazer isso precisamos de sua autorização; portanto, por favor, leia a afirmação a seguir cuidadosamente e marque SIM ou NÃO, de acordo com a opção que melhor expressa a sua opinião. Independente do que você decidir, sua decisão não afetará seus cuidados de saúde nem sua participação neste estudo.

Se sua resposta for NÃO, isto não influenciará a sua participação no estudo.

Rubrica do Pesquisador _____ Rubrica do voluntário ou responsável _____

"Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença"

TCLE versão 2.1 de 03-mar-2014

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parte 4)

“Minhas amostras de sangue, do meu filho(a) podem ser armazenadas para uso futuro em pesquisas para saber mais sobre a prevenção e o tratamento da infecção pelo vírus da DENGUE”

SIM

NÃO

OBS: O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq)

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(   ) ***SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu/do meu filho(a) material.***

(   ) ***NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização.***

CONSENTIMENTO PARA A UTILIZAÇÃO DO DNA PARA FINS RELACIONADOS AO ESTUDO

Amostras de DNA (DNA é o seu/do seu filho(a) material genético) serão retidas para usar no estudo genético (genotipagem) do antígeno leucocitário humano (HLA) para auxiliar na investigação das respostas de células T e para estudos de associação genética de resistência ou susceptibilidade à dengue severa.

HLA são partes (moléculas) das células de defesa presentes em todos os seres humanos, que caracterizam cada indivíduo e que está associada à forma de evolução da doença. Também é utilizada na avaliação de compatibilidade de transplantes entre doadores e receptores de órgãos. Essas informações genéticas serão mantidas em segredo pela equipe do estudo. As informações serão armazenadas com identificadores codificados e não com o nome do participante.

Para que se possa analisar o seu/do seu filho(a) HLA, precisamos que você autorize a sua utilização. Por favor, leia o parágrafo a seguir e marque SIM ou NÃO na opção que melhor expressar a sua decisão:

Se sua resposta for NÃO, isto não influenciará a sua participação no estudo.

“Eu permito o uso de DNA para fins relacionados ao estudo.”

SIM

NÃO

CONSENTIMENTO

Rubrica do Pesquisador _____ Rubrica do voluntário ou responsável _____

“Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença”

TCLE versão 2.1 de 03-mar-2014

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parte 5)

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença"**. Eu discuti com o Dr. Esper G. Kallás ou um membro de sua equipe, sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perdas de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

_____
Assinatura do Paciente/Representante Legal

Data: _____

_____
Assinatura da Testemunha

Data: _____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____
Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Data: _____

_____
Assinatura do Responsável pelo estudo

Rubrica do Pesquisador _____ Rubrica do voluntário ou responsável _____

"Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença"

TCLE versão 2.1 de 03-mar-2014

Anexo D - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Parte 1)

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 02.12.15 a execução do subprojeto intitulado "Perfil Tromboelastométrico de Pacientes com Dengue Hemorrágica Grave", como tese de doutorado do aluno Felipe Maia de Toledo Piza.

O referido projeto faz parte do Protocolo de Pesquisa nº 0652/09, intitulado "Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença", aprovado por esta CAPPesq em 15.07.2009.

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallás

CAPPesq, 02 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo D - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Parte 2)

Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq

Nº Protocolo: 0652/09

Título: Identificação de células infectadas pelo vírus da Dengue e resposta imunológica celular na fase aguda da doença.

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallós

Pesquisador Executante: Andréia Manso de Matos

Disciplina: Imunologia Clínica e Alergia

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 02/12/2015, do(s) documento(s) abaixo mencionada(s):

- Carta datada 10/11/2015 - Emenda ao protocolo de estudo solicitação de inclusão do subprojeto "Perfil Tromboelastométrico de Pacientes com Dengue Hemorrágica Grave" versão 1.0 de 09 de novembro de 2015 que será tese de doutorado do aluno Felipe Maia de Toledo Fiza, sob orientação do Dr. Alexandre Biasi Cavalcante.
- Carta datada de 21/10/2015 - Solicitação de inclusão do pesquisador Alexandre Biasi Cavalcanti no estudo.
- Carta datada de 21/10/2015 - Justificativa para realização do subprojeto "Perfil Tromboelastométrico de Pacientes com Dengue Hemorrágica Grave", que será tese de doutorado do aluno Felipe Maia de Toledo Fiza, sob orientação do Dr. Alexandre Biasi Cavalcante.

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 - cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

CAPPesq, 02 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

8 REFERÊNCIAS

1. Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. *The history of dengue outbreaks in the Americas*. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(4):584-93.
2. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 30th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
3. Chen R, Vasilakis N. *Dengue--quo tu et quo vadis?* J Viruses. 2011;3(9):1562-608.
4. Guzman M. *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges*. J Clin Virol. 2003;27(1):1-13.
5. Guzmán MG, Kouri G. *Dengue: an update*. Lancet Infect Dis. 2002;2(1):33-42.
6. Halasa YA, Shepard DS, Zeng W. *Economic cost of dengue in Puerto Rico*. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(5):745-52.
7. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. *Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever*. Trop. Med. Int. Health. 2006;11(8):1238-55.
8. Camero S, Jeremy F, Nguyen C, Bridget W. *Dengue*. N Engl J Med. 2012;366:1423-32.
9. Maria G Guzman EH. *Dengue*. Lancet. 2015;385:453-65.
10. Smith A, Schwartz E. *Dengue in Travelers*. N Engl J Med. 2005;353:924-32.
11. Nidhi Bouri, BAa Tara Kirk Sell, MAa Crystal Franco. *Return of Epidemic Dengue in the United States: implications for the public health practitioner*. 2012;127:259-265.
12. Humungkorn M, Thisyakorn U, Thisyakorn. *Dengue infection: a growing global health threat*. Biosci Trends. 2007;1(2):90-96.
13. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):564-81.

14. Kurane I. *Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. New Microbes New Infect. 2007;30(5-6):329-40.
15. Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vance Vorndam A. *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. Lancet. 1998;352(9132):971-7.
16. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, et al. *Autoimmunity in dengue pathogenesis*. J Formos Med Assoc = Taiwan yi zhi. 2013;112(1):3-11.
17. ANTIGA REF 18 - Rigau-Pérez JG. *Severe dengue: the need for new case definitions*. Lancet Infect Dis. 2006;6(5):297-302.
18. ANTIGA REF 17 - Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, See LL, Farrar J, et al. *Comparing the usefulness of the 1997 and 2009 WHO dengue case classification: a systematic literature review*. Am J Trop Med Hyg. 2014;91(3):621-34.
19. Nascimento EJ, Hottz ED, Garcia-Bates TM, Bozza F, Marques ET Jr, Barratt-Boyes SM. *Emerging concepts in dengue pathogenesis: interplay between plasmablasts, platelets, and complement in triggering vasculopathy*. Crit Rev Immunol. 2014;34(3):227-40.
20. Singhi S, Kissoon N, Bansal A. *Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit*. J Pediatr. 2007;83(2 Suppl):S22-35.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. *Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança*. 4a ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.
22. Riddel JP, Jr., Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. *Theories of blood coagulation*. J Pediatr Oncol Nurs: official journal of the Association of Pediatric Oncology Nurses. 2007;24(3):123-31.
23. Chitlur M. *Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders*. Thromb Res. 2012;130(1):1-6.

24. Favaloro EJ, Lippi G. *Coagulation update: what's new in hemostasis testing?* Thromb Res. 2011;127:S13-S6.
25. Karon BS. *Why is everyone so excited about thromboelastography (TEG)?* Clinica Chimica Acta. J Int Fed Clin Chem. 2014;436:143-8.
26. McMichael MA, Smith SA. *Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations.* Vet Clin Pathol / American Society for Veterinary Clinical Pathology. 2011;40(2):140-53.
27. Reikvam H, Steien E, Hauge B, Liseth K, Hagen KG, Storkson R, et al. *Thrombelastography.* Transfus Apher Sci: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis . 2009;40(2):119-23.
28. Whiting D, DiNardo JA. *TEG and ROTEM: technology and clinical applications.* Am J Hematol. 2014;89(2):228-32.
29. van Geffen M, van Heerde WL. *Global haemostasis assays, from bench to bedside.* Thromb Res. 2012;129(6):681-7.
30. Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS. *Global assays of hemostasis.* Curr Opin Hematol. 2014;21(5):395-403.
31. Mackie IJ, P.R., *Vascular integrity and platelet function.* Int Anesthesiol Clin. 1985;23(2):3-21.
32. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. *Thrombin generation: what have we learned?* Blood Rev. 2012;26(5):197-203.
- 33..Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA. *Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice.* Transfus Med Rev. 2012;26(1):1-13.
34. Ganter MT, Hofer CK. *Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices.* Anesth Analg. 2008;106(5):1366-75.
35. Kenneth A. Baue. *Activation markers of coagulation.* Clin Lab Haematol. 1999;12:387-406.

36. Levy JH, Dutton RP, Hemphill JC, 3rd, Shander A, Cooper D, Paidas MJ, et al. *Multidisciplinary approach to the challenge of hemostasis*. Anesth Analg. 2010;110(2):354-64.
37. Perry DJ, Fitzmaurice DA, Kitchen S, Mackie IJ, Mallett S. *Point-of-care testing in haemostasis*. Br J Haematol. 2010;150(5):501-14.
38. Mallett SV, Armstrong M. *Point-of-care monitoring of haemostasis*. Anaesthesia. 2015;70(Suppl 1):73-7, e25-6.
39. Chua MN, Molanida R, de Guzman M, Laberiza F. *Prothrombin time and partial thromboplastin time as a predictor of bleeding in patients with dengue hemorrhagic fever*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1993;24(Suppl. 1):141–3.
40. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, et al. *Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome*. Clin Infect Dis. 2002;35:277–85.
41. Díaz-Quijano FA. *Predictors of spontaneous bleeding in dengue patients: a systematic review of the literature*. Invest Clin. 2008;49:111–22.
42. Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martinez-Vega RA. *Predictors of spontaneous bleeding in patients with acute febrile syndrome from a dengue endemic area*. J Clin Virol. 2010;49:11–15.
43. Sniecinski RM, Levy JH. *Bleeding and management of coagulopathy*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011;142(3):662-7.
- 44.. Peng HT, Rhind SG. *Thromboelastographic Study of Psychophysiological Stress: A Review*. Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official Clin Appl Thromb Hemost. 2015;21(6):497-512.
- 45.. Schochl H, Nienaber U, Hofer G, Voelckel W, Jambor C, Scharbert G, et al. *Goal-directed coagulation management of major trauma patients using thromboelastometry (ROTEM)-guided administration of fibrinogen concentrate and prothrombin complex concentrate*. J Crit Care. 2010;14(2):R55.

46. Hunt BJ. *Bleeding and coagulopathies in critical care*. N Engl J Med. 2014;370(9):847-59.
47. Chuang YC, Lin YS, Liu CC, Liu HS, Liao SH, Shi MD, et al. *Factors contributing to the disturbance of coagulation and fibrinolysis in dengue virus infection*. J Formos Med Assoc = Taiwan yih. 2013;112(1):12-7.
48. de Azeredo EL, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. *Thrombocytopenia in Dengue: interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators*. Mediators Inflamm. 2015;2015:313-842.
49. Mairuhu ATA, Mac Gillavry MR, Setiati TE, Soemantri A, ten Cate H, Brandjes DPM, et al. *Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence*. Lancet Infect Dis. 2003;3(1):33-41.
50. Srikiatkachorn A. *Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever*. Thromb Haemost. 2009;102(6):1042-9.
51. Villar LA, Gélvez RM, Rodriguez JA, Salgado D, Parra B, Osorio L, et al. *Biomarcadores pronósticos de severidad del dengue*. Biomédica. 2012;33(0).
52. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. *Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases*. J Thromb Haemost. 2013;11(5):951-62.
53. Pea L, Roda L, Moll F. *Desmopressin treatment for a case of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome*. Clin Infect Dis. 2001 Nov 1;33(9):1611-2.
54. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. *Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue*. J Immunol. 2014 Aug 15;193(4):1864-72.
55. Fries D, Martini WZ. *Role of fibrinogen in trauma-induced coagulopathy*. Br J Anaesth. 2010;105(2):116-21.

56. Stensballe J, Ostrowski SR, Johansson PI. *Viscoelastic guidance of resuscitation*. Curr Opin Anaesthesiol. 2014;27(2):212-8.
57. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, Dong TH, Tran TN, Le TT, et al. *Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome*. N Engl J Med. 2005 Sep; 1;353(9):877-89.
58. Kozek-Langenecker SA. *Fluids and coagulation*. Curr Opin Crit Care. 2015;21(4):285-91.
59. Saner FH. *Rotational thrombelastometry: a step forward to safer patient care?* J Crit Care. 2014;18(6):706.