

Estudo de Fatores Pró-trombóticos e Pró-inflamatórios na Cardiomiopatia Chagásica

Study of Pro-thrombotic and Pro-inflammatory Factors in Chagas Cardiomyopathy

Leila Maria Magalhães Pessoa de Melo¹, Germano Emílio Conceição Souza¹, Leandro Richa Valim¹, Luiz Felipe Pinho Moreira¹, Elbio Antonio Damico², Tania Rubia Flores da Rocha², Antonio Carlos Pereira Barretto¹, Celia Maria Cassaro Strunz¹, Edimar Alcides Bocchi¹, José Antonio Franchini Ramires¹

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP¹; Laboratório de Hemostasia do Hospital das Clínicas da FMUSP², São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A relação entre atividade inflamatória e pró-trombótica na cardiomiopatia chagásica e em outras etiologias é obscura.

Objetivo: Estudar o perfil de marcadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios em pacientes com insuficiência cardíaca chagásica e compará-los com os de etiologia não chagásica.

Métodos: Coorte transversal. Critérios de inclusão: fração de ejeção do VE (FEVE) < 45% e tempo de início de sintomas > um mês. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo 1 (G1) - sorologias positivas para Chagas - e grupo 2 (G2) - sorologias negativas para Chagas. Fator pró-inflamatório: PCR ultrasensível. Fatores pró-trombóticos: fator trombina-antitrombina, fibrinogênio, antígeno do fator de von Willebrand, P-selectina plasmática e tromboelastograma. Amostra calculada para poder de 80%, assumindo-se diferença de 1/3 de desvio-padrão; p significativo se < 0,05. Análise estatística: teste exato de Fischer para variáveis categóricas; teste *t* de Student não pareado para variáveis contínuas paramétricas e teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas não paramétricas.

Resultados: Entre janeiro e junho de 2008, foram incluídos 150 pacientes, 80 no G1 e 70 no G2. Ambos os grupos mantinham médias de PCR ultrasensível acima dos valores de referência, porém, sem diferença significativa ($p=0,328$). Os níveis de fibrinogênio foram maiores no G2 do que no G1 ($p=0,015$). Entre as variáveis do tromboelastograma, os parâmetros MA ($p=0,0013$), G ($p=0,0012$) e TG ($p=0,0005$) foram maiores no G2 em comparação ao G1.

Conclusão: Não há indícios de maior status pró-trombótico entre chagásicos. A dosagem de fibrinogênio e dos parâmetros MA, G e TG do tromboelastograma apontam para status pró-trombótico entre não chagásicos. Ambos os grupos tinham atividade inflamatória exacerbada. (Arq Bras Cardiol 2010; 95(5): 655-662)

Palavras-chave: Cardiomiopatia chagásica, trombina, fibrinolíticos, inflamação.

Abstract

Background: The relationship between inflammatory and prothrombotic activity in chagas cardiomyopathy and in other etiologies is unclear.

Objective: To study the profile of pro-thrombotic and pro-inflammatory markers in patients with Chagas' heart failure and compare them with patients of non-chagas etiology.

Methods: Cross-sectional cohort. Inclusion criteria: left ventricle ejection fraction (LVEF) < 45% and onset time to symptoms > one month. The patients were divided into two groups: group 1 (G1) - seropositive for Chagas - and group 2 (G2) - seronegative for Chagas. Pro-inflammatory factor: Ultra-sensitive CRP. Pro-thrombotic factors: thrombin-antithrombin factor, fibrinogen, von Willebrand factor antigen, plasma P-selectin and thromboelastography. Sample calculated for 80% power, assuming a standard deviation difference of 1/3; significant *p* if it is < 0.05. Statistical analysis: Fisher's exact test for categorical variables; unpaired Student's *t*-test for parametric continuous variables and Mann-Whitney test for nonparametric continuous variables.

Results: Between January and June 2008, 150 patients were included, 80 in G1 and 70 in G2. Both groups maintained the averages of high sensitivity CRP above baseline values, however, there was no significant difference ($p = 0.328$). The fibrinogen levels were higher in G2 than in G1 ($p = 0.015$). Among the thromboelastography variables, the parameters MA ($p=0.0013$), G ($p=0.0012$) and TG ($p = 0.0005$) were greater in G2 than in G1.

Conclusion: There is no evidence of greater pro-thrombotic status among patients with Chagas disease. The levels of fibrinogen and the MA, G and TG parameters of the thromboelastography point to pro-thrombotic status among non-chagas patients. Both groups had increased inflammatory activity. (Arq Bras Cardiol 2010; 95(5): 655-662)

Keywords: Chagas cardiomyopathy; thrombin; fibrinolytic agents; inflammation.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Leila Maria Magalhães Pessoa de Melo •

Rua Oscar Freire, 1961, apt. 61 - Pinheiros - 05409-011 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: leilammpm@uol.com.br

Artigo recebido em 05/04/09; revisado recebido em 21/12/09; aceito em 28/04/10.

Introdução

A Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome endêmica no mundo. No Brasil, apresenta forte impacto socioeconômico, dada à alta morbimortalidade. É a terceira causa geral e a primeira causa cardiovascular de hospitalização em nosso meio¹. Na fisiopatologia, predomina a ativação neuro-humoral e inflamatória. Essa última guarda estreita relação com ativação de fatores pró-trombóticos. Isso pode explicar, em parte, o risco aumentado para tromboembolismo, morte súbita, trombose intracavitária e acidente vascular encefálico entre pacientes com IC em relação à população em geral^{2,3}. Mais recentemente, foi demonstrada influência mútua entre fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos⁴. Marcadores de disfunção/lesão endotelial, de ativação plaquetária ou de ativação da cascata de coagulação^{5,6} podem estar relacionados à ativação inflamatória⁷.

Na cardiomiopatia chagásica (CMC), foi demonstrada uma tendência para maior atividade inflamatória, o que pode explicar, em parte, o pior prognóstico. Estudo realizado em nosso meio demonstrou relação entre ativação pró-inflamatória e neuro-humoral e pior prognóstico, inclusive na CMC⁸.

Outra hipótese para explicar esse pior prognóstico na CMC seria um possível risco adicional para fenômenos trombóticos. Em estudos fisiopatológicos, observou-se aumento significativo de marcadores pró-trombóticos na CMC em relação a controles saudáveis⁹. Entretanto, não houve comparação com outras etiologias de IC. Diversos relatos de casos, séries de casos e estudos de caso-controlado, incluindo de autópsias, relatam alta prevalência de achados isquêmicos, tais como infarto renal, trombose arterial e outros fenômenos tromboembólicos, nessa população¹⁰⁻¹⁴. Todavia, não existem estudos controlados para outras etiologias de IC a esse respeito.

Alguns marcadores pró-trombóticos têm sido estudados em pacientes com IC, a saber: fator de von Willebrand, complexo trombina-antitrombina, dímero-D, fator tecidual, p-selectina, entre outros. Cada marcador estuda uma parte do processo de formação do coágulo. O tromboelastograma é um teste importante na avaliação global da coagulação e da fibrinólise, integrando células e proteínas da coagulação que não são avaliadas nos testes habituais. A análise das variáveis pode determinar o estado de coagulabilidade do paciente. Existe correlação entre o estado de hipercoagulabilidade pós-operatória determinado pela tromboelastografia e as complicações trombóticas pós-operatórias^{15,16}. A sua utilidade em pacientes com IC não está estabelecida.

Assim, planejamos estudar o perfil de marcadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios em portadores da CMC, incluindo, nessa análise, a tromboelastografia, em comparação com pacientes portadores de IC de etiologias não chagásicas.

Métodos

Estudo de coorte transversal. Entre 14 de janeiro de 2008 e 31 de maio do mesmo ano, 150 pacientes com IC crônica definida pelos critérios de Framingham foram consecutivamente selecionados do ambulatório, das unidades

de internação, pronto-socorro e unidades de terapia intensiva em nossa instituição.

Os critérios de inclusão eram presença de sintomas de IC há mais de um mês e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) < 45%. Entre esses, 80 pacientes apresentavam etiologia chagásica - grupo 1 (G1) - e 70 pacientes eram não chagásicos - grupo 2 (G2), definidos pela positividade ou negatividade, respectivamente, de, pelo menos, dois testes sorológicos (imunofluorescência indireta e ELISA - ensaio imunoabsorvente ligado à enzima).

Foram excluídos pacientes com prótese valvar mecânica, neoplasia diagnosticada, terapia estrogênica atual, infecção fora de controle, circulação extracorpórea nos últimos dois meses, presença de hipotireoidismo ou hipertireoidismo clínicos não tratados, gravidez suspeita ou confirmada, puerpério, insuficiência hepática ou outra coagulopatia clinicamente relevante, anticoagulação plena, história clínica de trombofilia, cardiomiopatia congênita, concomitância de cardiomiopatia chagásica crônica e isquêmica (presença de doença aterosclerótica coronariana obstrutiva de $\geq 50\%$ no tronco de coronária esquerda ou $\geq 70\%$ em outras artérias) ou hemodiálise nos últimos dois meses.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição, e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Cada paciente teve uma ficha de avaliação clínica individual, que foi preenchida com dados clínicos, laboratoriais, radiológicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos.

Foi realizada coleta de sangue venoso no leito em caso de pacientes internados e no laboratório de análises clínicas em pacientes ambulatoriais.

As amostras para a determinação dos testes de fibrinogênio, trombina-antitrombina, P-selectina, fator de von Willebrand e tromboelastograma foram colhidas em tubos com volume de aspiração de 4,5 ml da marca BD Vacutainer®, que continham citrato de sódio 3,2%, por meio de uma venopunção periférica, sem garroteamento do membro. As amostras para a contagem automatizada de plaquetas foram colhidas em tubos com volume de aspiração de 4,0 ml da marca BD Vacutainer®, que continham EDTA 7,2 mg.

As amostras para determinação da sorologia para Chagas e Proteína C reativa ultrasensível foram colhidas em tubos secos com gel com volume de aspiração de 5 ml da marca Vacuette®, por meio de uma venopunção periférica.

Fatores pró-trombóticos

Para a avaliação do sistema de coagulação, foram determinados os níveis séricos de TAT (complexo trombina-antitrombina) e fibrinogênio; para a avaliação da ativação plaquetária, utilizamos a sP-selectina plasmática; para a detecção de lesão endotelial, determinamos o antígeno do fator de von Willebrand; e, para uma avaliação global da coagulação e da fibrinólise, utilizamos o tromboelastograma. Todas as amostras, exceto para o tromboelastograma, foram centrifugadas duas vezes a (3.000 rpm) por 15 minutos, a 22° C, congeladas em nitrogênio líquido a -180° C, estocadas a -80° C antes da determinação final e realizadas em duplicata.

O nível de TAT foi determinado pelo método de ELISA (imunoensaio enzimático) Enzygnost® TAT (Dade Behring, Marburg, Alemanha), com intervalos de referência de 1,0 a 4,1 $\mu\text{g/l}$. A determinação quantitativa de fibrinogênio em plasma humano foi obtida pelo Método Clássico de Clauss, equipamento AMAX-190, número de referência 886-A (Trinity Biotech, St. Louis, MO, EUA), com intervalo de referência de 220-380 mg/dl. A determinação da sP-selectina foi realizada por meio da técnica de ELISA, usando um Kit solúvel sP-Selectin ELISA Kit, (BioSource®), Catalog Number - KHS2021, com intervalo de referência de 90-290 ng/ml. A determinação do antígeno de von Willebrand em plasma humano foi realizada pelo clássico método de ELISA - imunoensaio enzimático (Coergenix Inc, Broomfield, Colorado, EUA), com intervalos de referência de 50 a 160%.

As amostras do tromboelastograma foram analisadas, a 37°C, em um intervalo de tempo inferior a 120 minutos, entre a coleta e a realização do teste. Foram utilizados 20 ml de Kaolin (0,006%), 20 ml de cloreto de cálcio (0,2 Molar) e 300 ml de sangue total citratado. Os dados foram analisados pelo software TEG® da Haemoscope Corporation (Niles, IL, EUA), com representação gráfica da formação e da subsequente lise do coágulo.

As variáveis estudadas nesse teste foram:

a) Tempo de coagulação

- Tempo r (período para atingir 2 mm de amplitude da curva): é o tempo de coagulação medido em minutos. Mede o tempo decorrido do início do ensaio até o momento em que a produção de fibrina se inicia, com intervalo de referência de dois a oito minutos.

b) Cinética do coágulo

- Determinação do k (período entre 2 e 20 mm de amplitude da curva): representa o momento em que o coágulo se estabiliza, a rede de fibrina consolida-se, e as plaquetas aderem a essa, com intervalo de referência de um a três minutos.
- Ângulo alfa (inclinação entre o r e o k): mede a velocidade de formação do coágulo. Representa a taxa de geração da trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, com intervalo de referência de 55 a 78°.

c) Força do coágulo

- MA (amplitude máxima): é função direta da máxima propriedade dinâmica da fibrina e adesão plaquetária via glicoproteína IIb/IIIa e representa a resistência global do coágulo, com intervalo de referência de 51 a 69 mm.
- Parâmetro G (dyn/cm^2): trata-se da conversão algorítmica do MA (em mm) do coágulo em seu valor de resistência a pressão (dyn/cm^2). Enquanto o MA analisa uma reação linear entre a força do coágulo e a atividade plaquetária, o G o faz como uma relação exponencial. O G é mais sensível a alterações na função plaquetária, com intervalo de referência de 4,6 a 10,9 k.

d) CI (índice de coagulação): permite avaliar o estado hemostático global do paciente. É resultante de uma combinação entre os parâmetros cinéticos do coágulo (r, k

e ângulo α) e a força do coágulo (MA), com intervalo de referência de -3 a 3.

e) LY 30 (%) e EPL (%): A LY 30 representa a lise do coágulo após 30 minutos e, em conjunto com o EPL (percentual estimado de lise), forma os parâmetros que monitoram a fase final do processo de coagulação, com intervalo de referência de 0 a 8%.

f) MRTG (*Maximum rate of thrombus generation* - mm/min): representa o pico da geração de trombina, com intervalo de referência de 5 a 17 mm/min.

g) TMRTG (*Time to maximum rate of thrombus generation* - min): representa o tempo decorrido para atingir o pico da geração de trombina, com intervalo de referência de 6 a 12 min.

h) TG (*Total thrombus generation* - mm/min): representa a área total de geração de trombina, com intervalo de referência de 584 a 796 mm/min.

Fator pró-inflamatório

Para a avaliação da proteína C reativa (PCR) ultrasensível, o método utilizado foi a nefelometria (Dade Behring, Marburg, Alemanha), com intervalo de referência de $< 1,0 \text{ mg/l}$.

Análise estatística

Os resultados foram tabulados e analisados usando o software Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA). O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc, USA).

A amostra foi calculada assumindo-se uma estimativa de diferença entre os grupos de, aproximadamente, 1/3 de desvio-padrão para um poder de 80%, considerando-se teste de hipótese bicaudal. Essa estimativa de diferença pode ser considerada razoável, de acordo com a dispersão aferida de variáveis pró-trombóticas em outros estudos em portadores de IC. Considerou-se como estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

Variáveis categóricas e contínuas foram expressas como porcentagens e médias \pm desvio-padrão. Comparações de variáveis clínicas, ecocardiográficas e laboratoriais entre os diversos grupos serão realizadas com uso do teste t de Student não pareado, para variáveis contínuas paramétricas, e o teste de Mann-Whitney, para variáveis não paramétricas. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação entre proporções.

Resultados

Características da amostra

Na Tabela 1, estão dispostas as características de base da amostra estudada.

Observa-se que os chagásicos (G1) são significativamente mais jovens, têm menor índice de massa corpórea e pior fração de ejeção no ecocardiograma bidimensional, em relação aos não chagásicos (G2). Este grupo apresenta, ainda, maior frequência de tabagismo, dislipidemia, diabetes e hipertensão e fazem uso mais frequentemente de ácido acetil salicílico em relação ao G1.

Tabela 1 - Características da amostra

Características	G1	G2	Valor P
Idade	51,02 ± 1,256	54,88 ± 0,8787	p=0.0114
Sexo	52M / 28F (65%)	48 M / 22F (68,57%)	p=0.7291
IMC	24,32 ± 0,3960	27,16 ± 0,6331	p=0.0001
CF NYHA	2,550 ± 0,09727	2,3 ± 0,1045	p=0.0818
FEVE	25,25±0,9324	27,86±0,8966	p=0.0472
ICT	0,6145±0,0098	0,5904±0,0098	p=0.0882
Etilismo	28/80 (35%)	17/70 (24,28%)	p=0.2111
Tabagismo	33/80 (41,25%)	42/70 (60%)	p=0.0330
DLP	19/80 (23,75%)	36/70 (51,42%)	p=0.0006
DM	5/80 (6,25%)	17/70 (24,28%)	p=0.0023
HAS	29/80 (36,25%)	46/70 (65,71%)	p=0.0005
IRC	8/80 (10%)	8/70 (11,42%)	p=0.7971
DPOC	3/80 (3,75%)	7/70 (10%)	p=0.1897
Tireoidopatia	6/80 (7,5%)	12/70 (17,14%)	p=0.0818
B-bloqueador	78/80 (97,5%)	66/70(94,28%)	p=0.4183
IECA	75/80 (93,75%)	66/70 (94,28%)	p=1.0
Espironolactona	52/80 (65%)	40/70 (57,14%)	p=0.4010
Digital	40/80 (50%)	25/70 (35,71%)	p=0.0988
AAS	23/80 (28,75%)	37/70 (52,85%)	p=0.0043
Diurético	60/80 (75%)	47/70 (67,14%)	p=0.3658

G1 - grupo chagásico; G2 - grupo não chagásico; IMC - índice de massa corpórea; CF NYHA - classe funcional da New York Heart Association; FEVE - fração de ejeção de ventrículo esquerdo; ICT - índice cardiotorácico; DLP - dislipidemia; DM - diabetes melito; HAS - hipertensão arterial sistêmica; IRC - insuficiência renal crônica; DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica; IECA - inibidor da enzima de conversão da angiotensina; AAS - ácido acetil salicílico.

Variáveis pró-trombóticas

Sistema de coagulação

- Trombina-antitrombina

A determinação plasmática da Trombina-antitrombina está disposta na Tabela 2. Em ambos os grupos, nota-se que, pelo menos, 25% das determinações estão acima do valor de referência, com mediana próxima deste. Não houve diferença entre os grupos.

- Fibrinogênio

A dosagem do fibrinogênio foi significativamente mais alta no G2 (343,2 mg/dl ± 69,63) em relação ao G1 (315,0 mg/dl ± 70,41; p=0.0156), conforme a Figura 1.

Avaliação plaquetária

- Contagem automatizada de plaquetas

A contagem automatizada de plaquetas está disposta na Tabela 2. Não houve diferença nessa contagem entre os grupos estudados.

- sP-Selectina humana

A determinação plasmática da P-selectina solúvel humana está disposta na Tabela 2. Essa dosagem esteve abaixo do valor mínimo de referência em, pelo menos, 75% da amostra de ambos os grupos.

Avaliação endotelial

- Antígeno do fator de von Willebrand

A determinação plasmática do fator de von Willebrand está disposta na Tabela 2. Sua determinação em ambos os grupos mostrou mediana próxima ao limite superior dos valores de referência, com grande parte da amostra acima desse.

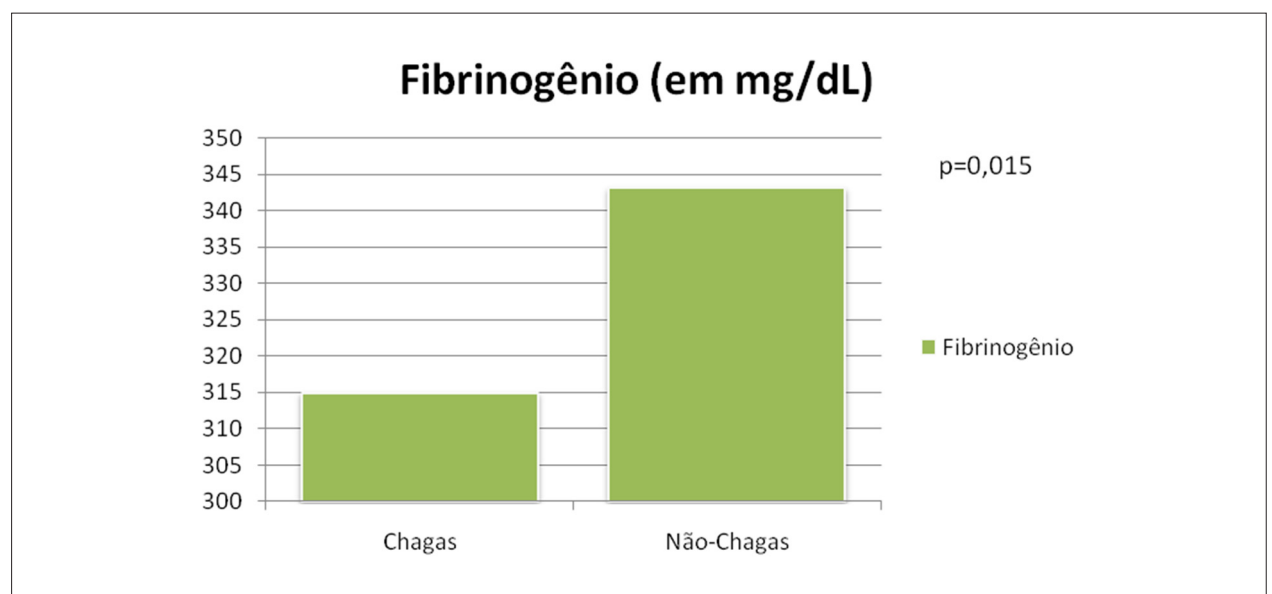


Fig. 1 - Níveis plasmáticos de fibrinogênio entre chagásicos e não chagásicos.

Tabela 2 - Variáveis pró-trombóticas e pró-inflamatórias medidas em pacientes com IC chagásica e não chagásica

Variável	G1	G2	P	Valor de referência
TAT (mg/l)	3,4 (2,4-5,1)	3,5 (2,7-4,8)	p=0,2768	1-4,1 mg/l
Contagem de plaquetas (mil/mm ³)	202 (170-252)	214,5 (172-258)	p=0,2609	150-450 mil/mm ³
sP-Selectina (ng/ml)	46,5 (24-81)	46,5 (27,75-58,25)	p=0,8248	90- 290 ng/ml
FVW (%)	158 (127-232,5)	141 (102-181,5)	p=0,0657	50-160%
PCR us (mg/dl)	2,04 (0,99-7,88)	3,2 (0,97-8,79)	P=0,3280	PCR < 1 mg/l

G1 - grupo chagásico; G2 - grupo não chagásico; TAT - complexo trombina-antitrombina; FVW - antígeno do fator de von Willebrand; PCR us - proteína C reativa ultrasensível; sP-Selectina - P-selectina solúvel. Todos os valores estão expressos em mediana (intervalo interquartil).

Variáveis do romboelastograma

Os resultados das variáveis do tromboelastograma estão dispostos na Tabela 3.

Conforme a Tabela 3, a determinação da amplitude máxima, do parâmetro G e da geração total de trombina foi significativamente maior no G2 em relação ao G1.

Variável pró-inflamatória

PCR ultrasensível

Os resultados das determinações do PCR ultrasensível estão dispostos na Tabela 2. A determinação do PCR mostrou-se aumentada em ambos os grupos em relação ao valor de referência. Porém, não houve diferença entre eles.

Discussão

Este é o primeiro estudo controlado a comparar o perfil pró-trombótico de portadores de CMC com IC de etiologia não chagásica. Em relação aos marcadores pró-trombóticos, encontramos semelhança na maior parte dos parâmetros estudados e indícios de maior ativação pró-trombótica entre os não chagásicos, medida pelo tromboelastograma (parâmetros G, MA e TG), bem como pelos níveis de fibrinogênio. Já na análise da atividade inflamatória, encontramos aumento dessa, medida pela PCR ultrasensível, em ambos os grupos, em consonância

com estudos previamente publicados⁸, sem que houvesse diferença significativa entre esses grupos.

Na avaliação do sistema de coagulação, dosamos os níveis plasmáticos de TAT e o fibrinogênio. A importância da dosagem do TAT reside no fato de medir indiretamente a geração de trombina, enzima central da cascata de coagulação, que converte o fibrinogênio em fibrina, promove ativação plaquetária e ativa o fator XIII da coagulação¹⁷. A antitrombina III é o inibidor primário da trombina. Em estados pró-trombóticos, espera-se elevação na determinação desse complexo. Em nossa amostra, encontramos elevação desses níveis em mais de 25% dos indivíduos de ambos os grupos, sem diferença significativa entre eles. Assim, demonstra-se tendência procoagulante entre chagásicos e não chagásicos. O fibrinogênio é uma proteína plasmática precursora da fibrina. A trombina cliva o fibrinogênio, dando origem aos monômeros de fibrina, que se agregam para formar polímeros de fibrina insolúveis. Também é uma proteína da fase aguda, cuja concentração está aumentada em resposta a muitos diferentes estímulos fisiológicos, tais como estados inflamatórios, infecção, trauma e tabagismo. Altos níveis plasmáticos de fibrinogênio têm sido associados a estados pró-trombóticos. Também têm sido correlacionados positivamente com o desenvolvimento de doença cardíaca isquêmica, AVC e mortalidade¹⁸. Na amostra estudada, a dosagem do fibrinogênio foi significativamente mais alta no G2 em relação ao G1 (p=0,0156). Isso pode ser devido ao

Tabela 3 - Resultados das variáveis do tromboelastograma

Variáveis	G1	G2	P	Valor de referência
Tempo R (min)	5,8(4,8-6,8)	6,1(4,9-7,1)	p=0,257	2-8 min
Ângulo alfa (graus)	59,4(54,1-64,08)	60,1(53,63-66,3)	p=0,4355	55-78 graus
MA (mm)	58,90(54,3-69,9)	61,80(58,1-65,25)	p=0,0013	51-69 mm
G (K)	7,2(5,92-8,47)	8,1(6,97-9,4)	p=0,0012	4,6K-10,9 K
CI	-0,5(-1,97-0,37)	-0,2(-1,85-1,0)	p=0,3450	-3 a 3
LY 30 (%)	1,450(0,4-3,57)	1,050(0,1-3,125)	p=0,2457	0-8%
MRTG (mm/min)	11,35(9,21-12,89)	11,61(8,9-13,63)	p=0,4137	5 – 17mm/min
TMRTG (min)	7,33(5,94-8,42)	7,585(6,23-8,92)	p=2631	6-12 min
TG (mm/min)	712,2(652,3-762,9)	747,6(706,3-788,3)	p=0,0005	584-796 mm/min

G1 - grupo chagásico; G2 - grupo não chagásico; Tempo R - tempo de coagulação; MA - amplitude máxima; G - parâmetro G; CI - índice de coagulação; LY 30 - lise após 30 minutos; MRTG - maximum rate of thrombus generation; TMRTG - time to maximum rate of thrombus generation; TG - total thrombus generation. Todos os valores estão expressos em mediana (intervalo interquartil).

fato de o G2 apresentar maior índice de massa corpórea ($p=0.0001$) e maior frequência de tabagismo ($p=0.0330$) em relação ao G1¹⁹.

O componente plaquetário da coagulação foi avaliado pela contagem automatizada de plaquetas e pelo nível de P-selectina solúvel no plasma. A P-selectina é um membro da família selectina de moléculas de adesão celular que estão envolvidas na adesão dos leucócitos às células endoteliais, plaquetas-leucócitos, plaquetas-vênulas e entre plaquetas. Tem sido relatado que essas moléculas de adesão podem participar da patogênese da IC via modulação da interação plaquetas-leucócitos-endotélio. É estocada nos grânulos alfa das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais. É transportada rapidamente para a superfície celular sob uma variedade de mediadores, incluindo trombina, histamina e citocinas. Não está claro se a sP-selectina é um fator causal na formação e progressão de aterosclerose ou simplesmente um marcador de ativação plaquetária e dano endotelial. Seu nível pode estar aumentado em pacientes com diabetes, doença cardíaca isquêmica, tabagismo e em insuficiência cardíaca congestiva, sugerindo uma ativação plaquetária persistente^{20,21}. Em nossa amostra, tanto a contagem de plaquetas quanto os níveis de sP-selectina não foram diferentes entre os grupos.

A lesão endotelial foi avaliada pelos níveis plasmáticos do antígeno do fator de von Willebrand (FvW), que é uma proteína plasmática presente na circulação ligada ao fator VIII por meio de uma ligação covalente. É sintetizada e armazenada nas células endoteliais, porém 15-20% são sintetizados nos megacariócitos e armazenados nas plaquetas circulantes. O FvW pode ser um marcador de lesão e disfunção endotelial, podendo estar aumentado na IC^{22,23}. Um estudo demonstrou relação direta entre os níveis de marcadores inflamatórios (IL6), de lesão endotelial (fator de von Willebrand) e pró-trombóticos (fator tecidual) com descompensação e prognóstico da IC. Os pacientes que, após tratamento da descompensação, evoluíram com redução dos níveis desses marcadores tiveram melhor sobrevida em um seguimento de seis meses⁶. Dados semelhantes entre pacientes com CMC não existem na literatura. Observamos níveis elevados dessa proteína em ambos os grupos com tendência à maior elevação no grupo chagásico, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Para entender a contribuição e a interação de plaquetas, leucócitos, eritrócitos e componentes solúveis no plasma no processo de coagulação, tem sido dada atenção especial à geração de trombina. Em uma coorte prospectiva de 914 pacientes após o primeiro evento tromboembólico venoso, a geração de trombina foi capaz de identificar os pacientes de baixo risco para recorrência desses eventos²⁴. A tromboelastografia, tecnologia que permite, *in vitro*, a simulação de processo *in vivo* da formação e dissolução do coágulo, foi primeiramente descrita por Hartert em 1948. Essa tecnologia tem sido usada extensivamente para a monitorização da hemostasia durante procedimentos cirúrgicos, no intuito de guiar as transfusões de hemoderivados. A relação entre hipercoagulabilidade através do TEG[®] e estado pró-trombótico tem sido estudada. Um estudo prospectivo observou que a amplitude máxima (MA) medida no TEG[®] pré-operatório

pode ser útil na predição de fenômenos tromboembólicos, com sensibilidade de 72% e especificidade de 69%. Outro estudo também confirma que a MA na tromboelastografia realizada no pré-operatório prediz complicações trombóticas no pós-operatório, incluindo infarto agudo do miocárdio^{15,16}.

As plaquetas contribuem com 80% da MA, enquanto o fibrinogênio participa com 20%, além de fornecer sítios de aderência para as plaquetas. O MA elevado sugere atividade plaquetária elevada, indicando maior risco trombótico ou aumento da atividade ou dos níveis de fibrinogênio. O parâmetro G, por ser uma conversão algorítmica do MA, é mais sensível a alterações na função plaquetária ou do fibrinogênio. Em nossa amostra, não encontramos diferença em relação ao número de plaquetas ou à ativação medida pela sP-selectina. Por isso, atribuímos a diferença dos parâmetros G e MA do tromboelastograma aos níveis de fibrinogênio mais elevados entre os não chagásicos do que entre os chagásicos. Por outro lado, os níveis do parâmetro TG (geração total de trombina) demonstram *status* pró-trombótico que independe do fibrinogênio, uma vez que a trombina é uma enzima de papel central na cascata de coagulação, convertendo fibrinogênio em fibrina, levando à formação do coágulo. Em nosso estudo, o TG foi estatisticamente maior no grupo G2 em relação ao G1, $p=0,0005$. Altos níveis de geração de trombina podem representar maior potencial de *status* de hipercoagulabilidade²⁵. Entretanto, como a maior parte dos valores desses parâmetros esteve dentro dos valores de normalidade em ambos os grupos, pode-se questionar a importância clínica desses achados.

Em relação aos marcadores pró-inflamatórios, estudamos a PCR ultrasensível, que é uma das principais proteínas de fase aguda. A PCR não somente está aumentada na IC, como também é preditor independente de mortalidade cardiovascular, principalmente nos pacientes de com IC de etiologia isquêmica^{26,27}. Foram demonstrados, também, aumento da atividade inflamatória e pior prognóstico na cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica⁸. Em nosso estudo, a determinação do PCR mostrou-se aumentada em ambos os grupos, porém sem diferença estatística entre eles.

Limitações

A exclusão de pacientes com anticoagulação plena poderia constituir viés de seleção. Esses pacientes poderiam apresentar maior perfil pró-trombótico, uma vez que, em sua maioria, já apresentaram fenômenos tromboembólicos ou fatores de risco conhecidos como fibrilação atrial. Entretanto, a probabilidade de alterarmos a conduta terapêutica desses pacientes é pequena, pois já estão sob anticoagulação plena. O intuito desta nova linha de pesquisa é, inicialmente, identificar subgrupos de pacientes sob maior risco desses fenômenos e, futuramente, estudar ampliação das indicações de anticoagulação em pacientes com IC.

A variável pró-inflamatória utilizada neste estudo foi o PCR ultrasensível. Apesar da consagrada utilização como variável prognóstica na IC, seu papel nas diversas etiologias da IC não está completamente validado. Além disso, outros marcadores pró-inflamatórios, como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa, serão futuramente determinados em

amostras congeladas e armazenadas desses pacientes, em estudos posteriores.

As variáveis pró-trombóticas estudadas nesta amostra foram escolhidas com o intuito de obter informações acerca de cada uma das etapas do processo de formação e lise do coágulo. Entretanto, outras variáveis que não foram contempladas no presente estudo poderiam ampliar nossa compreensão de outras vias da coagulação. Também está prevista a determinação de outros fatores pró-trombóticos para esse fim em estudos futuros.

Alguns leitores podem sentir falta de um grupo controle sadio para efeito comparativo. No entanto, uma vez que os exames utilizados neste estudo já foram validados e são amplamente utilizados em nosso meio, torna-se redundante tal grupo controle sadio, já que dispomos de valores confiáveis de referência.

Embora o cálculo para um poder de 80% seja considerado adequado, a amostra será ampliada para atingir um poder de 90%, com um total estimado de 300 pacientes.

Outra limitação deste estudo está na diferença entre os grupos. O G2 é mais idoso e mais obeso do que o G1, além de ter maior prevalência de dislipidemia, diabete, hipertensão e tabagismo. Tais diferenças tornam os dois grupos *mismatched* em variáveis fundamentais nos processos de inflamação e trombose. Dessa forma, é possível que diferenças eventualmente existentes entre os dois grupos tenham sido atenuadas pela heterogeneidade na prevalência dos fatores de

risco. Esse efeito pode ser atenuado por recursos estatísticos como análise de covariância.

Por fim, trata-se de estudo de coorte transversal. Assim, não é possível obter qualquer informação acerca da incidência de fenômenos tromboembólicos nessa amostra ou validação desses marcadores como variáveis prognósticas nesse contexto. Para isso, encontra-se em andamento, uma continuação deste estudo, sob a forma de coorte prospectiva.

Conclusão

Há aumento da atividade inflamatória medida pela PCR ultrassensível em ambos os grupos. Não há indícios de um *status* pró-trombótico maior no grupo chagásico do que entre os não chagásicos.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Leila Maria Magalhães Pessoa de Melo pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Referências

1. Ministério da Saúde. Datasus. [Acesso em 2008 jun 6]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br>
2. Chung I, Lip GY. Platelets and heart failure. *Eur Heart J*. 2006; 27 (22): 2623-31.
3. Baker DW, Wright RF. Management of heart failure. IV. Anticoagulation for patients with heart failure due to left ventricular systolic function. *JAMA*. 1994; 272 (20): 1614-8.
4. Levi M, van der Poll T, Buller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004; 109 (22): 2698-704.
5. Chin BS, Blann AD, Gibbs CR, Chung NA, Conway DG, Lip GY. Prognostic value of interleukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest*. 2003; 33 (11): 941-8.
6. Chin BS, Conway DS, Chung NA, Blann AD, Gibbs CR, Lip GY. Interleukin-6, tissue factor and von Willebrand factor in acute decompensated heart failure: relationship to treatment and prognosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003; 14 (6): 515-21.
7. Rodriguez-Reyna TS, Arrieta O, Castillo-Martinez L, Orea-Tejeda A, Guevara P, Rebolgar V, et al. Tumour Necrosis Factor alpha and Troponin T as predictors of poor prognosis in patients with stable heart failure. *Clin Invest Med*. 2005; 28 (1): 23-9.
8. Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bocchi EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2005; 7 (5): 869-73.
9. Herrera RN, Díaz E, Pérez R, Chaín S, Sant-Yacumo R, Rodríguez E, et al. The prothrombotic state in early stages of chronic chagas' disease. *Rev Esp Cardiol*. 2003; 56 (4): 377-82.
10. Mohallen SV, Ramos SG, dos Reis MA, Seabra DD, Teixeira Vde P. Prevalence of renal infarcts in autopsies of chronic Chagas disease patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29 (6):571-4.
11. Ramos SG, Matturri L, Rossi L, Rossi MA. Sudden cardiac death in the indeterminate phase of Chagas' disease associated with acute infarction of the right carotid body. *Int J Cardiol*. 1995; 52 (3): 265-8.
12. De Moraes CF, Higuchi ML, Lage S. Chagas' heart disease and myocardial infarct. Incidence and report of four necropsy cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1989; 83 (3): 207-14.
13. Arteaga-Fernández E, Barretto AC, Ianni BM, Mady C, Lopes EA, Vianna Cde B, et al. Cardiac thrombosis and embolism in patients having died of chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol*. 1989; 52 (4):189-92.
14. Samuel J, Oliveira M, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am J Cardiol*. 1983; 52 (1): 147-51.
15. Luddington RJ. Thromboelastography / thromboelastometry. *Clin Lab Haematol*. 2005; 27 (2): 81-90.
16. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. *Anesth Analg*. 2005; 100 (6): 1576-83.
17. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci*. 2008; 38 (1): 15-23.
18. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, et al.

- Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005; 294 (14): 1799-809.
19. James S, Vorster HH, Venter CS, Kruger HS, Nell TA, Veldman FJ, et al. Nutritional status influences plasma fibrinogen concentration: evidence from the THUSA survey. *Thromb Res*. 2000; 98 (5): 383-94.
20. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (8): 1718-23.
21. O'Connor CM, Gurbel PA, Serebruany VL. Usefulness of soluble and surface-bound P-Selectin in detecting heightened platelet activity in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1999; 83 (9): 1345-9.
22. Chong AY, Freestone B, Patel J, Lim HS, Hughes E, Blann AD, et al. Endothelial activation, dysfunction, and damage in congestive heart failure and the relation to brain natriuretic peptide and outcomes. *Am J Cardiol*. 2006; 97 (5): 671-5.
23. Lip GY, Pearce LA, Chin BS, Conway DS, Hart RG. Effects of congestive heart failure on plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin concentrations in patients with non-valvar atrial fibrillation. *Heart*. 2005; 91 (6): 759-63.
24. Hron C, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006; 296 (4): 397-402.
25. Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol*. 2008; 142 (6): 889-903.
26. Shah SJ, Marcus GM, Gerber IL, McKeown BH, Vessey JC, Jordan MV, et al. High-sensitivity C-reactive protein and parameters of left ventricular dysfunction *J Card Fail*. 2006; 12 (1): 61-5.
27. Lamblin N, Mouquet F, Hennache B, Dagorn J, Susen S, Bauters C, et al. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *Eur Heart J*. 2005; 26 (21): 2245-50.