

## Avaliação Laboratorial da Hemostasia

Dayse Maria Lourenço

### INTRODUÇÃO

O objetivo da avaliação laboratorial da coagulação sanguínea é identificar as causas e definir a intensidade do defeito da hemostasia responsável tanto por doenças hemorrágicas como trombóticas, além de ser útil na monitorização de terapêutica antitrombótica. Ela é realizada *in vitro*, o que a torna distante do processo fisiológico, mas útil do ponto de vista prático. A exatidão do diagnóstico depende da qualidade do laboratório que realiza os exames e é recomendável que seja um laboratório especializado em hemostasia, onde existam pessoal e rotina voltados para o diagnóstico de monitorização de doenças hemorrágicas ou trombóticas. A evolução tecnológica vem proporcionando o desenvolvimento de novas metodologias e, principalmente, assegurando melhor qualidade dos testes, com aparelhos automatizados que eliminam muitos erros devidos à manipulação da amostra ou mesmo interpretação do resultado. É importante que se oriente o diagnóstico, evitando-se solicitar “coagulograma completo”, mas escolhendo sim os testes para avaliar com precisão o tipo de doença hemorrágica ou trombótica que o paciente apresenta. As técnicas que podem ser divididas de acordo com o processo que avaliam: a hemostasia primária, a coagulação propriamente dita, os sistemas reguladores da coagulação e a fibrinólise.

Os testes usados na avaliação da hemostasia podem ser classificados em funcionais ou imunológicos. Os **funcionais** levam em conta a atividade da proteína a ser testada, enquanto os **imunológicos** detectam sua presença com base em anticorpos específicos, independentemente de sua função. Entre os métodos funcionais citam-se os métodos coagulométricos e os métodos amidolíticos que usam substratos cromogênicos. Os métodos imunológicos são a imunoeletroforese e o Imuno-Enzima-Ensaio (ELISA).

### HEMOSTASIA PRIMÁRIA

A **hemostasia primária** envolve a interação das plaquetas com componentes do endotélio vascular e com

proteínas plasmáticas como o fator de von Willebrand. Os testes relacionados à hemostasia primária são: tempo de sangramento, contagem de plaquetas e avaliação da função plaquetária (Tabela 60.1).

A **contagem de plaquetas** é geralmente feita em sangue total anticoagulado com EDTA, usando-se contadores automáticos de células. Esses aparelhos são capazes ainda de avaliar a distribuição do volume plaquetário, observando a presença de plaquetas grandes, regenerativas. A enumeração das plaquetas pode ser feita também em lâmina, pelo método de Fonio, cuja precisão é menor, mas permite a análise da morfologia plaquetária. A observação da lâmina também permite descartar a falsa trombocitopenia, uma aglutinação plaquetária que ocorre *in vitro* e que é induzida pela presença do EDTA, com a participação de proteínas plasmáticas.<sup>1,2</sup>

O **tempo de sangramento** é a medida da função plaquetária *in vivo*. Consiste na realização de uma perfuração com cerca de 1 mm de profundidade, de modo a lesar apenas pequenos vasos, onde atuam os processos envolvidos na hemostasia primária. O **tempo de sangramento de Duke** é realizado preferencialmente no lóbulo da orelha, pois a polpa digital é mais sujeita a variações determinadas pelo tônus vascular. É um teste pouco sensível, sendo prolongado em alterações importantes da função plaquetária ou em trombocitopenias graves. Para melhorar a sensibilidade do tempo de sangramento, desenvolveu-se a **técnica de Ivy**, que é feita no antebraço, com o manguito de esfigmomanômetro insuflado a 40 mm de mercúrio, realizando um corte padronizado com lâmina especial. O objetivo é tornar o método mais sensível e útil nos estudos de alteração da função plaquetária como trombopatias e doença de von Willebrand.<sup>3</sup>

O tempo de sangramento estará prolongado em casos de trombocitopenia. Habitualmente esse prolongamento é proporcional à redução do número de plaquetas. Entretanto, em pacientes com trombocitopenia autoimune, o tempo de sangramento é desproporcionalmente curto, refletindo

Tabela 60.1

► Testes que avaliam a hemostasia primária e a coagulação.

Teste	O que avalia
<b>Hemostasia primária</b>	
Tempo de sangramento	Avaliação global da hemostasia primária
Contagem de plaquetas	Número de plaquetas e volume plaquetário
Testes automatizados	Avaliação global da hemostasia primária Resposta a antiagregantes plaquetários
Agregação plaquetária	Resposta plaquetária a agentes agonistas
Citometria de fluxo	Trombopatias congênitas Agregação plaquetária
Fator de von Willebrand	Diagnóstico da doença de von Willebrand
<b>Coagulação – Métodos coagulométricos</b>	
Tempo de Protrombina (TP)	Fatores VII, X, II e Fibrinogênio
Tempo da Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)	Fatores XII, XI, IX, VIII, X, II e Fibrinogênio Calicreína e cininogênio de alto peso molecular
Tempo de Trombina (TT)	Fibrinogênio e polimerização da fibrina
Dosagem de fibrinogênio	Fibrinogênio
Dosagem de fatores	Atividade plasmática de fatores específicos
Pesquisa de anticoagulante circulante	Distingue deficiência de fator da presença de inibidor
Fragmento 1+2 da protrombina Fibrinopeptídeo A	Detecta ativação da coagulação
<b>Testes globais da coagulação</b>	
Tromboelastografia Tromboelastometria	Avaliação global da coagulação e da fibrinólise
Teste da geração da trombina	Avalia capacidade de gerar trombina

a função exacerbada das plaquetas jovens em circulação. O tempo de sangramento é um teste usado no *screening* pré-operatório em muitos centros. É importante lembrar que a sensibilidade da técnica de Duke é baixa, podendo deixar de detectar alterações da hemostasia primária capazes de provocar sangramento intraoperatório. Em caso de pacientes com história de sangramento anormal, é imperativo a realização do tempo de sangramento de Ivy, caso o de Duke seja normal.<sup>4</sup>

Atualmente estão disponíveis equipamentos capazes de reproduzir as condições avaliadas pelo tempo de sangramento, com maior reprodutibilidade e sensibilidade, substituindo-o com vantagem. Eles utilizam pequeno volume de sangue total citratado, o que facilita a automação. Esses analisadores de função plaquetária estão disponíveis em um número ainda pequeno de laboratórios.<sup>5,6</sup>

O estudo da **agregação plaquetária** é útil na avaliação da função das plaquetas, através da exploração de diferen-

tes vias de ativação plaquetária *in vitro*. O método é baseado na medida da formação de agregados de plaquetas após sua exposição a um agente agregante. Essa medida é realizada em um agregômetro, que é um aparelho espectrofotométrico capaz de medir a variação da transmissão de luz através de uma suspensão de plaquetas, quando estas se agregam na presença de agonistas. Há vários agonistas usados na prática: o colágeno, o ADP, a adrenalina, o ácido araquidônico e a trombina. O resultado do teste é habitualmente expresso em porcentagem de agregação, que traduz a quantidade de transmissão de luz e, portanto, da formação de agregados. A ristocetina não é agente agregante plaquetário, pois produz apenas aglutinação das plaquetas na presença de fator de von Willebrand e da glicoproteína Ib da membrana plaquetária, sendo útil na investigação da doença de von Willebrand e na púrpura de Bernard-Soulier. A utilidade do teste de agregação plaquetária é identificar o local do defeito da hemostasia primária, já detectado através de história clínica

e prolongamento do tempo de sangramento. Embora muito pesquisado, o papel da hiperagregação plaquetária no diagnóstico de doenças trombóticas é precário.<sup>7</sup>

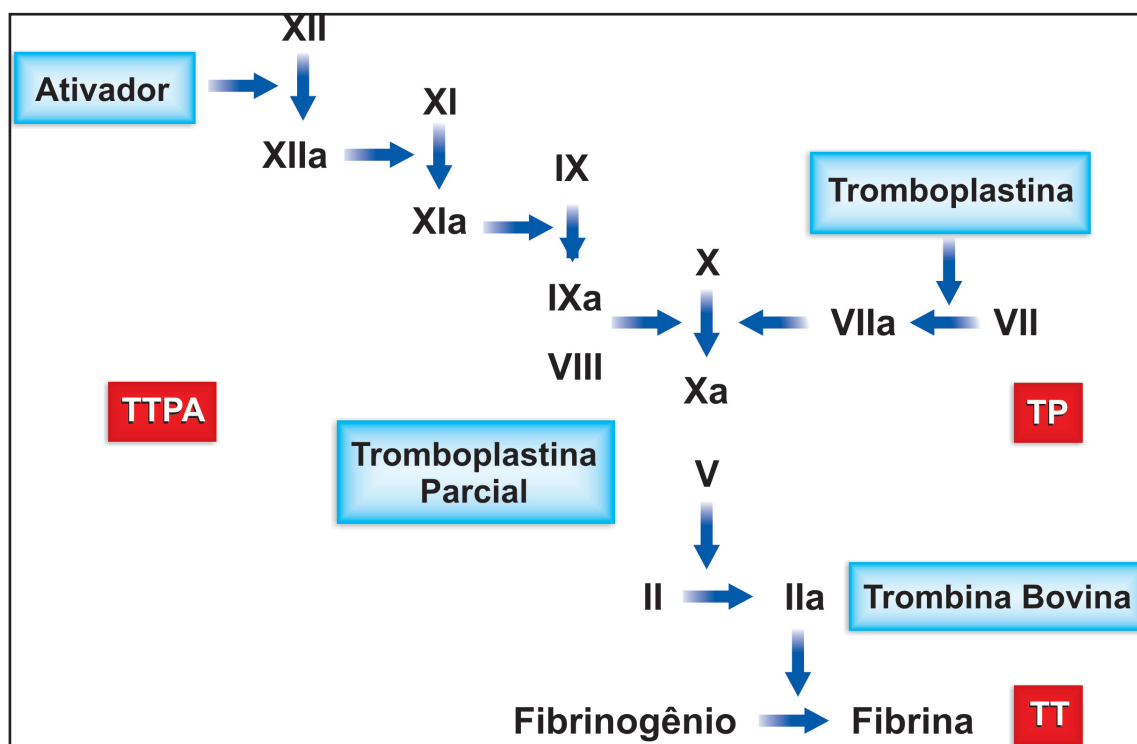
O aparecimento da **citometria de fluxo** permitiu aprofundar o estudo das plaquetas, usando-se anticorpos contra glicoproteínas que são expostas apenas na plaqueta ativada, como a P-selectina, além de permitir o diagnóstico das trombopatias por deficiência de determinadas glicoproteínas da membrana plaquetária, como a IIb/IIIa na púrpura de Glanzmann e o complexo IbIX na púrpura de Bernard-Soulier. A citometria de fluxo permite ainda a numeração de plaquetas recém-lançadas na circulação, as plaquetas reticuladas, usando corante específico, o que possibilita estimar o ritmo de produção das plaquetas.<sup>8</sup>

## COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Para o estudo dos componentes plasmáticos, utiliza-se o plasma livre de hemácias, glóbulos brancos e plaquetas, ou o chamado plasma pobre em plaquetas, obtido a partir do sangue total colhido na presença de um anticoagulante. A coleta de sangue para o estudo da coagulação deve ser a menos traumática possível, com o mínimo de estase venosa, pois a própria punção venosa leva à exposição de fator tecidual, capaz de ativar a coagulação. O anticoagulante é o citrato de sódio e a proporção entre o volume de anticoagulante e o volume de sangue total é padronizada, pois os testes coagulométricos são baseados no tempo que o plasma leva para coagular, a partir do momento em que se adiciona o cloreto de cálcio, o qual vai repor esse íon que é quelado pelo anti-

coagulante. **A proporção padronizada entre o sangue e o anticoagulante é de 9:1, ou seja, 4,5 mL de sangue total para 0,5 mL de citrato.** Essa proporção é válida para indivíduos com hematócrito normal, isto é, por volta de 45%. Se o paciente tiver hematócrito de 60%, por exemplo, o volume de citrato deve ser proporcionalmente reduzido, para que se mantenha a mesma proporção de anticoagulante. O sangue citratado é centrifugado para obtenção do plasma pobre em plaquetas, a 3000 rpm durante 15 minutos. A demora no processamento da amostra de sangue total ou na realização dos testes com o plasma é sempre prejudicial à boa qualidade do exame, especialmente naqueles pacientes que estejam recebendo heparina, pois a ativação *in vitro* das plaquetas leva à liberação do fator 4 plaquetário, que tem ação anti-heparina e que pode falsear os resultados dos testes, levando a erros no controle do tratamento.

Ainda que, fisiologicamente, a ativação da coagulação não se dê pelas vias intrínseca ou extrínseca, essa designação ainda é útil na avaliação laboratorial da hemostasia, pois os testes coagulométricos são sensíveis a determinados fatores apenas, o que os torna úteis na detecção das doenças hemorrágicas e na monitorização de tratamento antitrombótico.<sup>9</sup> Os **métodos coagulométricos** baseiam-se na formação do coágulo de fibrina, que pode ser visualizado no tubo, nas técnicas manuais, ou detectado fotometricamente, através dos aparelhos denominados coagulômetros. Os métodos coagulométricos são: Tempo de Protrombina (TP), tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA), Tempo de Trombina (TT), pesquisa de anticoagulante circulante, dosagem de fibrinogênio e dosagem de fatores (Figura 60.1).



**Figura 60.1** Fatores da coagulação avaliados pelo Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) e pelo Tempo de Trombina (TT).

O **tempo de protrombina**, ou TP, consiste na determinação do tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição de tromboplastina tecidual (fator III) e de cálcio, o que promove a ativação do fator VII, seguida da ativação do fator X, iniciando a via comum da coagulação. Dessa forma, o TP mede os fatores envolvidos na via extrínseca e na via comum, sendo independente da via intrínseca. O TP depende do nível dos fatores vitamina K dependentes (II, VII e X), sendo o teste usado no controle de pacientes em uso de anticoagulantes orais. O TP pode ser expresso pela Relação (R) do tempo obtido com o plasma do doente e o tempo de um *pool* de plasmas de indivíduos normais. O TP pode ainda ser expresso em Atividade de Protrombina (AP). Em pacientes recebendo drogas antivitaminas K, o nível de anticoagulação é medido de forma diversa por diferentes reagentes e precisou-se padronizar os resultados, de modo a se estabelecer uma zona terapêutica comum e utilizável por todo o mundo. Essa padronização é feita por meio da determinação do **Índice de Sensibilidade Internacional** de cada tromboplastina, chamado ISI, com o qual pode-se calcular o chamado RNI (que significa **Razão Normalizada Internacional**) e corresponde à relação do TP do doente com o TP do normal, caso se houvesse utilizado a tromboplastina de referência. Assim, qualquer que seja a sensibilidade do reagente utilizado, o nível de anticoagulação, avaliado pelo RNI, é sempre o mesmo.<sup>10</sup>

O **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado** (TTPA) consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma após adição de um ativador da fase de contato da coagulação e de cefalina, que substitui o fosfolípido da membrana plaquetária. O TTPA é sensível ao nível dos fatores da via intrínseca e da via comum. Ele é bastante sensível à presença de heparina, sendo o teste de escolha para a sua monitorização. O resultado deve ser expresso pela relação entre o tempo obtido para o doente e o tempo do normal do dia. Os valores em segundos variam com o ativador e a cefalina utilizados, de modo que a expressão dos resultados em segundos não é recomendada.<sup>11</sup>

O **tempo de trombina** é obtido após adição de trombina em baixa concentração ao plasma puro, de maneira que o tempo de coagulação é influenciado pela concentração de fibrinogênio e pela presença de inibidores da formação de fibrina, tais como a heparina.

Na presença de um teste de coagulação prolongado, deve-se repetir o teste em questão (TP, TTPA ou TT) usando-se **mistura** em partes iguais do plasma do doente com o plasma normal. O prolongamento do tempo de coagulação causado pela presença do inibidor não é corrigido pela adição de plasma normal, o que o diferencia da deficiência de fator, quando o tempo é corrigido pela adição de plasma normal. No caso de deficiência de fator, o tempo de coagulação da mistura deve ser totalmente corrigido, caindo para um valor dentro da faixa normal para o teste. Na presença de um inibidor ou anticoagulante circulante, o tempo de coagulação da mistura permanecerá prolongado, além da

faixa considerada normal no laboratório. Alguns inibidores, como o inibidor do fator VIII, que ocorre em hemofílicos, têm ação lenta e progressiva e, nesses casos, pode ocorrer a correção imediata do TTPA a despeito da presença do inibidor. Por esse motivo é importante a realização do TTPA da mistura também após a incubação dessa mistura por 2 horas a 37 C, o que permitirá que a ação inibidora seja evidenciada.<sup>12,13</sup>

O **anticoagulante lúpico** é um anticorpo dirigido contra proteínas que se ligam a fosfolípidos e interfere com o reagente utilizado nos testes *in vitro*, como a cefalina, prolongando o TTPA, embora não haja inibição da coagulação *in vivo*. Existem algumas técnicas que visam aumentar a sensibilidade do teste para a pesquisa de anticoagulante lúpico, usando-se fosfolípidos especialmente desenhados para melhorar o reconhecimento pelo anticorpo. Assim, alguns reagentes para TTPA são mais sensíveis à sua presença. O TTPA com o veneno da víbora Russel diluído contém um ativador de fator X, sendo bastante sensível à presença de anticoagulante lúpico, mas não detecta inibidores de fatores VIII e IX.<sup>14,15</sup>

O **fibrinogênio** pode ser medido por teste baseado no tempo de coagulação do plasma por alta concentração de trombina, ou método de Clauss, e por avaliação da densidade óptica do coágulo. Os valores da medida pelo método coagulométrico são em geral menores que aqueles obtidos pela avaliação da densidade óptica, mas ambos os métodos correlacionam-se bem.<sup>16</sup>

A **dosagem de fatores** pode ser feita individualmente, utilizando-se um plasma deficiente apenas no fator que se quer determinar. Esse plasma tem um tempo de coagulação (TP ou TTPA) bastante prolongado por causa da ausência de um único fator, mas ele contém níveis normais dos demais fatores, de modo que a adição de um plasma normal vai encurtar o tempo proporcionalmente à concentração do fator presente no plasma normal. O plasma deficiente no fator em questão pode ser obtido de indivíduo congenitamente deficiente ou artificialmente, pela imunoabsorção. Os plasmas deficientes disponíveis no mercado, em sua maioria, são obtidos pela depleção artificial do fator a ser dosado.<sup>13</sup>

A identificação do estado de ativação *in vivo* da coagulação permite identificar indivíduos expostos a maior risco de trombose e melhor aplicar medidas profiláticas. Desse modo, foi necessário desenvolver métodos altamente específicos e sensíveis para detecção de peptídeos que são liberados durante o processo de ativação dos zimogênios. Assim foram desenvolvidos métodos imunológicos para a quantificação de: fragmento 1+2 da protrombina ( $F_{1+2}$ ), resultante da ação do fator Xa sobre a molécula de protrombina; fibrinopeptídeo A, resultante da ação da trombina sobre a molécula do fibrinogênio. Em condições como coagulação intravascular disseminada e trombose, grandes quantidades desses “marcadores” são formadas e seus níveis estão substancialmente elevados.<sup>17,18</sup>

## SISTEMAS REGULADORES DA COAGULAÇÃO

A dosagem das proteínas envolvidas nos sistemas de inibidores que regulam a ativação da coagulação, a saber, antitrombina, proteína C e proteína S, é útil na avaliação de pacientes com quadro de trombose venosa para identificação de trombofilia (Tabela 60.2). O nível dessas proteínas também está reduzido por consumo em outras condições, como a coagulação intravascular.<sup>19</sup>

A **determinação de antitrombina** no plasma pode ser feita por método funcional, usando substrato cromogênico, ou por método imunológico, geralmente por nefelometria. O método funcional deve ser preferido na investigação de trombofilia, pois o método imunológico não detecta deficiência funcional da proteína. O nível de antitrombina está reduzido em pacientes em uso de heparina, de modo que o diagnóstico de deficiência congênita não pode ser firmado nessa situação.<sup>19,20</sup>

A **dosagem de proteína C** pode ser feita por método imunológico ou por métodos funcionais, que se baseiam na ativação da proteína C pelo veneno de víbora *Agkistrodon contortrix*. A ação da proteína C ativada é medida sobre um substrato cromogênico específico ou sobre a coagulação do plasma, uma vez que ela prolonga o TTPA por inativar os fatores Va e VIIIa.<sup>20</sup>

A **proteína S** circula no plasma livre ou formando um complexo com a proteína carregadora da fração C4 do sistema complemento (C4bp), e é a forma livre que funciona como cofator da proteína C ativada. Os primeiros ensaios imunológicos usavam anticorpos que reconheciam ambas as frações da proteína S e era necessário precipitar a proteína ligada à C4bp com polietilenoglicol antes de se determinar a proteína S livre. Atualmente está disponível

um enzimo-imuno-ensaio que emprega um anticorpo monoclonal que só reconhece a proteína S livre, sendo este o método de escolha para identificação da deficiência de proteína S. Há também métodos funcionais, em que a atividade de cofator da proteína S presente na amostra de plasma é testada na presença de proteína C ativada e fator V bovino purificados, em um sistema de coagulação. Entretanto, sua reprodutibilidade é muito baixa.<sup>21,22</sup>

A resistência à proteína C ativada é causada pela presença de uma molécula anormal do fator V, com a substituição da arginina pela glutamina na posição 506, que está associada a trombose. A sua medida é feita adicionando-se proteína C purificada ao plasma, o que provoca prolongamento do TTPA em indivíduos normais, mas não naqueles com a alteração. A quase totalidade de pacientes com resistência à proteína C ativada apresenta a mutação do fator V. Não há relação entre essa mutação e a atividade coagulante do fator V.<sup>19,20</sup>

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Há vários métodos para estudo da atividade fibrinolítica, tais como técnicas globais da atividade basal e do potencial fibrinolítico após estímulo adequado, dosagem funcional e imunológica das moléculas livres e em complexo (Tabela 60.3). A **atividade fibrinolítica plasmática** global pode ser medida por meio do tempo de lise do coágulo de sangue total ou da Fração Euglobulina (TLE). A euglobulina é obtida após precipitação de algumas proteínas plasmáticas em meio ácido, entre elas o plasminogênio, o fibrinogênio e o ativador tecidual do Plasminogênio (t-PA), que ficam relativamente livres dos inibidores, o inibidor do ativador tecidual do Plasminogênio (PAI-1) e a  $\alpha$ 2-antiplasmina. A atividade da fração euglobulina pode ser medida através da determinação do tempo de lise após sua coagulação pela trombina.

Tabela 60.2

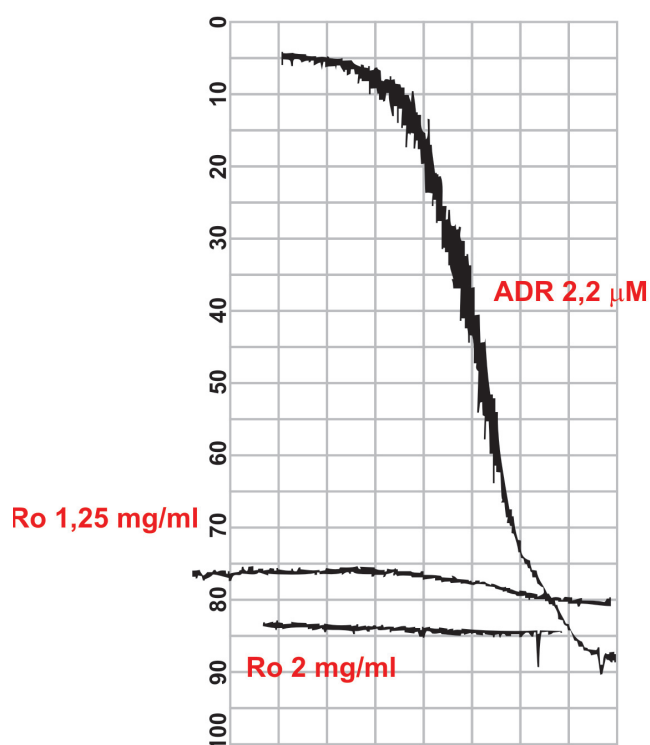
► Testes que avaliam os sistemas reguladores da coagulação.

Sistemas reguladores da coagulação		
Teste	Princípio	O que avalia
Antitrombina	Imunológico-nefelometria	Quantificação da proteína
	Amidolítico (cromogênico)	Atividade plasmática da antitrombina
Proteína C	Amidolítico (cromogênico) Coagulométrico	Atividade plasmática da proteína C
	Imunológico (ELISA)	Quantificação da proteína
Proteína S	Imunológico (ELISA)	Quantificação da proteína Proteína S total e livre
	Coagulométrico	Atividade plasmática da proteína S
Resistência à proteína C ativada	Coagulométrico	Efeito da proteína C no fator V

**Tabela 60.3**

► Testes que avaliam o sistema fibrinolítico.

Teste	Princípio	O que avalia
Tempo de lise da euglobulina	Imunológico-nefelometria	Avaliação global da fibrinólise
Plasminogênio	Amidolítico (cromogênico)	Atividade plasmática do plasminogênio
Ativador tecidual do plasminogênio: t-PA	Amidolítico (cromogênico)	Atividade plasmática do t-PA
Resistência à proteína C ativada	Coagulométrico	Efeito da proteína C no fator V
Inibidor do ativador tecidual do plasminogênio: PAI-1	Imunológico ELISA	Quantificação da proteína
2-antiplasmina	Amidolítico (cromogênico)	Atividade plasmática da 2-antiplasmina
Produtos de degradação da fibrina D-dímero	Imunológico ELISA	Quantificação da proteína



**Figura 60.2** Curva de agregação plaquetária, obtida com plasma rico em plaqueta exposto a adrenalina 2,2  $\mu$ M e a duas concentrações de ristocetina (1,25 e 2 mg/mL). Observar que o paciente apresenta agregação normal com adrenalina e não apresenta agregação com ristocetina em ambas as concentrações, sugerindo o diagnóstico de doença de von Willebrand.

A determinação do **potencial fibrinolítico** consiste em se avaliar a capacidade de resposta do indivíduo em liberar ativadores do plasminogênio, diante de estímulos como exercício físico, oclusão venosa e administração de drogas como o DDAVP. Todos esses estímulos atuam de maneira

similar, isto é, promovendo a liberação de t-PA e o PAI-1 armazenados nas células endoteliais.

Podem-se dosar os componentes isolados do sistema fibrinolítico como o plasminogênio, o t-PA, o PAI-1 e a  $\alpha$ 2-antiplasmina por métodos funcionais, usando-se substratos cromogênicos específicos, ou por métodos imunológicos, que não estimam sua função.<sup>23</sup>

A medida da concentração de **produtos de degradação de fibrina** é um ótimo marcador de atividade fibrinolítica, sendo útil em situações clínicas como a coagulação intravascular disseminada e trombose venosa. Os métodos são imunológicos e usam anticorpos com diferentes especificidades, de modo que podem detectar diferentes fragmentos de fibrina ou de fibrinogênio degradados pela plasmina. O D-dímero é o único que deriva exclusivamente da fibrina e não do fibrinogênio, sendo então específico para mostrar a atividade fibrinolítica secundária à formação de fibrina, que ocorre em situações como a trombose e a coagulação intravascular disseminada. Nos pacientes com tratamento trombolítico, a quantidade de D-dímero é muito pequena, predominando os produtos de degradação do fibrinogênio. Há vários métodos disponíveis para dosagem de PDF, alguns quantitativos, os melhores, e outros semiquantitativos ou qualitativos.<sup>24,25</sup>

## TESTES GLOBAIS DA COAGULAÇÃO

Os testes que permitem avaliar a coagulação de sangue total e que mostram uma visão global do processo da coagulação são muito úteis em ambientes clínicos ou cirúrgicos onde se fazem necessárias presteza e precisão de resultados para conduta imediata, como nas salas de emergência e centro cirúrgico.<sup>26</sup>

A tromboelastografia, mais antiga, e a tromboelastometria, que representa modificações na técnica inicial, alcançam esses objetivos.<sup>27</sup>

O princípio do método é o monitoramento da tensão da rede de fibrina que se forma em sangue total à medida que a coagulação se processa, o que é expresso em gráficos cuja forma depende do desempenho dos componentes da coagulação.<sup>28</sup>

## TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA

O potencial de plasma em gerar pequenas quantidades de trombina pode ser medido apenas por métodos muito

sensíveis, como a emissão de luz após quebra de substratos fluorogênicos. Essa técnica utiliza então fluorímetros especialmente adaptados que medem o pico de geração de trombina em amostra de plasma, o que pode ser útil na detecção de estados de hipercoagulabilidade ou na medida do efeito de agentes anticoagulantes. Entretanto, ainda não é teste adaptado à rotina e estudos são necessários para embasar seu uso clínico.<sup>29,30</sup>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hem.* 2007; 29:77-91.
2. Berkman N, Michaeli Y, Or R, Eldor A. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am J Hematol.* 1991;36(3):195-201.
3. Rodgers RP, Levin J. Bleeding time revisited. *Blood.* 1992;79(9):2495-7.
4. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost.* 1990;16(1):1-20.
5. Perry DJ, Fitzmaurice DA, Kitchen S, Mackie IJ, Mallett S. Point-of-care testing in haemostasis. *Br J Haematol.* 2010; 150(5):501-14.
6. Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Cattaneo M. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(12):2393-8.
7. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews.* 2005;19:111-123.
8. Shah U, Ma AD. Tests of platelet function. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(5):432-7.
9. Rapaport SI, Rao LVM. The tissue factor pathway: how it has become a "Prima Ballerina". *Thrombos Haemost.* 1995; 74(1):7-17.
10. Lourenço DM, Alves EC. Controle laboratorial da anticoagulação oral. *Rev da Assoc Méd Brasil.* 1994;41(2):103-8.
11. Dembitzer FR, Suarez Y, Aledort LM, Peerschke EI. Screening coagulation testing using the APTT: which reagent to choose? *Am J Hematol.* 2010;85(9):726.
12. Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(7):864-73.
13. Lillicrap D, Nair SC, Srivastava A, Rodeghiero F, Pabinger I, Federici AB. Laboratory issues in bleeding disorders. *Haemophilia.* 2006;12 Suppl 3:68-75.
14. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Palmucci C, Bison E, Banzato A, et al. Standardization of lupus anticoagulant. Feasibility study of a calibration model to minimize between-method variability. *Thromb Res.* 2011 Feb 26.
15. Luginbühl R, Barizzi G, Sulzer I, Lämmle B, Alberio L. Screening for lupus anticoagulant: improving the performance of the lupus-sensitive PTT-LA. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(2):168-75.
16. Nieuwenhuisen W. Biochemistry and measurement of fibrinogen. *Eur Heart J.* 1995;16(suppl A):6-10.
17. Mannucci PM, Tripodi A. Mechanisms, markers and management of hypercoagulable states. *Haemostasis.* 1996;26(suppl 4):1-8.
18. Khor B, Van Cott EM. Laboratory evaluation of hypercoagulability. *Clin Lab Med.* 2009;29(2):339-66.
19. Baglin T, Gray E, Greaves M, Hunt BJ, Keeling D, Machin S, et al. British Committee for Standards in Haematology. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol.* 2010;149(2):209-20.
20. Cunningham MT, Olson JD, Chandler WL, Van Cott EM, Eby CS, Teruya J, et al. External quality assurance of anti-thrombin, protein C, and protein S assays: results of the College of American Pathologists proficiency testing program in thrombophilia. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(2):227-32.
21. Goodwin A, Rosendaal F, Kottke-Marchant K, Bovill E. A review of the technical, diagnostic and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:1349-66.
22. ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia.* 2008;14(6):1222-8.
23. Takada A, Takada Y, Urano T. The physiological aspects of fibrinolysis. *Thrombos Res.* 1994;76(1):1-31.

24. Kabrhel C, Mark Courtney D, Camargo CA Jr, Plewa MC, Nordenholz KE, Moore CL, et al. Factors associated with positive D-dimer results in patients evaluated for pulmonary embolism. *Acad Emerg Med.* 2010;17(6):589-97.
25. Thachil J, Fitzmaurice DA, Toh CH. Appropriate use of D-dimer in hospital patients. *Am J Med.* 2010;123(1):17-9.
26. Chen A, Teruya J. Global hemostasis testing thromboelastography: old technology, new applications. *Clin Lab Med.* 2009;29(2):391-407.
27. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haem.* 2005;27:81-90.
28. Rugeri L, Levrat A, David JS, Delecroix E, Floccard B, Gros A, et al. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. *J Thromb Haemost.* 2007;5:289-95.
29. Wolberg AS. Thrombin generation assays: understanding how the method influences the results. *Thromb Res.* 2007;119:663-665.
30. Favaloro EJ, Lippi G. Coagulation update: what's new in hemostasis testing? *Thromb Res.* 2011;127Suppl 2:S13-6.