

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação
da fibrina/fibrinogênio (PDF) e troponina cardíaca T na
investigação dos distúrbios tromboembólicos**

RAFAEL NOAL MORESCO

Tese de Doutorado

2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação
da fibrina/fibrinogênio (PDF) e troponina cardíaca T na
investigação dos distúrbios tromboembólicos**

RAFAEL NOAL MORESCO

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Tese de Doutorado

2005

M843a Moresco, Rafael Noal

Associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) e troponina cardíaca T na investigação dos distúrbios tromboembólicos / Rafael Noal Moresco ; orient. Lúcia Mariano da Rocha Silla. – 2005.
92 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Transtornos hemostáticos vasculares 2. Hemostasia 3. Tromboembolismo 4. Troponina T 5. Produtos de degradação da fibrina e do fibrinogênio 6. Dímeros de pirimidina 7. Técnicas e procedimentos de laboratório I. Silla, Lúcia Mariano da Rocha II. Título.

NLM: WH 310

“Há três coisas que jamais voltam atrás:

a flecha lançada,

a palavra pronunciada

e a oportunidade perdida.”

Provérbio chinês

À minha amada mãe Regiani, pelo exemplo de amor, dignidade, respeito, superação, humildade, bondade e tudo mais do que há de verdadeiramente valioso na vida.

Ao Marcos, pelo carinho paterno demonstrado nos últimos 22 anos.

Às minhas irmãs Raquel, Fernanda e Thuany, pelos momentos de alegria.

Aos meus avós Catarina (*in memorian*) e Felisberto (*in memorian*), pelo apoio, carinho e amor dedicados ao longo de suas vidas.

À minha noiva Patrícia, pelo carinho, amor, companheirismo e cumplicidade compartilhados ao longo dos últimos oito anos de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla, minha orientadora, pela confiança, amizade, carinho, dedicação e exemplo profissional, além dos conselhos que certamente contribuíram e permanecerão contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, na pessoa da Profa. Dra. Sandra Costa Fuchs, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

Aos meus eternos amigos Roberto Christ Vianna Santos e Patrick Gasparetto, pela amizade e cumplicidade compartilhadas ao longo dos melhores e também piores momentos da vida.

Aos amigos Luís Cláudio Rosa Vargas e Luciano da Silva Xavier, pelo incentivo, estímulo e sabedoria demonstrados ao longo da realização deste estudo.

À minha amiga Neusa do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do HCPA, pelo apoio e pela constante atualização gastronômica sempre buscando a melhor receita.

A todos os amigos e colegas do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do HCPA, especialmente à: Sandrine, Cida, Elvira, Ronald, Felipe, Cláudio,...

À Letícia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, pela dedicação, competência e carinho com que desempenha as suas atividades.

À Profa. Dra. Nádia Fátima dos Santos Bucco, Pró-Reitora de Graduação da Universidade de Cruz Alta, pela confiança e apoio.

Ao Dr. Carlos Franco Voegeli, chefe do Laboratório Central de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo apoio.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão de mais esta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	13
Considerações gerais sobre a hemostasia	13
D-dímero	16
Produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF)	20
Troponinas cardíacas	21
Coagulação e o desenvolvimento de lesões cardíacas	22
OBJETIVOS	26
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO CIENTÍFICO 1 (INGLÊS)	33
ARTIGO CIENTÍFICO 2 (INGLÊS)	36
ARTIGO CIENTÍFICO 3 (INGLÊS)	48
ARTIGO CIENTÍFICO 1 (PORTUGUÊS)	58
ARTIGO CIENTÍFICO 2 (PORTUGUÊS)	69
ARTIGO CIENTÍFICO 3 (PORTUGUÊS)	81
CONCLUSÕES	92

LISTA DE ABREVIATURAS

PDF: Produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio

cTnT: Troponina cardíaca T

cTnI: Troponina cardíaca I

TVP: Trombose venosa profunda

EP: Embolia pulmonar

CIVD: Coagulação intravascular disseminada

ELISA: Enzimaimunoensaio

VPN: Valor preditivo negativo

IAM: Infarto agudo do miocárdio

tPA: Ativador tecidual do plasminogênio

PAI-I: Inibidor do ativador do plasminogênio-I

PDFt: Tempo de reação necessário para a detecção de PDF

CK: Creatina quinase

CK-MB: Creatina quinase fração MB

LDH: Lactato desidrogenase

AST: Aspartato aminotransferase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A cascata da coagulação 15

ARTIGO 1

FIGURA 1. Relações entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF observadas nos grupos de pacientes 35 e 68

ARTIGO 2

FIGURA 1. Associação entre os níveis de D-dímero e o tempo necessário para a detecção de PDF >20 µg/mL ($P<0,001$) 47 e 80

ARTIGO 3

FIGURA 1. Associação entre os níveis de cTnT e D-dímero em pacientes com cTnT>0,01 ng/mL 57 e 91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Metodologias disponíveis para a mensuração do D-dímero	18
TABELA 2. Características das diferentes técnicas para a detecção de D-dímero ...	18
TABELA 3. Aplicação do D-dímero para a exclusão diagnóstica de TVP e EP	19

ARTIGO 1

TABELA 1. Níveis de D-dímero encontrados nos grupos de pacientes	34 e 66
TABELA 2. Resultados de PDF observados nos grupos de pacientes	34 e 67

ARTIGO 2

TABELA 1. Associação entre os níveis plasmáticos de PDF e D-dímero	46 e 79
---	---------

ARTIGO 3

TABELA 1. Níveis de cTnT e D-dímero obtidos nos pacientes avaliados	56 e 90
--	---------

INTRODUÇÃO

Os distúrbios tromboembólicos são resultantes de um desequilíbrio do sistema hemostático, ocorrendo uma maior propensão à formação de coágulos que, por sua vez, passam a se fixar em determinadas localidades do organismo ou circulam pelo sistema vascular. Os episódios tromboembólicos acometem um grande número de pacientes, especialmente os internados em hospitais, sendo que as complicações decorrentes desses quadros fazem com que parte destes pacientes evolua ao óbito. O diagnóstico pode ser difícil, exigindo a realização de testes invasivos que consomem tempo e geram um custo elevado para o sistema de saúde. Com isso, há um crescente interesse na implantação de testes não-invasivos com um custo menor que possam vir a contribuir para o diagnóstico ou monitoramento destes pacientes.

Dentre os testes laboratoriais, um dos que mais vem se destacando recentemente é o D-dímero, sendo este o menor produto de degradação oriundo da ação da plasmina sobre a fibrina. Sua eficácia diagnóstica tem sido relatada em uma série de pesquisas realizadas nos mais diversos centros de pesquisa do mundo. Atualmente, o D-dímero é reconhecido como o melhor marcador fisiológico de fibrinólise. Em virtude do sistema fibrinolítico estar envolvido em uma série de distúrbios, especialmente os tromboembólicos, a determinação laboratorial de seus níveis constitui uma importante ferramenta para o critério diagnóstico de vários quadros.

Uma das áreas consideradas mais promissoras à aplicação do D-dímero na triagem laboratorial se refere aos quadros suspeitos de doenças coronarianas, especialmente o infarto agudo do miocárdio (IAM). Já vem sendo relatado que a trombose intracoronariana desempenha um papel fundamental na patogênese do IAM. Nos últimos anos, alguns estudos vêm demonstrando um forte grau de associação entre o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e alguns fatores trombóticos, incluindo o D-dímero, o qual constitui um fator de risco independente para

o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares. A ativação do processo inflamatório e da coagulação sangüínea está associada a um aumento do risco de trombose coronariana, sendo que o D-dímero tem sido considerado um melhor indicador de risco coronariano do que os marcadores inflamatórios.

No presente estudo transversal foram avaliados os níveis plasmáticos de D-dímero e produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF), além dos níveis séricos de troponina cardíaca T (cTnT) a fim de estudar a associação entre estes parâmetros na investigação dos distúrbios tromboembólicos. A melhor compreensão da participação do sistema fibrinolítico nestes eventos pode contribuir futuramente para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, colaborando com todos aqueles que participam do processo.

REVISÃO DA LITERATURA

Considerações gerais sobre a hemostasia

A hemostasia pode ser definida como o processo que consiste na manutenção do sangue no estado fluido, garantindo a permeabilidade da rede circulatória e a prevenção da perda de sangue ocorrida nas situações de risco da integridade vascular. Para que essas funções ocorram normalmente no organismo, são necessários dois componentes principais: (a) um potente mecanismo pró-coagulante capaz de formar tampões hemostáticos nos sítios comprometidos por rompimento vascular; (b) um sistema regulatório com capacidade de limitar a formação de tampões hemostáticos somente para as áreas comprometidas. A hemostasia normal é mantida por um delicado equilíbrio entre os mecanismos pró-coagulante e regulatório. No momento em que este equilíbrio é rompido, ocorre a instalação de um distúrbio hemostático com sangramento excessivo ou com a formação de coágulos (1).

O mecanismo pró-coagulante é normalmente desencadeado a partir do dano ou rompimento vascular. Ocorre inicialmente uma migração de plaquetas para o local afetado, sendo então constituído o tampão plaquetário que é reforçado pela rede de fibrina. Mecanismos anticoagulantes garantem um controle cuidadoso da coagulação e, em condições normais, pela necessidade da manutenção do fluxo sanguíneo, eles prevalecem sobre os mecanismos pró-coagulantes. Distúrbios ocorridos no balanço natural entre os sistemas pró-coagulantes e anticoagulantes devido a fatores genéticos ou adquiridos podem resultar em alterações hemorrágicas ou trombóticas. (1,2).

A hemostasia primária compreende os mecanismos associados à formação do tampão plaquetário enquanto que a hemostasia secundária compreende os mecanismos associados à formação das redes de fibrina. Na primária, a resposta

característica das plaquetas diante de uma lesão vascular pode ser dividida em três fases principais: adesão plaquetária, ativação plaquetária e a agregação plaquetária (1,2). A hemostasia secundária é caracterizada pela conversão do fibrinogênio em um gel insolúvel de fibrina. A formação das redes de fibrina contribui para a estabilização do tampão plaquetário no local onde ocorreu o rompimento vascular. O processo de formação do coágulo de fibrina pode ser dividido em duas fases: a primeira fase consiste na formação da enzima pró-coagulante trombina, enquanto que a segunda fase consiste na conversão do fibrinogênio para fibrina com a subsequente polimerização e estabilização. A trombina é uma enzima fundamental para a coagulação sanguínea, apresentando muitas funções biológicas importantes, incluindo a ativação de plaquetas e a conversão do fibrinogênio em redes de fibrina. A trombina é formada a partir de uma série de processos enzimáticos conhecido como cascata da coagulação. Existem pelo menos dois mecanismos iniciais envolvidos na formação da trombina, sendo estes conhecidos como vias intrínseca e extrínseca. Seus nomes derivam do fato de que todos os componentes da via intrínseca são encontrados na corrente circulatória, enquanto que a via extrínseca necessita de fator tissular, sendo este um componente não encontrado normalmente na corrente circulatória (1-3).

A cascata da coagulação sanguínea é ativada quando o fator tissular subendotelial é exposto/expesso para a circulação sanguínea devido ao dano ou ativação do endotélio. Este processo pode ocorrer em virtude de uma lesão da parede vascular ou pela ativação do endotélio desencadeada por substâncias químicas, toxinas ou por citocinas nos processos inflamatórios (3).

Após o dano vascular, o fator tissular se liga ao fator VIIa ocorrendo a formação do complexo fator tissular:fator VIIa, sendo que este complexo converte os fatores IX e X para as suas formas ativas (IXa e Xa). O fator Xa produzido estimula a produção de trombina que ativa parcialmente as plaquetas e interage com os pró-cofatores fator V e fator VIII, produzindo os cofatores ativos fator Va e fator VIIIa, respectivamente. O fator VIII circula ligado ao fator de von Willebrand, o qual é uma proteína com

características de adesividade importante para formação do tampão plaquetário inicial. Após a ativação, o fator VIIIa dissocia-se do fator de von Willebrand e forma um complexo na superfície plaquetária juntamente com o fator IXa. O complexo fator VIIIa:fator IXa produz uma rota alternativa para ativar o fator X, criando o fator Xa, o qual participa do complexo protrombinase (fator Va:fator Xa). Este complexo converte a protrombina em trombina, a qual desempenha um papel central na cascata da coagulação. A trombina ativa o fator XI, que constitui uma via alternativa para produzir o fator IXa. A trombina também ativa o fator XIII, assim como vários cofatores, quebrando o fibrinogênio e estimulando as plaquetas através da clivagem dos receptores protease ativáveis (PARs). As plaquetas aceleram a ativação da cascata da coagulação através da ligação do fator XI e também pelo fornecimento de uma superfície trombogênica para a construção do complexo protrombinase (fator Va:fator Xa)(2-4). A Figura 1 ilustra a série de reações envolvidas na cascata da coagulação.

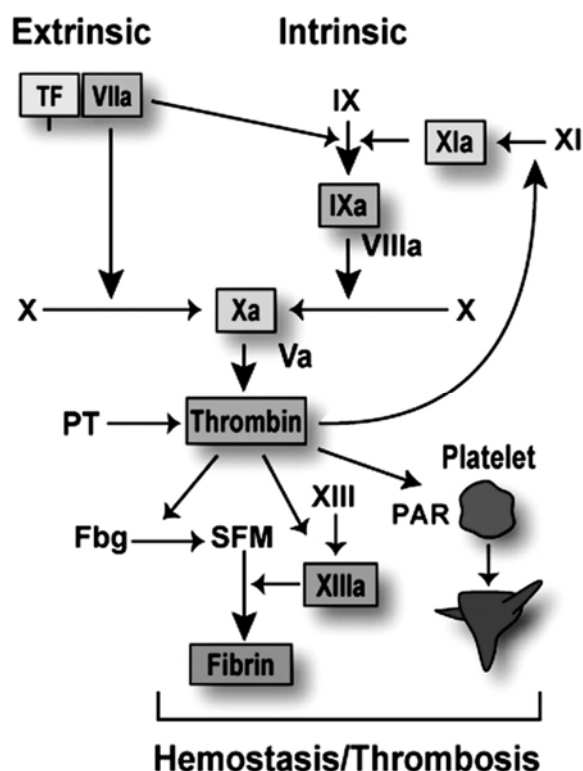


Figura 1. A cascata da coagulação. Formação do complexo fator tissular (TF) e fator VII ativado (VIIa) que inicia a coagulação resultando na ativação dos fatores X e IX. Alternativamente, o fator XI pode ativar o fator IX. O complexo fator Va:fator Xa converte a protrombina (PT) em trombina. A trombina ativa várias proteases e cofatores, além de clivar o fibrinogênio em monômeros solúveis (SFM), os quais são unidos pelo fator XIIIa, e ativar os receptores protease ativáveis (PARs) das plaquetas que conduzem à formação do coágulo. Reproduzido de Mackman 2004 (4).

A via extrínseca da coagulação envolve o mecanismo de ativação iniciado *in vivo* em resposta a um trauma físico ou químico. A via intrínseca é um mecanismo alternativo da coagulação pelo qual a mesma também pode ser iniciada *in vitro*, sendo que esta envolve o fator XII, cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína e fator XI. O papel fisiológico desta via ainda não está completamente compreendido, uma vez que ela não é importante nos casos conhecidos de ameaça da integridade vascular. Da mesma forma, deficiências hereditárias de proteínas deste sistema não estão associadas a distúrbios hemorrágicos, excetuando a deficiência do fator XI, a qual constitui um distúrbio hemorrágico moderadamente severo, talvez por integrar também a chamada via extrínseca (2).

D-dímero

Durante a formação de um trombo, os polímeros da fibrina são degradados pela plasmina e passam a dar origem a produtos de degradação de diferentes pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero, sendo este constituído por duas subunidades idênticas derivadas de duas moléculas de fibrina (5,6). Apresenta uma meia-vida de aproximadamente 8 horas sendo excretado por via urinária (7).

Embora baixos níveis de D-dímero possam ser detectados na circulação de indivíduos saudáveis, seus níveis aumentam significativamente nos pacientes com trombose venosa profunda (TVP) (8-11), embolia pulmonar (EP) (12-16), coagulação intravascular disseminada (9), infarto do miocárdio (17), câncer (18), complicações da gravidez (19), sepse (20), entre outros. O D-dímero é reconhecido atualmente como o mais específico marcador para trombose e fibrinólise fisiológica (5). Apresenta uma alta sensibilidade para o diagnóstico de TVP e EP, embora não seja específico para a identificação destes distúrbios. A sua principal aplicação clínica diz respeito à possibilidade de exclusão diagnóstica de eventos tromboembólicos quando os seus

resultados são normais, ou seja, inferiores a 500 ng/mL. Devido à sua baixa especificidade, a dosagem do D-dímero apresenta pouca ou nenhuma utilidade na distinção entre os pacientes com trombose daqueles pacientes sem trombose se eles apresentarem idade superior a 60 anos ou hospitalização por um período maior que três dias ou, ainda, apresentarem elevados níveis de proteína-C reativa (21).

Heim *et al.* recentemente relataram em sua meta-análise que a utilização do D-dímero como teste único não é recomendada para a exclusão diagnóstica de TVP, uma vez que o valor preditivo negativo observado geralmente é inferior a 90% (22). Os resultados de D-dímero devem ser interpretados com cautela durante a gravidez, uma vez que os seus níveis plasmáticos ultrapassam o limite de 500 ng/mL em todo período gestacional, especialmente no terceiro trimestre, onde são encontrados valores significativamente elevados, fazendo com que este parâmetro não seja confiável para a exclusão diagnóstica de tromboembolismo venoso em pacientes gestantes (23). Eggebrecht *et al.* recentemente observaram níveis elevados de D-dímero em pacientes que apresentam dissecação aórtica aguda, sugerindo a implantação do referido parâmetro como teste complementar para a triagem diagnóstica deste distúrbio (24).

Quanto às técnicas para a mensuração dos níveis de D-dímero, o método de ELISA ainda continua sendo considerado o padrão-ouro. Um dos únicos aspectos negativos referentes a esta técnica ocorre em relação ao longo tempo de reação necessário. Em virtude disso, outras técnicas que demandam um menor tempo de ensaio vêm sendo desenvolvidas e testadas, demonstrando serem eficazes para a exclusão diagnóstica de eventos tromboembólicos, incluindo algumas técnicas automatizadas baseadas em imunoturbidimetria (15-21,25). As técnicas de aglutinação em látex realizadas em placas vêm sendo gradativamente substituídas pelas técnicas automatizadas, uma vez que estas eliminam vários interferentes presentes nas técnicas manuais. As Tabelas 1 e 2 abordam as metodologias disponíveis para a mensuração dos níveis de D-dímero bem como as suas respectivas características.

Tabela 1. Metodologias disponíveis para a mensuração do D-dímero.

Ensaio	Nomes comerciais	Metodologias	Características	Referências
ELISA	Dimertest	ELISA	Quantitativo e reprodutível, mas o tempo de ensaio limita o seu uso em serviços de emergência	Crippa et al. (27)
	Asserachrom		Alta sensibilidade, baixa especificidade	Ginsberg et al. (28)
Látex	Dimertest I	Aglutinação em látex	Baixa sensibilidade, baixo valor preditivo negativo se comparado com ELISA	Laaban et al. (29)
	D-dimertest			Duet et al. (15)
SimpliRED D-dimer	SimpliRED D-dimer	Anticorpos específicos contra D-dímeros e eritrócitos	Boa variabilidade interobservador Mais rápido e fácil do que ensaios que utilizam ELISA ou látex	Mauron et al. (30) Turkstra et al. (31)
Imunofiltração	NycoCard D-dimer	Anticorpos monoclonais que reagem diretamente contra D-dímeros	Fácil de interpretar, rápido e simples	Dale et al. (32)
Imunoturbidimetria	Liatest D-dimer	Micropartículas de látex revestidas com anticorpos anti-D-dímeros	Rápido e totalmente automatizado com boa concordância com os resultados obtidos por ELISA	Barro et al. (33)

Adaptado de Mavromatis *et al.* (26) com modificações.

Tabela 2. Características das diferentes técnicas para detecção de D-dímero.

Técnicas	Exemplos	Sensibilidade	Especificidade	Comentários
ELISA em microplaca	Asserachrom Ddi e Fibrinostika FbDP	Alta	Baixa	Considerada o padrão-ouro; adequada para análise em série mas não conveniente devido ao longo tempo do ensaio
ELISA	VIDAS ELISA	Alta	Baixa	Sensibilidade similar ao ELISA clássico em microplacas, sendo um ensaio quantitativo
Imunofiltração	NycoCard e Instant IA	Alta	Baixa a intermediária	Rápida; sensibilidade comparável ao ELISA em microplacas; qualitativo ou semiquantitativo
Aglutinação em látex de primeira geração	Dimertest e D-Dimertest	Intermediária	Intermediária	Rápida, mas insuficientemente sensível para uso clínico
Aglutinação com sangue total	SimpliRED	Geralmente alta, mas intermediária em alguns estudos	Intermediária	Rápida, pode ser realizada no sangue total, sendo qualitativa ou semiquantitativa
Aglutinação em látex de segunda geração (imunoturbidimetria)	TinaQuant e Liatest	Alta	Intermediária	Rápida; sensibilidade comparável ao ELISA em microplacas; quantitativo ou semiquantitativo

Adaptado de Kelly *et al.* (6) com modificações.

Os níveis de D-dímero aumentam significativamente nos pacientes com eventos tromboembólicos, especialmente nos casos de EP e TVP. Com isso, vários autores vêm desenvolvendo estudos que demonstram a aplicação diagnóstica do D-dímero nestes distúrbios. Entretanto, é importante salientar que níveis elevados de D-dímero não confirmam o diagnóstico de EP e nem de TVP, servindo como um teste de triagem preliminar a outros métodos utilizados na investigação clínica, incluindo alguns testes invasivos. A principal aplicação clínica do D-dímero está na exclusão diagnóstica de EP e TVP quando os seus níveis estão normais, ou seja, inferiores a 500 ng/mL. O valor preditivo negativo (VPN) deste teste é muito elevado para EP e TVP, o que confirma a capacidade que este teste tem de excluir o diagnóstico destes distúrbios quando os seus valores estão normais. A Tabela 3 apresenta alguns estudos demonstrando a eficácia do D-dímero na exclusão diagnóstica de EP e TVP.

Tabela 3. Aplicação do D-dímero para a exclusão diagnóstica de TVP e EP.

Distúrbio	Número de pacientes	VPN	Referência
TVP	445	99,4%	Kearon <i>et al.</i> (8)
TVP	468	93,3%	Kovacs <i>et al.</i> (10)
TVP	100	87,1%	Bucek <i>et al.</i> (34)
EP	525	98,3%	Kovacs <i>et al.</i> (10)
EP	196	99%	Perrier <i>et al.</i> (13)
EP	87	96%	Duet <i>et al.</i> (15)
EP	171	92%	Bounameaux <i>et al.</i> (18)

Os valores apresentados no estudo realizado por Kovacs *et al.* (10) estão expressos como a média de três métodos diferentes de determinação de D-dímero avaliados pelos respectivos autores.

Produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF)

Os PDF constituem um grupo heterogêneo de polipeptídeos resultantes da ação da plasmina sobre o fibrinogênio e também sobre os polímeros de fibrina. Desta proteólise resulta uma série de fragmentos com diferentes pesos moleculares, sendo que o melhor caracterizado destes é o D-dímero (35). A determinação simultânea dos níveis de PDF e D-dímero permite avaliar o grau de ativação da coagulação ocorrida nos diferentes distúrbios hemostáticos, especialmente no que se refere à fibrinogenólise e fibrinólise. Embora a utilização clínica dos PDF já esteja bem estabelecida, os ensaios de aglutinação em látex amplamente utilizados para a detecção de PDF que empregam anticorpos para os fragmentos D e E do fibrinogênio não conseguem diferenciar a fibrinólise primária da fibrinólise secundária (36).

Os achados laboratoriais da coagulação intravascular disseminada (CIVD) podem ser extremamente variáveis, complexos e de difícil interpretação. Embora a utilização clínica dos PDF já esteja bem estabelecida, é possível observar uma elevação nos níveis de PDF em outras condições diferentes da CIVD, incluindo pneumonia, angina e infarto agudo do miocárdio. A falta de especificidade das técnicas utilizadas para a detecção dos PDF tem sido uma das principais objeções contra a sua utilização como ferramenta laboratorial para a investigação clínica (12,36). Além disso, os resultados podem ser falso-negativos em função da baixa sensibilidade, quando comparado às técnicas de ELISA, ou também apresentar discordâncias nas situações em que ocorre fibrinogenólise acelerada sem fibrinólise secundária ou quando a concentração dos monômeros solúveis de fibrina está elevada (36).

Troponinas cardíacas

As troponinas são proteínas que integram as células musculares esqueléticas, sendo que elas se apresentam na forma de complexo juntamente com as moléculas de actina e tropomiosina. Este complexo consiste em três subunidades protéicas: troponina C, troponina T e troponina I. A troponina C liga-se ao cálcio e regula a ativação dos filamentos finos durante a contração, sendo que o peso molecular de sua isoforma cardíaca é 18 kDa. A troponina T faz a ligação do complexo troponina com a tropomiosina, sendo que a sua isoforma cardíaca apresenta um peso molecular de 37 kDa. A troponina I, por sua vez, previne o processo de contração na ausência de cálcio e troponina C, sendo que a sua isoforma cardíaca apresenta um peso molecular de 23 kDa (37).

Dentre as proteínas cardio-específicas, as troponinas cardíacas T (cTnT) e I (cTnI) são consideradas os melhores marcadores para o diagnóstico do IAM porque elas aparecem precocemente no soro após o início dos sintomas (4-12h) e permanecem alteradas por 4-10 dias (38,39), sendo que seus resultados não apresentam elevação quando a troponina proveniente do músculo esquelético está presente (40). Os marcadores bioquímicos são mais sensíveis e específicos do que as técnicas de imagem para o diagnóstico de necrose do miocárdio (41).

As cTnT e cTnI constituem parâmetros altamente específicos para a detecção de lesões ocorridas no miocárdio e ambas apresentam o mesmo valor prognóstico (37,42,43). Na doença coronariana arterial instável, uma elevação dos níveis de troponina indica um alto risco e uma alta atividade do sistema da coagulação (44).

Metzler *et al.* recentemente relataram a evidência de que a cTnT pode servir como parâmetro para estimar a extensão do infarto (45). Remppis *et al.* também relataram que a mensuração dos níveis de cTnT permite estimar a extensão do infarto, especialmente no tempo de 96 horas após o início da dor, onde foi observado um forte grau de correlação entre estes parâmetros (46). Bertinchant *et al.* demonstraram uma

associação significativa entre o nível sérico máximo de cTnT e a extensão das alterações morfológicas do miocárdio em modelo experimental utilizando ratos. A cTnT demonstrou grande capacidade para detectar os menores danos no miocárdio induzidos por doxorubicina em comparação com outros marcadores, incluindo cTnI, CK-MB massa e CK (47). Mullen *et al.* recentemente investigaram a capacidade da cTnI e/ou cTnT em avaliar o índice de rejeição após o transplante cardíaco, sendo demonstrado que elas não constituem parâmetros úteis para prever a rejeição do transplante cardíaco (48).

Coagulação e o desenvolvimento de lesões cardíacas

A trombose intracoronariana desempenha um papel fundamental na patogênese do infarto agudo do miocárdio (IAM), sendo que a formação do trombo geralmente precede a lesão do miocárdio (49,50). Nos últimos anos, alguns estudos vêm demonstrando um forte grau de associação entre o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares com alguns fatores trombóticos, especialmente em relação ao D-dímero, fibrinogênio e fator de von Willebrand (50-52). Yarnell *et al.* inclusive descrevem que os fatores trombóticos estão mais associados ao desenvolvimento de doenças coronarianas do que os próprios níveis de colesterol total e o hábito de fumar (52). Outros fatores associados à inflamação, disfunção endotelial e a resistência à insulina também influenciam no processo de interação entre o sistema hemostático e o desenvolvimento de doenças vasculares (50,53).

As células endoteliais produzem substâncias que apresentam efeito pró-coagulante e também anticoagulante, fazendo com que o funcionamento normal do endotélio seja essencial para a manutenção do balanço hemostático, sendo que uma disfunção ocorrida no endotélio contribui para o desenvolvimento de trombose. Em condições normais, a manutenção do endotélio em seu estado íntegro impede a ação de proteínas subendoteliais com ação protrombótica, fazendo com que o tônus

vascular seja mantido (50). A formação de um trombo intracoronariano, que normalmente ocorre após a ruptura de uma placa de ateroma, precede o desenvolvimento da necrose do miocárdio com a subsequente liberação de macromoléculas intramiocárdicas. Alguns estudos têm sugerido que elevadas concentrações de fibrinogênio podem influenciar a formação das placas de ateroma e de trombos, constituindo um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (54,55). Recentemente foi demonstrado que os inibidores do fator tecidual parecem modular o processo de formação do trombo nas placas de ateroma, uma vez que a exposição do fator tecidual ativa a via extrínseca da coagulação (50).

Durante o desenvolvimento da trombose, a ativação da trombina precede a formação e degradação da fibrina. O D-dímero é um produto de degradação da fibrina, sendo, portanto, indicativo de fibrinólise, confirmando a participação da trombina e da plasmina neste processo (49). Embora os níveis de D-dímero estejam elevados na presença de necrose do miocárdio, esse parâmetro pode constituir um potencial marcador para a detecção da ativação da coagulação que ocorre juntamente à superfície da placa de ateroma, especialmente nas situações onde não tenham ocorrido alterações nos níveis de troponina ou CK-MB, uma vez que a ativação da coagulação precede o evento necrótico (53).

Apesar de alguns estudos preliminares estarem demonstrando uma associação entre alguns marcadores hemostáticos, especialmente o D-dímero, ou moléculas de adesão celular e o risco de eventos isquêmicos recorrentes, o valor preditivo destes marcadores ainda não foi determinado para os pacientes que apresentam dor torácica aguda com níveis normais de troponina cardíaca (53). As investigações mais promissoras em busca da detecção da trombose coronariana e de suas complicações parecem envolver a determinação de marcadores plasmáticos de formação e degradação de fibrina, uma vez que níveis plasmáticos elevados de D-dímero constituem um fator de risco independente para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares (35,56).

Menown *et al.* recentemente relataram que a determinação dos níveis de D-dímero e de marcadores inflamatórios, especialmente a P-selectina, nos pacientes com dor torácica aguda, permite avaliar o risco para eventos isquêmicos recorrentes (53). A hipercolesterolemia também está associada à presença de altos níveis de marcadores inflamatórios, sendo que esta combinação está diretamente associada a um aumento do risco de doença cardiovascular. Considerando que a inflamação desempenha um papel chave na patogênese da aterotrombose, o tratamento a base de substâncias que atuam para diminuir os níveis séricos de lipídeos podem diminuir os distúrbios cardíacos através da redução da trombose (50).

A ativação do processo inflamatório e da coagulação sanguínea está associada a um aumento do risco de trombose coronariana, sendo que o D-dímero tem sido considerado um melhor indicador de risco coronariano do que os marcadores inflamatórios. Além disso, tem sido verificado que os níveis de D-dímero se correlacionam com os níveis de proteína C reativa e de interleucina-6 (57,58). Mair *et al.* demonstraram que a determinação do complexo trombina-antitrombina III apresenta alta sensibilidade para a investigação do IAM, conseguindo detectar a fase inicial do processo trombótico, entretanto, este parâmetro apresenta elevação em outras situações em que também ocorre a ativação da coagulação, sendo necessário a mensuração dos níveis de proteínas cardio-específicas para o correto diagnóstico do IAM (49). Ottani *et al.* recentemente descreveram que os pacientes que apresentavam elevações dos níveis de cTnI associadas a elevações nos níveis de PDF no momento da admissão apresentavam um risco de evolução para trombose coronariana muito maior do que os pacientes com evidência bioquímica isolada de lesão do miocárdio (35).

O sistema fibrinolítico desempenha um papel chave na fisiopatologia dos distúrbios cardiovasculares. A principal enzima que atua no sistema fibrinolítico é a plasmina, sendo que esta degrada os polímeros de fibrina. A plasmina é formada a partir do plasminogênio com o envolvimento do ativador tecidual do plasminogênio

(tPA). Somente um pequeno percentual do tPA é encontrado na forma ativa, sendo que a maior parte do tPA remanescente é encontrado na forma de complexo com o seu inibidor, o inibidor do ativador do plasminogênio-I (PAI-I). É possível dizer que a atividade fibrinolítica é dependente do balanço entre o tPA e o PAI-I (50). Alguns estudos têm inclusive associado as alterações ocorridas no tPA e no PAI-I ao aumento do risco de desenvolvimento de infarto do miocárdio (50,59).

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o grau de associação entre os níveis de D-dímero, produtos de degradação da fibrina/fibriogênio (PDF) e troponina cardíaca T (cTnT) na investigação dos distúrbios tromboembólicos.

Específicos

Comparar os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos por um método imunoturbidimétrico (Liatest D-Dimer) com os níveis plasmáticos de PDF determinados por aglutinação em látex.

Investigar o grau de associação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e o tempo de reação necessário para a detecção dos PDF.

Avaliar os níveis de D-dímero e cTnT nos pacientes com suspeita de apresentarem lesões no miocárdio para investigar se existe uma associação entre a extensão da trombose intracoronariana e o dano no miocárdio.

REFERÊNCIAS

1. McClatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
2. Dahlbäck B. Blood coagulation. Lancet 2000;355:1627-32.
3. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. Biochemistry (Mosc) 2002;67:3-12.
4. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1015-22.
5. Rowe CA, Bolitho JS, Jane A, *et al.* Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. Thromb Haemost 1998;79:94-8.
6. Kelly J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. Arch Intern Med 2002;162:747-56.
7. Hager K, Platt D. Fibrin degradation product concentration (D-dimers) in the course of ageing. Gerontology 1995;41:159-65.
8. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, *et al.* Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. Ann Intern Med 2001;135:108-11.
9. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. Brit J Haem 1989;71:65-70.
10. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, *et al.* A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. Brit J Haem 2001;115:140-44.
11. Escoffre-Barbe M, Oger E, Leroyer C, *et al.* Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). Am J Clin Pathol 1998;109:748-53.

12. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-62.
13. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, *et al.* D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-96.
14. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, *et al.* Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
15. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, *et al.* A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
16. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, *et al.* Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
17. Francis CW, Connaghan DG, Marder VJ. Assessment of fibrin degradation products during fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1986;74:1027-36.
18. Gabazza EC, Taguchi O, Yamakami T, *et al.* Coagulation fibrinolysis system and markers of collagen metabolism in lung cancer. *Cancer* 1992;70:2631-36.
19. Trofatter KF, Howell MC, Greenberg CS, Hage ML. Use of the fibrin D-dimer in screening for coagulation abnormalities in pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 1989;73:435-39.
20. Deitcher SR, Eisenberg PR. Elevated concentrations of cross-linked fibrin degradation products in plasma: an early marker of Gram-negative bacteremia. *Chest* 1993;103:1107-12.
21. Caprini JA, Glase CJ, Anderson CB, Hathaway K. Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Circulation* 2004;109[suppl]:I-4-I-8.
22. Heim SW, Schectman JM, Siadaty MS, Philbrick JT. D-dimer testing for deep venous thrombosis: a metaanalysis. *Clin Chem* 2004;50:1136-47.

23. Kline JA, Williams GW, Hernandez-Nino J. D-dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. *Clin Chem* 2005;51:825-29.
24. Eggebrecht H, Naber CK, Bruch C, *et al.* Value of plasma fibrin D-dimers for detection of acute aortic dissection. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:804-809.
25. Kulstad EB, Kulstad CE, Lovell EO. A rapid quantitative turbidimetric d-dimer assay has high sensitivity for detection of pulmonary embolism in the ED. *Am J Emerg Med* 2004;22:111-14.
26. Mavromatis BH, Kessler CM. D-dimer testing: the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism. *J Clin Pathol* 2001;54:664-68.
27. Crippa L, D'Angelo SV, Tomassini L, *et al.* The utility and cost-effectiveness of D-dimer measurements in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Haematologica* 1997; 82:446-51.
28. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, *et al.* Application of a novel and rapid whole blood assay for D-dimer in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 1995;73:35-8.
29. Laaban JP, Achkar A, Horellou MH, *et al.* Value of plasma D-dimer assays in the diagnosis of venous thromboembolism. *Rev Mal Respir* 1997;14:119-27.
30. Mauron T, Baumgartener I, S'Brun A, *et al.* SimpliRED D-dimer assay: comparability of capillary and citrated venous whole blood, between-assay variability, and performance of the test for exclusion of deep venous thrombosis in symptomatic outpatients. *Thromb Haemost* 1998;79:1217-19.
31. Turkstra F, Kuijter PMM, van Beek EJR, *et al.* Diagnostic utility of ultrasonography of leg veins in patients suspected of having pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 1997;126:775-81.
32. Dale S, Gogstad GO, Brosstad F, *et al.* Comparison of three D-dimer assays for the diagnosis of DVT: ELISA, latex and immunofiltration assay. *Thromb Haemost* 1994;71:270-74.

33. Barro C, Bosson JL, Pernod G, Carpentier PH, Polack B. Plasma D-dimers: comparison of ELISA with a new, rapid, quantitative latex assay. *Clin Lab Haem* 1999;21:363-64.
34. Bucek RA, Quehenberger P, Feliks I, Handler S, Reiter M, Minar E. Results of a new rapid D-dimer assay (Cardiac D-dimer) in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Thromb Res* 2001;103:17-23.
35. Ottani F, Galvani M. Prognostic role of hemostatic markers in acute coronary syndromes patients. *Clin Chim Acta* 2001;311:33-39.
36. Song KS, Kim YA, Kim HK, Park Q. Incidence and possible reasons for discordant results between positive FDP and negative D-dimer latex assays in clinical specimens. *Yonsei Med J* 1999;40:107-11.
37. Sarko J, Pollack CV Jr. Cardiac troponins. *J Emerg Med* 2002;23:57-65.
38. Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* 1999;45:1104-21.
39. Panteghini M, Pagani F, Yeo KTJ, *et al.* Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004;50:327-32.
40. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1996;42:1770-76.
41. Araújo K, Silva J, Sañudo A, Kopelman B. Plasma concentrations of cardiac troponin I in newborn infants. *Clin Chem* 2004;50:1717-18.
42. Penttilä K, Koukkunen H, Kemppainen A, *et al.* Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, and troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:93-101.

43. Moresco RN, Xavier LS, Kayser MG, Birck A, Becker RP. Associação entre os níveis séricos das troponinas cardíacas T e I na investigação das lesões do miocárdio. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2004;36:135-36.
44. Oldgren J, Siegbahn A, Grip L, Linder R, Thygesen K, Wallentin L. Myocardial damage, coagulation activity and the response to thrombin inhibition in unstable coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2004;91:381-87.
45. Metzler B, Hammerer-Lercher A, Jehle J, *et al.* Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2002;325:87-90.
46. Remppis A, Ehlermann P, Giannitsis E, *et al.* Cardiac troponin T levels at 96 hours reflect myocardial infarct size: a pathoanatomical study. *Cardiology* 2000;93:249-253.
47. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, *et al.* Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta* 2003;329:39-51.
48. Mullen JC, Bentley MJ, Scherr KD, *et al.* Troponin T and I are not reliable markers of cardiac transplant rejection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:233-37.
49. Mair J, Genser N, Maier J, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B. Markers of activated coagulation for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1997;267:239-45.
50. Saigo M, Abe S, Ogawa M, *et al.* Imbalance of plasminogen activator inhibitor-1/tissue plasminogen activator and tissue factor/tissue factor pathway inhibitor in young Japanese men with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001;86:1197-1203.
51. Danesh J, Whincup P, Walker M, *et al.* Fibrin D-dimer and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Circulation* 2001;103:2323-27.
52. Yarnell J, McCrum E, Rumley A, *et al.* Association of European population levels of thrombotic and inflammatory factors with risk of coronary heart disease: the MONICA Optional Haemostasis Study. *Eur Heart J* 2005;26:332-42.

53. Menown IBA, Mathew TP, Gracey HM, *et al.* Prediction of recurrent events by D-dimer and inflammatory markers in patients with normal cardiac troponin I (PREDICT) study. *Am Heart J* 2003;145:986-92.
54. Ma J, Hennekens CH, Ridker PM, *et al.* A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1347-52.
55. Danesh J, Collins R, Appleby P, *et al.* Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477-82.
56. Koenig W, Rothenbacher D, Hoffmeister A, *et al.* Plasma fibrin D-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1701-05.
57. Lowe GDO, Rumley A, McMahon AD, Ford I, O'Reilly DSJ, Packard CJ. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1529-34.
58. Lowe GDO, Sweetnam PM, Yarnell JWG, *et al.* C-reactive protein, fibrin D-dimer, and risk of ischemic heart disease: the caerphilly and speedwell studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1957-62.
59. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, *et al.* Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.

D-Dimer and Its Relationship to Fibrinogen/Fibrin Degradation Products (FDPs) in Disorders Associated With Activation of Coagulation or Fibrinolytic Systems

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Luis Cláudio Rosa Vargas,¹ Carlos Franco Voegeli,¹ and Roberto Christ Vianna Santos²

¹Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Levels of D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDPs) are significantly elevated in patients with deep venous thrombosis, pulmonary embolism, disseminated intravascular coagulation, or other complications. The diagnosis of these disorders can be difficult, time-consuming, and expensive. Assays for the detection of FDPs and D-dimer are used in many laboratories to investigate these disorders. The aim of this study was to compare plasma D-dimer levels obtained by the immuno-turbidimetric method (Liatest D-Dimer; Diagnostica Stago, Asnières, France) with plasma FDPs were measured by latex agglutination to investigate the relationship between these parameters. These immunoassays were tested in 144 blood samples from patients with suspected disorders

associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems. D-dimer and FDPs assays were performed in plasma samples by the use of Liatest D-dimer and plasma FDPs (Diagnostica Stago), respectively. Patients were divided into four groups according to plasma D-dimer levels. In group 1, 47.4% had negative FDPs and 52.6% had positive FDPs. In group 2, 15.4% had negative FDPs and 84.6% had positive FDPs. In group 3, 10.3% had negative FDPs and 89.7% had positive FDPs. All of the patients in group 4 had positive FDPs. It was shown that plasma D-dimer levels measured by Liatest D-dimer have a relation to FDP levels measured by latex agglutination. *J. Clin. Lab. Anal.* 17:77–79, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: hemostasis; D-dimer; fibrinogen/fibrin degradation products; fibrinolysis; immunoassays

INTRODUCTION

Hemostasis requires an interesting balance between coagulation and fibrinolysis. During thrombus formation, plasmin degrades cross-linked fibrin polymers, resulting in the formation of a number of soluble cross-linked fibrin degradation products of various molecular weights. The smallest and most well characterized of these products is D-dimer (1,2).

Although low levels of D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDPs) can be detected in the circulation of healthy individuals, concentrations are significantly elevated in patients with deep venous thrombosis (2–5), pulmonary embolism (6–10), disseminated intravascular coagulation (5), or other complications. The diagnosis of venous thromboembolism, whether as deep vein thrombosis or pulmonary embolism, can be difficult, time-consuming, and expensive.

There is increasing interest in the use of D-dimer tests to improve the diagnostic procedure by reducing the need for expensive and invasive testing (11). Assays for the detection FDPs and D-dimer are used in many laboratories for the investigation of disorders associated with activation of the coagulation and/or fibrinolytic systems. It is now accepted that D-dimer, which is formed only by plasmin-mediated proteolysis of cross-linked fibrin, is the most specific marker for thrombosis and physiological fibrinolysis (1).

*Correspondence to: Rafael Noal Moresco, Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Rua Prof. Annes Dias 285, Porto Alegre, RS, 90020-090, Brasil. E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Received 1 November 2002; Accepted 6 January 2003

DOI 10.1002/jcla.10072

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Many of the tests currently used to determine D-dimer levels involve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or latex agglutination technologies. The aim of this study was to compare plasma D-dimer levels obtained by the immuno-turbidimetric method (Liatest D-Dimer) with plasma FDPs levels measured by latex agglutination to investigate the relationship between these parameters.

MATERIALS AND METHODS

In this study 144 blood samples from patients with suspected disorders associated with activation of the coagulation or fibrinolytic systems were tested using D-dimer and FDPs immunoassays. Patients were classified into four groups according to plasma D-dimer levels. This protocol was approved by the Ethics Committee of Santa Casa Hospital.

Blood samples were collected by venous puncture and put into tubes containing a 0.109 mol/L concentration of trisodium citrate (9:1, vol:vol). Platelet-poor plasma was obtained by centrifuging the samples for 10 min at 2,500 g. D-dimer and FDPs assays were performed on each sample.

The Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, France) is a quantitative and automated immunoassay. A microlatex suspension was coated covalently with two complementary monoclonal antibodies specific for fibrin degradation products. The assay was performed by mixing 50 μ L of undiluted plasma with 100 μ L of reaction buffer, and the test was initiated with 150 μ L of latex suspension. The test is fully automated. The change in absorbance, measured at 540 nm on STA Compact analyzer (Diagnostica Stago), was automatically recorded for 140 sec and represented a direct relationship to D-dimer concentration in the specimen. Results were expressed in ng/mL of fibrinogen equivalent units.

The plasma FDPs assay (Diagnostica Stago) is a semiquantitative assay for the detection of FDPs. In the presence of corresponding antigens, the latex particles coated with monoclonal anti-FDPs antibodies agglutinate to form macroscopic clumps. Following the manufacturer's protocol, each patient's plasma was tested at two dilutions: 1:2 and 1:8. The assay was performed by mixing 20 μ L of the patient's 1:2 diluted plasma with 20 μ L of latex suspension and 20 μ L of the patient's 1:8 diluted plasma with 20 μ L of latex suspension at different positions of the test card. The assay was performed in 3 min, and results were expressed in μ g/mL (<5 μ g/mL, 5–20 μ g/mL, and \geq 20 μ g/mL). In this study, the FDPs results were classified as positive when their levels were \geq 5 μ g/mL, and negative when they were < 5 μ g/mL.

D-dimer levels in the groups were compared with FDPs using chi-square tests with adjusted residuals. The relationship between the specificity and sensitivity of the D-dimer and FDPs assays were compared by use of a receiver operating characteristics (ROC) curve.

RESULTS

Plasma D-dimer levels in the groups ranged from 410 to 1,980 ng/mL (see Table 1).

Of the 57 patients in group 1, 27 (47.4%) had negative FDPs and 30 (52.6%) had positive FDPs. In group 2 (n = 26), four patients (15.4%) had negative FDPs and 22 (84.6%) had positive FDPs. In group 3 (n = 29), three patients (10.3%) had negative FDPs and 26 (89.7%) had positive FDPs. In group 4 (n = 32), when plasma D-dimer levels were > 1,600 ng/mL, all patients had positive FDPs, as shown in Table 2 and Fig. 1. ROC analysis demonstrated that plasma D-dimer levels > 1,420 ng/mL were directly associated to positive FDPs (FDPs levels \geq 5 μ g/mL).

DISCUSSION

This study demonstrated a relationship between plasma D-dimer and FDPs levels in the patients studied. It was verified that when D-dimer levels increased in the groups, FDPs detection increased also. However, when small alterations in plasma D-dimer levels occurred in patients with disorders associated with activation of the coagulation or fibrinolytic systems, the FDPs were generally negative. Although FDPs are consistently elevated in hemostatic disorders, and have become well established in the armamentarium of many coagulation

TABLE 1. D-dimer levels in the patient groups

	D-dimer (ng/mL)
Group 1	590 \pm 120
Group 2	920 \pm 90
Group 3	1380 \pm 100
Group 4	1780 \pm 110

Results expressed in mean \pm SD.

TABLE 2. FDPs results in the patient groups

	Negative FDPs	Positive FDPs
Group 1 (n = 57)	27 ^a	30
Group 2 (n = 26)	4	22
Group 3 (n = 29)	3	26
Group 4 (n = 32)	0	32 ^a

Results expressed in number of patients with negative or positive FDPs.

^aP < 0.05.

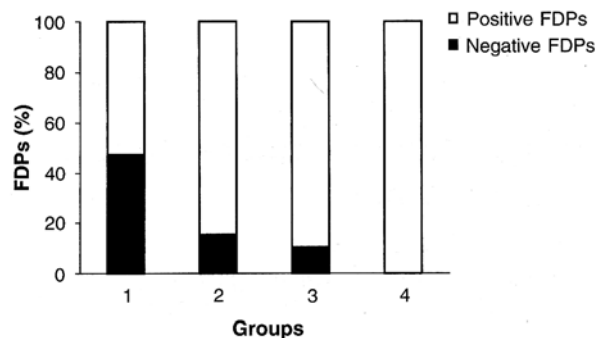


Fig. 1. Relationships between plasma D-dimer levels and FDPs in four patient groups.

laboratories, a lack of specificity in the assay has been one of the most important objections to their use (6). The poor performance of latex FDPs assays may be attributable, in part, to two factors: the assay is semiquantitative, and the interpretation of agglutination patterns varies among investigators.

Plasma D-dimer levels obtained by the immunoturbidimetric method (Liatest D-Dimer) are important parameters for pulmonary embolism exclusion diagnosis (9) and other hemostatic disorders. The measurement of D-dimer levels by Liatest D-dimer has more advantages than the measurement of plasma FDPs by latex agglutination. More importantly, there is a strong agreement between results from the Liatest D-dimer technique and the standard ELISA method (8).

In conclusion, plasma D-dimer levels measured by Liatest D-dimer have a relation to FDPs levels measured by latex agglutination, and D-dimer levels $\geq 1,420$ ng/mL are directly associated with positive FDPs. The measurement of D-dimer in plasma has a definite role in the diagnosis of patients with disorders associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems, including pulmonary embolism, deep venous thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and other complications.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Mr. Alan Birck for technical assistance with managing the data.

REFERENCES

1. Rowe CA, Bolitho JS, Jane A, et al. Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. *Thromb Haemost* 1998;79:94-98.
2. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108-111.
3. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Br J Haem* 2001;115:140-144.
4. Escoffre-Barbe M, Oger E, Leroyer C, et al. Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol* 1998;109:748-753.
5. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Br J Haem* 1989;71:65-70.
6. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-262.
7. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-496.
8. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
9. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
10. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
11. Keeling DM, Wright M, Baker P, Sackett D. D-dimer for the exclusion of venous thromboembolism: comparison of a new automated latex particle immunoassay (MDA D-dimer) with an established enzyme-linked fluorescent assay (VIDAS D-dimer). *Clin Lab Haem* 1999;21:359-362.

ARTIGO 2**Association between plasma levels of D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) for exclusion of thromboembolic disorders**

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Ronald Halla Júnior,¹ Luis Cláudio Rosa Vargas,³ and
Lúcia Mariano da Rocha Silla^{1,2}

J Thromb Thrombolysis - accept for publication

¹ Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Correspondence to: Rafael Noal Moresco, Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350 Sala 2235, Porto Alegre, RS, 90035-007, Brazil.

Fax 55-51-33165626; Email: rnmoresco@yahoo.com.br

ABSTRACT

D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) levels are elevated in subjects with thromboembolic disorders, and the assays for detection of D-dimer and FDP are used in many laboratories for the investigation of these disorders. The aim of this study was to evaluate the association between the plasma levels of D-dimer and FDP in the investigation of thromboembolic disorders. D-dimer and FDP immunoassays were performed in 217 consecutive blood samples from subjects with suspected of thromboembolic disorders by use of Liatest D-dimer and Plasma FDP. FDP results were classified in: <5, 5-20, >20 $\mu\text{g/mL}$, and D-dimer levels obtained in these groups ranged to 350-1210 ng/mL, 420-1960 ng/mL, and 1190-51170 ng/mL, respectively. A significant association between D-dimer levels and the reaction times necessary to occur agglutination in latex agglutination test for FDP was observed. There was an association between plasma levels of D-dimer and FDP. The preliminary determination of FDP levels could be useful because it allows estimating the D-dimer levels before of the automated systems analysis, reducing costs associated to dilutions of plasma samples.

Key Words: D-dimer; fibrinogen/fibrin degradation products (FDP); thromboembolism; immunoassays.

INTRODUCTION

Haemostasis is one of the most basic of host defense mechanisms, serving to preserve the integrity of circulatory system. It consists of an integrated process of checks for vascular damage as well as balances between procoagulant and anticoagulant functions of blood and the vessel wall, preventing both excess bleeding and unwanted thrombosis. Haemostasis requires an interesting balance between coagulation and fibrinolysis. During thrombus formation, plasmin degrades cross-linked fibrin polymers resulting in the formation of a number of soluble cross-linked fibrin degradation products of varying molecular weights. The smallest and better characterized of these products is D-dimer (1). Although low levels of D-dimer and fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) can be detected in the circulation of healthy individuals, their levels are significantly elevated in patients with deep venous thrombosis (DVT) (1-4), pulmonary embolism (PE) (5-9), disseminated intravascular coagulation (2), myocardial infarction (10), cancer (11,12), and sepsis (13). It is well accepted in the clinical setting that the normal value of D-dimer is a reliable indication of the absence of thrombosis. D-dimer is a degradation product of cross-linked fibrin. Fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) do not distinguish between the plasmin degradation of fibrin or fibrinogen. D-dimer is now accepted as a global indicator of coagulation activation and fibrinolysis, and its half-life is approximately 8 hours, with plasma clearance by urinary excretion and by the monocyte macrophagic system (14,15).

Assays for detection of D-dimer and FDP are used in many laboratories for the investigation of disorders associated with activation of the coagulation and fibrinolytic systems, including thromboembolic disorders. It has been suggested that screening for venous thromboembolic disease using D-dimer is a cost-effective method. D-dimer levels of 500 ng/mL have been established as being 97% sensitive for venous thromboembolic events (16). FDP assay, being as unspecific as it is, has been increasingly substituted by D-dimer assays. The former, however, is significantly less

expensive and accordingly still used in several laboratories all over the world even with obviously diagnostic limitations. Considering the importance of fibrinolysis and fibrinogenolysis in the development of thromboembolic disorders, the aim of this study was to investigate the association between plasma levels of D-dimer and FDP in subjects with suspected of thromboembolic disorders.

MATERIALS AND METHODS

We investigated 217 consecutive blood samples from subjects with suspected of thromboembolic disorders. In this study we do not classified the subjects according their thromboembolic disorders due to the large variability of these disorders. Blood samples were collected by venous puncture into tubes containing 0.109 mol/L trisodium citrate at a ratio of nine parts blood to one part citrate and centrifuged for 10 minutes at 2500 g. D-dimer and FDP assays were performed on each sample. This study was approved by Institutional Review Board from Santa Casa University Hospital.

D-dimer was performed by use of quantitative and automated immunoassay Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, France). A microlatex suspension was coated covalently with two complementary monoclonal antibodies specific for fibrin degradation products. The assay was performed by mixing 50 μ L of undiluted plasma with 100 μ L of reaction buffer, and the test was initiated with 150 μ L of latex suspension. The change in absorbance, measured at 540 nm on STA Compact analyzer (Diagnostica Stago, Asnières, France), was automatically recorded for 140 seconds and represented a direct relationship of D-dimer concentration in the specimen. Results were expressed in ng/mL of fibrinogen equivalent units.

Plasma FDP (Diagnostica Stago, Asnières, France), a semi-quantitative assay, was used for detection of FDP. In the presence of the corresponding antigens, the latex particles coated with monoclonal anti-FDP antibodies agglutinate to form macroscopic clumps. Following the manufacturer's protocol, each patient's plasma is tested at two

dilutions: 1:2 and 1:8. The assay was performed by mixing 20 μL of the patient's 1:2 diluted plasma with 20 μL of latex suspension and 20 μL of the patient's 1:8 diluted plasma with 20 μL of latex suspension in different positions of the test card. The assay was performed in 3 minutes and results were expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$ (<5 , 5-20 and >20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). FDP levels are higher than 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the presence of agglutination in both patients' plasma dilutions. The endpoint was determined in the first appearance of agglutination. The reaction times necessary to occur agglutination in both plasma dilutions of the subjects presenting FDP levels >20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were evaluated and compared to respective D-dimer levels obtained by Liatest.

The association between D-dimer and FDP levels was evaluated using Kruskal-Wallis test and Dunns multiple comparison post-test. The relationship between D-dimer levels and the reaction times necessary to detect FDP levels >20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the latex agglutination (FDPt) was evaluated by regression analysis, and $P<0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Plasma D-dimer levels ranged from 350 to 1210 ng/mL in the subjects presenting FDP <5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When FDP levels were 5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D-dimer ranged from 420 to 1960 ng/mL , and D-dimer levels between 1190 and 51170 ng/mL were observed in subjects presenting FDP >20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The Table 1 showed the association between D-dimer and FDP levels.

D-dimer levels obtained in the subjects presenting FDP >20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were associated to the reaction times necessary to occur agglutination in both plasma dilutions of this latex agglutination test. The reaction times ranged from 2 to 98 seconds, while D-dimer levels ranged from 1190 to 51170 ng/mL , as indicated in the Figure 1. A significant association between D-dimer levels and FDPt was observed

($r=0.87$, $P<0.001$), and the increase of D-dimer levels was associated to decrease of FDPt.

Table 1.

Figure 1.

DISCUSSION

This study reported an association between plasma D-dimer and FDP levels in the investigation of thromboembolic disorders. The thromboembolic disorders may not have the same level of coagulation or fibrinolysis activation but the association reported in this study probably could be applied to various thromboembolic disorders. D-dimer levels obtained by immunoturbidimetric method were higher in the group of subjects presenting FDP >20 $\mu\text{g/mL}$. D-dimer is the more appropriate laboratory test for investigating thromboembolic disease but there is no need to run D-dimer unless suspect primary fibrinolysis if FDP $>20\mu\text{g/mL}$. We recently reported a relationship between D-dimer and FDP levels in the investigation of disorders associated with activation of fibrinolytic or coagulation systems, and D-dimer levels >1420 ng/mL were directly associated to positive FDP (17). D-dimer is the smallest cross-linked fibrin degradation product. Although D-dimer could be measured by automated specific assays, including ELISA or immunoturbidimetric methods, a latex agglutination test for FDP, which detect fibrinogen and fibrin degradation products also, allows detecting D-dimer indirectly. The time necessary to detect plasma FDP levels >20 $\mu\text{g/mL}$ decreased with the increased of D-dimer levels. It is possible to suggest that D-dimer levels were inversely proportional to the time necessary to occur agglutination in the latex agglutination test employed in this study. Wilde *et al.* found a close correlation between the elevation of D-dimer and serum FDP levels (2). High levels of D-dimer are particularly common among individuals who have experienced recent trauma and those with pregnancy or malignancy because these states may be associated with

accelerated coagulation and fibrinolysis (18). The decrease of D-dimer during unfractionated and low-molecular-weight heparin treatment in DVT is associated also to an improved of Marder score (19). Marder score is a quantitative phlebographic method based on the calculated relative area and degree of occlusion in the venous system (20).

The potential for blood laboratory tests investigated the stages of fibrinolysis has been received enthusiastically by clinicians eager to avoid expensive radiologic testing for exclusion of thromboembolic disorders. D-dimer measurement using a specific assay, e.g. Liatest D-dimer, presents more advantages than manual latex agglutination tests. However, the FDP assay is much cheaper than the D-dimer assay, and FDP usually is a manual semi-quantitative assay. In Brazil, a lot of clinical laboratories did not have automated systems for evaluations of some laboratorial tests employed for the investigation of thromboembolic disorders, including the D-dimer. Besides, the preliminary determination of FDP levels could be useful also for the clinical laboratories that have automated systems because it allows estimating the D-dimer levels before of the automated systems analysis, reducing costs associated to dilutions of plasma samples. The time necessary to determination of D-dimer levels could be optimized also. The results we present here suggests further studies in order to test the applicability of FDP as a laboratory tool for determine which D-dimer assay dilution should be start with in order to save laboratory reagents and, at the clinical setting, there should be a prospective study looking for a possible relation on D-dimer and FDP assays for laboratory prediction of patients outcomes.

REFERENCES

1. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, Crowther M, Brill-Edwards P, Weitz JI, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108-111.

2. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Br J Haematol* 1989;71:65-70.
3. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, O'Rourke K, Keeney M, Kearon C, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Brit J Haem* 2001;115:140-144.
4. Escoffre-Barbe M, Oger E, Leroyer C, Grimaux M, Le Moigne E, Nonent M, et al. Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol* 1998;109:748-753.
5. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-262.
6. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, Nonent M, Le Moigne E, Bizais Y, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
7. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, De Moerloose P, Morabia A, Unger PF, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-496.
8. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, Vilain D, Ajzenberg C, Elkharrat D, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
9. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, Schneider PA, Slosman D, Reber G, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
10. Francis CW, Connaghan DG, Marder VJ. Assessment of fibrin degradation products during fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1986;74:1027-1036.

11. Gabazza EC, Taguchi O, Yamakami T, Machisi M, Ibata H, Tsutsui K, et al. Coagulation fibrinolysis system and markers of collagen metabolism in lung cancer. *Cancer* 1992;70:2631-2636.
12. Kim HK, Lee KR, Yang JH, Yoo SJ, Lee SW, Jang HJ, et al. Plasma levels of D-dimer and soluble fibrin polymer in patients with hepatocellular carcinoma: a possible predictor of tumor thrombosis. *Thromb Res* 2003;109:125-129.
13. Deitcher SR, Eisenberg PR. Elevated concentrations of cross-linked fibrin degradation products in plasma: an early marker of Gram-negative bacteremia. *Chest* 1993;103:1107-1112.
14. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Quehenberger P, Schneider B, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA* 2003;290:1071-1074.
15. Meythaler JM, Fisher WS, Rue LW, Johnson A, Davis L, Brunner RC. Screening for venous thromboembolism in traumatic brain injury: limitations of D-dimer assay. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:285-290.
16. Kelley J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002;162:747-756.
17. Moresco RN, Vargas LCR, Voegeli CF, Santos RCV. D-dimer and its relationship to fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) in disorders associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems. *J Clin Lab Anal* 2003;17:77-79.
18. Schrecengost JE, LeGallo RD, Boyd JC, Moons KGM, Gonias SL, Edward Rose C, et al. Comparison of diagnostic accuracies in outpatients and hospitalized patients of D-dimer testing for the evaluation of suspected pulmonary embolism. *Clin Chem* 2003;49:1483-1490.
19. Harenberg J, Merx K, Hoffmann U, Tolle AR, Huisman MV. Association of changes in D-dimer and other coagulation markers with changes in Marder score after treatment of acute venous thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14:73-78.

20. Björgell O, Nilsson PE, Svensson PJ, Bergqvist D. A new scoring system for the detailed description of the distribution and thrombotic burden in deep leg vein thrombosis. *Angiology* 1999;50:179-187.

Table 1. Association between the plasma levels of FDP ($\mu\text{g/mL}$) and D-dimer (ng/mL).

FDP	<5	5-20	>20
n	37	80	100
D-dimer	551 ± 43.6	$1147^{\text{a}} \pm 51.4$	$8773^{\text{b}} \pm 981.2$

Values are given as number of subjects and mean \pm SEM. ^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.001$.

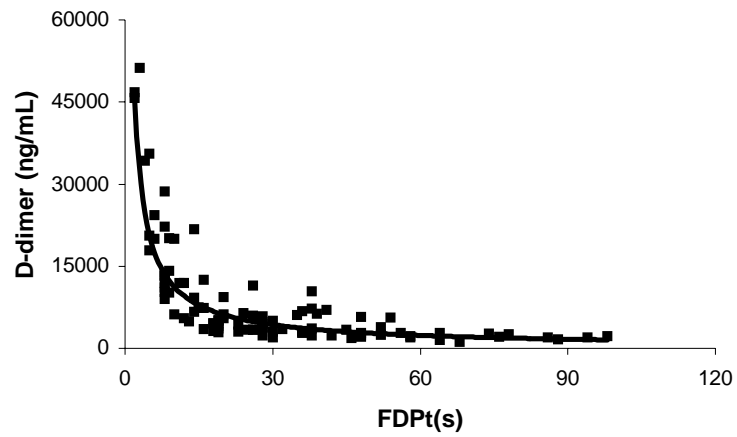


Figure 1. Association between D-dimer levels and the time necessary to detect FDP levels $>20 \mu\text{g/mL}$ ($P<0.001$).

ARTIGO 3**Lack of association between cardiac Troponin T and D-dimer in the evaluation
of myocardial damage**

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Luís Cláudio Rosa Vargas,³ Ronald Halla Júnior,¹ and
Lúcia Mariano da Rocha Silla^{1,2}

J Clin Lab Anal - accept for publication

¹ Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Correspondence to: Rafael Noal Moresco, Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350 Sala 2235, Porto Alegre, RS, 90035-007, Brazil.

Fax 55-51-33165626; Email: rnmoresco@yahoo.com.br

ABSTRACT

Acute myocardial infarction (AMI) disrupts cardiac cell membranes, releasing intracellular cardiac proteins into the vascular system. Some of these proteins, including the cardiac troponin subunits T and I have proven useful in diagnosing of myocardial damage. Intracoronary thrombosis plays a key role in the pathogenesis of AMI, and the formation of an occlusive thrombus usually precedes the development of myocardial damage. To evaluate whether there is an association between the size of intracoronary thrombosis and myocardial damage, we analyzed D-dimer and cTnT levels in the blood samples from patients suspected of myocardial damage. We investigated 102 patients admitted to emergency service with suspected of myocardial damage. D-dimer was performed in plasma by use of the immunoassay Liatest D-dimer, and cTnT levels were measured by use of an electrochemiluminescence immunoassay (Troponin T STAT, Roche). D-dimer levels were lower in patients with cTnT <0.01 than patients presenting cTnT >0.01 ng/mL. We investigated the relationship between D-dimer and cTnT levels in the patients with cTnT >0.01 ng/mL (0.40 ± 0.10 ng/mL) but the absence of significant agreement ($r=0.20$, $P>0.05$) was observed. The levels of D-dimer were not associated to the levels of cTnT in the patients that presented cTnT >0.01 ng/mL.

Key words: myocardial; haemostasis; thrombosis; cardiac troponin T; D-dimer.

INTRODUCTION

Acute myocardial infarction (AMI) disrupts cardiac cell membranes, releasing intracellular cardiac proteins into the vascular system. Some of these proteins, including myoglobin, creatine kinase-MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH) type 1, and cardiac troponin subunits T and I have proven useful in diagnosing AMI (1). In many patients with chest pain, the correct diagnosis of myocardial cell injury is dependent mainly on cardiac markers, because the electrocardiogram is often non-diagnostic (2). Traditional biochemical markers, including creatine kinase (CK), CK-MB isoenzyme, LDH and aspartate aminotransferase, play a limited role in the diagnosis of AMI because their specificity and sensitivity are unsatisfactory (3). The measurement of serum cardiac troponin T (cTnT) and I (cTnI) levels has contributing to correct diagnosis of AMI because they are sensitive and specific markers for evaluation of myocardial damage (2-9).

Intracoronary thrombosis plays a key role in the pathogenesis of AMI, and the formation of an occlusive thrombus usually precedes the development of myocardial damage. Thus, sensitive markers for an activated coagulation system could be useful for an early diagnosis of AMI (10). During thrombus formation, plasmin degrades cross-linked fibrin polymers resulting in the formation of a number of soluble cross-linked fibrin degradation products of varying molecular weights. The smallest and most well characterized of these products is D-dimer (11,12). D-dimer levels are elevated in patients with deep venous thrombosis (12-14), pulmonary embolism (15-19), disseminated intravascular coagulation (14) trauma (20) and malignancy, including hepatocellular carcinoma (21). To evaluate whether there is an association between the size of intracoronary thrombosis and myocardial damage, we analyzed D-dimer and cTnT levels in the blood samples from patients suspected of myocardial damage.

MATERIALS AND METHODS

We investigated 102 patients admitted to emergency service with suspected of myocardial damage. A blood sample was collected from each patient in the moment of admittance at the emergency service by venous puncture into serum tubes or tubes containing 0.109 mol/L trisodium citrate at a ratio of nine parts blood to one part citrate. The serum and plasma were obtained by centrifuging the samples for 10 min at 2500 g. D-dimer and cardiac troponin T immunoassays were performed in plasma and serum, respectively. This protocol was approved by the Ethics Committee of Santa Casa Hospital.

D-dimer was performed in plasma by use of quantitative and automated immunoassay Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, France). A microlatex suspension was coated covalently with two complementary monoclonal antibodies specific for fibrin degradation products. The assay was performed by mixing 50 μ L of undiluted plasma with 100 μ L of reaction buffer, and the test was initiated with 150 μ L of latex suspension. The change in absorbance, measured at 540 nm on STA Compact analyzer (Diagnostica Stago, Asnières, France), was automatically recorded for 140 seconds and represented a direct relationship of D-dimer concentration in the specimen. Results were expressed in ng/mL of fibrinogen equivalent units. The normal level of D-dimer in the adult population is generally less than 500 ng/mL.

Serum cTnT levels were measured by use of a quantitative electrochemiluminescence immunoassay (Troponin T STAT, Roche) in the Roche Elecsys 2010 analyzer. This assay is based on a sandwich principle. The sample, a biotinylated monoclonal troponin T-specific antibody and a monoclonal troponin T-specific antibody labeled with a ruthenium complex react to form a sandwich complex. After addition of streptavidin-coated microparticles, the complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin. The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed. Application of a

voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission, which is measured by a photomultiplier. Results are determined using a calibration curve. The lower detection limit of this assay is 0.01 ng/mL (range to 0.01-25 ng/mL). The expected values of cTnT for healthy individuals were lower than 0.01 ng/mL.

The association between cTnT and D-dimer levels was evaluated by Student's *t* test and the relationship between D-dimer and cTnT >0.01 ng/mL was investigated by linear regression. Results were expressed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

This study reported an association between cTnT and D-dimer levels in the patients with suspected of myocardial damage. D-dimer levels were lower in patients with cTnT <0.01 than cTnT >0.01 ng/mL (Table 1). We investigated also the relationship between D-dimer and cTnT levels in the patients with cTnT >0.01 ng/mL (0.40 ± 0.10 ng/mL) but the absence of significant agreement ($r=0.20$, $P > 0.05$) was observed (Figure 1). Although D-dimer levels were increased in patients presenting cTnT >0.01, their alterations were not directly proportional to cTnT variations.

Table 1.

Figure 1.

DISCUSSION

Although previous studies have shown the association between hemostatic markers and cTnT, the association between higher levels of cTnT and D-dimer has been unclear. Intracoronary thrombosis plays a key role in the pathogenesis of AMI. The formation of an intracoronary thrombus in stenosed coronary arteries after rupture of atherosclerotic plaques precedes the development of myocardial necrosis with the subsequent release of intramyocardial macromolecules. During the development of

thrombosis thrombin activation precedes fibrin degradation. Early endogenous activation of fibrinolysis, on the other hand, may limit infarct size (10).

The most promising approaches for the detection of coronary thrombosis and its complications appear to involve the measurement in plasma of markers of fibrin formation and degradation (22). D-dimer levels were significantly higher in patients with ischemia than in patients without ischemia, and D-dimer appeared to be useful for the diagnosis of AMI during index admission in patients without elevation of CK/CK-MB at presentation (23). Although we reported that D-dimer levels were increased in patients presenting cTnT >0.01, these alterations were not directly proportional to cTnT variations. There was not a statistically significant relationship between cTnT and D-dimer, and our results showed that the degree of activation of fibrinolysis is not directly associated to the extension of myocardial damage. It is important to note that D-dimer levels may be affected by other illnesses, such as pulmonary embolus, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease, and renal or hepatic insufficiency (23). In summary, the levels of D-dimer were not associated to the levels of cTnT in the patients that presented cTnT >0.01 ng/mL. However, D-dimer constitutes an important complementary instrument for investigation of myocardial damage due to importance of intracoronary thrombosis in the pathogenesis of AMI and other cardiac disorders.

REFERENCES

1. Le Moigne F, Beauviex MC, Derache P, Darmon YM. Determination of myoglobin: comparative evaluation of the new automated VIDAS assay with two other immunoassays. Clin Biochem 2002;35:255-62.
2. Penttilä K, Koukkunen H, Kempainen A, et al. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. Int J Clin Lab Res 1999;29:93-101.

3. Plebani M, Zaninotto M. Cardiac markers: present and future. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:56-63.
4. Sarko J, Pollack CV. Cardiac troponins. *J Emerg Med* 2002;23:57-65.
5. Speth M, Seibold K, Katz N. Interaction between heparin and cardiac troponin T and troponin I from patients after coronary bypass surgery. *Clin Biochem* 2002;35:355-62.
6. Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; 44:1855-64.
7. Mullen JC, Bentley MJ, Scherr KD, et al. Troponin T and I are not reliable markers of cardiac transplant rejection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:233-37.
8. Apple FS, Falahati A, Paulsen PR, Miller EA, Sharkey SW. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem* 1997;43:2047-51.
9. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, et al. Development and *in vitro* characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992;38:386-93.
10. Mair J, Genser N, Maier J, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B. Markers of activated coagulation for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1997;267:239-45.
11. Rowe CA, Bolitho JS, Jane A, et al. Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. *Thromb Haemost* 1998;79:94-8.
12. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001; 135:108-11.
13. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2001;115:140-44.
14. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Br J Haematol* 1989;71:65-70.

15. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-62.
16. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-96.
17. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
18. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
19. Bounameaux H, Cirafici P, De Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
20. Kelley J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002;162:747-56.
21. Kim HK, Lee KR, Yang JH, et al. Plasma levels of D-dimer and soluble fibrin polymer in patients with hepatocellular carcinoma: a possible predictor of tumor thrombosis. *Thromb Res* 2003;109:125-29.
22. Ottani F, Galvani M. Prognostic role of hemostatic markers in acute coronary syndromes patients. *Clin Chim Acta* 2001;311:33-9.
23. Menown IBA, Mathew TP, Gracey HM, et al. Prediction of recurrent events by D-dimer and inflammatory markers in patients with normal cardiac troponin I (PREDICT) study. *Am Heart J* 2003;145:986-92.

Table 1. Levels of cTnT and D-dimer observed in the patients

cTnT	<0.01	>0.01
n	56	46
D-dimer	1371 ± 234	3920* ± 1020

Values of D-dimer are given as mean ± SEM. * $P < 0.01$

cTnT and D-dimer values were expressed in ng/mL

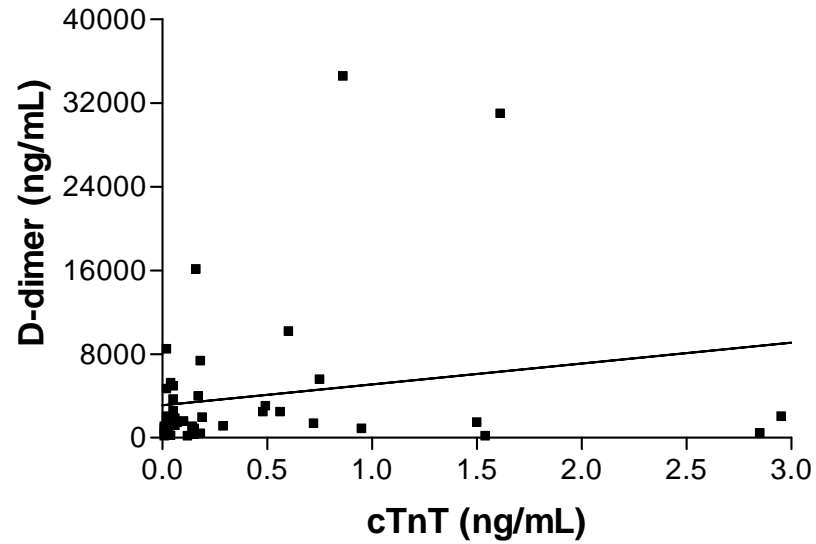


Figure 1. Association between the levels of cTnT and D-dimer in the patients with cTnT >0.01 ng/mL. The absence of significant agreement ($r=0.20$, $P>0.05$) was observed.

ARTIGO 1**D-dímero e sua relação com os produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) nos distúrbios associados com a ativação do sistema fibrinolítico**

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Luis Claudio Rosa Vargas,¹ Carlos Franco Voegli,¹ e Roberto Christ Vianna Santos²

J Clin Lab Anal 2003, 17:77-79.

¹ Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Correspondência para: Rafael Noal Moresco, Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, Rua Prof. Annes Dias 285, Porto Alegre, RS, 90020-090, Brasil.

Email: rnmoresco@yahoo.com.br

RESUMO

Os níveis de D-dímero e dos produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) encontram-se significativamente elevados nos pacientes com trombose venosa profunda, embolia pulmonar, coagulação intravascular disseminada e também em algumas outras condições. O diagnóstico destes distúrbios pode ser difícil, demorado e caro. Os ensaios para a detecção de PDF e D-dímero são utilizados em muitos laboratórios para a investigação dos distúrbios anteriormente descritos. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos por um método imunoturbidimétrico (Liatest D-Dimer, Diagnostica Stago, Asnières, France) com os níveis plasmáticos de PDF determinados por aglutinação em látex para investigar a associação entre estes parâmetros. Estes imunoensaios foram avaliados em 144 amostras de sangue de pacientes com suspeita diagnóstica de distúrbios associados à ativação do sistema fibrinolítico. Os ensaios para a determinação dos níveis de D-dímero e PDF foram realizados em amostras de plasma com a utilização dos reagentes Liatest D-dimer e Plasma FDP (Diagnostica Stago), respectivamente. Os pacientes avaliados foram divididos em quatro grupos de acordo com os seus níveis plasmáticos de D-dímero. No grupo 1, 47,4% dos pacientes apresentaram PDF negativo e 52,6% apresentaram PDF positivo. No grupo 2, 15,4% dos pacientes avaliados apresentaram PDF negativo e 84,6% PDF positivo. No grupo 3, 10,3% apresentaram PDF negativo e 89,7% PDF positivo. Todos os pacientes do grupo 4 apresentaram PDF positivo. Considerando os resultados obtidos é possível sugerir que os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos por imunoturbidimetria estão relacionados com os níveis de PDF determinados por aglutinação em látex.

Palavras-chave: hemostasia; D-dímero; PDF; fibrinólise; imunoensaios.

INTRODUÇÃO

A hemostasia requer um interessante equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise. Durante a formação de um trombo, os polímeros da fibrina são degradados pela plasmina e passam a dar origem a produtos de degradação de diferentes pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero (1,2).

Embora baixos níveis de D-dímero e de produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) possam ser detectados na circulação de indivíduos saudáveis, seus níveis aumentam significativamente nos pacientes com trombose venosa profunda (2-5), embolia pulmonar (6-10), coagulação intravascular disseminada (5), entre outros. O diagnóstico do tromboembolismo venoso, incluindo a trombose venosa profunda e o embolismo pulmonar, pode ser difícil, demorado e caro. Em virtude disto, há um crescente interesse na utilização do D-dímero como um parâmetro laboratorial que possa vir a contribuir com o processo diagnóstico, reduzindo, desta forma, a necessidade de técnicas diagnósticas invasivas e caras (11). Os ensaios para a detecção de PDF e D-dímero são utilizados em muitos laboratórios para a investigação de distúrbios associados com a ativação do sistema fibrinolítico. Atualmente o D-dímero, o qual é formado a partir da degradação da fibrina, é considerado o mais específico indicador de ativação da coagulação e de fibrinólise (1).

Muitos dos testes utilizados atualmente para a determinação dos níveis de D-dímero empregam o princípio de ELISA ou de aglutinação em látex. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos por um método imunoturbidimétrico (Liatest D-Dimer) com os níveis plasmáticos de PDF determinados por aglutinação em látex para investigar a associação entre estes parâmetros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foi realizada a mensuração dos níveis plasmáticos de D-dímero e PDF em 144 amostras de sangue provenientes de pacientes com suspeita diagnóstica de distúrbios associados com a ativação do sistema fibrinolítico. Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com os seus níveis de D-dímero. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa e transferidas para tubos contendo 0,109 mol/L de citrato trissódico (9:1). O plasma pobre em plaquetas foi obtido após centrifugação a 2500 g durante 10 minutos. A determinação dos níveis de D-dímero e PDF foi realizada em cada uma das amostras.

O Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, France) é um imunoenensaio quantitativo totalmente automatizado. Partículas de microlátex em suspensão ligam-se covalentemente a dois anticorpos monoclonais complementares específicos para os produtos de degradação da fibrina. O ensaio ocorre a partir da mistura de 50 μ L de plasma não-diluído com 100 μ L do tampão de reação, sendo que a reação é iniciada com a adição de 150 μ L de látex em suspensão. O teste é totalmente automatizado. A variação de absorvância, mensurada em 540 nm no analisador STA Compact (Diagnostica Stago), é automaticamente avaliada durante 140 segundos e está diretamente relacionada à concentração de D-dímero na amostra. Os resultados são expressos em ng/mL de unidades equivalentes de fibrinogênio.

O Plasma FDP (Diagnostica Stago) é um ensaio semiquantitativo para a detecção de PDF. Na presença de antígenos correspondentes, as partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PDF aglutinam e formam grumos macroscópicos. De acordo com o protocolo do fabricante, cada amostra é testada em duas diluições: 1:2 e 1:8. O ensaio é realizado a partir da mistura de 20 μ L do plasma diluído 1:2 com 20 μ L de latex em suspensão, além da mistura de 20 μ L de plasma

diluído 1:8 com 20 μL de latex em suspensão aplicados em diferentes posições do cartão de reação. O ensaio é realizado em 3 minutos e os resultados são expressos em $\mu\text{g/mL}$ ($<5 \mu\text{g/mL}$, $5\text{-}20 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 20 \mu\text{g/mL}$). Neste estudo, os resultados de PDF foram classificados como positivos quando os seus níveis foram $\geq 5 \mu\text{g/mL}$ e negativos quando $<5 \mu\text{g/mL}$.

Os níveis de D-dímero e de PDF foram comparados nos grupos pelo teste de Qui-quadrado com resíduo ajustado. A relação entre especificidade e sensibilidade dos ensaios para detecção de D-dímero e PDF foi avaliada com a utilização da curva ROC.

RESULTADOS

Os níveis plasmáticos de D-dímero variaram entre 410 e 1980 ng/mL nos grupos de pacientes (Tabela 1). Dos 57 pacientes do grupo 1, 27 (47,4%) apresentaram PDF negativo e 30 (52,6%) PDF positivo. No grupo 2 ($n=26$), quatro pacientes (15,4%) apresentaram PDF negativo e 22 (84,6%) PDF positivo. No grupo 3 ($n=29$), três pacientes (10,3%) apresentaram PDF negativo e 26 (89,7%) apresentaram PDF positivo. No grupo 4 ($n=32$), quando os níveis plasmáticos de D-dímero foram $>1600 \text{ ng/mL}$, todos os pacientes apresentaram PDF positivo, conforme indicado na Tabela 2 e na Figura 1. A análise da curva ROC demonstrou que concentrações plasmáticas de D-dímero $>1420 \text{ ng/mL}$ estão diretamente associadas a resultados positivos de PDF ($\text{PDF} \geq 5 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 1.

Tabela 2.

Figura 1.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou uma relação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF. Foi verificado que o aumento dos níveis de D-dímero nos grupos está associado a um aumento na detecção de PDF. Entretanto, quando ocorrem pequenas alterações nos níveis de D-dímero, os resultados de PDF geralmente são negativos. Embora os PDF estejam elevados nos distúrbios hemostáticos, a falta de especificidade deste ensaio tem sido uma das principais objeções ao seu uso (6). O desempenho deficiente dos ensaios com látex para a detecção de PDF pode ser atribuído, em parte, a dois fatores: o ensaio é semi-quantitativo e a interpretação do padrão de aglutinação pode variar de acordo com os investigadores.

Os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos pelo método imunoturbidimétrico (Liatest D-Dimer) constituem um importante parâmetro para a exclusão diagnóstica de embolismo pulmonar (9) e outros distúrbios hemostáticos. A mensuração dos níveis de D-dímero pelo Liatest D-dimer apresenta mais vantagens do que a determinação dos níveis plasmáticos de PDF por aglutinação em látex. Além disso, os resultados de D-dímero obtidos com Liatest D-dimer apresentam um forte grau de correlação com os resultados obtidos pelo método padrão de ELISA (8).

Em conclusão, os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos com o Liatest D-dimer estão relacionados com os níveis de PDF determinados por aglutinação em látex e os níveis de D-dímero ≥ 1420 ng/mL estão diretamente associados aos resultados positivos de PDF. A determinação do D-dímero no plasma constitui um importante critério diagnóstico para a investigação de distúrbios da hemostasia associados à ativação do sistema fibrinolítico, incluindo embola pulmonar, trombose venosa profunda, coagulação intravascular disseminada e outras condições.

REFERÊNCIAS

1. Rowe CA, Bolitho JS, Jane A, et al. Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. *Thromb Haemost* 1998;79:94-98.
2. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Annals of Internal Medicine* 2001;135:108-111.
3. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Brit J Haem* 2001;115:140-144.
4. Escoffre-Barbe M, Oger E, Leroyer C, et al. Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol* 1998;109:748-753.
5. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Brit J Haem* 1989;71:65-70.
6. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-262.
7. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-496.
8. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
9. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
10. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.

11. Keeling DM, Wright M, Baker P, Sackett D. D-dimer for the exclusion of venous thromboembolism: comparison of a new automated latex particle immunoassay (MDA D-dimer) with an established enzyme-linked fluorescent assay (VIDAS D-dimer). *Clin Lab Haem* 1999;21:359-362.

Tabela 1. Níveis de D-dímero encontrados nos grupos de pacientes

	D-dímero (ng/mL)
Grupo 1	590 ± 120
Grupo 2	920 ± 90
Grupo 3	1380 ± 100
Grupo 4	1780 ± 110

Resultados expressos em média ± DP.

Tabela 2. Resultados de PDF observados nos grupos de pacientes

	PDF Negativo	PDF Positivo
Grupo 1 (n=57)	27 *	30
Grupo 2 (n=26)	4	22
Grupo 3 (n=29)	3	26
Grupo 4 (n=32)	0	32 *

Resultados expressos em número de pacientes com PDF negativo ou positivo. * $P < 0.05$

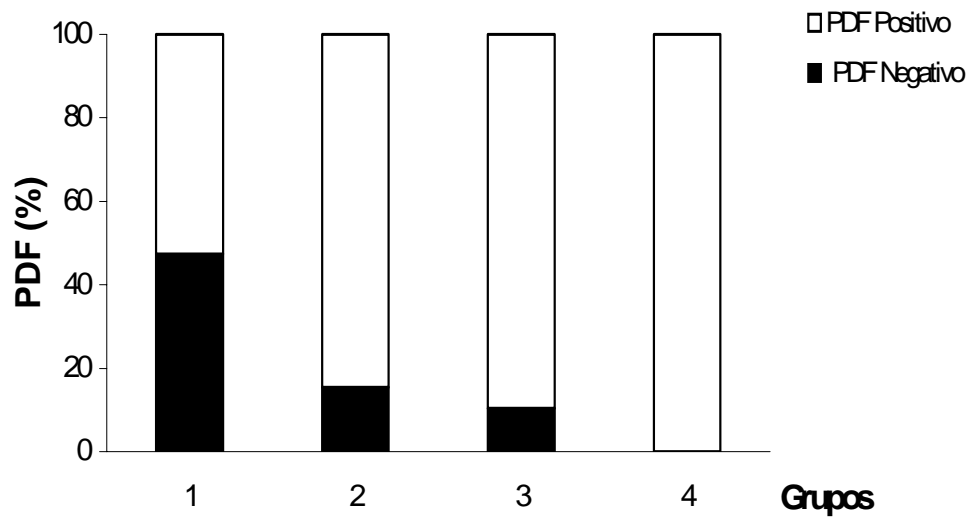


Figura 1. Relações entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF observadas nos quatro grupos de pacientes.

ARTIGO 2**Associação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) para a exclusão de distúrbios tromboembólicos**

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Ronald Halla Júnior,¹ Luis Cláudio Rosa Vargas,³ e
Lúcia Mariano da Rocha Silla^{1,2}

J Thromb Thrombolysis - aceito para publicação

¹ Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Correspondência para: Rafael Noal Moresco, Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350 Sala 2235, Porto Alegre, RS, 90035-007, Brasil.

Fax 55-51-33165626; Email: rnmoresco@yahoo.com.br

RESUMO

Os níveis de D-dímero e dos produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) apresentam-se elevados nos pacientes com distúrbios tromboembólicos, sendo que os ensaios para a detecção de D-dímero e de PDF são utilizados em muitos laboratórios para a investigação destes distúrbios. O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de associação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF na investigação de distúrbios tromboembólicos. Os imunoenaios para a determinação dos níveis de D-dímero e PDF foram realizados com a utilização dos kits Liatest D-dimer e Plasma FDP (Diagnostica Stago, França) em 217 amostras de sangue obtidas de pacientes com suspeita de apresentarem distúrbios tromboembólicos. Os resultados de PDF foram classificados em: <5, 5-20, >20 $\mu\text{g/mL}$, sendo que os níveis de D-dímero obtidos nestes grupos variaram entre 350-1210 ng/mL, 420-1960 ng/mL e 1190-51170 ng/mL, respectivamente. Foi observada uma associação significativa entre os níveis de D-dímero e o tempo de reação necessário para a ocorrência de aglutinação no ensaio de detecção de PDF. Também foi encontrada uma associação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF. A determinação prévia dos níveis de PDF pode ser útil uma vez que ela permite estimar os níveis de D-dímero antes de sua mensuração em sistemas automatizados, reduzindo custos associados com diluições de amostras.

Palavras-chave: D-dímero; produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF); tromboembolismo; imunoenaios.

INTRODUÇÃO

A hemostasia é um dos principais mecanismos de proteção do nosso organismo, agindo principalmente na preservação da integridade do sistema circulatório. Ela consiste em um processo integrado que tem por finalidade investigar as áreas que possam apresentar dano vascular, assim como avaliar o equilíbrio entre as funções pró-coagulantes e anticoagulantes, prevenindo o sangramento excessivo ou quadros indesejáveis de trombose. A hemostasia requer um interessante equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise. Durante a formação de um trombo, os polímeros da fibrina são degradados pela plasmina e passam a dar origem a produtos de degradação de diferentes pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero (1).

Embora baixos níveis de D-dímero e de produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDF) possam ser detectados na circulação de indivíduos saudáveis, seus níveis aumentam significativamente nos pacientes com trombose venosa profunda (1-4), embolia pulmonar (5-9), coagulação intravascular disseminada (2), infarto do miocárdio (10), câncer (11,12) e sepsis (13). Atualmente, níveis normais de D-dímero constituem um indicador confiável na prática clínica referente à ausência de trombose. O D-dímero é um produto de degradação exclusivo da fibrina, enquanto que os PDF não distinguem os produtos de degradação oriundos da ação da plasmina sobre o fibrinogênio ou sobre a fibrina. O D-dímero é atualmente reconhecido como um indicador global da ativação da coagulação e da fibrinólise, sendo que ele apresenta uma meia-vida de aproximadamente 8 horas, com depuração e excreção urinária pela ação do sistema retículoendotelial (14,15).

Os ensaios para a detecção de D-dímero e PDF são utilizados em muitos laboratórios para a investigação de distúrbios associados com a ativação do sistema fibrinolítico, incluindo os eventos tromboembólicos. Têm sido sugerido inclusive que a utilização do D-dímero como um teste de *screening* para o tromboembolismo venoso é

considerado um método custo-efetivo. Considerando um ponto de corte de 500 ng/mL para os resultados de D-dímero, foi estabelecida uma sensibilidade de 97% para os eventos tromboembólicos (16). Os ensaios para a detecção de PDF vêm sendo gradativamente substituídos pelos ensaios de detecção do D-dímero em virtude da falta de especificidade dos ensaios para detecção de PDF. Entretanto, estes ensaios apresentam um custo mais reduzido quando comparado ao D-dímero, sendo ainda utilizados em vários laboratórios espalhados pelo mundo. Considerando a importância da fibrinólise e da fibrinogénólise no desenvolvimento dos distúrbios tromboembólicos, o objetivo deste estudo foi investigar o grau de associação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e PDF em pacientes com suspeita de apresentarem distúrbios tromboembólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram investigadas 217 amostras de sangue obtidas de pacientes com suspeita de apresentarem distúrbios tromboembólicos. Neste estudo os pacientes não foram classificados de acordo com os seus distúrbios tromboembólicos devido à grande variabilidade destes. As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa e transferidas para tubos contendo citrato trisódico 0,109 mol/L na proporção de nove partes de sangue para uma parte de citrato, sendo posteriormente centrifugadas a 2500 g durante 10 minutos. Os ensaios para a determinação dos níveis de D-dímero e de PDF foram realizados em cada uma das amostras. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

A determinação dos níveis de D-dímero foi realizada em amostras de plasma com a utilização do imunoensaio automatizado quantitativo Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, França). Partículas de microlátex em suspensão ligam-se covalentemente a dois anticorpos monoclonais complementares específicos para os produtos de degradação da fibrina. O ensaio ocorre a partir da mistura de 50 µL de

plasma não-diluído com 100 μL do tampão de reação, sendo que a reação é iniciada com a adição de 150 μL de látex em suspensão. O teste é totalmente automatizado. A variação de absorvância, mensurada em 540 nm no analisador STA Compact (Diagnostica Stago, Asnières, França), é automaticamente avaliada durante 140 segundos e está diretamente relacionada à concentração de D-dímero na amostra. Os resultados são expressos em ng/mL de unidades equivalentes de fibrinogênio.

O Plasma FDP (Diagnostica Stago) é um ensaio semiquantitativo para a detecção de PDF. Na presença de antígenos correspondentes, as partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PDF aglutinam e formam grumos macroscópicos. De acordo com o protocolo do fabricante, cada amostra é testada em duas diluições: 1:2 e 1:8. O ensaio é realizado a partir da mistura de 20 μL do plasma diluído 1:2 com 20 μL de látex em suspensão, além da mistura de 20 μL de plasma diluído 1:8 com 20 μL de látex em suspensão aplicados em diferentes posições do cartão de reação. O ensaio é realizado em 3 minutos e os resultados são expressos em $\mu\text{g/mL}$ ($<5 \mu\text{g/mL}$, $5-20 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 20 \mu\text{g/mL}$). Os resultados de PDF são superiores a $20 \mu\text{g/mL}$ quando ocorre aglutinação em ambas as diluições testadas com a amostra de plasma do paciente. Foi estabelecido como ponto final da reação a primeira aparência visual de aglutinação. Os tempos de reação necessários para a ocorrência de aglutinação em ambas diluições testadas dos pacientes com PDF $>20 \mu\text{g/mL}$ foram avaliados e comparados com os respectivos níveis de D-dímero obtidos pelo ensaio Liatest.

A associação entre os níveis de D-dímero e PDF foi avaliada com a utilização do teste de Kruskal-Wallis e do pós-teste de Dunns. A correlação entre os níveis de D-dímero e os tempos de reação necessários para a detecção de PDF $>20 \mu\text{g/mL}$ (PDFt) foi avaliada por análise de regressão, sendo $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Os níveis plasmáticos de D-dímero encontrados variaram entre 350 e 1210 ng/mL nos pacientes que apresentaram PDF <5 µg/mL. Quando os resultados de PDF ficaram entre 5-20 µg/mL, o D-dímero variou entre 420 e 1960 ng/mL. Os resultados de D-dímero observados nos pacientes com PDF >20 µg/mL variaram entre 1190 e 51170 ng/mL. A Tabela 1 demonstra a associação entre os níveis de D-dímero e PDF encontrados.

Os resultados de D-dímero obtidos nos pacientes que apresentaram PDF >20 µg/mL foram associados aos tempos de reação necessários para a ocorrência de aglutinação em ambas as diluições das amostras de plasma dos pacientes. Os tempos de reação variaram entre 2 e 98 segundos, enquanto que os níveis de D-dímero variaram entre 1190 e 51170 ng/mL, conforme indicado na Figura 1. Foi observado um grau significativo de correlação entre os níveis de D-dímero e o PDFt ($r=0.87$, $P<0,001$), sendo que a elevação dos níveis de D-dímero esteve associada a uma diminuição do PDFt.

Tabela 1.

Figura 1.

DISCUSSÃO

Este estudo relatou uma associação entre os níveis de D-dímero e de PDF na investigação dos distúrbios tromboembólicos. Os distúrbios tromboembólicos podem não apresentar o mesmo nível de ativação da coagulação ou da fibrinólise, entretanto, a associação relatada neste estudo provavelmente pode ser aplicada a vários tipos de distúrbios tromboembólicos. Os níveis de D-dímero obtidos pelo método imunoturbidimétrico foram mais elevados no grupo de pacientes que apresentaram PDF >20 µg/mL. O D-dímero é o teste laboratorial mais apropriado para a investigação de distúrbios tromboembólicos, mas, quando os resultados de PDF >20µg/mL, não se

faz necessária a determinação dos níveis de D-dímero, exceto nos casos em que há a suspeita de fibrinogenólise primária. Recentemente nós relatamos uma relação entre os níveis de D-dímero e PDF na investigação de distúrbios associados com a ativação do sistema fibrinolítico, sendo que resultados de D-dímero >1420 ng/mL foram diretamente associados a resultados positivos de PDF (17). O D-dímero é o menor produto de degradação da fibrina. Embora o D-dímero possa ser mensurado através de ensaios automatizados específicos, incluindo os métodos de ELISA e de imunoturbidimetria, um teste de aglutinação em látex para a detecção de PDF, o qual detecta os produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina, permite também uma detecção indireta do D-dímero. O tempo necessário para a detecção de níveis plasmáticos de PDF >20 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu com a elevação dos níveis de D-dímero. É possível sugerir que os níveis de D-dímero são inversamente proporcionais ao tempo necessário para a ocorrência de aglutinação no teste de aglutinação em látex utilizado neste estudo. Wilde *et al.* encontraram um forte grau de correlação entre a elevação dos níveis de D-dímero e de PDF no soro (2). Elevados níveis de D-dímero são particularmente comuns nos indivíduos que apresentam trauma recente ou nas situações de gestação e malignidade, uma vez que estes estados podem estar associados com a ativação da coagulação e da fibrinólise (18). A diminuição dos níveis de D-dímero observada durante o tratamento com heparina não-fractionada e de baixo peso molecular na TVP está associada também a um aperfeiçoamento score Marder (19), sendo este um método flebográfico quantitativo baseado no cálculo da área relativa e do grau de oclusão do sistema venoso (20).

A potencialidade de testes laboratoriais para a investigação dos estágios da fibrinólise tem sido recebida com entusiasmo pelos médicos que procuram evitar a utilização dos testes radiológicos para a exclusão diagnóstica dos distúrbios tromboembólicos. A mensuração do D-dímero com a utilização de ensaio específico como, por exemplo, o Liatest D-dimer, apresenta mais vantagens do que os testes manuais de aglutinação em látex. Entretanto, os ensaios para a determinação dos

níveis de PDF apresentam um custo menor do que os ensaios para a detecção de D-dímero, sendo que os ensaios para PDF normalmente são semiquantitativos. No Brasil, muitos laboratórios de análises clínicas ainda não dispõem de sistemas automatizados para a realização dos testes utilizados na investigação de distúrbios tromboembólicos, incluindo o D-dímero. Além disso, a determinação prévia dos níveis de PDF pode trazer contribuições para os laboratórios que possuem sistemas automatizados, uma vez que os níveis de D-dímero podem ser estimados antes da realização dos ensaios automatizados, reduzindo os custos com diluições de amostras quando estas se fizerem necessárias. O tempo empregado para a mensuração dos níveis de D-dímero também pode ser otimizado. Os resultados apresentados por nós sugerem que estudos complementares devem ser realizados para avaliar a aplicabilidade do PDF como ferramenta laboratorial na escolha da diluição de amostra adequada para a determinação dos níveis de D-dímero, reduzindo os custos com procedimentos desnecessários. Sob o ponto de vista clínico deve ser realizado um estudo prospectivo investigando uma possível correlação entre PDF e D-dímero a fim de contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, Crowther M, Brill-Edwards P, Weitz JI, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001;135:108-111.
2. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Br J Haematol* 1989;71:65-70.
3. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, O'Rourke K, Keeney M, Kearon C, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Brit J Haem* 2001;115:140-144.

4. Escoffre-Barbe M, Oger E, Leroyer C, Grimaux M, Le Moigne E, Nonent M, et al. Evaluation of a new rapid D-dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-dimer). *Am J Clin Pathol* 1998;109:748-753.
5. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-262.
6. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, Nonent M, Le Moigne E, Bizais Y, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
7. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, De Moerloose P, Morabia A, Unger PF, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-496.
8. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, Vilain D, Ajzenberg C, Elkharrat D, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.
9. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, Schneider PA, Slosman D, Reber G, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
10. Francis CW, Connaghan DG, Marder VJ. Assessment of fibrin degradation products during fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1986;74:1027-1036.
11. Gabazza EC, Taguchi O, Yamakami T, Machisi M, Ibata H, Tsutsui K, et al. Coagulation fibrinolysis system and markers of collagen metabolism in lung cancer. *Cancer* 1992;70:2631-2636.
12. Kim HK, Lee KR, Yang JH, Yoo SJ, Lee SW, Jang HJ, et al. Plasma levels of D-dimer and soluble fibrin polymer in patients with hepatocellular carcinoma: a possible predictor of tumor thrombosis. *Thromb Res* 2003;109:125-129.

13. Deitcher SR, Eisenberg PR. Elevated concentrations of cross-linked fibrin degradation products in plasma: an early marker of Gram-negative bacteremia. *Chest* 1993;103:1107-1112.
14. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Quehenberger P, Schneider B, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA* 2003;290:1071-1074.
15. Meythaler JM, Fisher WS, Rue LW, Johnson A, Davis L, Brunner RC. Screening for venous thromboembolism in traumatic brain injury: limitations of D-dimer assay. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:285-290.
16. Kelley J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002;162:747-756.
17. Moresco RN, Vargas LCR, Voegeli CF, Santos RCV. D-dimer and its relationship to fibrinogen/fibrin degradation products (FDP) in disorders associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems. *J Clin Lab Anal* 2003;17:77-79.
18. Schrecengost JE, LeGallo RD, Boyd JC, Moons KGM, Gonias SL, Edward Rose C, et al. Comparison of diagnostic accuracies in outpatients and hospitalized patients of D-dimer testing for the evaluation of suspected pulmonary embolism. *Clin Chem* 2003;49:1483-1490.
19. Harenberg J, Merx K, Hoffmann U, Tolle AR, Huisman MV. Association of changes in D-dimer and other coagulation markers with changes in Marder score after treatment of acute venous thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14:73-78.
20. Björgell O, Nilsson PE, Svensson PJ, Bergqvist D. A new scoring system for the detailed description of the distribution and thrombotic burden in deep leg vein thrombosis. *Angiology* 1999;50:179-187.

Tabela 1. Associação entre os níveis plasmáticos de PDF ($\mu\text{g/mL}$) e D-dímero (ng/mL).

PDF	<5	5-20	>20
n	37	80	100
D-dímero	551 ± 43.6	$1147^a \pm 51.4$	$8773^b \pm 981.2$

Os valores estão expressos em número de pacientes e média \pm erro padrão.

^a $P < 0,01$ e ^b $P < 0,001$.

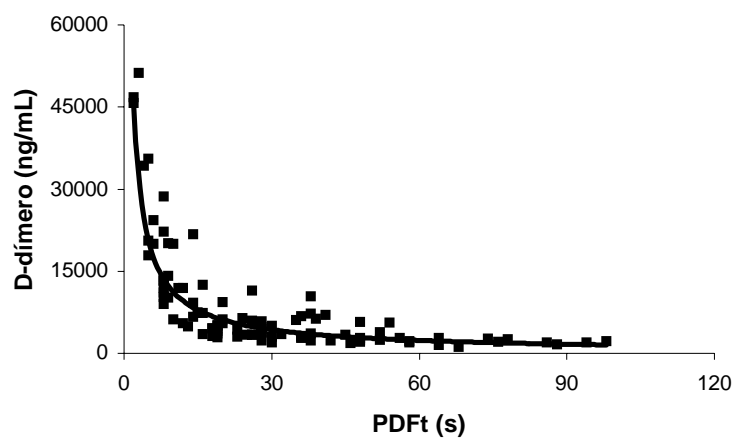


Figura 1. Associação entre os níveis de D-dímero e o tempo necessário para a detecção de PDF $>20 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$).

ARTIGO 3**Falta de associação entre os níveis de troponina cardíaca T e D-dímero na
avaliação das lesões do miocárdio**

Rafael Noal Moresco,^{1,2*} Luís Cláudio Rosa Vargas,³ Ronald Halla Júnior,¹ e
Lúcia Mariano da Rocha Silla^{1,2}

J Clin Lab Anal - aceito para publicação

¹ Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Laboratório Central de Análises Clínicas, Complexo Hospitalar Santa Casa, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Correspondência para: Rafael Noal Moresco, Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350 Sala 2235, Porto Alegre, RS, 90035-007, Brasil.

Fax 55-51-33165626; Email: rnmoresco@yahoo.com.br

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocasiona o rompimento da membrana das células cardíacas, ocorrendo a liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular. Algumas destas proteínas, incluindo as troponinas cardíacas T e I, têm apresentado eficácia no diagnóstico das lesões do miocárdio. A trombose intracoronariana desempenha um papel chave na patogênese do IAM, sendo que a formação de um trombo oclusivo geralmente precede o desenvolvimento das lesões no miocárdio. Para avaliar se existe uma associação entre a extensão da trombose intracoronariana e o dano no miocárdio, nós investigamos os níveis de D-dímero e cTnT em amostras de sangue obtidas de pacientes com suspeita de apresentarem lesões no miocárdio. Foram avaliados 102 pacientes admitidos no serviço de emergência com suspeita clínica do quadro em questão. Os níveis de D-dímero foram determinados no plasma com a utilização do ensaio automatizado Liatest D-dimer e os níveis de cTnT foram determinados através do ensaio de eletroquimioluminescência (Troponin T STAT, Roche). Os níveis de D-dímero foram menores nos pacientes com cTnT $<0,01$ ng/mL do que naqueles que apresentaram cTnT $>0,01$ ng/mL. Também foi investigado o grau de correlação entre os níveis de D-dímero e cTnT nos pacientes com cTnT $>0,01$ ng/mL ($0,40 \pm 0,10$ ng/mL), mas não foi observado um grau significativo de correlação entre estes parâmetros ($r=0,20$, $P>0,05$). Os níveis de D-dímero não apresentaram uma associação significativa com os níveis de cTnT nos pacientes que apresentaram cTnT $>0,01$ ng/mL.

Palavras-chave: miocárdio; hemostasia; trombose; troponina cardíaca T; D-dímero.

INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) ocasiona o rompimento da membrana das células cardíacas, ocorrendo a liberação de proteínas cardíacas intracelulares para o sistema vascular. Algumas destas proteínas, incluindo a mioglobina, creatina quinase fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) tipo 1 e as troponinas cardíacas T e I têm contribuído para o diagnóstico do IAM (1). Em muitos pacientes apresentando dor torácica, o diagnóstico correto das lesões do miocárdio depende principalmente dos marcadores cardíacos, uma vez que o eletrocardiograma freqüentemente não é diagnóstico (2). Os marcadores bioquímicos tradicionais, incluindo a creatina quinase (CK), CK-MB, LDH e aspartato aminotransferase (AST), desempenham um papel limitado do diagnóstico do IAM em função de sua especificidade e sensibilidade insatisfatória (3). A mensuração dos níveis séricos das troponinas cardíacas T (cTnT) e I (cTnI) têm contribuído para o correto diagnóstico do IAM, já que estes são considerados sensíveis e específicos marcadores para a avaliação das lesões do miocárdio (2-9).

A trombose intracoronariana desempenha um papel chave na patogênese do IAM, sendo que a formação de um trombo oclusivo geralmente precede o desenvolvimento das lesões no miocárdio. Desta forma, a descoberta de sensíveis marcadores da ativação do sistema da coagulação pode contribuir de forma importante para o diagnóstico precoce do IAM (10). Durante a formação de um trombo, os polímeros da fibrina são degradados pela plasmina e passam a dar origem a produtos de degradação de diferentes pesos moleculares. O menor e melhor caracterizado destes produtos é o D-dímero (11,12). Os níveis de D-dímero estão elevados nos pacientes com trombose venosa profunda (12-14), embolia pulmonar (15-19), coagulação intravascular disseminada (14), trauma (20) e doenças malignas, incluindo o carcinoma hepatocelular (21). Para avaliar se existe uma associação entre a extensão da trombose intracoronariana e o dano no miocárdio, nós avaliamos os

níveis de D-dímero e cTnT em amostras de sangue obtidas de pacientes com suspeita de apresentarem lesões no miocárdio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 102 pacientes admitidos no serviço de emergência com suspeita clínica de apresentarem lesões no miocárdio. As amostras de sangue foram coletadas de cada paciente no momento da admissão no serviço de emergência através de punção venosa, sendo posteriormente transferidas para tubos sem anticoagulante ou para tubos contendo citrato trisódico 0,109 mol/L na proporção de nove partes de sangue para uma parte de citrato. O soro e o plasma foram obtidos após uma centrifugação a 2500 g durante 10 minutos. Os ensaios para a determinação do D-dímero e da cTnT foram realizados em amostras de plasma e soro, respectivamente. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

A determinação dos níveis de D-dímero foi realizada em amostras de plasma com a utilização do imunoensaio automatizado quantitativo Liatest D-dimer (Diagnostica Stago, Asnières, França). Partículas de microlátex em suspensão ligam-se covalentemente a dois anticorpos monoclonais complementares específicos para os produtos de degradação da fibrina. O ensaio ocorre a partir da mistura de 50 µL de plasma não-diluído com 100 µL do tampão de reação, sendo que a reação é iniciada com a adição de 150 µL de látex em suspensão. O teste é totalmente automatizado. A variação de absorbância, mensurada em 540 nm no analisador STA Compact (Diagnostica Stago, Asnières, França), é automaticamente avaliada durante 140 segundos e está diretamente relacionada à concentração de D-dímero na amostra. Os resultados são expressos em ng/mL de unidades equivalentes de fibrinogênio. Os resultados normais de D-dímero na população adulta normalmente são inferiores a 500 ng/mL.

Os níveis séricos de cTnT foram mensurados com a utilização de um imunoenensaio eletroquimioluminescente quantitativo (Troponin T STAT, Roche) no analisador automatizado Roche Elecsys 2010. Este ensaio está baseado no princípio sanduíche. A amostra, um anticorpo monoclonal biotinilado troponina T-específico e um anticorpo monoclonal troponina T-específico marcado com rutênio reagem entre si formando um complexo. Após a adição de micropartículas revestidas com estreptavidina, o complexo formado fixa-se à fase sólida através da interação da biotina e da estreptavidina. Esse complexo é aspirado para a célula de leitura onde as micropartículas são magneticamente capturadas pela superfície do eletrodo. As substâncias livres são então removidas. É aplicada uma voltagem sobre o eletrodo para que ocorra uma emissão quimioluminescente, a qual é mensurada por um fotomultímetro. Os resultados são determinados a partir de uma curva de calibração. O limite mínimo de detecção deste ensaio é 0,01 ng/mL (faixa de 0,01-25 ng/mL). Os valores de cTnT esperados para indivíduos saudáveis são inferiores a 0,01 ng/mL.

A associação entre os níveis de cTnT e D-dímero foi avaliada com a utilização do teste *t* Student e o grau de correlação entre os níveis de D-dímero e cTnT nos pacientes que apresentaram cTnT >0,01 ng/mL foi investigado por regressão linear. Os resultados estão expressos em media \pm erro padrão e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Este estudo demonstra uma associação entre os níveis de cTnT e D-dímero nos pacientes com suspeita de apresentarem lesões no miocárdio. Os níveis de D-dímero foram menores nos pacientes com cTnT <0,01 ng/mL do que naqueles que apresentaram cTnT >0,01 ng/mL (Tabela 1). Também foi investigado o grau de correlação entre os níveis de D-dímero de cTnT nos pacientes que apresentaram cTnT >0,01 ng/mL ($0,40 \pm 0,10$ ng/mL), mas não foi observado um grau significativo de correlação ($r=0,20$, $P > 0,05$) entre estes parâmetros (Figura 1). Embora os níveis de D-

dímero sejam elevados nos pacientes que apresentaram cTnT $>0,01$, essa elevação não é diretamente proporcional ao aumento dos níveis de cTnT.

Tabela 1.

Figura 1.

DISCUSSÃO

Embora estudos preliminares já tenham relatado a associação entre os marcadores hemostáticos e a cTnT, a investigação do grau de associação entre o D-dímero e a cTnT não está totalmente elucidada nas situações em que os níveis de cTnT estão significativamente elevados. A trombose intracoronariana desempenha um papel chave na patogênese do IAM. A formação do trombo ocorrida após a ruptura das placas de ateroma precede o desenvolvimento da necrose do miocárdio com a subsequente liberação de macromoléculas que originalmente estão presentes no miocárdio. Durante o desenvolvimento da trombose, a ativação da trombina precede a degradação da fibrina. Por outro lado, a ativação precoce da fibrinólise endógena pode limitar a extensão do infarto (10).

As tentativas mais promissoras para a detecção da trombose coronariana e suas complicações parecem envolver a mensuração plasmática dos marcadores de formação e degradação da fibrina (22). Os níveis de D-dímero estão significativamente mais elevados nos pacientes com isquemia do que naqueles sem isquemia, demonstrando ser um parâmetro útil para o diagnóstico do IAM no momento da admissão para aqueles pacientes que não apresentam elevação dos níveis de CK/CK-MB (23). Embora nós tenhamos relatado que os níveis de D-dímero estão elevados nos pacientes com cTnT $>0,01$, estas alterações não são diretamente proporcionais às variações de cTnT. Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de cTnT e D-dímero, sendo que nossos resultados demonstram que o grau de ativação da fibrinólise não está diretamente associado à extensão do dano no

miocárdio. É importante salientar que os níveis de D-dímero podem ser afetados por outros distúrbios, incluindo: embolia pulmonar, doença vascular cerebral, doença vascular periférica, insuficiência renal ou hepática (23). Em resumo, os níveis de D-dímero não apresentaram associação com os níveis de cTnT nos pacientes que apresentaram cTnT >0,01. Apesar disso, o D-dímero constitui um importante parâmetro complementar para a investigação das lesões do miocárdio devido à importância que a trombose intracoronariana desempenha na patogênese do IAM e de outros distúrbios cardíacos.

REFERÊNCIAS

1. Le Moigne F, Beauviex MC, Derache P, Darmon YM. Determination of myoglobin: comparative evaluation of the new automated VIDAS assay with two other immunoassays. *Clin Biochem* 2002;35:255-62.
2. Penttilä K, Koukkunen H, Kempainen A, et al. Myoglobin, creatine kinase MB, troponin T, troponin I - rapid bedside assays in patients with acute chest pain. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:93-101.
3. Plebani M, Zaninotto M. Cardiac markers: present and future. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:56-63.
4. Sarko J, Pollack CV. Cardiac troponins. *J Emerg Med* 2002;23:57-65.
5. Speth M, Seibold K, Katz N. Interaction between heparin and cardiac troponin T and troponin I from patients after coronary bypass surgery. *Clin Biochem* 2002;35:355-62.
6. Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; 44:1855-64.
7. Mullen JC, Bentley MJ, Scherr KD, et al. Troponin T and I are not reliable markers of cardiac transplant rejection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:233-37.
8. Apple FS, Falahati A, Paulsen PR, Miller EA, Sharkey SW. Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem* 1997;43:2047-51.

9. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, et al. Development and *in vitro* characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992;38:386-93.
10. Mair J, Genser N, Maier J, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B. Markers of activated coagulation for early diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1997;267:239-45.
11. Rowe CA, Bolitho JS, Jane A, et al. Rapid detection of D-dimer using a fiber optic biosensor. *Thromb Haemost* 1998;79:94-8.
12. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, et al. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med* 2001; 135:108-11.
13. Kovacs MJ, MacKinnon KM, Anderson D, et al. A comparison of three rapid D-dimer methods for the diagnosis of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2001;115:140-44.
14. Wilde JT, Kitchen S, Kinsey S, Greaves M, Preston FE. Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states. *Br J Haematol* 1989;71:65-70.
15. Flores J, Lancha C, Rodriguez EP, Avello AG, Bollo E, Frade LJG. Efficacy of D-dimer and total fibrin degradation products evaluation in suspected pulmonary embolism. *Respiration* 1995;62:258-62.
16. Perrier A, Desmarais S, Goehring C, et al. D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:492-96.
17. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, et al. Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:65-70.
18. Duet M, Benelhadj S, Kedra W, et al. A new quantitative D-dimer assay appropriate in emergency: reliability of the assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis. *Thromb Res* 1998;91:1-5.

19. Bounameaux H, Cirafici P, De Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991;337:196-200.
20. Kelley J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002;162:747-56.
21. Kim HK, Lee KR, Yang JH, et al. Plasma levels of D-dimer and soluble fibrin polymer in patients with hepatocellular carcinoma: a possible predictor of tumor thrombosis. *Thromb Res* 2003;109:125-29.
22. Ottani F, Galvani M. Prognostic role of hemostatic markers in acute coronary syndromes patients. *Clin Chim Acta* 2001;311:33-9.
23. Menown IBA, Mathew TP, Gracey HM, et al. Prediction of recurrent events by D-dimer and inflammatory markers in patients with normal cardiac troponin I (PREDICT) study. *Am Heart J* 2003;145:986-92.

Tabela 1. Níveis de cTnT e D-dímero obtidos nos pacientes avaliados

cTnT	<0,01	>0,01
n	56	46
D-dímero	1371 ± 234	3920* ± 1020

Os valores de D-dímero estão expressos em média ± erro padrão. * $P < 0,01$

Os resultados de cTnT e D-dímero estão expressos em ng/mL.

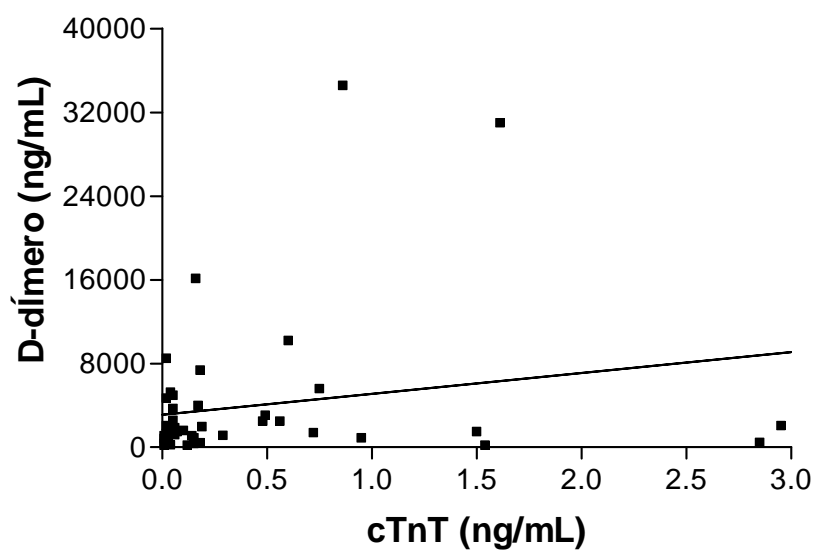


Figura 1. Associação entre os níveis de cTnT e D-dímero em pacientes com cTnT >0,01 ng/mL. Não foi observado um grau significativo de correlação ($r=0,20$, $P>0,05$).

CONCLUSÕES

- Os níveis plasmáticos de D-dímero obtidos com o Liatest D-dimer estão relacionados com os níveis de PDF determinados por aglutinação em látex, sendo que níveis de D-dímero ≥ 1420 ng/mL estão diretamente associados a resultados positivos de PDF.
- A determinação prévia dos níveis de PDF pode trazer contribuições para os laboratórios que possuem sistemas automatizados, uma vez que os níveis de D-dímero podem ser estimados antes da realização dos ensaios automatizados, reduzindo os custos com diluições de amostras quando estas se fizerem necessárias.
- O tempo de reação necessário para a detecção de PDF na técnica de aglutinação em látex foi inversamente proporcional aos níveis plasmáticos de D-dímero obtidos pela técnica imunoturbidimétrica Liatest D-dimer.
- Resultados normais de PDF (< 5 $\mu\text{g/mL}$) não excluem a possibilidade da presença de elevados níveis de D-dímero.
- Pacientes que apresentam lesões no miocárdio com a conseqüente elevação dos níveis de cTnT também apresentam elevação nos níveis plasmáticos de D-dímero, quando comparado àqueles que apresentam níveis normais de cTnT.
- Embora os níveis de D-dímero estejam elevados nos pacientes que apresentam cTnT $> 0,01$ ng/mL, não há uma relação direta entre os níveis de D-dímero e cTnT, demonstrando que o grau de trombose intracoronariana não é diretamente proporcional ao dano ocorrido no miocárdio.