

GILBERTO PEDRO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA NO CHOQUE HEMORRÁGICO  
CONTROLADO APÓS REPOSIÇÃO VOLÊMICA COM RINGER LACTATO, SANGUE  
TOTAL, PLASMA FRESCO CONGELADO E GLÓBULOS, EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. **Área de Concentração:** Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual. **Orientador:** Professor Dr. José Renan da Cunha Melo. **Coorientador:** Professor Dr. João Baptista de Rezende Neto.

BELO HORIZONTE

2014

Ver arquivo em anexo: ficha catalográfica

**GILBERTO PEDRO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA NO CHOQUE HEMORRÁGICO  
CONTROLADO APÓS REPOSIÇÃO VOLÊMICA COM RINGER LACTATO, SANGUE  
TOTAL, PLASMA FRESCO CONGELADO E GLÓBULOS, EM RATOS.**

PRESIDENTE DA BANCA:

Professor Dr. José Renan da Cunha Melo

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Professor Dr. Paulo Roberto Savassi Rocha

Professora Dra. Paula Martins

MEMBRO SUPLENTE

Professor Dr. Rafael Calvão Barbuto

## DEDICATÓRIA

À minha esposa, Alessandra Nascimento Rodrigues, companheira de todos os momentos, pelo amor, cuidado, compreensão, força e incentivo.

Aos meus pais, Joaquim Pedro Rodrigues, em memória, e Ana Nunes Rodrigues, exemplo de superação, persistência e otimismo.

Aos meus irmãos Gil Carlos, Gildilene e Valdir, pela amizade, companheirismo e torcida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. José Renan da Cunha Melo, por suas correções, sugestões, orientações, sempre com o rigor científico imprescindível. Minha referência pessoal de amor incondicional à medicina e à ciência.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. João Baptista de Rezende Neto, idealizador e mentor dessa pesquisa, cujo brilhantismo, competência, visão inovadora e contagiante do estudo do trauma consegue deixar tudo mais fascinante e estimulante.

Ao Professor Dr. Marcus Vinicius Melo de Andrade, por ter proporcionado fácil acesso ao Laboratório de pesquisa Professor Lineu Freire-Maia e, juntamente com os Professores José Renan e João Batista, condições materiais e instrumentais para a realização desta pesquisa.

Ao biotério do CPRR (FIOCRUZ) que nos forneceu os ratos para realização da pesquisa.

Aos acadêmicos do curso de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais: Thiago Assis Lisboa, Mário Gissoni de Carvalho Júnior e Maria Júlia Martins Silva, que sacrificaram noites, fins de semana e vários dias de férias, ajudando-me com os experimentos.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1	Choque hemorrágico .....	4
3.2	Reposição volêmica no trauma.....	5
3.2.1	Cristaloides .....	5
3.2.2	Coloides.....	9
3.2.3	Hemoderivados.....	10
3.2.4	Reanimação volêmica hipotensiva X normotensiva.....	12
3.3	Coagulopatia no trauma.....	14
3.4	Tromboelastometria.....	17
4.	MÉTODO .....	21
4.1	Animais .....	21
4.2	Anestesia e procedimento cirúrgico .....	22
4.3	Indução do choque hemorrágico .....	24
4.4	Reposição volêmica.....	25
4.5	Cronologia dos tempos cirúrgicos.....	27
4.6	Tromboelastometria .....	29
4.7	Coleta de sangue para o banco de plasma e glóbulos .....	30
4.8	Análise estatística .....	31
5.	RESULTADOS.....	33
5.1	Curvas de pressão arterial média .....	33
5.2	Reposição volêmica.....	34
5.3	Tromboelastometria .....	37
5.3.1	Tempo de coagulação (CT) .....	37
5.3.2	Tempo de formação do coágulo (CFT) .....	38
5.3.3	Ângulo Alfa (“ $\alpha$ ”).....	40
5.3.4	Firmeza máxima do coágulo (MCF).....	41
5.3.5	Lise do coágulo após 60 minutos (Ly60) .....	43

6.	DISCUSSÃO.....	45
6.1	Considerações sobre o método.....	45
6.1.1	Anestésicos.....	45
6.1.2	Modelo animal e choque hemorrágico.....	45
6.1.3	Esquemas de reposição volêmica.....	46
6.2	Curvas de pressão arterial.....	49
6.3	Tromboelastometria.....	51
6.3.1	Tempo de coagulação (CT).....	51
6.3.2	Tempo de formação do coágulo (CFT).....	52
6.3.3	Ângulo Alfa ("α").....	54
6.3.4	Firmeza máxima do coágulo (MCF).....	54
6.3.5	Lise do coágulo após 60 minutos (Ly60).....	56
6.4	Considerações finais sobre reposição volêmica, resposta hemodinâmica e tromboelastometria.....	57
6.5	Limitações do estudo.....	59
6.6	Perspectivas.....	61
7.	CONCLUSÕES.....	62
8.	REFERÊNCIAS.....	63
9.	ANEXOS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Traçado gráfico da ROTEM.....	19
Figura 2. Procedimento cirúrgico. 1- Cânula em veia jugular esquerda (seta esquerda), cânula inserida em carótida direita (seta direita), cateter plástico inserido na traquéia (seta central). 2- Laparotomia com fio Nylon 2-0 .....	23
Figura 3. Cronologia do experimento. ....	28
Figura 4. Resposta hemodinâmica ao choque e à reposição volêmica.....	34
Figura 5. Volume total de hemocomponentes e ringer lactado administrado aos animais. Esse gráfico foi construído com os dados da Tabela 3. ....	36
Figura 6. Volume total de ringer lactato administrado. * P < 0.05 NP-R vs todos outros grupos. ....	37
Figura 7. Representação da média $\pm$ DP do CT antes e após CH controlado. ....	38
Figura 8. Representação da média $\pm$ DP do CFT antes e após choque hemorrágico controlado.....	39
Figura 9. Representação gráfica da média $\pm$ DP do ângulo "α" antes e após CH controlado.....	41
Figura 10. Representação gráfica da média $\pm$ DP do MCF antes e após CH controlado.....	43
Figura 11. Representação gráfica da média $\pm$ DP do Ly60 antes e após CH controlado.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações dos parâmetros da ROTEM.....	20
Tabela 2: Variações do volume da reposição volêmica .....	26
Tabela 3. Volume de hemoderivados e ringer lactato utilizado na reposição volêmica.....	35
Tabela 4. Média $\pm$ DP dos valores do CT antes e após choque hemorrágico controlado.....	38
Tabela 5. Média $\pm$ DP dos valores do CFT antes e após choque hemorrágico controlado.....	39
Tabela 6. Média $\pm$ DP dos valores do ângulo alfa (" $\alpha$ ") antes e após CH controlado.....	40
Tabela 7. Média $\pm$ DP dos valores do MCF antes e após CH controlado. ....	42
Tabela 8. Média $\pm$ DP dos valores do Ly60 antes e após CH controlado. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

RV	Reposição volêmica
PFC	Plasma Fresco Congelado
GV	Glóbulos Vermelhos
ST	Sangue Total
CH	Choque hemorrágico
GC	Grupo controle
NP-R	Normotensivo reposição com ringer lactato
NP-R(1:1)	Normotensivo reposição com ringer, glóbulos e plasma 1:1
NP-R(1:2)	Normotensivo reposição com ringer, glóbulos e plasma 1:2
NP-R(1:3)	Normotensivo reposição com ringer, glóbulos e plasma 1:3
NP-ST	Normotensivo reposição com sangue total
CT	Tempo de Coagulação
CFT	Tempo de Formação do Coágulo
“ $\alpha$ ”	ângulo alfa
MCF	Firmeza máxima do coágulo
Ly60	Lise aos 60 minutos
ML	Lise Máxima
IC	Índice cardíaco
DO <sub>2</sub>	Oferta de oxigênio
VO <sub>2</sub>	Extração de oxigênio
ATLS	Suporte Avançado de Vida no Trauma
FNT $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
IL	Interleucina

HP	Hipotensão permissiva
TCE	Traumatismo crânio encefálico
PAM	Pressão arterial média
RL	Ringer Lactato
CAT	Coagulopatia aguda traumática
CPT	Coagulopatia precoce do trauma
TEG	Tromboelastografia
ROTEM	Tromboelastometria rotacional
CPRR	Biotério da Fiocruz
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VS	Volemia estimada
Biopac	Sistema de monitorização contínua da PAM
DP	Desvio-padrão
T0	Tempo 0
T1	Tempo 1
T2	Tempo 2
ISS	Sigla em inglês = Injury severity Score
tPA	Ativador de plasminogênio

## RESUMO

Pedro-Rodrigues, G. **Avaliação da coagulação sanguínea no choque hemorrágico controlado após reposição volêmica com ringer lactato, sangue total, plasma fresco congelado e glóbulos, em ratos.** 2014. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

**Introdução:** O desenvolvimento de alterações da coagulação é frequente no trauma grave e contribui significativamente para morbidade e mortalidade. Há controvérsias sobre qual o melhor esquema de reposição volêmica (RV) no trauma. Objetivamos avaliar diferentes taxas de transfusão de plasma fresco congelado (PFC) em relação a glóbulos (GV) e cristalóide no tratamento do choque hemorrágico (CH). **Método:** Ratos albinos machos (n=36) foram aleatorizados em 06 grupos: Grupo controle (GC); NP-R, reposição com ringer lactato (RL); NP-R(1:1), reposição com glóbulos e plasma 1:1; NP-R(1:2), reposição com glóbulos e plasma (1:2); NP-R(1:3), reposição com glóbulos e plasma (1:3) e NP-ST, reposição com sangue total. Todos os animais, exceto o grupo GC, foram submetidos a choque hipovolêmico controlado e a realização de tromboelastometria (teste NATEM do ROTEM) antes e após o choque. Para avaliação da coagulopatia foram examinados os seguintes parâmetros do ROTEM®: CT (tempo de coagulação), CFT (tempo de formação do coágulo), ângulo “ $\alpha$ ”, MCF (Firmeza máxima do coágulo) e Ly60 (lise 60). Análise de variância com pós teste de Turkey foi utilizada para comparação entre os grupos. **Resultados:** No processo que envolve a iniciação do coágulo (CT), não houve significância entre os grupos. Com relação à cinética do coágulo (CFT e “ $\alpha$ ”), os grupos NP-R e NP-R(1:3) apresentaram piora significativa do coágulo em comparação com os demais grupos. Em relação à força do coágulo (MCF), o grupo NP-R teve diferença em relação ao GC, Baseline, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST; e o NP-R(1:3) também foi significativo em relação ao GC, Baseline e NP-ST. Ly60 não apresentou diferença entre os grupos. **Conclusões:** Os esquemas de reposição volêmica com sangue total e com proporções de glóbulos e plasma 1:1 e 1:2 apresentaram menor alteração na coagulação e melhor resposta hemodinâmica à reposição volêmica.

## ABSTRACT

Pedro-Rodrigues, G. **Evaluation of blood coagulation on controlled hemorrhagic shock after volume replacement with ringer's lactate, whole blood, fresh frozen plasma and red blood cells, in rats.** 2014. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

**Background:** The development of coagulation disorders is frequent in severe trauma and contributes significantly to morbidity and mortality. There is controversy about the best volume replacement in trauma. We aimed to evaluate different blood component ratios and crystalloid in the treatment of hemorrhagic shock. **Methods:** Male albino rats ( n = 36 ) were randomized into 06 groups: SHAM, NP-R , replacement with ringer lactate (RL), NP-R (1:1), NP-R(1:2), NP-R(1:3) replacement with plasma:red blood cells 1:1, 1:2 e 1:3 respectively and NP-TB replacement with fresh whole blood (FWB). All animals, except the SHAM group, underwent to controlled hypovolemic shock followed by resuscitation with the type of fluids described above analyzed by thromboelastometry (NATEM test of the ROTEM®) before and after shock induction. For evaluation of the following parameters were examined at ROTEM®: CT (clotting time), CFT (clot formation time), “ $\alpha$ ” angle, MCF (maximum clot firmness) and Ly60 (lysis 60). Analysis of variance was done using Turkey post test for comparisons between groups. **Results:** In the process involving the initiation of clot (CT) no differences between groups were observed. Regarding the kinetics of clot (CFT and “ $\alpha$ ”), the NP-R and NP-R (1:3) groups were significantly worse when compared to the other groups. Regarding the clot strength (MCF) NP-R group was significantly worse when compared to SHAM, Baseline, NP-R (1:1), NP-R (1:2) and NP-TB. In addition the NP- R (1:3) was significantly worse as compared to SHAM, Baseline and NP-TB. Values for Ly60 did not vary among groups. **Conclusions:** The fluid resuscitation with whole blood or with plasma:red blood cells ratios of 1:1 and 1:2 are the best options to treat controlled hemorrhagic shock in rats as less clotting alterations and better hemodynamic responses are achieved when compared to RL or to other PFC:FFP ratios.

### 1. INTRODUÇÃO

O trauma grave é uma das principais causas de mortalidade no mundo (1). No Brasil, é a maior causa de morte na faixa etária dos 05 aos 39 anos (2). O choque hemorrágico está envolvido em 44% das mortes pré-hospitalares e 55% das mortes após a admissão hospitalar (3).

Há estimativas de que, no ano de 2020, ocorrerão mais de 8 milhões de mortes por traumatismos no mundo, sendo que aproximadamente 40% dessas mortes serão devido a choque hemorrágico (CH). Para melhor compreensão da fisiopatologia e visando procurar alternativas para o tratamento e redução da mortalidade dessa condição, vários estudos, experimentais e clínicos, têm sido realizados (4-9).

O presente estudo faz parte de linha da pesquisa, ora vigente, do laboratório de fisiopatologia cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFMG, que investiga a fisiopatologia e a resposta inflamatória decorrentes do choque hemorrágico experimental com ênfase nos distúrbios de coagulação relacionados ao trauma. Estudo clínico demonstrou que o uso de plasma fresco congelado (PFC) em altas proporções associado à transfusão de glóbulos (GV) reduziu a coagulopatia e a mortalidade em combatentes na guerra do Iraque (10). No entanto, há controvérsias sobre possível “viés de sobrevivência” entre aqueles soldados que receberam maiores taxas de PFC, pois, estudos realizados em vítimas de trauma civil, não conseguiram demonstrar os mesmos resultados obtidos no cenário militar (6, 11-13). Além disso,

há falta de estudos experimentais, clinicamente relevantes, comparando as diferentes proporções de PFC na reposição volêmica, de forma controlada.

Modelo experimental em animais de pequeno porte capaz de reproduzir os eventos do choque hemorrágico de forma clinicamente relevante foi desenvolvido para demonstrar os benefícios dos diferentes esquemas de reposição volêmica. No presente estudo, foi proposto investigar as diferentes proporções de PFC:GV e cristaloides na reposição volêmica como forma de tratamento do CH controlado em modelo experimental, usando ratos.

## 2. OBJETIVOS.

- a) Avaliar a resposta de reanimação volêmica com diferentes proporções de PFC:GV, sangue total e ringer lactato como forma de tratamento do choque hemorrágico controlado em ratos.
  
- b) Determinar qual o esquema de reposição volêmica, traz maior benefício para a qualidade do coágulo e melhor resposta a reanimação volêmica no choque hemorrágico controlado em ratos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Choque hemorrágico

Choque é definido como perfusão tecidual inadequada, causando déficit de oxigênio e de nutrientes para suprir as demandas metabólicas celulares. O desequilíbrio prolongado entre oferta e consumo de oxigênio resulta em hipóxia celular e desarranjo de processos bioquímicos celulares, que podem progredir para o nível sistêmico, culminando em morte celular, falência múltipla de órgãos e morte(14-17).

Os efeitos celulares incluem disfunção da bomba de íons na membrana celular, perda do conteúdo intracelular para o espaço extracelular e regulação inadequada do pH intracelular (16, 17).

Os efeitos sistêmicos incluem alterações no pH sanguíneo, disfunção endotelial, disfunção da cascata de coagulação, bem como maior estimulação das cascatas inflamatória e antiinflamatória (16-18).

No CH, a pressão arterial pode ser mantida em níveis próximos da normalidade, apesar da diminuição do volume intravascular e do comprometimento da contratilidade miocárdica, por meio de mecanismo compensatório baseado, principalmente, na vasoconstricção arteriolar periférica (19). Esta, no entanto, não

melhora o débito cardíaco nem a oxigenação tecidual, apesar de restabelecer parcialmente a pressão arterial (15).

A hipotensão é sinal tardio e pouco sensível de CH, havendo correlação direta entre a intensidade e duração da hipotensão com a mortalidade (19). A presença de hipotensão (definida como pressão arterial sistólica inferior a 90 mmHg, na fase pré-hospitalar do trauma) está associada à mortalidade inicial de 12% e tardia de 32%, enquanto pacientes sem hipotensão pré-hospitalar têm mortalidade global inferior a 20%. Quando a hipotensão persiste por mais de 120 minutos, a mortalidade atinge 50% dos pacientes. Os pacientes com pressão sistólica inferior a 70 mmHg nas primeiras 24 horas têm mortalidade superior a 60%. Além disso, a presença de hipotensão no período pré-hospitalar está relacionada à maior incidência de falência múltipla de órgãos e maior tempo de internação em unidade de terapia intensiva(20).

### **3.2 Reposição volêmica no trauma**

#### **3.2.1 Cristaloides**

As principais classes de fluidos para reposição volêmica são as soluções cristaloides, coloides e hemoderivados. A escolha do fluido de substituição depende, em parte, do tipo de líquido perdido (21).

A infusão de cristaloides durante o tratamento do CH tornou-se prática corrente a partir dos anos 50, com o avanço do conhecimento da sua fisiopatologia, principalmente pelos resultados obtidos em modelo de hemorragia em cães. Neste modelo, o choque hemorrágico era provocado pela aspiração de sangue por um cateter intravascular, com débito, volume e pressão arterial pré-fixados. O choque provocava acentuado déficit de líquido extracelular, e a permanência do estado de choque por períodos prolongados resultava em falência orgânica irreversível, mesmo após múltiplas transfusões de sangue. Concluiu-se que esse déficit poderia ser revertido com a infusão precoce de cristaloides, correspondente a três vezes o volume de sangue perdido (regra de 3:1) (22).

O CH passou a ser tratado com infusões maciças de cristaloides durante a Guerra do Vietnã (1959-1975). Comparada à Guerra da Coreia (1950-1953), a incidência de necrose tubular aguda foi drasticamente reduzida com essa estratégia. Entretanto, não houve redução da mortalidade global (23, 24). Se, por um lado, infusões maciças de cristaloides reduziram a incidência de insuficiência renal, o excesso de cristaloides contribuiu para o aumento da incidência de edema pulmonar não-cardiogênico, denominado na época de “Pulmão de Choque” ou pulmão de Dan-Nung que teve grande impacto na mortalidade após hemorragia grave (25).

Na década de 1980, com o avanço das técnicas de monitorização hemodinâmica, e a busca contínua pela manutenção da perfusão tecidual, passou-se a defender a “reanimação supranormal”, que estabelecia parâmetros hemodinâmicos acima dos níveis fisiológicos: índice cardíaco (IC) 50% maior que 4,5 l/(min. m<sup>2</sup>), oferta de oxigênio (DO<sub>2</sub>) maior que 600 ml/(min. m<sup>2</sup>), extração de

oxigênio ( $VO_2$ ) maior que 170 ml/(min.  $m^2$ ) e 500 ml de sangue a mais que a média normal para a superfície corporal (26).

Apesar dessa abordagem, ensaio clínico com 75 pacientes vítimas de CH mostrou que a mortalidade do grupo que recebeu reanimação supranormal foi igual ao do grupo controle. Portanto, não está comprovado que a reanimação supranormal reduz a mortalidade no trauma (27). Esse fato ocorre, em parte, devido ao aumento do dano celular induzido pelo excesso de oxigênio, substrato para a formação de radicais livres (19).

As diretrizes iniciais do ATLS recomendavam a infusão rápida de 2000 ml de ringer lactato (RL) como parte do protocolo de tratamento do choque hemorrágico. O objetivo era restaurar o volume intravascular e equilibrar a oferta de oxigênio com as demandas teciduais (28). A normalização da pressão arterial era um dos parâmetros para atingir esse objetivo. Essa orientação persistiu até recentemente. A partir das edições do protocolo de 2008 foram modificadas para reposição volêmica cautelosa antes do controle mecânico da hemorragia em vítimas de traumatismo penetrante no tronco (29, 30).

A reanimação maciça com cristaloides altera as funções pulmonar e celular, provoca alterações na resposta inflamatória e nos processos de coagulação (23, 31, 32). O aumento da pressão hidrostática capilar reduz a pressão oncótica intravascular e diminui a drenagem linfática pulmonar. Esses mecanismos, associados ao aumento da permeabilidade capilar causado pelo fenômeno de

isquemia-reperfusão, provocam deslocamento de plasma do espaço intravascular para o interstício pulmonar, prejudicando as trocas gasosas (33). A infusão volêmica intra-operatória de cristaloides superior a 20 ml/(kg.h) aumentou o risco de edema pulmonar não cardiogênico em quase quatro vezes quando comparada à infusão inferior a 10 ml/(kg.h) (34).

A sobrecarga de cristaloides altera a função celular, ao sobrepujar mecanismos intrínsecos que mantêm as células em estreitas faixas de volume. Aumento da pressão hidrostática e diminuição da osmolaridade extracelular provocam influxo de água através da membrana celular, diminuindo o pH citoplasmático e a concentração de proteínas, resultando em queda da fosforilação oxidativa, vital para a produção eficiente de energia (32).

A infusão excessiva de cloreto de sódio pode provocar acidose hiperclorêmica e agravar a acidose láctica frequentemente encontrada em pacientes em CH (32). A acidose diminui a contratilidade cardíaca, a sensibilidade das fibras cardíacas ao cálcio e ao AMP cíclico, e reduz a resposta adrenérgica aos agentes inotrópicos (35).

A resposta inflamatória é exacerbada pela sobrecarga de cristaloides. O edema celular ativa a fosfolipase A2, resultando em aumento da produção de prostaglandinas, lipoxigenase, leucotrienos e ácidos epoxieicosanóicos. A produção do fator de necrose tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) pelos macrófagos e a secreção de

interleucinas (IL-6, IL-8 e IL-10) pelo sistema retículo-endotelial são exacerbadas pela reanimação volêmica maciça no CH (32).

Reposições volumosas com cristaloides provocam coagulopatia por hemodiluição dos fatores de coagulação. Estudo retrospectivo com 8724 pacientes com trauma grave demonstrou coagulopatia na admissão hospitalar em 50% dos pacientes que receberam mais de três litros de líquidos por via intravenosa, enquanto a coagulopatia estava presente em apenas 10% dos pacientes que receberam menos de 500 ml de fluidos pré-hospitalares. Portanto, outros fatores inerentes ao trauma parecem estar relacionados aos distúrbios de coagulação (36).

### **3.2.2 Coloides**

Não existe superioridade comprovada das soluções coloides (albumina, dextran) em relação aos cristaloides para a reanimação volêmica no choque traumático (37, 38).

Os coloides efetivamente aumentam o volume intravascular e podem manter a pressão oncótica plasmática em níveis próximos da normalidade em comparação com os cristaloides. No entanto, revisão sistemática de ensaios clínicos comparando fluidos de reanimação volêmica mostrou que o uso de coloides não melhorou a mortalidade ou a morbidade dos pacientes vítimas de trauma, em comparação ao uso de cristaloides (38).

### 3.2.3 Hemoderivados

Ao longo dos séculos, o manejo da hemorragia foi transformado pela prática da transfusão alogênica, permitindo a correção do choque hemorrágico que até então era fatal. No entanto, a valorização dos efeitos potencialmente nocivos da hemotransfusão tem crescido ao longo dos tempos. A associação entre transfusão de sangue e infecção em pacientes traumatizados foi descrita no início de 1990 (39). Estudos subseqüentes identificaram que transfusão pós trauma era um preditor significativo de morbidade pulmonar, insuficiência de múltiplos órgãos, infecção e morte (40-43). O benefício relativo e o risco de transfusão constituem preocupação clínica e continuam a ser área em investigação, especialmente na procura das proporções ideais entre os hemocomponentes capazes de trazer maiores benefícios e menores riscos aos pacientes.

Utilização de PFC precocemente no trauma e em proporções iguais aos dos glóbulos e plaquetas (1:1:1) constitui material de estudos recentes (10). Combatentes da guerra do Iraque que necessitaram transfusões maciças tiveram redução de 50% na mortalidade com o uso dessa estratégia, mas, no cenário do trauma civil, a mesma abordagem não resultou em redução de mortalidade (11, 44).

A transfusão precoce de PFC (15 ml/Kg) visa prevenir ou tratar o mais precocemente possível a coagulopatia relacionada ao trauma, recentemente denominada, Coagulopatia Aguda Associada ao Trauma e Choque – ACoTS, a qual é multifatorial. A participação de outros fatores: trauma tecidual, hemodiluição,

hipotermia, acidose, inflamação e consumo de fatores da coagulação nessa alteração foi descrita (18, 45-50).

Outro problema enfrentado atualmente é o da estocagem dos hemoderivados. Apesar de o PFC apresentar efeitos benéficos na permeabilidade endotelial, na estabilidade vascular e na reanimação após choque hemorrágico em ratos, esses benefícios diminuem significativamente entre os dias 0 e 05 de estocagem (51). GV com tempo maior de estocagem também podem provocar alterações na microcirculação, diminuir a perfusão e aumentar a mortalidade (43, 52).

A determinação da melhor proporção entre PFC:GV e cristaloides a ser usada na reposição volêmica de vítimas de choque hemorrágico traumático, carece de estudos experimentais. Os dados até agora obtidos em estudos clínicos são, na maioria das vezes, retrospectivos e possuem variações importantes, interferindo de forma significativa nos resultados.

Resultados parciais de estudo prospectivo, observacional de cohort em andamento, parece demonstrar que as proporções entre PFC e glóbulos  $\geq 1:1$  não oferece qualquer vantagem adicional em relação às proporções 1:2 ou 3:4 e que os benefícios da terapia com plasma são limitados aos pacientes que já estão com coagulopatia (12).

A transfusão de sangue total no trauma civil é incomum. No entanto, em operações militares, desde a I Guerra Mundial, a transfusão de sangue total é freqüente (53). A base racional é que a transfusão em massa de apenas um dos componentes do sangue (por exemplo, os glóbulos) vai levar a deficiências dilucionais dos outros componentes (por exemplo, plaquetas, fatores de coagulação). Isto pode ser evitado pela transfusão de sangue total. A estratégia ideal de reanimação para doente com CH grave ainda está indeterminada e o uso de sangue total se justifica em certas circunstâncias militares (53, 54).

#### **3.2.4 Reanimação volêmica hipotensiva X normotensiva.**

Hipotensão permissiva (HP) é definida como a manutenção deliberada de níveis pressóricos mais baixos em pacientes com hemorragia grave, até que se obtenha controle definitivo do sangramento (5, 55). O objetivo é repor volume, restaurar o fluxo microvascular e o transporte de oxigênio, sem interferir nos mecanismos de hemostasia. No entanto, ainda existem controvérsias se, no trauma grave, deve-se fazer a reanimação normovolêmica ou hipovolêmica até que se consiga o controle definitivo da hemorragia.

Para alguns autores, a RV agressiva é potencialmente perigosa e a reposição com HP pode melhorar os resultados (56, 57). A reanimação hipotensiva causa menos sangramento abdominal do que a reanimação normotensiva e apresenta perfusão tecidual equivalente. (5). Os que adotam essa estratégia visam

RV suficiente para manter perfusão tecidual adequada, sem comprometimento da hemostasia.

Por outro lado, a HP é prejudicial aos pacientes com traumatismos cranioencefálicos (TCE), já que a hipotensão reduz a perfusão cerebral e aumenta a mortalidade (58).

As origens da HP remontam à época da Primeira Guerra Mundial. Em 1918, foi observado que pacientes com CH não-controlado perdiam mais sangue quando submetidos à reanimação volêmica maciça antes do controle do foco hemorrágico(59).

A maioria dos estudos considera HP como a manutenção da pressão sistólica entre 80 e 90 mmHg ou da pressão arterial média (PAM) entre 50 e 65 mmHg para pacientes previamente normotensos (55, 60). Infusões maciças de cristaloides podem provocar a expulsão de coágulos formados nos vasos lesados, especialmente nos primeiros minutos após o trauma, quando estes ainda estão vulneráveis devido à exígua trama de fibrina (61). Modelo experimental de choque hemorrágico arterial não-controlado demonstrou que os animais ressangravam ao atingirem PAM de  $64 \pm 2$  mmHg após reposição volêmica com ringer lactato (RL). Esse achado é explicado pela lei de Laplace: o aumento radial do vaso eleva, em proporção direta, a tensão sobre as paredes do mesmo e, conseqüentemente, sobre o coágulo (33, 46, 62).

### 3.3 Coagulopatia no trauma

Alterações da coagulação são freqüentes no trauma grave e contribuem, significativamente, para morbidade e mortalidade (63). A hemorragia é causa de 40% de todas as mortes por trauma (63). No ambiente pré-hospitalar, a hemorragia não controlada é a segunda causa de morte, perdendo apenas para as lesões do sistema nervoso central (64) e é a primeira causa de morte precoce do trauma grave no ambiente intra-hospitalar (63). Entre 25% a 35% dos pacientes vítimas do trauma civil apresentam coagulopatia no momento da chegada à unidade de emergência apesar da redução do tempo entre o trauma e o início do tratamento (36, 65, 66).

A coagulopatia pode ser resultado de desarranjos fisiológicos tais como acidose, hipotermia ou hemodiluição relacionada com a administração de fluidos ou de hemoderivados. No entanto, a coagulopatia aguda também pode ocorrer independentemente da presença desses fatores no trauma grave (65, 67). Vários termos para se referir ao estado de coagulopatia aguda têm sido utilizados: coagulopatia aguda traumática (CAT), coagulopatia precoce do trauma (CPT), coagulopatia induzida pelo trauma e coagulopatia aguda do trauma e do choque (CoATS)(44, 65, 67, 68).

A perfusão tecidual inadequada em pacientes com choque hipovolêmico leva à acidose metabólica, que pode ser agravada por excesso de cloreto dos fluidos administrados e por hemocomponentes pobres em fatores de coagulação. A acidose provoca alteração da coagulação demonstrável em modelos experimentais com PH

< 7,2 por interferir com a montagem de complexos de fatores de coagulação que envolve o cálcio e fosfolípidios de carga negativa (69-71). No entanto, a correção da acidose por si só nem sempre corrige a coagulopatia associada ao trauma, o que indica que a lesão de tecidos provoca coagulopatia por meio de mecanismos adicionais (72, 73).

A hipotermia em pacientes feridos é classificada em leve (36°C a 34°C), moderada (34°C a 32° C) e grave (<32°C) (74). A hipotermia após a lesão é devida à exposição ao frio no momento da lesão, durante o transporte e durante o exame; e é agravada pela administração de fluidos intravenosos frios. A hipotermia é um preditor independente de mortalidade fraco (74-76), porém, acidose e hipotermia são sinérgicos em relação ao aumento da mortalidade(77). O efeito da hipotermia na coagulação inclui a disfunção das plaquetas e função enzimática diminuída (78, 79).

Estudos *in vitro* e em voluntários saudáveis demonstraram que RV generosa com cristalóide, colóide e concentrados de hemácias leva à diluição de proteínas de coagulação (80-82). Outros estudos mostraram que, apesar do peso da contribuição da hemodiluição, existem fatores inerentes ao próprio trauma que levam à chamada coagulopatia aguda relacionada ao trauma (36, 67).

Outro fator que contribui com a coagulopatia é o tempo de armazenamento dos concentrados de hemácias, que sofrem alterações funcionais e estruturais progressivas ao longo do tempo. As lesões de armazenamento incluem a diminuição do PH, a quelação do cálcio, os baixos níveis de 2,3 difosfoglicerato e diminuição da

concentração de fatores de coagulação. A transfusão de sangue com maior tempo de estocagem pode prejudicar ainda mais a perfusão microvascular e tem efeitos inflamatórios e imunomoduladores (83, 84). Vários estudos sugerem que transfusão de glóbulos com tempo de armazenamento prolongado está associada a maiores morbidade e mortalidade (85, 86), mas esta continua sendo área de controvérsia e investigação (87).

Coagulopatia associada ao trauma é deficiência da hemostasia caracterizada pelo desarranjo da ativação da fibrinólise que ocorre logo após a lesão, sendo bioquimicamente independente da presença de acidose metabólica, hipotermia ou hemodiluição. O risco de CAT aumenta com a presença de hipotensão, com a gravidade do trauma e com o TCE (45, 65, 88).

Estudos experimentais sugerem que a ativação da via da proteína C é o principal componente da CAT, que ocorre quando há lesão tecidual e choque (45, 89). A proteína C, um anticoagulante sistêmico, é convertida para proteína C ativada por meio do complexo da trombina com a trombomodulina. A proteína C ativada é uma protease sérica que inativa os fatores Va e VIIIa e esgota os inibidores do plasminogênio (90, 91). A proteína C ativada atua, a princípio, como proteção por inibição da trombose durante períodos de diminuição do fluxo.

A hipoperfusão sustentada aumenta os níveis de trombomodulina, aumentando a disponibilidade de trombina ligada a trombomodulina (45). Assim a trombina é desviada de sua função pró-coagulante para fazer um papel patológico

anticoagulante, ao ativar a proteína C em excesso (45). A inibição da proteína C mediada por anticorpos em um modelo animal mostrou ser capaz de impedir o desenvolvimento de CAT em resposta ao trauma e choque hemorrágico (90).

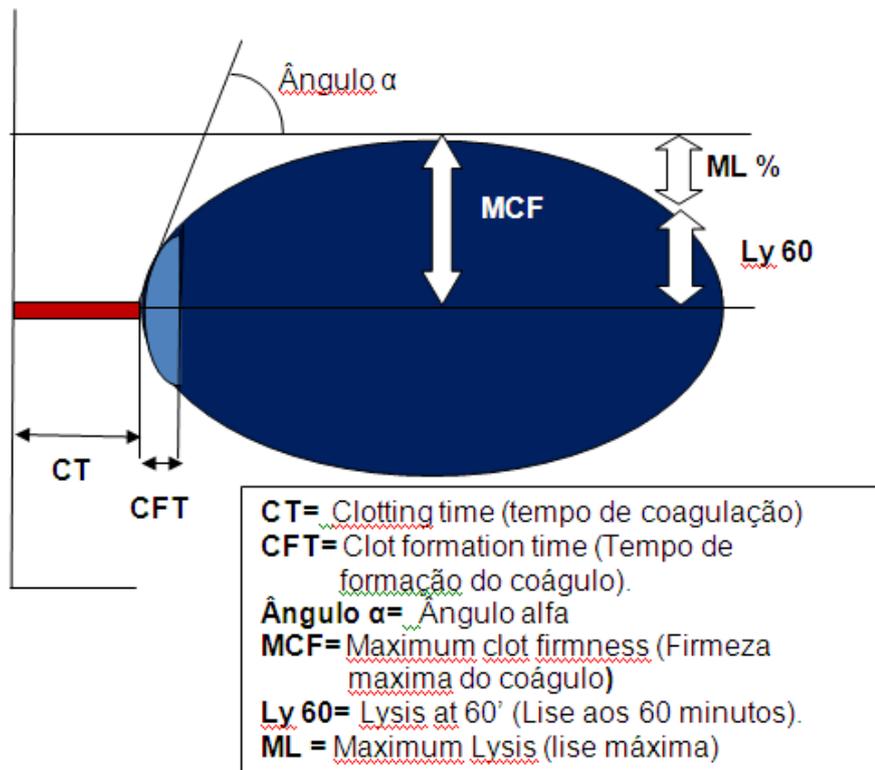
### **3.4 Tromboelastometria**

A tromboelastografia (TEG) foi primeiramente descrita por Hartet, em 1948 (92), como método para avaliar a função hemostática. Posteriormente, surgiu uma evolução da TEG que é a tromboelastometria rotacional (ROTEM®) (93). Ambos utilizam os mesmos princípios descritos por Hartet. A diferença entre eles é o mecanismo rotacional. Na TEG, o que movimenta é o recipiente com sangue, enquanto, na ROTEM, o que movimenta é um pino central. Neste caso, o recipiente com sangue serve apenas como estação imóvel. Isso trouxe mais estabilidade ao sistema, já que qualquer vibração no recipiente com sangue pode provocar alterações na TEG (94, 95).

A tromboelastometria avalia as propriedades viscoelásticas desde o início da formação do coágulo até o processo de fibrinólise, evidenciando a contribuição dos vários elementos que fazem parte do processo de coagulação (96, 97). Os testes que avaliam a viscoelasticidade do coágulo (TEG ou ROTEM), permitem identificar, precocemente, qual fator e/ou componente da coagulação está em déficit, permitindo corrigi-lo antes que ocorra o distúrbio de coagulação (98, 99).

Em vários estudos de coorte foi observado que a utilização destes testes para indicar hemotransfusões está associada à redução das indicações de transfusões de hemoderivados, menores efeitos colaterais associada a estas transfusões e melhores resultados na correção da coagulopatia (100, 101). Esses resultados foram confirmados por ensaio clínico prospectivo e randomizado recente em paciente de pós operatório de cirurgia cardíaca, que demonstrou redução da necessidade de transfusão, menores custos e efeitos adversos associados com hemotransfusões, bem como melhores resultados, incluindo redução da mortalidade(102).

A tromboelastometria fornece apresentação gráfica da formação do coágulo e da subsequente lise (ver Figura 1). O sangue é aquecido a 37° e colocado em um copo suspenso dentro do qual há um pino ligado a um sistema detector. O pino faz uma rotação de 4°, 45'. A resistência nesse processo de rotação é transmitida ao detector e ocorre a formação de um traçado, que é dividido em partes. Cada parte reflete estágios do processo hemostático (tempo de coagulação, a cinética do coágulo, a força do coágulo e a lise) (103).



**Figura 1. Traçado gráfico da ROTEM**

A Tabela 1, na página seguinte, mostra a relação dos principais parâmetros da tromboelastometria, o processo enzimático envolvido e as anormalidades que podem interferir nos estágios referidos.

Tabela 1. Especificações dos parâmetros da ROTEM.

Fase do coágulo	Parâmetro (ROTEM)	Definição no gráfico	Estágio enzimático	Alterações
Iniciação do Coágulo	CT (Clotting time)	Tempo até a linha atingir 2mm de amplitude.	Ativação precoce da cascata de coagulação	Aumentado: deficiência de fatores de coagulação, anticoagulantes e hipofibrinogenemia. Diminuído: estados de hipercoagulabilidade.
Cinética do coágulo	CFT (Clot formation time)	Tempo de 2mm até 20mm amplitude.	Potencialização do coágulo por ativação de plaquetas e clivagem do fibrinogênio mediada pela trombina	Aumentado: deficiência de fatores de coagulação, hipofibrinogenemia, trombocitopenia e disfunção plaquetária.
	“α”(Ângulo alfa)	Ângulo da linha que tangencia de 2 a 20mm		Anormalmente baixos em deficiências de fatores de coagulação, hipofibrinogenemia, trombocitopenia e disfunção plaquetária.
Força do Coágulo	MCF (Maximal Clot Firmness)	Amplitude medida no pico de força do coágulo	Força máxima do coágulo alcançada via interações de plaquetas e fibrina mediada por GP IIb/IIIa	Anormalmente baixos em hipofibrinogenemia, trombocitopenia ou disfunção plaquetária.
	MCE (Maximal Clot elasticity)	Calculado a partir da amplitude máxima.		Anormalmente elevado em hipercoagulabilidade plaquetária.
Lise do Coágulo	Ly 60 (Lysis at 60 min)	% perda de amplitude a partir da amplitude máxima	Ativação do sistema fibrinolítico	Anormalmente elevado em hiperfibrinólise enzimática ou mecânica.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos albinos machos, pesando entre 200 e 300g, (distribuídos de forma homogênea entre os grupos), alimentados *ad libitum* com ração própria (Purina® Ratochow, Caxias-RS) e alojados em gaiolas de 35 x 45 x 15 cm (quatro animais em cada gaiola). Os animais foram mantidos em temperatura de 25°C, sendo alocados, por meio de tabela de números aleatórios, em seis grupos de seis animais cada: G1) Grupo controle (GC), no qual, só não foi realizado o choque e a reposição volêmica; G2) normotensivo reposição com ringer lactato - (NP-R); G3) normotensivo reposição com ringer lactato, glóbulos e plasma fresco (1:1) - (NP-R 1:1); G4) normotensivo reposição com ringer lactato, glóbulos e plasma fresco (1:2) – (NP-R 1:2); G5) normotensivo reposição com ringer lactato, glóbulos e plasma fresco (1:3) – (NP-R 1:3); G6) normotensivo reposição com sangue total (NP-ST). Os animais que morreram durante o experimento foram excluídos e substituídos.

Os animais utilizados foram fornecidos pelo biotério do CPRR (FIOCRUZ) e hospedados no biotério da Faculdade de Medicina (UFMG), após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição (CETEA), Protocolo 193/2011, em anexo.

## 4.2 Anestesia e procedimento cirúrgico

Os animais, incluindo os do GC, foram anestesiados com 60 mg/kg de cetamina (Rhabifarma Indústria Farmacêutica LTDA., Hortolândia-SP) associada a 15 mg/kg de xilazina (Rhabifarma Indústria Farmacêutica LTDA., Hortolândia-SP) por via intraperitoneal. Durante os experimentos, os animais mantiveram plano anestésico superficial (ventilação espontânea) com bolus de 2,5 mg de cetamina associado a 1 mg de xilazina, via endovenosa, conforme a necessidade.

Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal, com os quatro membros presos à placa de madeira de 20 x 15 cm por fita adesiva. A região cervical foi incisada com tesoura e a traquéia dissecada e intubada com cateter plástico 14G (Smiths Medical do Brasil Produtos Hospitalares, São Paulo – SP) cortado de modo a medir 2,5 cm de comprimento.

A veia jugular esquerda e a artéria carótida direita foram dissecadas, ligadas distalmente e canuladas com cateteres plásticos 24G (Smiths Medical do Brasil Produtos Hospitalares, São Paulo – SP). O lúmen de cada cateter foi preenchido previamente com solução salina a 0,9%.

A cânula inserida na artéria carótida direita foi acoplada a um conector de três vias, sendo um dos orifícios conectado a uma seringa de 1 ml, posteriormente utilizada para induzir o CH por aspiração de sangue, e o outro orifício foi conectado

ao sistema Biopac (Biopac Systems Inc., CA-USA) por meio de transdutor de pressão para registro contínuo da PAM e da frequência cardíaca.

A cânula inserida na veia jugular esquerda, foi conectada a uma seringa de um ml, utilizada para fazer as reposições volêmicas, transfusões e eventuais doses de repique de anestésico.



**Figura 2. Procedimento cirúrgico.** 1- Cânula em veia jugular esquerda (seta esquerda), cânula inserida em carótida direita (seta direita), cateter plástico inserido na traquéia (seta central). 2- Laparotomia com fio Nylon 2-0

Em todos os animais dos grupos descritos no item 4.1, foi retirado um ml de sangue através do cateter da artéria carótida, colocado em frasco contendo citrato de sódio 3,2%, sendo realizada, imediatamente, a trombelastometria basal no Rotem® Coagulation analyzer (Pentapharm, Munich, Alemanha). Esse volume inicial

retirado para tromboelastometria, fez parte do volume de sangue retirado para choque, exceto no GC, porque, nesse grupo, os animais não foram submetidos a choque hipovolêmico. No final do experimento, foi retirado ,também, um ml de sangue para tromboelastometria final, o qual, por razões óbvias, não foi contabilizado no volume de sangue retirado para o chocar os animais.

### **4.3 Indução do choque hemorrágico**

Após esperar por cerca de três minutos em monitorização contínua da PAM no Biopac, foi anotado o valor da PAM basal.

Para simulação do trauma, todos os animais foram submetidos a laparotomia mediana medindo quatro centímetros, mobilização de alças intestinais por cerca de 60 segundos e, em seguida, foi realizada sutura contínua da parede abdominal, em plano único, com fio nylon 2-0 (Polysuture®, São Sebastião do Paraíso-MG).

No grupo controle, foram feitos todos os procedimentos, exceto o choque hemorrágico e a reposição volêmica. Assim, todos os grupos, exceto o grupo GC, foram submetidos ao CH controlado por 15 minutos. O sangue foi retirado através do acesso da artéria carótida direita.

Para realização do choque hipovolêmico foi calculada, inicialmente, a volemia estimada (VS) de cada animal pela fórmula ( $VS = 0,06 \times \text{Peso (g)} + 0,77$ ).

Foi realizada hemorragia de 40% da VS durante 15 minutos, sendo retirada 25% da VS de imediato e de forma contínua e o restante retirada de maneira intercalada a medida que havia uma recuperação espontânea da PAM, com o intuito de diminuir a mortalidade durante o choque e manter o animal chocado nesse período de 15 minutos, denominado de Tempo – T1. O volume de um ml de sangue, retirado de cada animal para se fazer a tromboelastometria inicial, foi incluído no volume de sangue a ser retirado para se fazer o choque hipovolêmico. O choque foi definido pela redução da PAM calculado pela fórmula (PAM BASAL X 0,45).

#### 4.4 Reposição volêmica

Após os primeiros 15 minutos, foi iniciada a fase de reposição volêmica (Tempo – T2), conforme definida para cada grupo. Esta fase perdurou por 90 minutos e a PAM foi anotada a cada 05 minutos.

Esta fase foi iniciada, sempre, com a infusão de bolus de RL (10ml/kg) em temperatura ambiente, pelo cateter conectado à jugular. O bolus de RL foi infundido, manualmente, em um tempo total de três minutos e 10 segundos (variando  $\pm$  cinco segundos).

Após o *bolus* inicial de RL, foi iniciada, imediatamente, a reposição dos hemoderivados, mantendo um volume total de 30ml/kg (nos grupos em que houve variação da relação entre plasma e glóbulos foi administrado ringer lactado para manter o volume de 30ml/kg), conforme mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2: Variações do volume da reposição volêmica**

Grupos	Bolus Ringer (ml/kg)	Plasma (ml/kg)	Glóbulos (ml/kg)	Ringer (ml/kg)	Sangue total (ml/kg)	Ringer - NP*
GC	0	0	0	0	0	0
NP-R	10	0	0	30	0	variável
NP-R(1:1)	10	15	15	0	0	variável
NP-R(1:2)	10	7,5	15	7,5	0	variável
NP-R(1:3)	10	5	15	10	0	variável
NP-ST	10	0	0	0	30	variável

\* Ringer – NP: Volume de ringer administrado para manter pressão normovolêmica. GC: grupo controle; NP-R: reposição só com ringer lactato; NP-R(1:1): reposição com plasma:glóbulos 1:1; NP-R(1:2): reposição com plasma:glóbulos 1:2; NP-R(1:3): reposição com plasma:glóbulos 1:3 e NP-ST: reposição com sangue total.

Nos grupos que receberam plasma e glóbulos: NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-R(1:3), o volume de glóbulos sempre foi constante (15ml/kg), e o volume de plasma variou, sendo 15ml/kg, 7,5ml/kg e 5ml/kg respectivamente. A transfusão de glóbulos sempre foi feita antes do plasma. O término da infusão dos hemoderivados foi completado em até, no máximo, 45 minutos após o início de T2.

Após o início das reposições volêmicas, a PAM dos animais foi mantida normal (normotensiva). Foi considerada PAM normal as variações iguais ou acima do valor calculado pela seguinte fórmula (Normotensivo = PAM Basal X 0,8). Após o término da administração dos volumes calculados para cada grupo, se algum animal apresentasse pressão arterial menor que 80% da pressão basal, era administrado RL para manter a pressão igual ou acima desse valor.

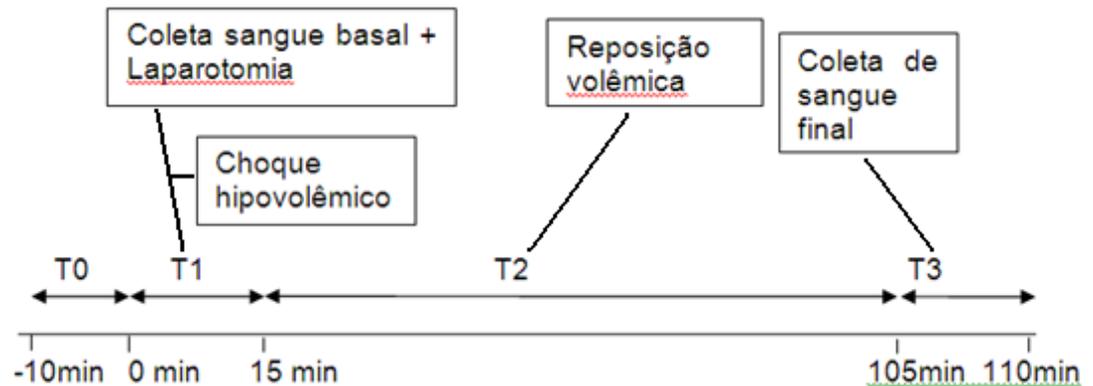
A temperatura dos animais foi mantida normal durante todo o experimento, por meio de aquecimento externo com lâmpada incandescente. A primeira medida, verificada logo após anestésiar o animal, foi considerada a temperatura basal. Foi adotada como temperatura normal a temperatura basal  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . A temperatura dos animais foi anotada aos 30, 60 e 90 minutos de experimento.

#### **4.5 Cronologia dos tempos cirúrgicos**

A razão da escolha dos tempos utilizados nos experimentos tem fundamento na simulação do que ocorre nos traumatismos em humanos, a saber – T0 = tempo até a chegada da equipe de resgate ao local do acidente; T1 = primeiro atendimento e obtenção de acesso venoso; T2 = tempo de reanimação volêmica, de transporte do acidentado até o hospital, de entrada na sala de emergência, até o controle vascular da lesão por cirurgia; T3 = refere-se aos cinco minutos que se seguem a T2, necessários para avaliação laboratorial e hemodinâmica das alterações causadas pelo CH e pelos métodos de reanimação utilizados.

O intervalo T2, com duração de 90 minutos, refere-se ao período de reanimação volêmica diante do CH controlado. Como visto, simula o período de tempo gasto pelas equipes de resgate durante a remoção do traumatizado até o centro de trauma, somados ao período pré-operatório na sala de emergência e operatório até o controle vascular da lesão. O tempo T3 refere-se aos cinco minutos que se seguem após T2, nos quais se colhe o sangue para realização da ROTEM

final (ver Figura 3). Os animais que sobreviveram à coleta de sangue para o exame foram eutanasiados por sobredose de anestésicos.



**Figura 3. Cronologia do experimento.**

Sequência resumida dos momentos realizados no experimento:

- a) Preparo dos hemoderivados a serem transfundidos conforme item 4.7;
- b) Anestesia do animal conforme item 4.1;
- c) Medida e anotação da temperatura basal via retal;
- d) Cirurgia do animal conforme item 4.2;
- e) Conexão do cateter da carótida direita ao sistema Biopac conforme item 4.2;
- f) Após 03 a 05 minutos da etapa anterior, verificação e anotação da PAM basal;
- g) Cálculo do volume de sangue a ser retirado para indução do CH no animal conforme item 4.3;

- h) Cálculo do valor da PAM a ser reduzida para ser considerado choque hipovolêmico conforme item 4.3;
- i) Cálculo do valor da pressão normal conforme item 4.4;
- j) Coleta do sangue para tromboelastometria basal, laparotomia e indução do choque por 15 minutos conforme item 4.3,
- k) Anotação da PAM de cinco em cinco minutos até 105 minutos após o início do CH;
- l) Início da reposição volêmica após 15 minutos de choque conforme o item 4.4;
- m) Retirada de 1ml de sangue pela carótida direita para realização da tromboelastometria final aos 105 minutos de experimento.

#### **4.6 Tromboelastometria**

Como descrito anteriormente, a tromboelastometria foi realizada em dois momentos. O primeiro, considerado tromboelastometria basal, realizado logo após monitorização do animal; e o segundo no final do experimento, considerado tromboelastometria final.

Para avaliação dos distúrbios de coagulação foi utilizado o aparelho de tromboelastometria (ROTEM<sup>®</sup>, TEM Innovations, Munich, Germany) e realizado o teste NATEM com o reagente Star-tem<sup>®</sup> (Ref. No 503-01 – 0,2mol/l CaCl<sub>2</sub> em

solução tampão HEPES com pH 7,4 e azida de sódio a 0,1%, armazenados em frascos de vidro).

No final do exame foram anotados todos os dados da tromboelastometria e utilizados os seguintes dados para análise do coagulograma: tempo de coagulação, tempo de formação do coágulo, ângulo alfa, firmeza máxima do coágulo e lise aos 60 segundos.

#### **4.7 Coleta de sangue para o banco de plasma e glóbulos**

Vinte e quatro ratos machos (Wistar) pesando entre 200 a 300g foram utilizados para a formação do banco de PFC e de GV. Os animais foram alojados em gaiolas de 35 x 45 x 15 cm (quatro animais em cada gaiola) e mantidos em temperatura de 25°C.

No mesmo dia do início do experimento, em cujos grupos foram necessárias reposições com glóbulos, plasma ou sangue total - NP-R(1:1), NP-R(1:2); NP-R(1:3) e NP-ST), um animal foi anestesiado com 60 mg/Kg de cetamina associada a 15 mg/Kg de xilazina por via intra-peritoneal. Em seguida, a artéria carótida direita foi dissecada, ligada distalmente e canulada com cateteres plásticos 24G (Smiths Medical do Brasil Produtos Hospitalares, São Paulo – SP). O sangue foi aspirado através do cateter da artéria carótida e colocado imediatamente em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio a 3,2%. O tubo foi centrifugado a 2000 RPM, por 19 minutos, e o plasma sobrenadante, sem o “buffy coat” (camada rica em plaquetas e

leucócitos), foi colocado em frascos de dois ml para armazenagem, a - 4 °C, até o momento da reposição volêmica. A camada de GV foi colocada em frascos siliconados de dois ml, a 37°C, para imediata transfusão nos animais dos grupos descritos no item 4.1 e, em seguida, foi realizada a infusão do PFC. Todos os animais do grupo da coleta de sangue para armazenamento foram mortos por sangria sob anestesia geral.

#### 4.8 Análise estatística

Utilizou-se teste t de Student para comparação entre as médias de dois grupos e análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações entre médias de mais de dois grupos, com valores de  $p \leq 0,05$  sendo considerados estatisticamente significantes.

Os resultados foram expressos em tabelas e figuras como médias  $\pm$  desvios-padrões (DP). Gráficos contendo médias e erros-padrão foram anexados. O modelo estatístico utilizado para o estudo foi:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = valor assumido para a variável em estudo no i-ésimo nível do fator combinação entre grupo e medida em estudo;

$\mu$  = efeito geral da média;

$\tau_i$  = efeito do i-ésimo nível do fator fixo (combinação entre grupo e medida);

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório.

Foi suposto que erros aleatórios ~~eram~~ eram independentes e identicamente dispostos com distribuição normal, média zero e variância constante. Foram feitas comparações múltiplas de Tukey quando observadas diferenças entre os níveis do fator, com intuito de detectar onde estas se encontravam.

Quando as variáveis não atendessem às suposições anteriores e nenhuma transformação aritmética pudesse ser empregada com sucesso, a análise prosseguia com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curvas de pressão arterial média

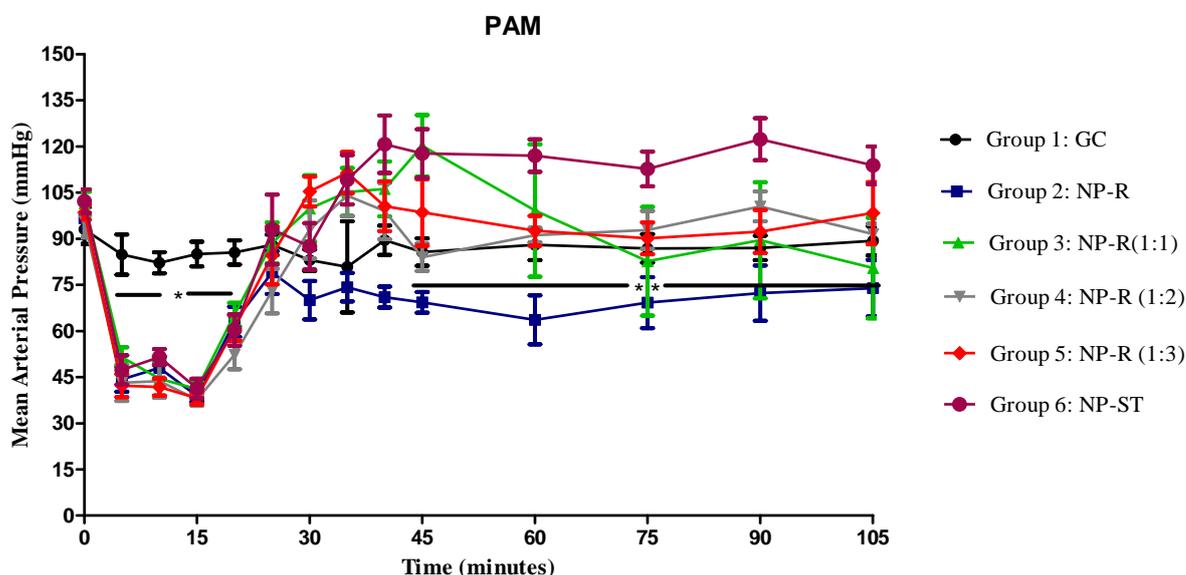
A PAM basal entre os grupos submetidos a CH apresentou redução igual ou inferior ao definido pela fórmula ( $PAM\ BASAL \times 0,45$ ), caracterizando o choque hipovolêmico conforme definido no item 4.3. (Figura 4)

A PAM basal foi de  $97,39 \pm 1,6$  mmHg e não houve significância estatística entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Após a retirada de sangue, os animais de todos os grupos apresentaram queda da PAM em comparação ao GC, com média de  $42,1 \pm 1,1$  mmHg vs  $84,2 \pm 2,6$  mmHg ( $P < 0,05$ ).

Além disso, a hipotensão persistiu pelos primeiros 20 minutos após o choque hemorrágico em comparação ao grupo GC, respectivamente  $60,9 \pm 2,2$  mmHg vs  $88 \pm 3,3$  mmHg ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças significantes entre os grupos após este período. No entanto, a partir dos 45 minutos em diante, a PAM foi persistentemente mais baixa no grupo NP-R (RL apenas), comparado a todos os outros grupos, apesar da infusão contínua de RL, respectivamente  $69,3 \pm 3,4$  mmHg vs.  $101,6 \pm 4,5$  mmHg ( $P < 0,05$ ).

Não houve diferença significativa no volume médio de sangue retirado dos animais dos grupos submetidos ao CH ( $5,8 \pm 0,2$  ml;  $p > 0,05$ )

Três animais morreram aos 10 minutos da fase choque hemorrágico, antes da reanimação hemodinâmica. Dois animais morreram durante a reanimação no G2 (RL) aos 40 e aos 60 minutos. Um animal morreu durante a reposição volêmica no G3 (1:1) e um no G6 (sangue total), ambos aos 50 minutos; e outro morreu no G5 (1:3) aos 100 minutos ( $p>0,05$ ).



**Figura 4. Resposta hemodinâmica ao choque e à reposição volêmica.**

PAM: Pressão arterial média. Reposição volêmica iniciada aos 15 minutos. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão (6 animais por grupo). \*ANOVA  $P < 0,05$ , em comparação Baseline (valores basais) e Grupo GC (grupo controle); \*\*ANOVA  $P < 0,05$ , Grupo NP-R em comparação com o Baseline e todos os outros

## 5.2 Reposição volêmica

O volume das transfusões de hemoderivados e de RL utilizado na reposição volêmica está especificado na Tabela 3 abaixo:

**Tabela 3. Volume de hemoderivados e ringer lactato utilizado na reposição volêmica.**

Grupos	Bolus Ringer (ml/kg)	Plasma (ml/kg)	Glóbulos (ml/kg)	Ringer (ml/kg)	Sangue total (ml/kg)	Ringer - NP* (ml/kg)
GC	0	0	0	0	0	0,0
NP-R	10	0	0	30	0	97,8
NP-R(1:1)	10	15	15	0	0	1,4
NP-R(1:2)	10	7,5	15	7,5	0	4,4
NP-R(1:3)	10	5	15	10	0	7,2
NP-ST	10	0	0	0	30	0,0

\* Ringer – NP= Volume de ringer lactado utilizado para manter a pressão normovolêmica, após as reposições iniciais estabelecidas.

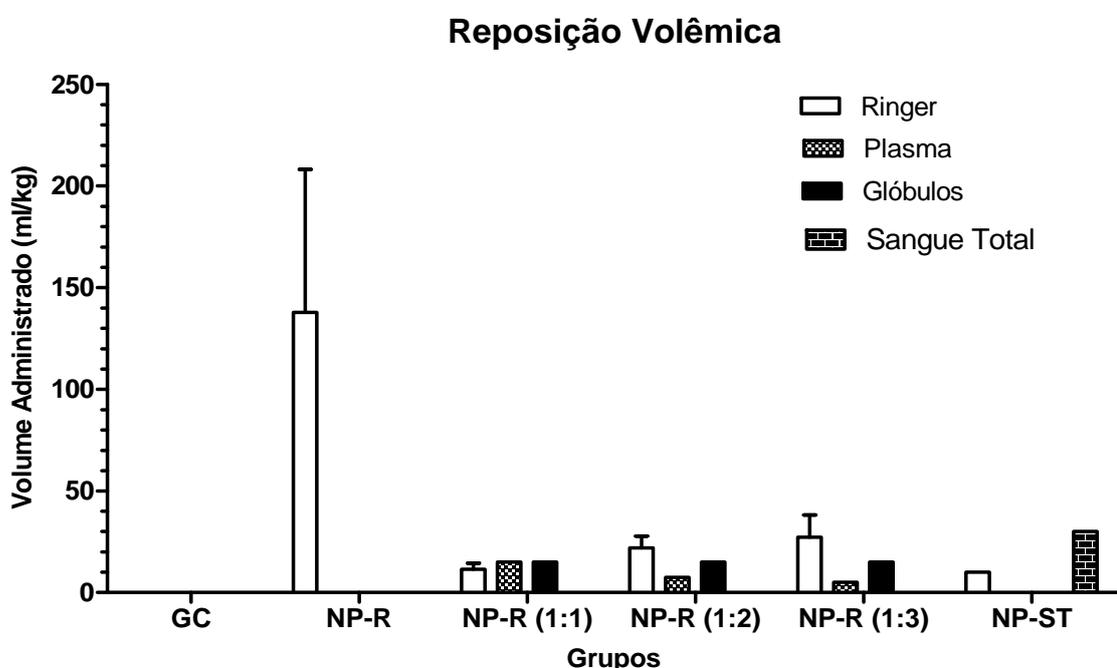
GC: grupo controle; NP-R: reposição só com ringer lactato; NP-R(1:1): reposição com plasma:glóbulos 1:1 e ringer; NP-R(1:2): reposição com plasma:glóbulos 1:2 e ringer; NP-R(1:3): reposição com plasma:glóbulos 1:3 e ringer; NP-ST: reposição com sangue total.

Conforme definido no item 4.4, o volume de GV foi constante nos grupos que receberam este hemoderivado (15ml/kg) e o de PFC variou para manter as proporções a serem estudadas.

O RL foi administrado em até três situações. A primeira foi o bolus de 10ml/kg infundido em todos os grupos, exceto o GC. A segunda situação dependeu do grupo a ser estudado, já que o volume total da reposição volêmica após o bolus de RL ficou estabelecido em 30ml/kg. Por exemplo, no grupo NP-R, que não recebeu hemoderivados, foram administrados 30ml/kg de RL, enquanto no grupo NP-R(1:2) no qual já havia sido transfundido 15ml/kg de GV + 7,5ml/kg de PFC, foram administrados somente 7,5ml/kg de RL para completar os 30ml/kg de reposição volêmica inicial, determinada para todos os grupos. A terceira situação da infusão de RL (última coluna da Tabela 3) foi somente em caso de necessidade para

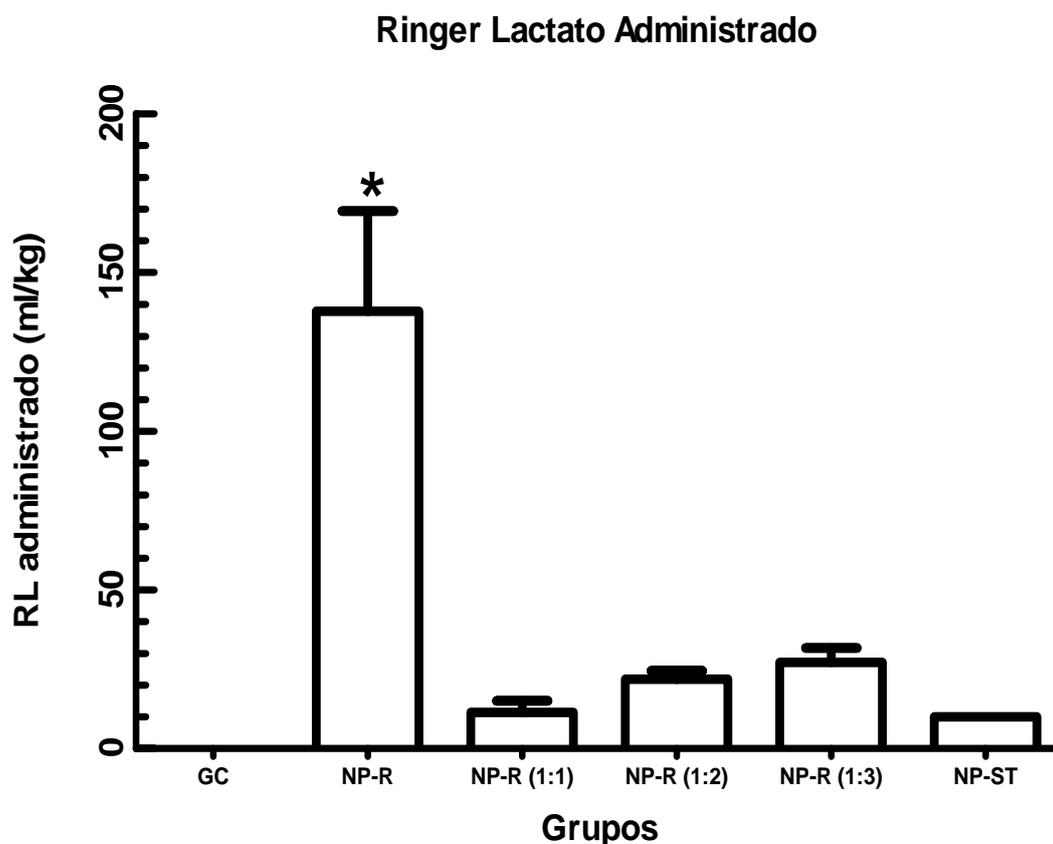
manter a pressão em, pelo menos, 80% do valor da PAM basal. Observa-se que para tentar manter a normovolemia, o grupo NP-R precisou de altas doses extras de RL, enquanto o NP-ST não necessitou de RL extra.

A Figura 5 sintetiza e ilustra a soma total dos volumes administrados aos animais de cada grupo e que foram apresentados na Tabela 3.



**Figura 5. Volume total de hemocomponentes e ringer lactado administrado aos animais. Esse gráfico foi construído com os dados da Tabela 3.**

O volume de RL administrado no NP-R foi significativo em relação a todos os outros grupos conforme mostra a Figura 6.



**Figura 6. Volume total de ringer lactato administrado.** \*ANOVA  $P < 0.05$  no grupo NP-R em relação aos demais grupos.

### 5.3 Tromboelastometria

#### 5.3.1 Tempo de coagulação (CT)

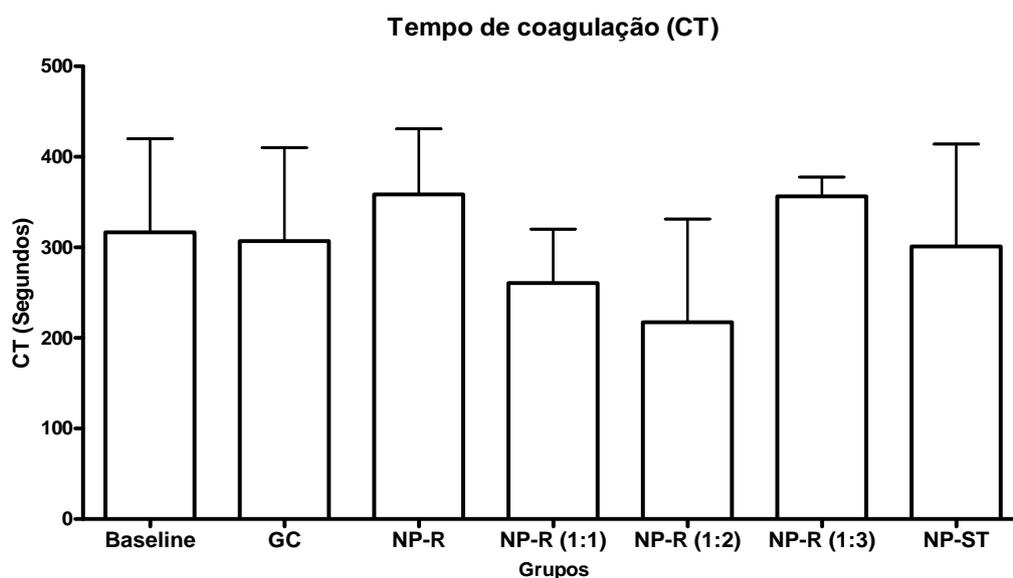
Os valores de CT (tempo gasto para o coágulo atingir 2mm de amplitude), antes e após o CH, não mostraram diferenças significantes entre os grupos, apesar de os valores médios de NP-R e NP-R(1:3) terem sido mais elevados do que os demais grupos (Tabela 4 e Figura 7).

**Tabela 4. Média  $\pm$  DP dos valores do CT, em segundos, antes e após choque hemorrágico controlado.**

Grupo	n	Média $\pm$ DP (segundos)
Baseline	36	316,7 $\pm$ 103,2
GC	6	307 $\pm$ 103,1
NP-R	6	358,6 $\pm$ 72,3
NP-R(1:1)	6	260,6 $\pm$ 59,5
NP-R(1:2)	6	217,4 $\pm$ 113,9
NP-R(1:3)	6	356,3 $\pm$ 21,2
NP-T	6	301,2 $\pm$ 113,0

DP= desvio padrão.

ANOVA – Não houve diferença entre os grupos ( $P > 0.05$ )



**Figura 7. Representação da média  $\pm$  DP do CT antes e após CH controlado.**

Esse gráfico foi construído com os dados da Tabela 4.

ANOVA – Não houve diferença entre os grupos ( $P > 0.05$ ) para esse

### 5.3.2 Tempo de formação do coágulo (CFT)

Ao contrário do CT, o parâmetro CFT apresentou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 5 e **Figura 8**)

**Tabela 5. Média  $\pm$  DP dos valores do CFT, em segundos, antes e após choque hemorrágico controlado.**

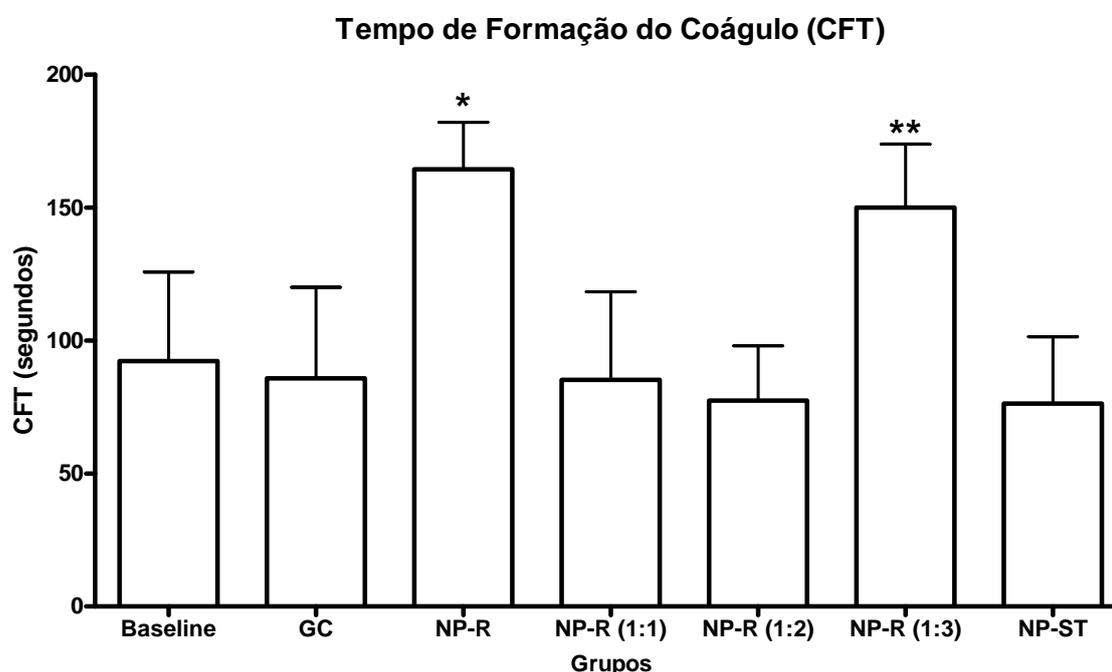
Grupo	n	Média $\pm$ DP (segundos)
Baseline	36	92,25 $\pm$ 33,48
GC	6	85,80 $\pm$ 43,27
NP-R	6	164,4 $\pm$ 17,70 *
NP-R(1:1)	6	85,20 $\pm$ 33,15
NP-R(1:2)	6	77,40 $\pm$ 20,67
NP-R(1:3)	6	150,00 $\pm$ 23,89 **
NP-ST	6	76,33 $\pm$ 25,07

DP= desvio padrão.

\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs GC, Baseline, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

\*\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R(1:3) vs GC, Baseline, NP-R (1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

Não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $P > 0.05$ ) = NP-R(1:1) vs NP-R (1:2); NP-R (1:1) vs NP-ST; NP-R (1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R (1:3).



**Figura 8. Representação da média  $\pm$  DP do CFT antes e após choque hemorrágico controlado.**

\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs GC, Baseline, NP-R (1:1), NP-R (1:2) e NP-ST.

\*\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R (1:3) vs GC, Baseline, NP-R (1:1), NP-R (1:2) e NP-ST.

Não foi estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ) = NP-R (1:1) vs NP-R (1:2); NP-R (1:1) vs NP-ST; NP-R (1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R (1:3).

A análise dos dados permite afirmar que o grupo em que foi realizada a reposição exclusiva com ringer (NP-R) e o grupo NP-R(1:3) apresentaram pior formação inicial do coágulo em relação a todos os outros grupos. Já os grupos NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST não mostraram significância estatística entre si relativas a esse parâmetro.

### 5.3.3 Ângulo Alfa (“ $\alpha$ ”)

A significância dos valores do ângulo “ $\alpha$ ” entre os grupos tiveram correspondência em relação ao que foi observado para o parâmetro CFT (Tabela 6). Essa correlação fortalece os dados obtidos pelo tromboelastograma, pois, tanto o CFT quanto o ângulo alfa expressam a cinética do coágulo e tendem a ser semelhantes, conforme expresso na Tabela 1.

**Tabela 6. Média  $\pm$  DP dos valores do ângulo alfa ( $\alpha$ ) antes e após CH controlado.**

Grupo	n	Média $\pm$ DP (Graus)
Baseline	36	72,54 $\pm$ 5,79
GC	6	73,40 $\pm$ 6,50
NP-R	6	61,00 $\pm$ 2,74 *
NP-R(1:1)	6	73,20 $\pm$ 6,14
NP-R(1:2)	6	74,80 $\pm$ 3,63
NP-R(1:3)	6	63,00 $\pm$ 2,90 **
NP-ST	6	75,00 $\pm$ 5,10

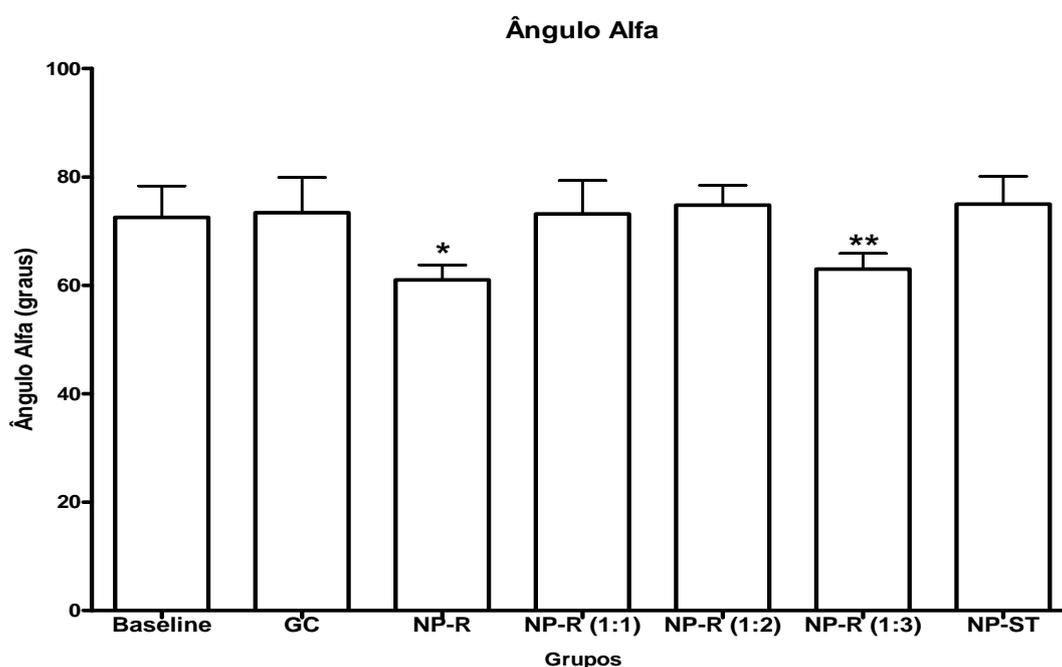
DP= desvio padrão.

\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs GC, Baseline, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

\*\*ANOVA  $P < 0.05$  NP-R(1:3) vs GC, Baseline, NP-R (1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

Não foi estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ) = NP-R(1:1) vs NP-R(1:2); NP-R(1:1) vs NP-ST; NP-R(1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R(1:3).

Os dados indicam que a força inicial do coágulo foi significativamente pior nos grupos NP-R e NP-R(1:3). Interessante notar, que não houve superioridade significativa na formação inicial do coágulo entre os grupos NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST (Figura 9).



**Figura 9. Representação gráfica da média  $\pm$  DP do ângulo “ $\alpha$ ” antes e após CH controlado.**

\*ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs GC, Baseline, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

\*\*ANOVA  $P < 0.05$  NP-R(1:3) vs GC, Baseline, NP-R (1:1), NP-R(1:2) e NP-ST. Não foi estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ) = NP-R(1:1) vs NP-R(1:2); NP-R(1:1) vs NP-ST; NP-R(1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R(1:3).

### 5.3.4 Firmeza máxima do coágulo (MCF)

O MCF expressa a estabilidade, a qualidade do coágulo. A Tabela 7 mostra que o grupo NP-R, cuja reposição volêmica foi somente com RL, teve o pior MCF, apresentando esse achado significância estatística em relação a todos os outros

grupos, exceto o NP-R(1:3), que também apresentou MCF ruim, com diferença significativa quando comparado ao Baseline, GC e NP-ST ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7. Média  $\pm$  DP dos valores do MCF, em milímetros, antes e após CH controlado.**

Grupo	n	Média $\pm$ DP (milímetros)
Baseline	36	66,93 $\pm$ 7,03
GC	6	66,40 $\pm$ 7,70
NP-R	6	46,60 $\pm$ 4,61*
NP-R(1:1)	6	60,60 $\pm$ 6,38
NP-R(1:2)	6	60,60 $\pm$ 5,73
NP-R(1:3)	6	50,33 $\pm$ 4,68**
NP-ST	6	68,33 $\pm$ 6,346

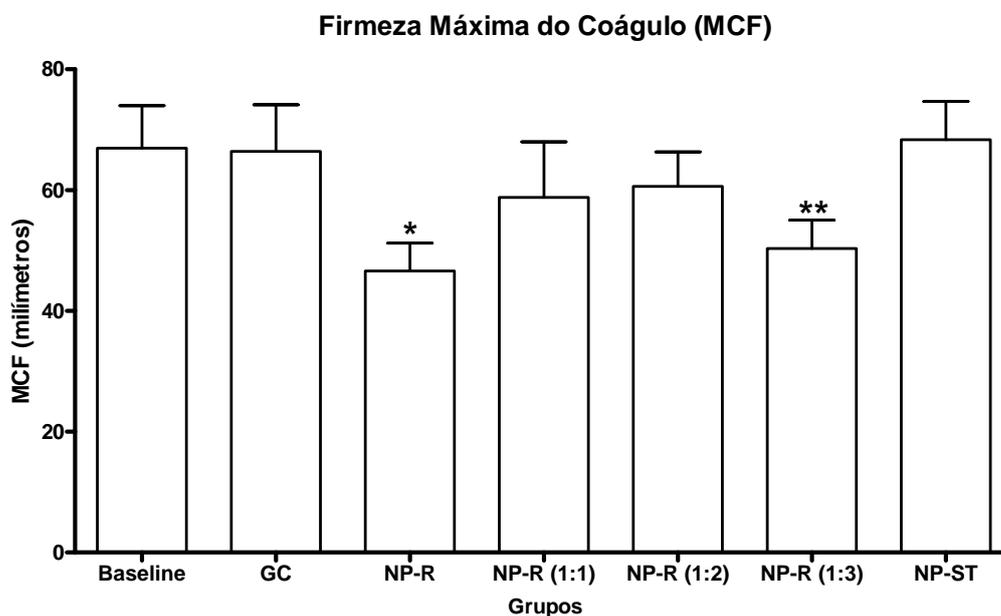
DP= desvio padrão.

\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs Baseline, GC, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

\*\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R(1:3) vs Baseline, GC e NP-ST.

Não foi estatisticamente significante ( $P > 0.05$ ): NP-R(1:1) vs NP-R(1:2); NP-R(1:1) vs NP-R(1:3); NP-R(1:1) vs NP-ST; NP-R(1:2) vs NP-R(1:3); NP-R(1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R(1:3).

O MCF dos grupos NP-R (1:1) e NP-R (1:2) apesar de apresentar uma tendência para ser melhor que o grupo NP-R(1:3), conforme mostra a Figura 10, não houve significância estatística entre esses três grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 10. Representação gráfica da média  $\pm$  DP do MCF antes e após CH controlado.**

\* ANOVA  $P < 0.05$  NP-R vs Baseline, GC, NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST.

\*\*ANOVA  $P < 0.05$  NP-R(1:3) vs Baseline, GC e NP-ST. Não foi estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ): NP-R (1:1) vs NP-R(1:2); NP-R (1:1) vs NP-R (1:3); NP-R (1:1) vs NP-ST; NP-R (1:2) vs NP-R (1:3); NP-R (1:2) vs NP-ST e NP-R vs NP-R (1:3).

### 5.3.5 Lise do coágulo após 60 minutos (Ly60)

A lise do coágulo aos 60 minutos não apresentou grandes variações entre os grupos e não teve significância estatística (Tabela 8 e Figura 11).

<b>Tabela 8. Média <math>\pm</math> DP dos valores do Ly60, em milímetros, antes e após CH controlado.</b>		
Grupo	n	Média $\pm$ DP (milímetros)
Baseline	36	96,93 $\pm$ 2,54
GC	6	98,40 $\pm$ 1,52
NP-R	6	96,80 $\pm$ 1,789
NP-R(1:1)	6	96,20 $\pm$ 3,11
NP-R(1:2)	6	97,00 $\pm$ 2,91
NP-R(1:3)	6	95,83 $\pm$ 3,2
NP-T	6	99,00 $\pm$ 1,00

DP= desvio padrão.  
ANOVA – sem significância entre os grupos (P > 0.05)

~ç´q,

**Figura 11. Representação gráfica da média  $\pm$  DP do Ly60 antes e após CH controlado.**

ANOVA – sem significância entre os grupos (P > 0.05)

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1 Considerações sobre o método**

#### **6.1.1 Anestésicos**

A associação de cetamina com xilazina foi utilizada com o objetivo de reduzir distúrbios hemodinâmicos fármacos-dependentes. A cetamina tem ação simpatomimética, aumentando a pressão arterial, o débito cardíaco e a resistência vascular sistêmica, além de induzir espasmos musculares. A xilazina, por sua vez, antagoniza estes efeitos por ser miorreloxante e por reduzir o débito cardíaco e frequência cardíaca (104). Ambas as drogas possuem meia-vida curta, e a maior parte da dose foi utilizada para a indução anestésica e para o ato operatório, reservando-se baixas doses suplementares durante o registro hemodinâmico, conforme demanda.

#### **6.1.2 Modelo animal e choque hemorrágico**

Modelos experimentais clinicamente relevantes de CH e reanimação volêmica devem incorporar hemorragia grave e lesão tecidual (105, 106). Além do choque grave e lesão tecidual, o modelo deve reproduzir, também, os tempos decorridos entre o acidente e o tratamento, tais como: chegada do socorro ao local e o transporte da vítima até o centro de trauma pelas equipes médicas de emergência,

já que o tempo após o trauma em que se inicia a reposição volêmica pode trazer resultados diferentes nos trabalhos com choque não controlado (61).

Optou-se pelo modelo de choque controlado, apesar de ser clinicamente menos relevante, porque o intuito principal era estudar os distúrbios de coagulação relacionados com os diferentes esquemas de reposição volêmica. O modelo de choque não controlado não permite controlar o volume de sangue perdido, e isso produziria um viés grave no trabalho, pois o volume de sangue perdido tem relação direta com os distúrbios de coagulação (48, 66). No choque não controlado fica difícil identificar se o distúrbio de coagulação é secundário ao volume de sangramento ou ao esquema de reposição volêmica. O cristalóide escolhido foi o RL, por ser o cristalóide mais utilizados nos modelos animais e ter uso freqüente no atendimento inicial ao politraumatizado (5,6,14).

### **6.1.3 Esquemas de reposição volêmica**

Os padrões atuais de reanimação volêmica no trauma recomendam infusão criteriosa de cristalóide e uso precoce de hemoderivados (107-109). No entanto, a dificuldade de excluir e controlar potenciais variáveis de confusão representa desafio importante para determinar a relação mais eficaz de produtos de hemotransfusão na reanimação pós CH. Assim, os modelos animais fornecem ferramentas importantes para resolver essa questão (110).

Os esquemas de reposição volêmica testados utilizaram os componentes mais habitualmente empregados na prática clínica, com ressalva de que o sangue total constitui prática controversa no trauma militar, embora seja ainda muito utilizado nos dias atuais (43, 53, 54).

O bolus inicial de RL foi realizado com o intuito de simular a reposição de cristaloides que já se inicia no local do trauma, conforme preconiza o *Advanced Trauma Life Support (ATLS)* (29).

Nos grupos em que foi feita a transfusão de glóbulos e plasma, foi mantido fixo o volume de glóbulos (15ml/kg), variando apenas o volume de plasma (15ml/kg, 7,5ml/kg e 5ml/kg respectivamente nos grupos NP-R(1:1), NP-R(1:2), NP-R(1:3). A diferença entre os volumes de glóbulos e plasma infundidos foi complementada com solução de RL, quando pertinente, para que todos os grupos recebessem, ao final, o volume total de 30ml/kg.

O volume de glóbulos foi mantido constante (15ml/kg), já que existem estudos que mostram que transfusão com glóbulos pode influenciar negativamente a microvascularização, produzir hipoperfusão tissular e aumentar a mortalidade, principalmente aqueles com maior tempo de estocagem (43, 52, 111).

O volume de plasma variou para menos com o intuito de possibilitar a manutenção do volume total a ser transfundido dentro das proporções plasma:glóbulos (1:1; 1:2; 1:3) programadas, sem alterar o volume total infundido de

30 ml/kg. Se não fosse utilizada essa estratégia o grupo NP-R (1:3), por exemplo, receberia um volume total de 60ml/kg de hemoderivados (15ml/kg de glóbulos e 45ml/kg de plasma), muito alto para infusão rápida podendo causar edema agudo de pulmão (112) . Os animais dos grupos NP-R (1:1) e NP-ST que receberam a metade desse volume de hemoderivados (30ml/kg), apresentaram picos hipertensivos, forçando a interrupção da reposição volêmica. A reposição programada para esses dois grupos só foi finalizada após os 45 minutos, enquanto nos demais grupos foi finalizada aos 30 minutos.

Após a reposição calculada para cada grupo, na maioria deles, foram necessários volumes adicionais de RL na tentativa de manter a pressão nos níveis de 80% da pressão arterial basal, conforme mostra a Tabela 3. O grupo NP-ST não necessitou de RL extra, ao contrário, foi o grupo que sempre manteve a PAM acima da PAM basal durante todo o experimento. Esse achado é sustentado por pesquisas anteriores que mostraram que o sangue total tem uma pressão colóide osmótica mais elevada que o plasma (113, 114). O volume de RL extra que o grupo NP-R necessitou para tentar manter a PAM foi muito mais alto quando comparado ao volume dessa solução utilizada com o mesmo fim em todos os outros grupos, conforme ilustrado na Figura 6. Foram necessárias altíssimas doses de RL extra no grupo NP-R para manter a PAM nos valores estabelecidos de 80% da basal (97,8ml/kg) e só se conseguiu manter a pressão arterial adequada por meio de infusões rápidas e contínuas.

A infusão de cristaloides em voluntários saudáveis, demonstra que apenas 16% do volume infundido permanecem no espaço intravascular após 30 minutos

(115). Na vigência de CH, o extravasamento de fluidos através dos capilares para o interstício é ainda maior pressupondo-se que menor proporção do volume infundido ficou retida no espaço intravascular. Isso poderia explicar porque os animais do grupo que recebeu reposição volêmica exclusiva com ringer lactato necessitou de volume acentuadamente maior dessa solução do que os demais grupos para manter a pressão arterial normovolêmica.

A reanimação volêmica desencadeia o fenômeno de isquemia-reperfusão, que ativa leucócitos e aumenta a síntese de mediadores inflamatórios e radicais livres derivados do oxigênio, aumentando a permeabilidade capilar. O extravasamento aumenta na proporção que a restauração da pressão arterial distende os capilares reperfundidos (116).

## **6.2 Curvas de pressão arterial**

A hemorragia causou queda da PAM superior a 65% dos valores basais, sem diferença significativa entre os grupos submetidos ao CH. As curvas pressóricas, durante os 15 minutos de CH, foram semelhantes, e, após a reposição volêmica, a pressão arterial média de todos os grupos voltou ao nível médio de pressão considerado normal (80% da basal) aos 20 minutos. Conforme assinalado, no grupo NP-R a pressão normotensiva só foi possível com a infusão de grandes volumes extras de RL. Nesse grupo, imediatamente após a infusão de RL ocorria recuperação da PAM, mas seguia-se novo período de hipotensão. Portanto, a recuperação é parcial. Esse achado sugere choque refratário no grupo NP-R por

mecanismos relacionados, possivelmente, a extravasamento de líquido para o interstício por diminuição da pressão oncótica e aumento da permeabilidade capilar, conforme já mostrado na literatura (32, 115), pois não há nenhum foco de sangramento adicional (CH controlado).

Ao contrário do grupo NP-R, o grupo NP-ST apresentou PAM sempre acima da basal após o início da hemotransfusão, e, em alguns momentos, foi necessário interromper a transfusão de sangue total, por alguns minutos, devido aos picos hipertensivos. O grupo NP-ST foi o único que não necessitou de infusão de doses adicionais de RL para manter pressão arterial normotensiva. No entanto, ele não apresentou melhora adicional da PAM, estatisticamente significativa, em relação aos demais grupos com reposição com hemoderivados. Assim, apesar da literatura mostrar que o sangue total tem uma pressão colóide osmótica mais elevada que o plasma (113,114), esse trabalho demonstrou que ele não oferece benefício significativo na recuperação da estabilidade hemodinâmica em relação aos demais esquemas com hemocomponentes.

Cabe notar que o grupo GC, também teve uma pequena queda inicial da PAM, o que pode ser explicado pela retirada de um ml de sangue para realização da tromboelastometria basal. Entretanto, nesse grupo de animais, verificou-se recuperação espontânea da pressão arterial, sem necessidade de infusão de volume.

## 6.3 Tromboelastometria

### 6.3.1 Tempo de coagulação (CT)

As diferenças dos valores de CT não foram significantes entre os grupos. Isso mostra que as diferentes formas de reposição volêmica, aparentemente não refletiram de forma significativa no início da formação do coágulo.

Sabemos que o CT no Rotem, representa o processo enzimático envolvido na ativação da cascata de coagulação, ou seja, o tempo gasto para a geração de trombina e a velocidade do início da formação da fibrina a partir do fibrinogênio (93).

Para haver formação de fibrina é necessário: a) gerar trombina a partir da protrombina; b) a geração de trombina envolve a ativação seqüencial de vários fatores de coagulação, produtos liberados pelas plaquetas e pelos tecidos lesados, e requer a ação do cálcio. A trombina atua sobre o fibrinogênio solúvel transformando-o em fibrina (117, 118). Então, os valores de CT representam o tempo gasto para iniciar a formação da fibrina nesse processo.

Conhecendo esses mecanismos, podemos observar que são vários os fatores que poderiam levar a alterações no CT, incluindo, alterações nos níveis de trombina, modificações na concentração dos fatores de coagulação, da atividade dos mesmos e alteração dos níveis de fibrinogênio (119).

O impacto da reposição volêmica como elemento principal desencadeante da coagulopatia no trauma ainda desperta contradições (36, 67, 120-122). A coagulopatia na admissão do paciente traumatizado no hospital apresenta relação com o ISS (Injury Severity Score) e descarta correlação com o volume de fluidos administrados no atendimento pré-hospitalar (67). Outro estudo, utilizando o mesmo método, demonstrou que o volume de cristaloides infundidos no pré-hospitalar tem relação direta com a ocorrência de coagulopatia(36).

A tendência dos valores aumentados de CT nos grupos NP-R e NP-R (1:3) poderia sugerir que reposições com maiores volumes de cristaloides pudessem trazer alguma repercussão no início da formação do coágulo pela possível redução dos fatores de coagulação provocado pelo grande volume infundido. Contudo essa suposição é especulativa, já que não foram demonstradas diferenças significativas desses dois grupos em relação aos demais.

### **6.3.2 Tempo de formação do coágulo (CFT)**

O CFT representa o tempo desde a iniciação da formação do coágulo até alcançar a amplitude de 20mm na curva da ROTEM, refletindo a firmeza do coágulo proporcionada pela polimerização da fibrina, pela ação das plaquetas e do fator XIII estabilizando o coágulo.

Os valores de CFT foram significativamente piores entre os grupos NP-R e NP-R (1:3) quando comparado a todos os outros grupos. Isso demonstra que os

esquemas de reposição somente com RL e os com reposição de PFC:GV na proporção 1:3 prejudicam a dinâmica de formação do coágulo traduzindo redução da atividade enzimática da trombina, responsável pela polimerização da fibrina, bem como prejuízo das contribuições das plaquetas e do fator XIII para a formação inicial do coágulo. Assim, apesar do início da coagulação (CT) não ter sido afetada pelos esquemas de reposição utilizados, a continuação da formação do coágulo (CFT) foi significativamente prejudicada. Isto pode ser justificado pelo fenômeno da hemodiluição dos fatores de coagulação, da trombina, fibrinogênio, das plaquetas e do fator XIII. Especula-se que tenha havido quantidade suficiente desses elementos para iniciar a coagulação, mas que seria insuficiente para consolidação do coágulo. Assim, não haveria prejuízo significativo da iniciação do coágulo, mas sim da cinética do coágulo. A hemodiluição e o consumo dos fatores de coagulação podem ter impedido a manutenção da produção adequada de fibrina, cuja insuficiência teria sido exacerbada pela hemodiluição e pelo consumo da trombina e fibrinogênio (50, 66, 119).

Foi observado, também, que não houve diferença no CFT na correlação entre os grupos NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-ST, mostrando que não existe superioridade entre esses esquemas de reposição no que se refere à cinética do coágulo. Nesse sentido, a preferência deve ser pela reposição NP-R(1:2), porque se pode reduzir os efeitos deletérios do plasma, sem prejudicar a adequada formação do coágulo. Transfusões maciças de plasma podem levar a aumento da incidência de lesão pulmonar aguda associada à transfusão (TRALI), síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS), e insuficiência múltipla de órgãos (123-125).

### 6.3.3 Ângulo Alfa (“ $\alpha$ ”)

Os resultados observados em relação ao ângulo “ $\alpha$ ”, foram compatíveis aos do CFT, já que os dois parâmetros refletem a dinâmica de formação do coágulo, sendo que o ângulo “ $\alpha$ ” tem relação com a força inicial do coágulo.

Os grupos NP-R e NP-R (1:3) apresentaram de forma significativa, a pior força inicial do coágulo, refletindo instabilidade inicial do coágulo. Esse achado pode ser explicado pelas mesmas razões utilizadas quando dos comentários relativos ao CFT. Também, de forma semelhante ao CFT, os grupos NP-R (1:1), NP-R (1:2) e NP-ST tiveram a melhor cinética do coágulo e não apresentaram diferenças significativas entre si. Assim, também neste aspecto, a preferência dentre esses três grupos é pelo esquema de reposição NP-R(1:2), e se justifica por conter menor quantidade de hemocomponentes e, teoricamente, produzir menos efeitos colaterais. Nesse aspecto, o grupo NP-R(1:3) também contém menor quantidade de hemocomponentes, mas apresentou força inicial do coágulo ruim.

### 6.3.4 Firmeza máxima do coágulo (MCF)

O pior coágulo de acordo com o MCF foi o do grupo NP-R, quando comparado à força e qualidade dos coágulos de todos os outros grupos, exceto ao grupo NP-R(1:3), que também teve MCF ruim, significativamente pior em relação ao GC, Baseline e NP-ST.

O MCF depende primariamente das interações entre plaquetas e fibrina. Desse modo, assume importância a função, atividade e contagem plaquetária, e as contribuições enzimáticas (126).

Após a centrifugação do sangue observam-se três camadas: a do plasma na porção mais superior do tubo de ensaio, a dos eritrócitos na porção mais inferior e entre as duas existe uma pequena camada brancacenta chamada de “*buffy coat*”. O maior número de plaquetas no sangue centrifugado encontra-se no “*buffy coat*”, que é formado por leucócitos e plaquetas. (127, 128). Mas, também há pequenas quantidades de plaquetas no plasma e no concentrado de hemácias. O “*buffy coat*” foi aspirado e desprezado, conforme o exposto no item 4.7. Assim, entre os grupos que foram transfundidos, o que recebeu o maior e o menor número de plaquetas foi o NP-ST e o NP-R(1:3), respectivamente.

A causa do pior resultado apresentado pelo grupo NP-R pode ser devida ao fato de os animais desse grupo não terem recebido nenhum hemocomponente e terem sofrido maior hemodiluição pela infusão pura de cristaloides.

Não houve diferença entre os grupos NP-R(1:1), NP-R(1:2) e NP-R(1:3), possivelmente porque o número de plaquetas entre esses grupos não deve ter variado consideravelmente. O grupo NP-ST dava impressão de melhor performance relativa ao MCF, mas, não foi possível demonstrar significância estatística em relação aos grupos NP-R(1:1) e NP-R(1:2). Dessa forma, apesar de o grupo NP-ST ter recebido o maior número de plaquetas, já que o sangue não foi centrifugado e,

portanto, não tinha como lhe extrair o “*buffy coat*”, ele não apresentou qualidade e força do coágulo melhores que os grupos NP-R(1:1) e NP-R(1:2). O grupo NP-ST foi melhor, de forma significativa, que o grupo NP-R(1:3), possivelmente por esse grupo ter recebido o menor número de plaquetas e de fibrinogênio presentes no plasma. Estudos anteriores mostram que o fibrinogênio exerce participação considerável na força do coágulo (129) e que no plasma estão presentes altas concentrações de fibrinogênio (130).

### **6.3.5 Lise do coágulo após 60 minutos (Ly60)**

O Ly60 representa a porcentagem de fibrinólise ocorrida 60 minutos após a amplitude máxima (126). As diferenças de valores de Ly60 entre os grupos não teve significância estatística.

No processo de fibrinólise, o plasminogênio liga-se à fibrina e ao ativador de plasminogênio (tPA) e este complexo ternário leva à conversão em plasmina proteolítica, que metaboliza a fibrina em produtos solúveis (131).

Há evidências de que o trauma grave ativa vias profibrinolíticas (45, 132). Ainda não existe, na literatura, consenso da fisiopatologia da hiperfibrinólise. Alguns trabalhos mostram que a hiper-hidratação induz a hiperfibrinólise por meio da redução das proteínas anti-fibrinolíticas e que o PFC é capaz de reverter esse estado pró-fibrinolítico (121). Outros estudos defendem que a hiperfibrinólise é secundária tanto à hemodiluição quanto ao consumo de fatores pró-coagulantes

(133). O estado de hipotermia e acidose também são citados como principais agravantes da hiperfibrinólise (79). Mais recentemente, há estudos que sugerem que a coagulopatia se desenvolve precocemente, mesmo antes e independentemente das razões apontadas anteriormente (9, 134).

Neste modelo de estudo, esperava-se que o grupo NP-R apresentasse estado de fibrinólise mais acentuado em relação aos demais grupos, o que não ocorreu. Todos os fatores acima descritos como relacionados à fibrinólise foram controlados nos experimentos. O intuito principal foi estudar a influência dos esquemas de reposição na coagulopatia, induzida pelo choque hemorrágico e, por isso, as variáveis passíveis de interferir na formação e lise do coágulo, tais como: variação de temperatura; controle do choque (no qual não ocorre tanto consumo dos fatores procoagulantes); trauma tecidual pequeno, mesmo sendo os animais submetidos a choque grau IV. Além disso, o teste mais sensível para diagnosticar a fibrinólise é o APTEM e não o NATEM que foi utilizado neste estudo (8, 135), o que pode ter contribuído para a não detecção de diferenças de fibrinólise entre os grupos estudados.

#### **6.4 Considerações finais sobre reposição volêmica, resposta hemodinâmica e tromboelastometria.**

O presente estudo demonstrou que a reanimação volêmica com infusão somente de cristaloides interfere na coagulação normal. Este achado é apoiado por vasta pesquisa experimental e clínica, que demonstrou o efeito adverso da infusão

excessiva de cristalóide durante a reanimação hemodinâmica (55, 136-138). Mesmo assim, a diluição é apenas uma parte do processo da CAT. Nossos resultados indicam que esta foi contribuição significativa para a coagulopatia neste modelo, já que, apesar da perda de sangue ter sido semelhante entre os grupos, o volume médio do fluido recebido pelos animais no grupo com infusão somente de RL foi até oito vezes maior do que o dos animais que receberam RL em conjunto com hemoderivados.

Os resultados também mostraram que foi necessário menos RL para manter a PAM dentro dos limites da linha de base quando havia infusão de algum esquema de hemoderivado, mesmo no grupo em que foi utilizada menor relação de PFC:GV (NP-R 1:3). Este achado pode ser atribuído à retenção intravascular de curta duração de cristalóides em comparação com a de colóides na reanimação volêmica (139-141).

Curiosamente, no entanto, a estabilidade hemodinâmica representada pelos valores constantes da PAM no grupo NP-R (1:3) não foi acompanhada por melhorias na coagulação (CFT, ângulo alfa e MCF) em comparação com o grupo que foi reanimado somente de RL (NP-R). Com isso, poderia se levantar a hipótese de que o aumento da PAM e a expansão do volume provocado pelo PFC ocorre mais cedo e requer menos PFC do que o necessário para repor os fatores de coagulação. De acordo com essa hipótese, os resultados deste estudo mostraram que a transfusão com as proporções de PFC:GV (1:1 e 1:2) e de sangue total promoveram melhora da resposta hemodinâmica e da coagulação em comparação com a infusão somente de RL e da transfusão na proporção PFC:GV (1:3). Dois estudos clínicos

retrospectivos e um estudo de coorte observacional prospectivo mostraram resultados semelhantes (142-144). Por outro lado, o estudo de coorte prospectivo multicêntrico demonstrou também que, apesar da proporção de PFC:GV  $\geq$  1:1,5 promover redução de mortalidade, está ligado a uma taxa mais elevada de síndrome do desconforto respiratório agudo em pacientes de trauma fechado (144).

Estudos clínicos demonstraram que, transfusão de PFC é mais benéfica no tratamento da coagulopatia grave quando é realizada mais precocemente (47, 67, 108, 109, 145). Portanto, os modelos animais clinicamente relevantes devem replicar essa condição (110, 146). Nesse sentido, os valores basais de CT, CFT, MCF e ML no presente estudo foram muito semelhantes à pesquisa anterior que avaliou o perfil normal de coagulação de ratos com tromboelastometria (147). Já os resultados finais da tromboelastometria, tornaram-se consistentemente anormais nos grupos com infusão única de RL e de PFC:GV (1:3) .

## **6.5 Limitações do estudo**

O presente estudo possui limitações referentes ao modelo experimental de CH, ao teste da ROTEM e a outras limitações inerentes a modelos com pequenos animais.

Modelos de CH em ratos, apesar das vantagens referentes aos custos com materiais e logística, trazem alguns inconvenientes. A resposta hemodinâmica de pequenos animais não é igual a de humanos, e o baixo volume de sangue limita a

coleta de amostras. O modelo de choque hemorrágico controlado utilizado neste estudo, não é o mais relevante clinicamente, por não simular adequadamente a lesão vascular e tecidual nem a utilização dos mecanismos endógenos para conter a hemorragia. No entanto, a utilização do choque hemorrágico controlado, trouxe vantagens neste estudo, já que a hemorragia no modelo de choque não controlado pode levar a consumo excessivo dos fatores de coagulação para coibir o sangramento, o que poderia confundir a interpretação dos dados pela possibilidade de os efeitos da coagulação observados terem sido provocados pelos diferentes esquemas de reposição ou pelo sangramento não controlado.

O presente estudo restringiu-se a investigar os distúrbios de coagulação relacionados à reanimação hemodinâmica na fase aguda do CH (105 minutos), mas sabe-se que os estados de choque provocam alterações tardias que podem resultar em falência orgânica múltipla. No entanto, dados clínicos retrospectivos mostraram que a transfusão de PFC:GV, em proporção de 1:1 resultou em aumento de sobrevida em comparação com a proporção de 1:4, apenas quando administrada dentro dos primeiros 137 minutos em pacientes que receberam mais de 10 unidades de GV na sala de cirurgia (109).

O teste de tromboelastometria utilizado foi somente o NATEM que avalia a coagulação de forma mais generalizada. Sabe-se que, para estudar com maior especificidade algum componente da coagulação, existem testes específicos, como por exemplo, o FIBTEM, que avalia de forma qualitativa o fibrinogênio, sem influência das plaquetas.

## 6.6 Perspectivas

O modelo de choque hemorrágico utilizado neste estudo (volume controlado e pressão controlada), abre novas possibilidades de pesquisa ao permitir que outros parâmetros possam ser avaliados no CH.

O presente desenho de pesquisa abre possibilidades para se fazer estudo sobre a influência dos distúrbios de coagulação associados a reposição volêmica em outras situações, como, por exemplo, em grupos de animais com hipotensão permissiva.

## 7. CONCLUSÕES

- 1- Nos animais submetidos a CH controlado, a alteração da coagulação é menor quando a reposição volêmica é feita com sangue total ou com proporção de PFC:GV 1:1 ou 1:2 em comparação aos que foram reanimados somente com RL ou com PFC:GV 1:3.
- 2- Os animais em CH controlado reanimados com sangue total, com proporções de PFC:GV 1:1; 1:2 e 1:3 apresentam maior estabilidade hemodinâmica do que os reanimados somente com RL.
- 3- O sangue total não oferece vantagem adicional em relação a estabilidade hemodinâmica ou alteração da coagulação quando comparado a reposição com PFC:GV 1:1 ou 1:2
- 4- A reposição de PFC:GV 1:2, produz os mesmos benefícios da hemostasia e da estabilidade hemodinâmica que a reposição com PFC:GV 1:1 e sangue total, com a vantagem de possibilitar o uso mais racional dos hemocomponentes.

## 8. REFERÊNCIAS

1. WHO. Global Health Estimates: World Health Organization; 2013 [updated acessado em dez 2013]. Available from: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/).
2. DATASUS-2011. Indicadores e Dados Básicos - Brasil - 2011: Ministério da Saúde. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idx2011/matriz.htm>.
3. Parreira J, Soldá SC, Rasslan S. Assessing the risk of death due to hemorrhage in victims of penetrating trauma to the torso admitted in shock: an objective method to select candidates for damage control. *Rev Col Bras Cir* 2002; 29(5):256-66.
4. Mizushima Y, Tohira H, Mizobata Y, Matsuoka T, Yokota J. Fluid resuscitation of trauma patients: how fast is the optimal rate? *Am J Emerg Med* 2005; 23(7):833-7.
5. Schmidt BM, Rezende-Neto JB, Andrade MV, Winter PC, Carvalho MG, Lisboa TA, et al. Permissive hypotension does not reduce regional organ perfusion compared to normotensive resuscitation: animal study with fluorescent microspheres. *World J Emerg Surg* 2012; 7 Suppl 1:S1-9.
6. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Ribeiro DD, Lisboa TA, Camargos ER, et al. Permissive hypotension and desmopressin enhance clot formation. *J Trauma* 2010; 68(1):42-50.
7. Bickell WH, Wall MJ, Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, et al. Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med* 1994; 331(17):1105-9.
8. Schöchl H, Voelckel W, Maegele M, Solomon C. Trauma-associated hyperfibrinolysis. *Hamostaseologie* 2012; 32(1):22-7.
9. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Schultz MJ, Levi M, Mackersie RC, et al. Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *J Trauma* 2008; 64(5):1211-7.
10. Borgman MA, Spinella PC, Perkins JG, Grathwohl KW, Repine T, Beekley AC, et al. The ratio of blood products transfused affects mortality in patients receiving massive transfusions at a combat support hospital. *J Trauma* 2007; 63(4):805-13.

11. Nascimento B, Callum J, Rubenfeld G, Neto JB, Lin Y, Rizoli S. Clinical review: Fresh frozen plasma in massive bleedings - more questions than answers. *Crit Care* 2010; 14(1):202-9.
12. Davenport R, Curry N, Manson J, De'Ath H, Coates A, Rourke C, et al. Hemostatic effects of fresh frozen plasma may be maximal at red cell ratios of 1:2. *J Trauma* 2011; 70(1):90-5.
13. Zehtabchi S, Nishijima DK. Impact of transfusion of fresh-frozen plasma and packed red blood cells in a 1:1 ratio on survival of emergency department patients with severe trauma. *Acad Emerg Med* 2009; 16(5):371-8.
14. Krausz MM. Initial resuscitation of hemorrhagic shock. *World J Emerg Surg* 2006;1:1-14.
15. Guyton A, Hall J. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. 1104p.
16. Barber AE, Shires GT. Cell damage after shock. *New Horiz* 1996; 4(2):161-7.
17. Kristensen SR. Mechanisms of cell damage and enzyme release. *Dan Med Bull* 1994; 41(4):423-33.
18. Godier A, Susen S. Trauma-induced coagulopathy. *Ann Fr Anesth Reanim* 2013; 32(7-8):527-30.
19. Barie PS, Hydo LJ. Epidemiology of multiple organ dysfunction syndrome in critical surgical illness. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1(3):173-85.
20. Zenati MS, Billiar TR, Townsend RN, Peitzman AB, Harbrecht BG. A brief episode of hypotension increases mortality in critically ill trauma patients. *J Trauma* 2002; 53(2):232-6.
21. Rose B, Post T. *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. 699-716p
22. Wiggers CJ. *Physiology of shock*. New York: Commonwealth Fund; 1950. 450p.
23. Alam HB, Rhee P. New developments in fluid resuscitation. *Surg Clin North Am* 2007; 87(1):55-72.
24. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114(1):5-14.
25. Eiseman B. Pulmonary effects of nonthoracic trauma. Introduction to conference. *J Trauma* 1968; 8(5):649-50.
26. Shoemaker WC. A new approach to physiology, monitoring, and therapy of shock states. *World J Surg* 1987; 11(2):133-46.

27. Velmahos GC, Demetriades D, Shoemaker WC, Chan LS, Tatevossian R, Wo CC, et al. Endpoints of resuscitation of critically injured patients: normal or supranormal? A prospective randomized trial. *Ann Surg* 2000; 232(3):409-18.
28. American College of Surgeons: Advanced Trauma Life Support Program for Doctors. 7th ed. Chicago: American College of Surgeons 2004.
29. American College of Surgeons: Advanced Trauma Life Support Program for Doctors. 9th ed. Chicago: American College of Surgeons 2012.
30. Kortbeek JB, Al Turki SA, Ali J, Antoine JA, Bouillon B, Brasel K, et al. Advanced trauma life support, 8th edition, the evidence for change. *J Trauma* 2008; 64(6):1638-50.
31. Schreiber MA. Coagulopathy in the trauma patient. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11(6):590-7.
32. Cotton BA, Guy JS, Morris JA, Abumrad NN. The cellular, metabolic, and systemic consequences of aggressive fluid resuscitation strategies. *Shock* 2006; 26(2):115-21.
33. Sondeen JL, Coppes VG, Holcomb JB. Blood pressure at which rebleeding occurs after resuscitation in swine with aortic injury. *J Trauma* 2003; 54(Suppl 5):S110-7.
34. Hughes CG, Weavind L, Banerjee A, Mercaldo ND, Schildcrout JS, Pandharipande PP. Intraoperative risk factors for acute respiratory distress syndrome in critically ill patients. *Anesth Analg* 2010; 111(2):464-7.
35. Crampin EJ, Smith NP, Langham AE, Clayton RH, Orchard CH. Acidosis in models of cardiac ventricular myocytes. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2006; 364(1842):1171-86.
36. Maegele M, Lefering R, Yucel N, Tjardes T, Rixen D, Paffrath T, et al. Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury* 2007; 38(3):298-304.
37. Roberts I, Blackhall K, Alderson P, Bunn F, Schierhout G. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 11:CD001208.
38. Perel P, Roberts I, Ker K. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 2:CD000567.
39. Agarwal N, Murphy JG, Cayten CG, Stahl WM. Blood transfusion increases the risk of infection after trauma. *Arch Surg* 1993; 128(2):171-6.

40. Claridge JA, Sawyer RG, Schulman AM, McLemore EC, Young JS. Blood transfusions correlate with infections in trauma patients in a dose-dependent manner. *Am Surg* 2002; 68(7):566-72.
41. Croce MA, Tolley EA, Claridge JA, Fabian TC. Transfusions result in pulmonary morbidity and death after a moderate degree of injury. *J Trauma* 2005; 59(1):19-23.
42. Dunne JR, Malone DL, Tracy JK, Napolitano LM. Allogenic blood transfusion in the first 24 hours after trauma is associated with increased systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and death. *Surg Infect (Larchmt)* 2004; 5(4):395-404.
43. Weinberg JA, McGwin G, Vandromme MJ, Marques MB, Melton SM, Reiff DA, et al. Duration of red cell storage influences mortality after trauma. *J Trauma* 2010; 69(6):1427-31.
44. Hess JR, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Holcomb JB, Kluger Y, et al. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma* 2008; 65(4):748-54.
45. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet JF. Acute traumatic coagulopathy: initiated by hypoperfusion: modulated through the protein C pathway? *Ann Surg* 2007; 245(5):812-8.
46. Brummel-Ziedins K, Whelihan MF, Ziedins EG, Mann KG. The resuscitative fluid you choose may potentiate bleeding. *J Trauma* 2006; 61(6):1350-8.
47. Curry N, Stanworth S, Hopewell S, Dorée C, Brohi K, Hyde C. Trauma-induced coagulopathy--a review of the systematic reviews: is there sufficient evidence to guide clinical transfusion practice? *Transfus Med Rev* 2011; 25(3):217-31.
48. Darlington DN, Craig T, Gonzales MD, Schwacha MG, Cap AP, Dubick MA. Acute coagulopathy of trauma in the rat. *Shock* 2013; 39(5):440-6.
49. Wohlauer MV, Moore EE, Droz NM, Harr J, Gonzalez E, Fragoso M, et al. Hemodilution is not critical in the pathogenesis of the acute coagulopathy of trauma. *J Surg Res* 2012; 173(1):26-30.
50. Maegele M, Schöchl H, Cohen MJ. An Up-date on the Coagulopathy of Trauma. *Shock* 2014; 41 (Suppl 1): S21-5.

51. Pati S, Matijevic N, Doursout MF, Ko T, Cao Y, Deng X, et al. Protective effects of fresh frozen plasma on vascular endothelial permeability, coagulation, and resuscitation after hemorrhagic shock are time dependent and diminish between days 0 and 5 after thaw. *J Trauma* 2010; 69 (Suppl 1):S55-63.
52. Weinberg JA, Maclennan PA, Vandromme-Cusick MJ, Magnotti LJ, Kerby JD, Rue LW, et al. The deleterious effect of red blood cell storage on microvascular response to transfusion. *J Trauma Acute Care Surg* 2013; 75(5):807-12.
53. Kauvar DS, Holcomb JB, Norris GC, Hess JR. Fresh whole blood transfusion: a controversial military practice. *J Trauma* 2006; 61(1):181-4.
54. Spinella PC, Reddy HL, Jaffe JS, Cap AP, Goodrich RP. Fresh whole blood use for hemorrhagic shock: preserving benefit while avoiding complications. *Anesth Analg* 2012; 115(4):751-8.
55. Morrison CA, Carrick MM, Norman MA, Scott BG, Welsh FJ, Tsai P, et al. Hypotensive resuscitation strategy reduces transfusion requirements and severe postoperative coagulopathy in trauma patients with hemorrhagic shock: preliminary results of a randomized controlled trial. *J Trauma* 2011; 70(3):652-63.
56. Ley EJ, Clond MA, Srour MK, Barnajian M, Mirocha J, Margulies DR, et al. Emergency department crystalloid resuscitation of 1.5 L or more is associated with increased mortality in elderly and nonelderly trauma patients. *J Trauma* 2011; 70(2):398-400.
57. Neal MD, Hoffman MK, Cuschieri J, Minei JP, Maier RV, Harbrecht BG, et al. Crystalloid to packed red blood cell transfusion ratio in the massively transfused patient: when a little goes a long way. *J Trauma Acute Care Surg* 2012; 72(4):892-8.
58. Winchell RJ, Simons RK, Hoyt DB. Transient systolic hypotension. A serious problem in the management of head injury. *Arch Surg* 1996; 131(5):533-9.
59. Cannon W, Frasier J, Cowell E. The preventive treatment of wound shock. *JAMA* 1918; 70:618-21.
60. Kreimeier U, Prueckner S, Peter K. Permissive hypotension. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130(42):1516-24.
61. Hirshberg A, Hoyt DB, Mattox KL. Timing of fluid resuscitation shapes the hemodynamic response to uncontrolled hemorrhage: analysis using dynamic modeling. *J Trauma* 2006; 60(6):1221-7.

62. Krausz MM, Bashenko Y, Hirsh M. Crystalloid or colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock after moderate splenic injury. *Shock* 2000; 13(3):230-5.
63. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma* 1995; 38(2):185-93.
64. MacKenzie EJ. Epidemiology of injuries: current trends and future challenges. *Epidemiol Rev* 2000; 22(1):112-9.
65. MacLeod JB, Lynn M, McKenney MG, Cohn SM, Murtha M. Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *J Trauma* 2003; 55(1):39-44.
66. Brohi K, Cohen MJ, Davenport RA. Acute coagulopathy of trauma: mechanism, identification and effect. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13(6):680-5.
67. Brohi K, Singh J, Heron M, Coats T. Acute traumatic coagulopathy. *J Trauma* 2003; 54(6):1127-30.
68. Spivey M, Parr MJ. Therapeutic approaches in trauma-induced coagulopathy. *Minerva Anesthesiol* 2005; 71(6):281-9.
69. Engström M, Schött U, Romner B, Reinstrup P. Acidosis impairs the coagulation: A thromboelastographic study. *J Trauma* 2006; 61(3):624-8.
70. Martini WZ. Coagulopathy by hypothermia and acidosis: mechanisms of thrombin generation and fibrinogen availability. *J Trauma* 2009; 67(1):202-8.
71. Hess JR. Blood and coagulation support in trauma care. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007(1): 187-91.
72. Martini WZ, Dubick MA, Pusateri AE, Park MS, Ryan KL, Holcomb JB. Does bicarbonate correct coagulation function impaired by acidosis in swine? *J Trauma* 2006; 61(1):99-106.
73. Martini WZ, Dubick MA, Wade CE, Holcomb JB. Evaluation of tris-hydroxymethylaminomethane on reversing coagulation abnormalities caused by acidosis in pigs. *Crit Care Med* 2007; 35(6):1568-74.
74. Tsuei BJ, Kearney PA. Hypothermia in the trauma patient. *Injury*. 2004;35(1):7-15.
75. Shafi S, Elliott AC, Gentilello L. Is hypothermia simply a marker of shock and injury severity or an independent risk factor for mortality in trauma patients? Analysis of a large national trauma registry. *J Trauma* 2005; 59(5):1081-5.

76. Trentzsch H, Huber-Wagner S, Hildebrand F, Kanz KG, Faist E, Piltz S, et al. Hypothermia for prediction of death in severely injured blunt trauma patients. *Shock* 2012; 37(2):131-9.
77. Dirkmann D, Hanke AA, Görlinger K, Peters J. Hypothermia and acidosis synergistically impair coagulation in human whole blood. *Anesth Analg* 2008; 106(6):1627-32.
78. Wolberg AS, Meng ZH, Monroe DM, Hoffman M. A systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function. *J Trauma* 2004; 56(6):1221-8.
79. Meng ZH, Wolberg AS, Monroe DM, Hoffman M. The effect of temperature and pH on the activity of factor VIIa: implications for the efficacy of high-dose factor VIIa in hypothermic and acidotic patients. *J Trauma* 2003; 55(5):886-91.
80. Hirshberg A, Dugas M, Banez EI, Scott BG, Wall MJ, Mattox KL. Minimizing dilutional coagulopathy in exsanguinating hemorrhage: a computer simulation. *J Trauma* 2003; 54(3):454-63.
81. Brazil EV, Coats TJ. Sonoclot coagulation analysis of in-vitro haemodilution with resuscitation solutions. *J R Soc Med* 2000; 93(10):507-10.
82. Coats TJ, Brazil E, Heron M. The effects of commonly used resuscitation fluids on whole blood coagulation. *Emerg Med J* 2006; 23(7):546-9.
83. Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, Hébert PC, Investigators A, Group CCCT. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. *Transfusion* 2006; 46(11):2014-27.
84. Levy JH. Massive transfusion coagulopathy. *Semin Hematol* 2006; 43(Suppl 1):S59-63.
85. Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; 358(12):1229-39.
86. Spinella PC, Carroll CL, Staff I, Gross R, Mc Quay J, Keibel L, et al. Duration of red blood cell storage is associated with increased incidence of deep vein thrombosis and in hospital mortality in patients with traumatic injuries. *Crit Care* 2009; 13(5):R151.
87. Dzik W. Fresh blood for everyone? Balancing availability and quality of stored GVs. *Transfus Med* 2008; 18(4):260-5.

88. Niles SE, McLaughlin DF, Perkins JG, Wade CE, Li Y, Spinella PC, et al. Increased mortality associated with the early coagulopathy of trauma in combat casualties. *J Trauma* 2008; 64(6):1459-63.
89. Rezaie AR. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem* 2010; 17(19):2059-69.
90. Chesebro BB, Rahn P, Carles M, Esmon CT, Xu J, Brohi K, et al. Increase in activated protein C mediates acute traumatic coagulopathy in mice. *Shock* 2009; 32(6):659-65.
91. Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 2002; 34(7-8):598-605.
92. Hartert H. Coagulation analysis with thrombelastography, a new method. *Klin Wochenschr* 1948; 26:577-83.
93. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesth Analg* 2008; 106(5):1366-75.
94. Da Luz LT, Nascimento B, Rizoli S. Thrombelastography (TEG®): practical considerations on its clinical use in trauma resuscitation. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2013; 21:29.
95. Whiting D, Dinardo JA. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. *Am J Hematol* 2014; 89 (2):228-32.
96. Di Benedetto P, Baciarello M, Cabetti L, Martucci M, Chiaschi A, Bertini L. Thrombelastography. Present and future perspectives in clinical practice. *Minerva Anesthesiol* 2003; 69(6):501-15.
97. Tanaka KA, Bolliger D, Vadlamudi R, Nimmo A. Rotational thromboelastometry (ROTEM)-based coagulation management in cardiac surgery and major trauma. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; 26(6):1083-93.
98. Lier H, Vorweg M, Hanke A, Görlinger K. Thromboelastometry guided therapy of severe bleeding. Essener Runde algorithm. *Hamostaseologie* 2013; 33(1):51-61.
99. Pezold M, Moore EE, Wohlaer M, Sauaia A, Gonzalez E, Banerjee A, et al. Viscoelastic clot strength predicts coagulation-related mortality within 15 minutes. *Surgery* 2012; 151(1):48-54.

100. Nienaber U, Innerhofer P, Westermann I, Schöchl H, Attal R, Breitkopf R, et al. The impact of fresh frozen plasma vs coagulation factor concentrates on morbidity and mortality in trauma-associated haemorrhage and massive transfusion. *Injury* 2011; 42(7):697-701.
101. Schöchl H, Nienaber U, Maegele M, Hochleitner G, Primavesi F, Steitz B, et al. Transfusion in trauma: thromboelastometry-guided coagulation factor concentrate-based therapy versus standard fresh frozen plasma-based therapy. *Crit Care* 2011; 15(2):R83.
102. Weber CF, Görlinger K, Meininger D, Herrmann E, Bingold T, Moritz A, et al. Point-of-care testing: a prospective, randomized clinical trial of efficacy in coagulopathic cardiac surgery patients. *Anesthesiology* 2012; 117(3):531-47.
103. Johansson PI, Stissing T, Bochsén L, Ostrowski SR. Thrombelastography and tromboelastometry in assessing coagulopathy in trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17:45.
104. Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ, Lumb WV, Jones EW. *Lumb & Jones' veterinary anesthesia*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. 727p.
105. Rönn T, Lendemans S, de Groot H, Petrat F. A new model of severe hemorrhagic shock in rats. *Comp Med* 2011; 61(5):419-26.
106. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Lisboa TA, Cunha-Melo JR. Rabbit model of uncontrolled hemorrhagic shock and hypotensive resuscitation. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43(12):1153-9.
107. Holcomb JB, Zarzabal LA, Michalek JE, Kozar RA, Spinella PC, Perkins JG, et al. Increased platelet:GV ratios are associated with improved survival after massive transfusion. *J Trauma* 2011; 71(Suppl 3):S318-28.
108. Shaz BH, Dente CJ, Nicholas J, MacLeod JB, Young AN, Easley K, et al. Increased number of coagulation products in relationship to red blood cell products transfused improves mortality in trauma patients. *Transfusion* 2010; 50(2):493-500.
109. Duchesne JC, Islam TM, Stuke L, Timmer JR, Barbeau JM, Marr AB, et al. Hemostatic resuscitation during surgery improves survival in patients with traumatic-induced coagulopathy. *J Trauma* 2009; 67(1):33-7.
110. Parr MJ, Bouillon B, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Hess JR, et al. Traumatic coagulopathy: where are the good experimental models? *J Trauma* 2008; 65(4):766-71.

111. Weinberg JA, MacLennan PA, Vandromme-Cusick MJ, Angotti JM, Magnotti LJ, Kerby JD, et al. Microvascular response to red blood cell transfusion in trauma patients. *Shock* 2012; 37(3):276-81.
112. Rana R, Fernández-Pérez ER, Khan SA, Rana S, Winters JL, Lesnick TG, et al. Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study. *Transfusion* 2006; 46(9):1478-83.
113. Odunayo A, Kerl ME. Comparison of whole blood and plasma colloid osmotic pressure in healthy dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011; 21(3):236-41.
114. Tønnessen T, Tølløfsrud S, Kongsgaard UE, Noddeland H. Colloid osmotic pressure of plasma replacement fluids. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37(4):424-6.
115. Watenpaugh DE, Gaffney FA. Measurement of net whole-body transcapillary fluid transport and effective vascular compliance in humans. *J Trauma* 1998; 45(6):1062-8.
116. Paes-da-Silva F, Gonzalez AP, Tibiriçá E. Effects of fluid resuscitation on mesenteric microvascular blood flow and lymphatic activity after severe hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2003; 19(1):55-60.
117. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005; 106(8):2605-12.
118. Mosesson MW. The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* 1992; 29(3):177-88.
119. He S, Johnsson H, Zabczyk M, Hultenby K, Wallén H, Blombäck M. Fibrinogen depletion after plasma-dilution: impairment of proteolytic resistance and reversal via clotting factor concentrates. *Thromb Haemost* 2014; 111(3):417-28.
120. Ruttman TG, James MF, Viljoen JF. Haemodilution induces a hypercoagulable state. *Br J Anaesth* 1996; 76(3):412-4.
121. Bolliger D, Szlam F, Levy JH, Molinaro RJ, Tanaka KA. Haemodilution-induced profibrinolytic state is mitigated by fresh-frozen plasma: implications for early haemostatic intervention in massive haemorrhage. *Br J Anaesth* 2010; 104(3):318-25.
122. Engels PT, Rezende-Neto JB, Al Mahroos M, Scarpelini S, Rizoli SB, Tien HC. The natural history of trauma-related coagulopathy: implications for treatment. *J Trauma* 2011; 71(Suppl 1):S448-55.

123. Godier A, Ozier Y, Susen S, (GIHP) Gdiehp. [1/1 plasma to red blood cell ratio: an evidence-based practice?]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011; 30(5):421-8.
124. MacLennan S, Williamson LM. Risks of fresh frozen plasma and platelets. *J Trauma* 2006; 60(6 Suppl):S46-50.
125. Triulzi DJ. Transfusion-related acute lung injury: current concepts for the clinician. *Anesth Analg* 2009; 108(3):770-6.
126. Harr JN, Moore EE, Wohlaer MV, Droz N, Fragoso M, Banerjee A, et al. The acute coagulopathy of trauma is due to impaired initial thrombin generation but not clot formation or clot strength. *J Surg Res* 2011; 170(2):319-24.
127. Hardwick J. Blood processing. *ISBT Science Series* 2008; 3(2):148-76.
128. Devine DV, Howe D. Processing of whole blood into cellular components and plasma. *ISBT Science Series* 2010; 5(1):78-82.
129. Harr JN, Moore EE, Ghasabyan A, Chin TL, Sauaia A, Banerjee A, et al. Functional fibrinogen assay indicates that fibrinogen is critical in correcting abnormal clot strength following trauma. *Shock* 2013; 39(1):45-9.
130. Caudill JS, Nichols WL, Plumhoff EA, Schulte SL, Winters JL, Gastineau DA, et al. Comparison of coagulation factor XIII content and concentration in cryoprecipitate and fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2009; 49(4):765-70.
131. Francis CW, Marder VJ. Concepts of clot lysis. *Annu Rev Med.* 1986;37:187-204.
132. Gando S, Tedo I, Kubota M. Posttrauma coagulation and fibrinolysis. *Crit Care Med* 1992; 20(5):594-600.
133. Cosgriff N, Moore EE, Sauaia A, Kenny-Moynihan M, Burch JM, Galloway B. Predicting life-threatening coagulopathy in the massively transfused trauma patient: hypothermia and acidoses revisited. *J Trauma* 1997; 42(5):857-61.
134. Floccard B, Rugeri L, Faure A, Saint Denis M, Boyle EM, Peguet O, et al. Early coagulopathy in trauma patients: an on-scene and hospital admission study. *Injury* 2012; 43(1):26-32.
135. Levrat A, Gros A, Rugeri L, Inaba K, Floccard B, Negrier C, et al. Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. *Br J Anaesth* 2008; 100(6):792-7.

136. Cotton BA, Reddy N, Hatch QM, LeFebvre E, Wade CE, Kozar RA, et al. Damage control resuscitation is associated with a reduction in resuscitation volumes and improvement in survival in 390 damage control laparotomy patients. *Ann Surg* 2011; 254(4):598-605.
137. Mapstone J, Roberts I, Evans P. Fluid resuscitation strategies: a systematic review of animal trials. *J Trauma* 2003; 55(3):571-89.
138. Rezende-Neto JB, Rizoli SB, Andrade MV, Ribeiro DD, Lisboa TA, Camargos ER, et al. Permissive hypotension and desmopressin enhance clot formation. *J Trauma* 2010; 68(1):42-50.
139. Lilly MP, Gala GJ, Carlson DE, Sutherland BE, Gann DS. Saline resuscitation after fixed-volume hemorrhage. Role of resuscitation volume and rate of infusion. *Ann Surg* 1992; 216(2):161-71.
140. Rizoli SB. Crystalloids and colloids in trauma resuscitation: a brief overview of the current debate. *J Trauma* 2003; 54(5 Suppl):S82-8.
141. Takasu A, Minagawa Y, Ando S, Yamamoto Y, Sakamoto T. Improved survival time with combined early blood transfusion and fluid administration in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *J Trauma* 2010; 68(2):312-6.
142. Davenport R, Curry N, Manson J, De'Ath H, Coates A, Rourke C, et al. Hemostatic effects of fresh frozen plasma may be maximal at red cell ratios of 1:2. *J Trauma* 2011; 70(1):90-5.
143. Kashuk JL, Moore EE, Johnson JL, Haenel J, Wilson M, Moore JB, et al. Postinjury life threatening coagulopathy: is 1:1 fresh frozen plasma:packed red blood cells the answer? *J Trauma* 2008; 65(2):261-70.
144. Gunter OL, Au BK, Isbell JM, Mowery NT, Young PP, Cotton BA. Optimizing outcomes in damage control resuscitation: identifying blood product ratios associated with improved survival. *J Trauma* 2008; 65(3):527-34.
145. Hoyt DB, Dutton RP, Hauser CJ, Hess JR, Holcomb JB, Kluger Y, et al. Management of coagulopathy in the patients with multiple injuries: results from an international survey of clinical practice. *J Trauma* 2008; 65(4):755-64.
146. Wohlaer MV, Moore EE, Harr J, Gonzalez E, Fragoso M, Silliman CC. A standardized technique for performing thromboelastography in rodents. *Shock* 2011; 36(5):524-6.
147. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008; 100(3):397-404.

9. ANEXOS