

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DOENÇA DE VON WILLEBRAND EM CÃES: ESTUDO
DA PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA
EM CÃES NORMAIS E EM FÊMEAS DURANTE O CICLO
ESTRAL, GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.**

CLÁUDIO ROBERTO SCABELO MATTOSO

BOTUCATU – SP
Dezembro 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Doença de von Willebrand em cães: estudo da
prevalência e caracterização da doença em cães
normais e em fêmeas durante o ciclo estral, gestação e
lactação.**

CLÁUDIO ROBERTO SCABELO MATTOSO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Regina Kiomi
Takahira

Co orientador: Prof. Dr. João Pessoa
Araujo Junior

BOTUCATU – SP
Dezembro 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Mattoso, Cláudio Roberto Scabelo.

Doença de von Willebrand em cães: estudo da prevalência e caracterização da doença em cães normais e em fêmeas durante o ciclo estral, gestação e lactação / Cláudio Roberto Scabelo Mattoso. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Co-orientador: João Pessoa Araujo Junior

Capes: 50503030

1. Hematologia veterinária. 2. von Willebrand, Fator de. 3. Sangue - Fator de coagulação.

Palavras-chave: Cão; Doença de von Willebrand; Hematologia; Hemostasia.

Nome do Autor: Cláudio Roberto Scabelo Mattoso

Título: “Doença de von Willebrand em cães: estudo da prevalência e caracterização da doença em cães normais e em fêmeas durante o ciclo estral, gestação e lactação.”

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Raimundo Souza Lopes
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a.Dr^a. Mere Erika Saito
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV - UDESC - SC

Prof.Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
Escola de Veterinária – UFMG – MG

Data da Defesa: 10 de dezembro de 2010.

*“I've loved, I've laughed and cried
I've had my fill, my share of losing
And now as tears subside
I find it all so amusing
To think I did all that
And may I say, not in a shy way
Oh no, oh no, not me
I did it my way”*

Claude François, Jacques Revaux & Paul Anka

*“Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente”*

Almir Satter & Renato Teixeira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais **Roberto e Emília**, sem vocês nada disso teria acontecido, levarei sempre comigo os ensinamentos que vocês me passaram. Sei que estão orgulhosos de mais esta etapa vencida

SINTO MUITO A FALTA DE VOCÊS!!!

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Quero também dedicar este trabalho a minha Princesinha linda, **Suzaninha**.....Muito obrigado por sempre me incentivar e me ajudar quando mais precisei, você é a razão da minha vida!!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profª. Drª. Regina Kiomi Takahira**, pelo apoio, incentivo e confiança. Mais que orientadora, uma amiga que me ajudou não só no desenvolvimento do doutorado, mas também em todas as dúvidas que surgiram sobre Patologia Clínica. Sempre recorrerei aos seus ensinamentos!!!

Ao meu co orientador, **Prof. Dr. João Pessoa Araujo Junior**, por ter aberto as portas do seu Laboratório, e sempre ter me deixado a vontade para realizar minhas dosagens. Sempre disposto a esclarecer todas as minhas dúvidas, por mais incoerentes que fossem. Muito obrigado!!!

À minha sogra, **Da Maria**, pelo apoio, ajuda, e sempre querendo me mimar, sempre me tratando como filho.

Ao **Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes**, pelos ensinamentos, papos, risadas, amizade, que sempre tivemos desde a época da graduação. Com quem sempre, as segundas feiras, ia falar de futebol...pena que o Flamengo nem sempre ia bem, mas como o próprio hino diz, “uma vez Flamengo, sempre Flamengo”.

À todos do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, UNESP Botucatu, que já me aguentam desde 1998!!! Muito obrigado por tudo!!!

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Provet Moema – São Paulo/SP, pela ajuda e apoio, sem vocês esse trabalho não se concluiria.

À grande amiga **Camila Louise, cabecinha chata**, pelo auxílio nas avaliações reprodutivas.

Ao **Prof. James L. Catalfamo**, PhD da Universidade de Cornell – Ithaca/NY que gentilmente cedeu os plasmas controle e pela orientação no desenvolvimento do projeto.

Ao **Prof. José Eduardo**, pela orientação estatística e análise dos resultados.

À meus cães, **Hannah, Lannah, Thor, Brenda, PA, Tucaninha, Luna, Kiki e Mel**, por sempre estarem ao meu lado, sempre me olharem compreendendo exatamente o que eu sentia...Vocês são nossa família!!!

À FAPESP pelo auxílio pesquisa cedido.

A Capes pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados da determinação do Antígeno do fator de von Willebrand (média e desvio padrão [DP]) em cães negativos para Doença de Von Willebrand..... 27
- Tabela 2 - Resultados do antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag), tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do FVIII (FVIII) em cães suspeitos para Doença de Von Willebrand (média±desvio padrão)..... 28
- Tabela 3 - Número absoluto (n=350) e porcentagem relativa de cães que foram negativos, suspeitos ou portadores para Doença de Von Willebrand..... 29
- Tabela 4 - Resultados do antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag), tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do FVIII (FVIII) em cães portadores para Doença de Von Willebrand..... 30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Variação do Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I (portadores para Doença de von Willebrand)..... 53
- Figura 2 - Variação do Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) durante os momentos estudados nos animais do Grupo II (negativos para Doença de von Willebrand). *Diferença estatística em comparação ao Momento Anestro ($p < 0,05$)..... 54
- Figura 3 - Concentração de Albumina plasmática (g/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I e II..... 55
- Figura 4 - Concentração de Cortisol plasmático (ug/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I e II.)..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

DvW	=	Doença de von Willebrand
FVIII	=	Fator oito da cascata de coagulação
FvW	=	Fator de von Willebrand
FvW:Ag	=	Antígeno do Fator de von Willebrand
FvW:CB	=	Atividade FvW baseada na ligação ao colágeno
FvW:Rco	=	Cofator da Ristocetina
GP	=	Glicoproteína
p	=	nível de significância
PPP	=	Plasma pobre em plaquetas
PRP	=	Plasma rico em plaquetas
RIPA	=	Agregação plaquetária induzida pela ristocetina
TS	=	Tempo de sangramento
TSMO	=	Tempo de sangramento da mucosa oral
TTPa	=	Tempo de tromboplastina parcial ativada

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO 1	
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
CAPÍTULO 2 – Prevalência da Doença de von Willebrand em cães provenientes do estado de São Paulo, Brasil.....	10
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Material e métodos.....	14
Resultados.....	17
Discussão.....	18
Referências.....	24
CAPÍTULO 3 – Avaliação do Fator de von Willebrand durante a gestação, lactação e ciclo estral em cadelas negativas e portadoras para Doença de von Willebrand	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Material e métodos.....	36
Resultados.....	40
Discussão.....	41
Referências.....	49
CAPÍTULO 4	
DISCUSSÃO GERAL.....	58
CONCLUSÕES GERAIS.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	62

ANEXOS

ANEXO 2. Normas da Revista Journal Veterinary Diagnostic Investigation.....	76
ANEXO 3. Avaliações individuais dos 350 animais utilizados para estudo de prevalência da DvW.....	88
ANEXO 4. Gráficos representativos, divididos por grupo, das variáveis albumina e cortisol no estudo de gestação e FvW.....	105

MATTOSO, C.R.S. **Doença de von Willebrand em cães: estudo da prevalência e caracterização da doença em cães normais e em fêmeas durante o ciclo estral, gestação e lactação.** Botucatu, 2010. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A Doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos homens e também nos cães. A DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos EUA. A DvW é causada por um defeito quantitativo e/ou qualitativo do Fator de von Willebrand (FvW), e nos cães é dividida em 3 tipos, tipo I, II e III. O diagnóstico da DvW está baseado na quantificação do FvW plasmático e testes de função plaquetária dependentes do FvW. Esse estudo foi dividido em duas partes, avaliação da prevalência da DvW (parte I) e avaliação das alterações do FvW em cadelas gestantes, e durante diferentes estágios do ciclo reprodutivo, em cadelas não gestantes (parte II). Os objetivos da parte I foram determinar a prevalência da Doença de von Willebrand (DvW) em cães da região de Botucatu, São Paulo, Brasil, e avaliar os testes laboratoriais para diagnóstico desta doença. Foram utilizados 350 cães de variadas idades e raças, de ambos os sexos. Os animais utilizados no estudo não tinham histórico ou evidências clínicas de alterações hemostáticas. Foram realizados os seguintes testes: antígeno do Fator de von Willebrand (vWF:Ag), Tempo de sangramento da Mucosa Oral (TSMO), Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do Fator VIII (FVIII). A prevalência encontrada para Doença de von Willebrand em cães da região de Botucatu foi de 1,43%. A determinação do vWF:Ag foi o melhor teste laboratorial para diagnosticar a DvW. Os objetivos da parte II foram a avaliação das alterações encontradas na concentração do FvW em cadelas gestantes, e também durante diferentes estágios do ciclo reprodutivo, observados após a gestação, em animais portadores e não portadores para a DvW, além da avaliação de correlação entre FvW e cortisol. Foram utilizadas 7 cadelas portadoras (GI) e 9 não portadoras (GII) para DvW. Os animais foram avaliados durante a gestação, parto, lactação e diferentes estágios do ciclo reprodutivo não gestacional. A concentração do FvW se manteve estável durante o ciclo

reprodutivo não gestacional, porém aumentou durante a gestação, com o maior valor sendo observado no momento do parto. Estas observações se repetiram nos dois grupos estudados. No GI o FvW aumentou 70% e no GII 124%, em comparação ao momento anestro. Não se observou correlação entre FvW e cortisol.

Palavras-chave: Brasil, cães, Doença de von Willebrand, gestação, cortisol.

MATTOSO, C.R.S. von Willebrand disease in dogs: study of prevalence and characterization in normal dogs and bitches during various reproductive cycles stages, pregnancy and lactation. Botucatu, 2010. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Von Willebrand disease (vWD) is the most common inherited hemostatic disturbance affecting men and also dogs. It has already been diagnosed in more than 54 dog breeds in the USA. vWD is caused by a quantitative and/or qualitative defect in von Willebrand Factor (vWF); in dogs, it is divided into types I, II and III. The diagnosis of vWD is based on plasma vWF quantification and vWF-dependent platelet function tests. This study was divided in two sections, evaluation of vWF prevalence (Section I) and evaluation of vWF concentrations in pregnant bitches, and during various reproductive cycle stages in non-pregnant bitches (section II). The aims of (section I) were to assess the prevalence of von Willebrand disease in dogs from the region of Botucatu, São Paulo State, Brazil, and to evaluate diagnostic tests. The study included 350 dogs of various ages, different breeds, and both sexes. Dogs included in the study had no historical or clinical evidence of abnormal bleeding. von Willebrand factor antigen (vWF:Ag), Buccal mucosal bleeding time (BMBT), Activated partial thromboplastin time (aPTT), and Factor VIII activity (FVIII) were evaluated in their ability to diagnose vWD. The prevalence of vWD in dogs was 1.43% in the Botucatu region of Brazil. Determination of vWF:Ag was the best laboratory test to diagnose vWD. The aims of section II were the evaluation of vWF concentrations in pregnant bitches, and during various reproductive cycle stages in non-pregnant bitches, observed after the pregnancy in vWD affected and unaffected bitches, over there of the correlation among vWF and cortisol. Were used seven bitches affected (GI) and nine unaffected (GII) to vWD. Animals were evaluated during the pregnancy, parturition, lactation, and during various reproductive cycle stages in non-pregnant bitches. vWF concentration did not change during reproductive cycle stages in non-pregnant bitches, however increase during pregnancy, with peaked at parturition moment

in the both groups. vWF increase 70% in GI, and 124% in GII, when compared with anestrus moment. Did not observed correlation among vWF and cortisol.

Key words: Brazil, dogs, von Willebrand disease, pregnancy, cortisol.

Capítulo 1

- Capítulo 1 -

1-INTRODUÇÃO

A Doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos homens e também nos cães (Murray e Lillicrap, 1996; Johnson et. al., 1988).

Esta doença já foi diagnosticada em diversas raças de cães (Dodds, 1997; Kraus e Johnson, 1989).

A doença resulta em uma deficiência ou anormalidade no Fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína necessária para a adesão plaquetária ao subendotélio vascular exposto e também muito importante na estabilização do fator VIII (Sadler et. al., 1995).

O fenótipo da DvW é classificado com base na concentração e na estrutura multimérica do FvW (Johnson et. al., 1988; Sadler et. al., 1995). O tipo 1 da DvW é caracterizado por uma baixa concentração do FvW, porém com estrutura normal, já no tipo 2 existe uma baixa concentração e estrutura multimérica anormal do FvW. O tipo 3 se caracteriza pela ausência do FvW (Brooks et. al., 2001).

Os sinais clínicos são compatíveis aos encontrados no ser humano, ou seja, alteração na hemostasia primária (Dodds, 1984).

Em cães o diagnóstico é realizado pela mensuração da concentração do antígeno do FvW plasmático (FvW:Ag) (Brooks, 1992). O tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) pode ser usado para detecção da expressão clínica da DvW (Dodds, 1997) e como teste pré-cirúrgico (Stokol e Parry 1993). A agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA) pode

estar diminuída, pois muitos tipos da DvW são caracterizados por hiporresponsividade a ristocetina (Federici et al., 2002).

A DvW possui apenas um relato no Brasil (Mattoso et al., 2010), apesar do seu diagnóstico já estar bem definido, com relatos sobre a doença em vários países (Estados Unidos, Austrália, Inglaterra, África do Sul, entre outros). A realização de estudos envolvendo a DvW em Medicina Veterinária se torna muito importante para demonstrar que esta doença existe, e que provavelmente, no Brasil, muitos diagnósticos deixem de ser realizados pela não realização de testes diagnósticos de rotina.

Na clínica médica de pequenos animais os sinais clínicos de diátese hemorrágica são muito frequentes, podendo ter diversas causas. Tais alterações na hemostasia se tornam um sério problema para os clínicos veterinários. O diagnóstico de alterações hemostáticas nem sempre é simples e direto, pois os animais portadores podem não demonstrar sinais clínicos de sangramento e com isso a evidenciação da doença pode ocorrer somente num ato cirúrgico ou traumático. A falta de um diagnóstico pode estar subestimando a importância da doença no Brasil, além do fato de que nem todos os subtipos descritos em humanos foram identificados em cães.

Um estudo envolvendo a prevalência da DvW em cães, e a incidência desta doença em diversas raças, seria muito importante, principalmente se a avaliação for realizada em animais que não apresentem distúrbios de sangramento. Com esses dados se verificaria a real importância dessa doença na espécie canina.

As alterações que ocorrem com o FvW durante a gestação são evidentes (Moser et al., 1998), com isso estudos avaliando tais alterações podem auxiliar na compreensão do aumento da produção do FvW durante essa fase, podendo contribuir de forma importantíssima no estudo da DvW, tanto em cães, quanto em seres humanos.

Por estes motivos a determinação da prevalência da DvW em cães sem evidências de sangramento e a caracterização de alterações no FvW durante a gestação e ciclo estral de cadelas não gestantes é fundamental para o melhor entendimento dessa doença, e com isso auxiliar tanto na Medicina Veterinária, quanto na Medicina Humana.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença de von Willebrand

A doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos cães (Dodds, 1984; Johnson et al., 1988; Brooks, 1992; Brooks, 2000) e também nos homens (Cooler, 1987; Bithell, 1993; Chen et al., 1998; Schwarz et al., 1998; Triplet, 2000; White e Montgomery, 2000; Sadler e Blinder, 2001; Federici et al., 2002; Mammen, 2002).

O primeiro relato da DvW foi feito em 1926, pelo Professor Erik von Willebrand, que observou alterações hemorrágicas em muitos membros de uma mesma família. A partir destas observações, o Prof. von Willebrand começou a estudar esta alteração hemorrágica e neste relato caracterizou os sinais mais frequentes como sendo sangramento nasal e por ocasião da troca dentária. O tempo de sangria se mostrava aumentado, porém com concentração de plaquetas normal, sendo este, segundo Prof. Von Willebrand, a característica mais importante da enfermidade. Acreditava-se que a herança da doença era autossômica dominante, com vários graus de penetrância ou mesmo recessiva (Nilsson, 1999).

A prevalência da DvW nos homens é de 0,82-2,0%, embora exista uma suspeita de subestimação desta prevalência devido a dificuldades no diagnóstico laboratorial desta doença (White e Montgomery, 2000; Rodeghiero et al., 1987). Em cães essa prevalência é de 1,43% (Mattoso et al., 2010), não sendo encontrados outros dados na literatura mundial.

A DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos EUA, sendo encontrada com alta prevalência em Dobermanns (maior que 50%), Airedale Terrier e Scottish Terrier (Dodds, 1997; Kraus e Johnson, 1989).

A herança da DvW é complexa e depende do tipo da doença. Esquemáticamente o tipo 3 é considerado recessivo, ao passo que muitas formas do tipo 2 são dominantes. O tipo 1 é geralmente considerado como dominante, embora existam diversas exceções pela heterogenicidade (Miller et al., 1979). O gene do FvW canino está localizado num autossomo, sendo que o cariótipo ainda não foi estabelecido (Brooks, 2000).

A DvW é causada por um defeito quantitativo e/ou qualitativo do fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular (Ginsburg e Bowie, 1992; Sadler e Gralnick, 1994; Mannucci, 1995; Sadler et al., 1995; Mazurier e Meyer, 1996; Murray e Lillicrap, 1996; Mohri et al., 1998; Budde e Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002).

O FvW exerce sua função de duas maneiras, iniciando e suportando a adesão plaquetária ao local de injúria vascular (Wagner, 1990; Ginsburg e Bowie, 1992; Mannucci, 1995; Murray e Lillicrap, 1996; Mohri et al., 1998) e estabilizando funcionalmente o fator VIII plasmático (Wagner, 1990; Ginsburg e Bowie, 1992; Mannucci, 1995; Murray e Lillicrap, 1996; Mohri et al., 1998; Schwarz et al., 1998; Budde e Schneppenheim, 2001; Federici et al., 2002; Schwarz et al., 2002).

As células endoteliais são os maiores locais de síntese e armazenamento do FvW em cães, sendo que também existe produção pelos megacariócitos (Budde e Schneppenheim, 2001). As plaquetas caninas praticamente não armazenam o FvW (Brooks, 2000).

O FvW é uma proteína multimérica que contém 2050 aminoácidos, sendo que a dimerização ocorre por pontes dissulfeto, da mesma maneira que a multimerização. A menor subunidade do FvW é o dímero com massa molecular de aproximadamente 540kDa, sendo que o maior multímero excede 10000kDa (Budde e Schneppenheim, 2001).

Quando ocorre exposição do subendotélio, o FvW liga-se ao colágeno e apresenta uma conformação que facilita sua interação com as plaquetas (glicoproteína Ib da superfície plaquetária), sendo que a ponte intraplaquetária também é mediada pelo FvW (Brooks, 2000; Schwarz et al., 2002.). Esta função do FvW é essencial para a formação do tampão plaquetário no local onde a integridade vascular foi perdida (Schwarz et al., 2002). O receptor plaquetário GP Ib é o principal receptor para o FvW, sendo que o FvW também pode se ligar ao receptor GPIIb-IIIa, que é expressado quando as plaquetas estão ativadas (Triplet, 2000).

Em cães, os sinais clínicos são similares aos encontrados nos humanos (Schwarz et al., 1998), como as hemorragias em mucosa, sangramento prolongado em ferimentos cirúrgicos e em erupções dentárias, sendo também

sinais típicos de alteração na hemostasia primária (Schwarz et al., 1998; Brooks, 2000; Budde e Schneppenheim, 2001; Schwarz et al., 2002).

A classificação da DvW em cães se dá com base na gravidade clínica, na concentração plasmática do FvW e nas estruturas multiméricas do FvW (Brooks, 2000). A DvW em cães é dividida em 3 tipos, sem subdivisões (Sato e Parry, 1998; Brooks, 2000).

A doença do tipo 1 é definida como uma deficiência parcial quantitativa do FvW, sendo que a concentração plasmática do FvW está diminuída (menor que 50%), porém o fator que está presente tem uma estrutura multimérica normal e normalmente suporta a interação plaquetária “in vitro”, sendo também a forma mais comum (Brooks, 2000).

A doença do tipo 2, em cães, consiste em uma perda desproporcional das formas multiméricas de alto peso molecular e uma redução significativa da aglutinação plaquetária “in vitro” (Brooks, 2000).

O tipo 3 da DvW é uma deficiência quantitativa grave do FvW (menos que 0,1%). Nos cães, a correlação entre a hemofilia A e a DvW é menor que em seres humanos (Schwarz et. al., 1998).

O antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) pode ser mensurado no plasma por muitos métodos imunológicos (imunoeletroforese, ELISA e radioimunoensaio), sendo que estes métodos irão quantificar a concentração total plasmática do FvW (Federici et al., 2002; Vischer e Moerloose, 1999). Em cães, o ELISA é o método mais utilizado para a quantificação do FvW:Ag (Benson et. al., 1991; Brooks, 1992; Johnson et. al., 1988), sendo o teste de escolha na identificação da DvW nessa espécie (Mattoso et al., 2010).

Outro teste que pode ser realizado como estimativa da hemostasia primária é o tempo de sangramento (TS). O TS realizado na pele não é indicado em Medicina Veterinária devido à dificuldade de padronização da técnica (Forsythe e Willis, 1989). Outra técnica que pode ser utilizada é o tempo de sangria da mucosa oral (TSMO), que irá avaliar somente a hemostasia primária, pelo fato de envolver somente a microcirculação. O TSMO é a melhor maneira de se testar a função da hemostasia primária (Brassard e Meyers, 1991). Os valores de referência para o TSMO variam de

1,7 a 4,2 minutos (Jergens et. al., 1987). O TSMO pode ser realizado pela técnica descrita por Marks (2000).

O método para atividade do cofator da ristocetina (FvW:RCo) explora a ligação do FvW com o complexo GP Ib plaquetário, sendo um teste funcional para atividade do FvW, importante na diferenciação entre o tipo I e o tipo II da doença (Brooks, 2000; Schneppenhein, 2001; Federici et al., 2002). Na Medicina Veterinária o FvW:RCo está sendo substituído pelo teste de atividade do FvW baseados na ligação ao colágeno (FvW:CB), pois sofre interferências de substâncias presentes no plasma canino, principalmente a albumina (Sabino et al., 2006).

O FvW pode ser analisado por eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose de baixa resolução separa os multímeros do FvW que são convencionalmente separados em multímeros de baixo, intermediário e alto peso molecular, No tipo 1 da DvW todos os multímeros estão presentes, ao passo que no tipo 2 os multímeros de alto e intermediário peso molecular são perdidos (Federici et al., 2002).

2.2. Doença de von Willebrand e gestação

A concentração de todos os multímeros do FvW aumentam durante a gestação em cadelas (Moser et al., 1998) e também mulheres (Conti et al., 1986; Chediak, et al., 1986) clinicamente normais e com o tipo I da DvW.

Segundo Ölundarson et al. (2001) o FvW não altera durante o ciclo menstrual de mulheres clinicamente normais, porém segundo Miller et al. (2002) existe uma variação na concentração do FvW durante o ciclo estral de mulheres clinicamente normais, com aumento significativo na fase folicular recente e tardia, em comparação aos valores encontrados durante a menstruação. Em cadelas não foram observadas diferenças significativas entre todas as fases do ciclo estral (pró estro, estro, diestro e anestro), tanto em cadelas normais, como em cadelas com o tipo I da DvW (Moser et al., 1998).

As oscilações do FvW durante a gestação podem ser em parte correlacionadas com as flutuações hormonais de estradiol e progesterona durante essa fase, porém suspeita-se que exista um efeito somatório ou

mesmo isolado durante o ciclo estral da cadela não gestante (Moser et al., 1998).

Capítulo 2

- Capítulo 2 -

3-TRABALHO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION

“Prevalência da Doença de von Willebrand em cães provenientes do estado de São Paulo, Brasil”

Cláudio Roberto S. Mattoso, Suzane Lílian Beier, José Eduardo Corrente, João Pessoa
Araújo Jr, Regina Kiomi Takahira.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Distrito de Rubião Jr., s/n,
Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Caixa postal 560, Brasil (Mattoso e Takahira),
Escola de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias - UDESC, Av.
Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, Santa Catarina, CEP 88520-000,
Brasil (Beier), e Instituto de Biociências - UNESP, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu,
São Paulo, 18618-000, Brasil (Corrente e Araújo Jr).

Autor Correspondente: Regina Kiomi Takahira, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - UNESP, Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório Clínico
Veterinário, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Caixa
postal 560, Brasil, telefone (55) 14 3811 6115, e-mail takahira@fmvz.unesp.br

DvW em cães do Brasil

Resumo. Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência da Doença de von Willebrand (DvW) em cães da região de Botucatu, São Paulo, Brasil, e avaliar os testes laboratoriais para diagnóstico desta doença. Foram utilizados 350 cães de variadas idades e raças, de ambos os sexos. Os animais utilizados no estudo não tinham histórico ou evidências clínicas de alterações hemostáticas. Foram realizados os seguintes testes, dosagem do antígeno do Fator de von Willebrand (vWF:Ag), Tempo de sangramento da Mucosa Oral (TSMO), Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do Fator VIII (FVIII). A prevalência encontrada para Doença de von Willebrand em cães da região de Botucatu foi de 1,43%. A determinação do vWF:Ag foi o melhor teste laboratorial para diagnosticar a DvW.

Palavras chave: Brasil, Cães, Doença de von Willebrand.

Introdução

A Doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos homens^{10,22} e também nos cães.^{3,4}

A prevalência da DvW nos homens é de 0,82-1,6%, embora exista uma suspeita de subestimação desta prevalência devido a dificuldades no diagnóstico laboratorial desta doença.⁴² Estudos recentes mostram uma prevalência da doença de 1 a 2%, sendo o tipo I o mais frequente (60-80%), seguido pelo tipo II (15-30%) e tipo III (5-10%).¹⁰

A DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos EUA, sendo encontrada com alta prevalência em Dobermann Pinscher, Airedale Terrier e Scottish Terrier^{19,36}. No Reino Unido outras raças também demonstram essa alta prevalência, entre elas Pastor Alemão, Golden retriever, Schnauzer Miniatura, Pembroke Welsh Corgi e Manchester Terrier.²⁰

A DvW hereditária é uma doença de trato autossômico, podendo ser recessiva ou com um padrão de dominância incompleta.¹⁶ Na DvW adquirida ocorre uma deficiência do Fator de von Willebrand (FvW) em associação com hipotireoidismo¹, entretanto estudos recentes não encontraram essa correlação entre DvW e hipotireoidismo.^{13,26}

A DvW é causada por um defeito quantitativo e/ou qualitativo do FvW, uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular^{8,10}. Esta glicoproteína é necessária para a adesão das plaquetas ao colágeno do subendotélio vascular exposto em áreas de alto fluxo sanguíneo.⁴

O FvW exerce sua função de duas maneiras, iniciando e suportando a adesão plaquetária ao local de injúria vascular^{24,25} e estabilizando funcionalmente o fator VIII plasmático.^{10,33}

Em cães, os sinais clínicos da DvW são similares aos encontrados nos humanos³², como as hemorragias em mucosa, sangramento prolongado em ferimentos cirúrgicos e em erupções dentárias.³³ Nos tipos II e III da DvW ocorre uma severa tendência ao sangramento, ao passo que no tipo I o sangramento ocorre de uma maneira induzida.⁴

A classificação da DvW em cães se dá com base na severidade clínica, na concentração plasmática e nas estruturas multiméricas do FvW.⁴ A DvW em cães é dividida em 3 tipos.^{4,31} A doença do tipo I é definida como uma deficiência parcial quantitativa do FvW, a do tipo II consiste em uma perda desproporcional das formas multiméricas de alto peso molecular e a do tipo III é uma deficiência quantitativa grave do FvW.⁴

O diagnóstico da DvW está baseado na quantificação do FvW plasmático e testes de função plaquetária dependentes do FvW, tanto “in vivo”, quanto “in vitro”.^{9,16}

Em Medicina Veterinária, a diátese hemorrágica pode ter diversas causas, sendo o diagnóstico um desafio a ser realizado. Além disso, os animais afetados podem não demonstrar sinais clínicos de sangramento e com isso a evidência da doença pode ocorrer somente num ato cirúrgico ou traumático.

A falta de diagnóstico pode estar subestimando a importância da DvW no Brasil. Apenas com o diagnóstico correto, poderemos diminuir a incidência da doença com base numa exclusão de indivíduos afetados de programas de reprodução.

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência da Doença de von Willebrand em cães da região de Botucatu e avaliar os testes diagnósticos a fim de melhor caracterizar a doença.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 350 cães de variadas idades e raças, independente de sexo, sem evidências históricas e/ou clínicas de alterações hemostáticas, provenientes do atendimento clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Campus de Botucatu.

Colheita e Conservação das Amostras

Foi colhido sangue da veia jugular em momento único em:

- tubos a vácuo com anticoagulante EDTA a 10%^a, para a contagem de plaquetas.

- tubos a vácuo com anticoagulante citrato de sódio a 3.2%^b, na proporção de 1 parte para 9 partes de sangue. Após a colheita os tubos eram mantidos em banho de gelo até a centrifugação. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 1710 X g por 15 minutos, para a obtenção do plasma citratado, que era separado e mantido em tubos tipo eppendorf, a -80°C até o momento do processamento. O plasma citratado era utilizado para a determinação do Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), atividade do FVIII (FVIII) e determinação do antígeno do FvW (vWF:Ag)

Exames laboratoriais

Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada em contador eletrônico de células^c e a morfologia celular plaquetária foi avaliada através de esfregaços sanguíneos, corados pelo método Romanowski¹⁴. Para inclusão no estudo os animais deviam apresentar uma contagem de plaquetas superior a 200.000/uL de sangue.

Tempo de sangramento da Mucosa Oral

O Tempo de sangramento da Mucosa Oral (TSMO) foi realizado conforme técnica modificada da literatura veterinária.²³ O animal era mantido em decúbito lateral ou esternal, e o lábio superior era evertido. Uma incisão vertical padronizada era realizada (perpendicular à margem do lábio) diretamente acima do dente canino maxilar com o auxílio de uma lanceta^d. O sangue era absorvido com um papel filtro circular, sempre 1 a 2 mm abaixo da incisão até que o sangramento cessasse. O tempo de sangramento, em segundos, foi aferido com auxílio de um cronômetro, se estendendo do momento da incisão inicial, até o momento em que o sangramento parasse.

Antígeno do FvW (vWF:Ag)

A dosagem do vWF:Ag foi realizada pelo método de ELISA direto (teste semi quantitativo comparativo), com anticorpo anti-FvW canino^e, conforme a técnica preconizada pelo fabricante. As amostras controle foram gentilmente cedidas pelo Dr. James Catalfamo.

Coagulograma

A determinação do TTPa e do FVIII foi realizada apenas nos animais que apresentaram vWF:Ag inferior a 70%. A determinação do TTPa foi realizada utilizando “Kit” comercial^f e a do FVIII foi realizada por meio da capacidade do plasma citratado do paciente em corrigir o TTPa de um plasma deficiente em fator VIII^g. Foram utilizados como controle para o TTPa o plasma citratado de 8 animais e também um Pool de plasmas (4 animais), sendo que todas as amostras utilizadas mostraram vWF:Ag > 70% e foram consideradas negativas para DvW. Esta determinação foi realizada para

se obter um valor de referência para o TTPa para o presente estudo ($14,67 \pm 2,19$ s). O intervalo de referência utilizado para atividade de FVIII foi de 56 a 180%.³⁷

Os animais foram classificados de acordo com o resultado do vWF:Ag em: negativos (vWF:Ag > 70%), suspeitos (vWF:Ag entre 50 e 70%) e portadores (vWF:Ag < 50%) para DvW.³⁹

Análise estatística

A comparação da dosagem do vWF:Ag com o TSMO, TTPa e FVIII e do TTPa com o FVIII foi realizada pelo Coeficiente de correlação de Pearson.

Foram realizadas comparações entre as raças e os sexos para o vWF:Ag dos animais negativos e suspeitos, sendo que foram excluídas as raças que apresentavam apenas um indivíduo. Foi utilizada a análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Para os animais suspeitos também foram avaliadas as variáveis TSMO, TTPa e FVIII de acordo com a mesma metodologia utilizada para vWF:Ag.

Para os animais portadores não foram realizadas comparações entre os valores obtidos para o vWF:Ag, TSMO, TTPa e FVIII segundo raças e sexo pois, apenas cinco animais foram encontrados (diferentes raças, com apenas um macho).

Foram realizadas comparações entre os animais suspeitos e portadores, dos seguintes parâmetros vWF:Ag, TSMO, TTPa e FVIII, utilizando-se Teste não paramétrico de Wilcoxon.

Todas as análises foram realizadas por meio de software comercial^h. Foi considerado o nível de significância de 5% ou p-valor correspondente.

Resultados

Na análise do vWF:Ag dos animais negativos não foram observadas diferenças estatísticas com relação ao sexo.

As maiores diferenças estatísticas entre raças ocorreram entre os Huskys Siberianos e Pugs e as demais raças estudadas (tabela 1).

As raças Akita, Malamute do Alaska, Fox Terrier, Border Collie, Chow Chow, Dálmata, Dobermann Pinscher, Dogue de Bordeaux, Pointer Inglês, Springer Spaniel, Fila Brasileiro, Schnauzer Gigante, Golden Retriever, Setter Irlandês e Pequinês não foram incluídas na tabela 1, pois apresentaram apenas um indivíduo por raça.

Para os animais suspeitos não foram observadas diferenças estatísticas com relação à raça e ao sexo para as variáveis vWF:Ag, TSMO e TTPa. A variável FVIII mostrou diferenças estatísticas entre algumas raças, não apresentando diferenças em relação ao sexo (tabela 2).

Os animais das raças Basset Hound, Boxer, Dobermann Pinscher, Pastor Alemão, Spitz Alemão, Schnauzer Gigante, Golden Retriever, Labrador retriever, Lhasa Apso, Dachshund Miniatura, Terrier Brasileiro, Premboke Welsh Corgi e Yorkshire Terrier não constam na tabela 2, pois apresentaram apenas um indivíduo por raça.

Com base nas 350 amostras testadas, que são apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 4, 300 (85,71%) cães foram negativos para DvW, com valor de FvW:Ag de $155,99 \pm 84,86\%$ (média \pm desvio padrão) e intervalo de 70,66-619,80%; 45 (12,86%) cães foram suspeitos para DvW, com valor de FvW:Ag de $61,11 \pm 5,05\%$ e intervalo de 51,16-69,55%; e 5 (1,43%) cães foram portadores para DvW, com valor de FvW:Ag de $33,49 \pm 11,52\%$ e intervalo de 24,15-48,70%.

Os animais portadores para DvW eram de cinco raças diferentes, sendo elas Dobermann Pinscher, Golden Retriever, Poodle Miniatura, Yorkshire Terrier e SRD

(tabela 4), sendo a incidência para DvW dentro das raças de 33,33%, 33,33%, 1,64%, 7,14% e 1,75% respectivamente.

A distribuição dos animais portadores para DvW foi de 0,69% (1/146) para machos e 1,94% (4/204) para fêmeas, sem diferenças estatísticas entre sexos

A maioria dos animais testados foram adultos, sendo que nenhum indivíduo apresentou alterações hemorrágicas no momento da colheita.

Não existiram diferenças estatísticas entre os valores de TSMO de animais negativos e suspeitos para DvW. Entretanto, foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores de TSMO de animais negativos e portadores, e entre animais suspeitos e portadores para a DvW.

No presente estudo não se observou correlação entre vWF:Ag e TSMO dos animais portadores ou dos animais suspeitos.

Todos os valores de TTPa e de FVIII encontrados neste trabalho se encontram dentro dos valores de referência adotados.³⁷ Não existiram diferenças estatísticas para os valores de TTPa e FVIII entre os animais suspeitos e portadores para DvW. Adicionalmente não se observou correlação entre o vWF:Ag e TTPa e entre o vWF:Ag e FVIII dos animais portadores ou suspeitos. Em contraste, houve correlação entre TTPa e FVIII nos animais suspeitos, mas não nos animais portadores.

Discussão

Algumas raças testadas mostraram 100% de animais negativos para DvW, apresentando no mínimo 2 indivíduos testados por raça, entre elas Husky Siberiano, Rottweiler, Pug, Bichon Frise, American Pit Bull Terrier, West Highland White Terrier, Pinscher Miniatura, Pastor Belga e Shih Tzu. Essas raças tiveram as maiores

concentrações de FvW:Ag (Tabela 1), demonstrando uma possível diferença na expressão gênica no FvW entre as raças.

Os valores encontrados para o TSMO para todos os animais negativos para DvW variou de 30 a 195 segundos, permanecendo dentro dos valores de referência propostos por vários autores.^{2,5,11,15,30}

O teste laboratorial de escolha para o diagnóstico inicial da DvW é a determinação do FvW:Ag, entretanto o TSMO, TTPa e FVIII apresentam um valor limitado para o diagnóstico da DvW.

A prevalência encontrada para animais portadores para DvW é semelhante à prevalência citada de 0,82 a 2%^{10,42} em seres humanos. A predisposição racial encontrada nas raças Dobermann Pinscher e Golden Retriever para desenvolver DvW, também foi observada por outros autores.^{6,18,38}

A incidência da DvW observada em cães da raça Yorkshire Terrier (7,14%) foi maior que a encontrada neste estudo para a DvW (1,43%), provavelmente pelo fato de apenas 14 animais terem sido testados, sendo que apenas um animal apresentou diminuição do vWF:Ag. A incidência da DvW obtida em animais das raças Poodle miniatura e SRD deste estudo se mostrou similar à relatada acima (1,43%), pois são raças bastante comuns em nosso meio.

Os animais suspeitos necessitariam de novas colheitas de material para serem novamente testados e redefinidos como animais negativos ou portadores. Em adição, testes de progênie também poderiam ser realizados, pois ao se quantificar o FvW dos progenitores e irmãos de ninhada se obteria informações adicionais sobre a incidência familiar da DvW, caso esta esteja presente.

Uma alta incidência de animais suspeitos para DvW foi encontrada neste estudo para as seguintes raças Basset Hound, Dobermann Pinscher, Schnauzer Gigante, Golden

Retriever e Premboke Welsh Corgi, sendo que a maioria destas possui uma predisposição racial para a DvW.²⁰ O fato de poucos indivíduos destas raças terem sido testados também pode ter contribuído para o aumento desta incidência.

Neste estudo, uma maior prevalência de DvW foi encontrada em fêmeas, contrariando outros autores^{7,39}, que encontraram uma maior ocorrência em machos, entretanto a diferença entre os sexos tende a ser minimizada quando o tamanho da amostragem aumenta, pois em doenças com um padrão autossômico de herança, machos e fêmeas são igualmente afetados.²⁰ Porém uma porcentagem maior de fêmeas também já foi relatada.³⁸, pois normalmente se testam animais com distúrbios de sangramento após cirurgias, sendo a OSH uma das cirurgias eletivas mais frequentemente realizadas na prática veterinária e pelo fato de vários distúrbios hemorrágicos ocorrerem no período pós parto e também devido ao estro.

O TSMO foi realizado em todos os cães sem sedação ou anestesia e os animais não demonstraram desconforto ou dor na realização da incisão, conforme também relatado por outros autores.^{15,30} Todos os valores de TSMO encontrados neste trabalho se encontram dentro dos valores de referência propostos para cães.¹⁵

O TSMO encontrado para animais portadores não se mostrou aumentado, possivelmente pelo fato de não ter ocorrido uma diminuição marcada do FvW:Ag (Tabela 4) e também pela diferença na técnica utilizada. Estudos anteriores utilizaram um aparelho para realização da incisão e uma gaze exercendo pressão direta sobre a maxila ou mandíbula^{2,5,15,29}, conseguindo desta forma, valores elevados de TSMO em animais portadores para a DvW. Neste estudo, o TSMO não se mostrou muito sensível na detecção de animais com DvW, sendo que a falta de sensibilidade pode ter ocorrido pelas leves reduções na atividade do FvW plasmático encontrados neste estudo, principalmente quando a função plaquetária é adequada.³⁰ Entretanto o uso da lanceta ao

invés de um aparelho padronizado para a realização do TSMO, pode ter sido responsável pela falta de sensibilidade encontrada para o TSMO no presente estudo. A incisão realizada por uma lanceta não fornece controle sobre a profundidade e o comprimento da incisão e, portanto, não é adequada para este teste. Apesar da diferença na técnica utilizada para o TSMO, conseguiu-se observar um resultado mais elevado nos animais portadores para a DvW, com diferenças estatísticas para o TSMO dos animais negativos para DvW.

Uma correlação entre dosagem do FvW:Ag e TSMO já foi encontrada para animais com DvW na raça Dobermann Pinscher⁵, porém não foi encontrada em Greyhounds.³⁰ Essa observação pode ser o resultado de uma diferença na estrutura multimérica do FvW, ou seja, Greyhounds com uma baixa concentração plasmática do FvW podem ter uma concentração maior de multímeros de alto peso molecular quando comparados aos Dobermanns Pinscher.³⁰

A ausência da correlação entre a quantidade do vWF:Ag e FVIII observada no corrente estudo já foi relatada em cães negativos para DvW²⁷, porém outros autores³⁷ encontraram correlação positiva em animais com DvW.

Neste estudo, tanto o TTPa, quanto o FVIII não mostraram resultados alterados nos animais portadores e suspeitos para DvW. Esta observação contraria relatos anteriores, que afirmam que a ligação ao FvW prolonga a meia vida do FVIII na circulação, sendo que uma diminuição do FvW pode estar associada a uma diminuição da atividade do FVIII.^{17,29,34} Entretanto, outros pesquisadores afirmam que o TTPa deve estar dentro dos intervalos de referência em animais portadores para DvW.¹⁸ Em um estudo anterior todos os animais portadores para DvW tiveram redução da atividade do FVIII, mas não com a mesma extensão da diminuição do vWF:Ag e também não o suficiente para alterar o TTPa.²⁰ Um aumento de TTPa com moderada diminuição da

atividade de FVIII já foi observado em alguns cães com diminuição do vWF:Ag^{7,38}, e pode ter sido encontrado devido à menor quantidade de vWF:Ag em animais com o tipo II da DvW, quando comparado aos animais afetados deste experimento.

Os cinco animais portadores para DvW que foram encontrados no presente estudo provavelmente têm o tipo I da DvW, o que poderia explicar a não diminuição da atividade de FVIII e consequente aumento do TTPa, mostrando que o TTPa avaliado sozinho tem um diagnóstico limitado em cães com DvW.²¹ Em seres humanos, o tipo I da DvW mostra uma diminuição da atividade do FVIII proporcional a redução do vWF:Ag, embora alguns pacientes apresentem atividade normal de FVIII.^{9,41} Os pacientes humanos do tipo II e III da DvW têm marcada redução da atividade de FVIII.^{12,28}, demonstrando que a resposta da atividade de FVIII e TTPa é diferente em cães e seres humanos com DvW.

Neste estudo houve correlação entre TTPa e FVIII nos animais suspeitos, mas não nos animais afetados, provavelmente devido ao pequeno número de animais com FvW:Ag < 50% (5 animais).

É importante notar que uma única mensuração normal do FvW:Ag não necessariamente exclui a DvW, especialmente em cães que apresentam uma leve diminuição no FvW:Ag. Alguns animais portadores para DvW podem não apresentar alterações laboratoriais quando testados, pois o FvW:Ag pode aumentar com o exercício, gestação, endotoxemia, azotemia, doença hepática e outras doenças.³⁵

A prevalência da DvW em cães sem evidências clínicas de hemorragia no Estado de São Paulo é de 1,43%, sem evidências de predisposição sexual, ocorrendo uma maior incidência nas raças Dobermann Pinscher e Golden Retriever.

A dosagem do vWF:Ag é o teste de escolha para o diagnóstico inicial da DvW, sendo que o TSMO, TTPa e o FVIII têm um valor limitado para o diagnóstico da DvW.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Brasileiro de Diagnósticos e Especialidades Veterinárias (PROVET Moema).

Fontes e Fabricantes

- a. Vacutainer®, BD, Franklin Lakes, NJ
- b. Vacuette®, Greiner Bio-one, Kremsmuenster, Osterreich, Austria
- c. CELL-DYN 3500 R, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL
- d. Feather Blood Lancets®, Feather Safety Razor Co. Ltd., Kita-Ku, Osaka, Japão
- e. Sheep anti-canine VWF®, Research Diagnostics Inc., Concord, MA
- f. Helena aPTT SA (ellagic acid), Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX
- g. Factor VIII Deficient Plasma, Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX
- h. SAS for Windows, v.9.2. - SAS Institute Inc., Cary, NC

Referências

1. Avgeris S, Lothrop Jr CD, McDonald TP: 1990, Plasma von Willebrand factor concentration and thyroid function in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 196(6): 921-924.
2. Brassard JA, Meyers KM: 1991, Evaluation of the Buccal Bleeding Time and Platelet Glass Bead Retention as Assays of Hemostasis in the Dog: the Effects of Acetylsalicylic Acid, Warfarin and von Willebrand Factor Deficiency. *Thromb Haemost* 65(2): 191-195.
3. Brooks M: 1992, Management of canine von Willebrand's disease. *Probl Vet Med* 4(4): 636-46.
4. Brooks M: 2000, von Willebrand Disease. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, eds. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 5th ed., pp. 509-515. Lea & Febiger, Philadelphia.
5. Brooks M, Catalfamo J: 1993, Buccal Mucosa bleeding time is prolonged in canine models of primary hemostatic disorders. *Thromb Haemost* 70(5): 777-80
6. Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL: 1992, Epidemiologic features of von Willebrand disease in Doberman pinscher, Scottish Terrier and Shetland sheepdogs: 260 cases (1984-1988). *J Am Vet Med Assoc* 200(8): 1123-127.
7. Brooks M, Raymond SBS, Catalfamo J: 1996, Severe, recessive von Willebrand's disease in German Wirehaired Pointers. *J Am Vet Med Assoc* 209(5): 926-929.
8. Budde U, Schneppenheim R: 2001, von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Rev Clin Exp Hematol* 5(4): 335-368.
9. Cooler BS: 1987, von Willebrand's disease. *In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, eds. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, 2nd ed., pp. 60-96. Lippincott, Philadelphia.
10. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM: 2002, Guidelines for the Diagnosis and Management of von Willebrand Disease in Italy. *Haemophilia* 8(5): 607-621.
11. Forsythe LT, Willis SE: 1989, Evaluating Oral Mucosa Bleeding Time in Healthy Dogs Using a Spring-Loaded Device. *Can Vet J* 30(4): 344-345.
12. Foster PA, Zimmerman TS: 1989, Factor VIII Structure and function. *Blood rev* 3(3): 180-191.
13. Heseltine JC, Panciera DL, Troy GC, et al.: 2005, Effect of levothyroxine administration on hemostatic analytes in Doberman Pinschers with von Willebrand disease. *J Vet Intern Med* 19:523-527.
14. Jain NC: 1986, Hematologic Techniques. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, ed. Jain NC, 4 ed., pp. 31-35. Lea & Febiger, Philadelphia.

15. Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS: 1987, Buccal Mucosa Bleeding Times of Healthy Dogs and of Dogs in Various Pathologic States, Including Thrombocytopenia, Uremia and von Willebrand's Disease. *Am J Vet Res* 48(9): 1337-42.
16. Johnson GS, Turrentine MA, Kraus KH: 1988, Canine von Willebrand's disease: a heterogeneous group of bleeding disorders. *In: Vet Clin North Am: Hemostasis*. Ed. Feldman BF. 18: 195-229.
17. Johnstone IB, Norris AM, Hirzer L: 1993, Type III von Willebrand's disease in Scottish Terriers: a report of two cases. *Can Vet J* 34(11): 679-681.
18. Littlewood JD: 1986, A practical approach to bleeding disorders in the dog. *Journal of Small Animal Practice* 27(6): 397-409.
19. Littlewood JD: 1991, von Willebrand's Disease in the dog. *Vet Annu* 31: 163-172.
20. Littlewood JD, Herrtage ME, Gorman NT, McGlennon NJ: 1987, von Willebrand's Disease in dogs in the United Kingdom. *Vet Rec* 121(20): 463-468.
21. Lobetti RG, Dippenaar T: 2000, von Willebrand's disease in the German shepherd dog. *J S Afr Vet Assoc* 71(2): 118-121.
22. Mammen EF: 2002, Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* 28(2): 109-110.
23. Marks SL: 2000, The Buccal Mucosal Bleeding Time. *J Am Anim Hosp Assoc* 36(4): 289-290.
24. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, et al.: 1998, Clinical Significance of Inhibitors in Acquired von Willebrand Syndrome. *Blood* 91(10): 3623-3629.
25. Murray EW, Lillicrap D: 1996, von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management. *Transfus Med Rev* 10(2): 93-110.
26. Panciera DL, Johnson GS: 1994, Plasma von Willebrand factor antigen concentration in dogs with hypothyroidism. *J Am Vet Med Assoc* 205:1550-1553.
27. Rosborough TK, Johnson GS, Benson RE, et al.: 1980, Measurement of canine von Willebrand factor using ristocetin and polybrene: diagnosis of canine von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med* 96(1): 47-56.
28. Ruggieri ZM: 1991, Structure and function of von Willenbrand factor: Relationship to von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc* 66(8):847-861.
29. Sadler JE: 1995, von Willebrand disease. *In: The Metabolic and Molecule Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 7th ed., pp. 3269-3287. New York, McGraw Hill.

30. Sato I, Anderson GA, Parry BW: 2000, An interobserver and intraobserver study of buccal mucosal bleeding time in Greyhounds. *Res Vet Sci* 68(1): 41-45.
31. Sato I, Parry BW: 1998, Effect of Desmopressin on plasma Factor VIII and von Willebrand Factor Concentrations in Greyhounds. *Aust Vet J* 76(12): 809-812.
32. Schwarz HP, Dorner F, Mitterer A, et al.: 1998, Evaluation of Recombinant von Willebrand Factor in a Canine Model of von Willebrand Disease. *Haemophilia* 4(suppl 3): 53-62.
33. Schwarz HP, Schlokot U, Mitterer A, et al.: 2002, Recombinant von Willebrand Factor – Insight into Structure and Function through Infusion Studies in Animals with Severe von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* 28(2): 215-226.
34. Slappendel RJ, Beijer EGM, van Leeuwen M: 1998, Type III von Willebrand's disease in Dutch Kooiker Dogs. *Vet Q* 20(3): 93-97.
35. Stockham SL, Scott MA: 2008, Hemostasis. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, ed. Stockham SL, Scott MA, 2nd ed., pp. 259–321. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
36. Stokol T, Parry BW: 1993, Canine von Willebrand Disease: A Review. *Aust Vet Prac* 23: 94-103.
37. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: 1995, Factor VIII Activity in Canine von Willebrand Disease. *Vet Clin Pathol* 24(3): 81-90.
38. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: 1995, von Willebrand Disease in Doberman dogs in Australia. *Aust Vet J* 72(7): 257-262.
39. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: 1995, von Willebrand's disease in Scottish Terriers in Australia. *Aust Vet J* 72(11): 404-407.
40. van Dongen AM, van Leuwen M, Slappendel RJ: 2001, Canine von Willebrand's disease type 2 in German Wirehair pointers in the Netherlands. *Vet Rec* 148(3): 80-82.
41. Weiss HJ, Hoyer LW, Rickles FR, et al.: 1973, Quantitative assay of plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. *J Clin Invest* 52(11): 2708-16.
42. White Ii GC, Montgomery RR: 2000, Clinical Aspects of and Therapy for von Willebrand Disease. In: *Hematology Basic Principles and Practice*, eds. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, et al., 3th ed., pp. 1946-1956. Churchill Livingstone.

Tabela 1. Resultados da determinação do Antígeno do fator de von Willebrand (média e desvio padrão [DP]) em cães negativos para Doença de von Willebrand.

Raças*	n	Média (%)	DP
Husky Siberiano^a	3	326,24	255,88
Rottweiler^{a,c}	7	260,92	329,32
Pug^{a,b}	4	260,46	58,50
Bichon Frise^{a,b,d}	5	197,49	48,16
American Pit Bull Terrier^{a,b,d,e}	2	179,26	138,43
Pastor Alemão^{b,d,e}	6	176,47	35,45
West Highland White Terrier^{b,d,e}	3	175,18	130,37
Beagle^{c,d,e}	9	168,46	41,98
Labrador retriever^{c,d,e}	6	165,73	56,49
SRD^{c,d,e}	49	161,19	75,89
Pinscher miniatura^{c,d,e}	8	156,78	66,00
Lhasa Apso^{c,d,e}	14	152,98	52,00
Pastor Belga^{c,d,e}	4	151,42	16,81
Yorkshire Terrier^{c,d,e}	12	150,99	65,85
Poodle miniatura^{d,e}	51	149,15	63,88
Dachshund miniatura^{c,d,e}	15	148,25	51,51
Shih Tzu^{c,d,e}	8	146,01	28,25
Terrier brasileiro^{c,d,e}	3	143,56	35,87
Maltês^{d,e}	22	138,37	64,04
Cocker Spaniel^e	29	137,88	68,41
Boxer^{d,e}	11	137,49	56,21
Schnauzer miniatura^e	14	124,25	56,86
Outras raças[†]	15	138,22	67,24
Total	300	155,99	84,86

*Raças com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa

($p < 0,05$). †Não incluído na análise estatística.

Tabela 2. Resultados da dosagem do antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag), tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do FVIII (FVIII) de cães suspeitos para Doença de von Willebrand (média±desvio padrão).

Raças	n	FvW:Ag (%)	TSMO (s)	TTPa (s)	FVIII (%)[*]
Maltês	2	66,73±2,09	81,00±43,84	13,00±1,41	105,22±13,84 ^{a,b}
Cocker Spaniel	10	61,52±5,15	79,30±22,93	14,80±1,62	84,31±10,11 ^b
Schnauzer miniatura	2	60,85±0,32	83,50±20,51	16,00±1,41	86,98±3,82 ^{a,b}
Beagle	2	59,87±8,93	74,00±36,77	15,50±0,71	118,69±5,22 ^a
Poodle miniatura	9	58,73±5,13	73,89±19,52	14,67±2,00	88,93±9,55 ^b
SRD	7	58,33±5,99	83,43±28,11	15,00±2,89	88,18±13,17 ^b
Outras raças†	13	63,31±3,38	108,08±26,72	15,08±1,85	82,28±8,58
Total	45	61,11±5,05	87,20±27,48	14,89±1,92	87,83±12,48

***Médias com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa**

(p<0.05). †Não incluído na análise estatística.

Tabela 3. Número absoluto (n=350) e porcentagem de cães que foram negativos, suspeitos ou portadores para Doença de von Willebrand.

Sexo	n° animais	Negativos (%)	Suspeitos (%)	Portadores (%)
Macho	144	84,72	14,58	0,69
Fêmea	206	86,41	11,65	1,94
Ambos	350	85,71	12,86	1,43

Tabela 4. Resultados do antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag), tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e atividade do Fator VIII (FVIII) em cães portadores para Doença de von Willebrand.

Raças	vWF:Ag (%)	TSMO (s)	TTPa (s)	FVIII (%)
Dobermann Pinscher	24,15	119	14,00	79,20
Yorkshire Terrier	25,28	145	15,00	95,43
SRD	26,23	130	17,00	63,71
Poodle Miniatura	43,11	138	15,50	84,28
Golden Retriever	48,70	150	13,50	92,51
Média	33,49	136,40	15,00	83,03
Desvio padrão	11,52	12,30	1,37	12,58

Capítulo 3

- Capítulo 3 -

4-TRABALHO A SER ENVIADO PARA A REVISTA JOURNAL VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION

“Avaliação do Fator de von Willebrand durante a gestação, lactação e ciclo estral em
cadelas negativas e portadoras para Doença de von Willebrand”

Cláudio Roberto S. Mattoso, Suzane Lílian Beier, José Eduardo Corrente, João Pessoa
Araújo Jr, Regina Kiomi Takahira.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Distrito de Rubião Jr., s/n,
Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Caixa postal 560, Brasil (Mattoso e Takahira),
Escola de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias - UDESC, Av.
Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, Santa Catarina, CEP 88520-000,
Brasil (Beier), e Instituto de Biociências - UNESP, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu,
São Paulo, 18618-000, Brasil (Corrente e Araújo Jr).

Autor Correspondente: Cláudio R. S. Mattoso, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia - UNESP, Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório Clínico
Veterinário, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-000, Caixa
postal 560, Brasil, telefone (55) 14 3811 6115, e-mail crsmattoso@yahoo.com

DvW e reprodução em cães

Resumo. Os objetivos deste estudo foram a avaliação das alterações encontradas na concentração do FvW em cadelas gestantes, e também durante o ciclo estral observado após a gestação, em animais portadores e não portadores para a DvW, e avaliação de correlação entre FvW e cortisol. Foram utilizadas sete cadelas portadoras (GI) e nove não portadoras (GII) para DvW. Os animais foram avaliados durante a gestação, parto, lactação e ciclo estral não gestacional. A concentração do FvW se manteve estável durante o ciclo estral não gestacional, porém aumentou durante a gestação, com o maior valor sendo observado no momento do parto, cujas observações se repetiram nos dois grupos estudados. No GI o FvW aumentou 70% e no GII 124%, em comparação ao momento anestro. Não se observou correlação entre FvW e cortisol.

Palavras chave: Cães, Doença de von Willebrand, gestação, cortisol.

Introdução

A Doença de von Willebrand (DvW) é o distúrbio hemostático hereditário mais comum nos homens^{12,29} e também nos cães.^{3,4}

A prevalência da DvW em cães é de 1,43%³¹, concordando com os valores encontrados em seres humanos.^{12,46} Estudos recentes mostram que o tipo I da doença é o mais frequente (60-80%), seguido pelo tipo II (15-30%) e tipo III (5-10%).¹²

A DvW já foi diagnosticada em mais de 54 raças de cães nos EUA, sendo encontrada com alta prevalência em Dobermann Pinscher, Airedale Terrier e Scottish Terrier.^{28,43} No Brasil já foi diagnosticada em cinco raças, com alta incidência em Dobermann Pinscher e Golden Retriever, sendo observados resultados suspeitos (valores de FvW:Ag entre 50 e 70%) em outras 14 raças.³¹

A DvW hereditária é uma doença de trato autossômico, podendo ser recessiva ou com um padrão de dominância incompleta.²¹

A DvW é causada por um defeito quantitativo e/ou qualitativo do fator de von Willebrand (FvW), uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular^{5,12}, que é necessária para a adesão das plaquetas ao subendotélio vascular exposto em áreas de alto fluxo sanguíneo.⁴⁴

O FvW exerce sua função de duas maneiras, iniciando e suportando a adesão plaquetária ao local de lesão vascular^{33,35} e estabilizando funcionalmente o fator VIII plasmático.^{12,40}

Em cães, os sinais clínicos são similares aos encontrados nos humanos³⁹, como as hemorragias em mucosa, sangramento prolongado em ferimentos cirúrgicos e em erupções dentárias.⁴⁰ Nos tipos II e III da DvW ocorre uma grave tendência ao sangramento, ao passo que no tipo I o sangramento ocorre de uma maneira induzida.⁴

A classificação da DvW em cães se dá com base na gravidade clínica, na concentração plasmática e nas estruturas multiméricas do FvW.⁴ A DvW em cães é dividida em 3 tipos.^{4,38} A doença do tipo I é definida como uma deficiência parcial quantitativa do FvW, a do tipo II consiste em uma perda desproporcional das formas multiméricas de alto peso molecular e a do tipo III é uma deficiência quantitativa grave do FvW.⁴

O diagnóstico da DvW está baseado na quantificação do FvW plasmático e testes de função plaquetária dependentes do FvW, tanto “in vivo”, quanto “in vitro”.^{9,21}

A concentração do FvW aumenta durante a gestação em seres humanos^{2,27,37} e também em cães³⁴, tanto em pacientes portadores, quanto em pacientes não portadores para a DvW. No momento do parto pode ocorrer um aumento de 155% em cães que não possuem a DvW, e de 119% em cães com o tipo I da DvW, quando comparados a valores basais pré gestação.³⁴

O mecanismo do aumento do FvW em cadelas gestantes ainda não foi bem definido, com provável envolvimento do desenvolvimento placentário e possível correlação com progesterona e estradiol, porém existe a possibilidade da associação dos hormônios reprodutivos com outros fatores, que poderiam levar ao aumento observado na concentração do FvW.³⁴

A cadela prenha apresenta alterações nas concentrações de progesterona, estrógeno e cortisol, com modificações abruptas relacionadas ao momento do parto.⁷

Os objetivos deste estudo foram a avaliação das alterações encontradas na concentração do FvW em cadelas gestantes, e também durante o ciclo estral observado após a gestação, em animais portadores e não portadores para a DvW. Essa avaliação ocorreu nos animais estudados numa única escala de tempo, ou seja, se iniciou na gestação e terminou no diestro não gestacional subsequente. Além dessa avaliação se

buscou uma correlação entre FvW e cortisol durante a gestação e também na avaliação do ciclo estral não gestacional dos animais estudados.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizadas 16 cadelas de variadas idades, provenientes da região de Botucatu – SP, Brasil. Os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo I - animais portadores para DvW;
- Grupo II - animais normais para DvW.

Antes do início do estudo, o antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) foi mensurado para caracterização dos animais em portadores (FvW:Ag < 50%) e não portadores para DvW (FvW > 70%).⁴⁵ Em seguida os animais dos dois grupos foram avaliados em 11 momentos:

- Gestação 1 (MG1): Entre 30 e 35 dias de gestação, confirmada por meio de exame ultrassonográfico realizado 30 a 35 dias após a última cobertura a fim de observar vesículas embrionárias nas fêmeas prenhes, sendo que neste momento realizava-se a primeira coleta. Na 7ª semana de gestação foi realizado um novo exame ultrassonográfico para observação da viabilidade fetal, através dos batimentos cardíacos e desenvolvimento fetal, além de possíveis ocorrências de abortos ou reabsorções;
- Gestação 2 (MG2): Entre 50 a 55 dias de gestação, ou seja, 20 dias após o momento Gestação 1;
- Parto (MP): A coleta de amostras era realizada em no máximo 90 minutos após o parto;
- Lactação 1 (ML1): 5 dias após o parto;

- Lactação 2 (ML2): 15 dias após o parto;
- Lactação 3 (ML3): 30 dias após o parto;
- Anestro (MA): 90 a 100 dias pós parto era realizada citologia vaginal para confirmação do anestro (maioria das células parabasais e células intermediárias pequenas);
- Pró estro (MPE): Após o período de anestro (cerca de 3 meses após a coleta anterior), quando os proprietários observavam edema e/ou secreção serosanguinolenta na vulva das cadelas, realizava-se uma citologia vaginal e confirmando-se o pró estro (predomínio de células parabasais e intermediárias, além de hemácias) as amostras eram coletadas;
- Estro (ME): A partir do primeiro sinal de pró estro, realizava-se um acompanhamento das cadelas a cada dois dias por meio de citologia vaginal para identificação do estro, caracterizado por uma redução na proporção de células basais e intermediárias, com quantidade superior a 80% de células queratinizadas. Além disso, a observação do comportamento (cauda levantada, posição firme na presença do macho e aceitação de monta) dessas fêmeas frente à pelo menos dois machos foi associada à citologia para a confirmação de estro. Assim que o estro era identificado, as amostras eram colhidas. Nesse momento não foi permitida a monta efetiva, e com isso a cadela não entrava em gestação;
- Diestro 1 (MD1): 30 dias após o estro, com confirmação por meio de citologia vaginal (grande número de neutrófilos, com igual proporção de células superficiais e intermediárias);
- Diestro 2 (MD2): 60 dias após o estro, com confirmação por meio de citologia vaginal (grande número de neutrófilos, com igual proporção de células superficiais e intermediárias)

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Campus de Botucatu em 05 de outubro de 2007.

Colheita e Conservação das Amostras

Foi colhido sangue da veia jugular em todos os momentos estudados em:

- tubos a vácuo^a com anticoagulante EDTA, para a contagem de plaquetas.
- tubos a vácuo^b com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%, na proporção de 1 parte para 9 partes de sangue, em banho de gelo, para a determinação do antígeno do FvW (FvW:Ag), albumina e cortisol. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 1710 X g por 15 minutos, para a obtenção do plasma, e mantidas em microtubos tipo Eppendorf, a -80°C até o momento do processamento.

Exames laboratoriais

Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada em contador eletrônico de células^c. A morfologia celular plaquetária foi realizada através de esfregaços sanguíneos, corados pelo método Romanowski¹⁹, sendo que em todos os momentos estudados, os animais do estudo tiveram valores normais²⁰ para contagem plaquetária (200.000 a 500.000/uL sangue).

Antígeno do FvW (FvW:Ag)

A dosagem do FvW:Ag foi realizada pelo método de ELISA direto (teste semi quantitativo comparativo), com anticorpo anti-FvW canino^d, conforme a técnica

preconizada pelo fabricante. As amostras controle foram gentilmente cedidas pelo Dr James Catalfamo, Universidade de Cornell.

Albumina

A concentração de albumina foi determinada em plasma citratado³⁴, pelo método do Verde de Brocomresol^e e a mensuração realizada em aparelho semi-automático^f.

Cortisol

A concentração de cortisol foi dosada no plasma citratado²⁶, por radioimunoensaio^g no Laboratório Clínico do Instituto Brasileiro de Diagnósticos e Especialidades Veterinárias (PROVET Moema). O cortisol foi dosado apenas nos momentos Gestação 1, Parto, Lactação 1, Lactação 3 e anestro.

Análise estatística

Após a obtenção dos resultados da dosagem do FvW, os animais foram divididos em dois grupos (Grupo I e Grupo II). Os dados de dosagens do FvW:Ag, albumina e cortisol foram divididos nesses grupos e repetidos ao longo do tempo (Momentos – Gestação I, Gestação II, Parto, Lactação I, Lactação II, Lactação III, Anestro, Pró estro, Estro, Diestro I e Diestro II), sendo realizada uma análise em medida repetida através do PROC MIXED, segundo um esquema fatorial, considerando os efeitos de grupo e tempo e a interação grupo*tempo. Os dados de FvW:Ag e cortisol foram normalizados através de uma transformação raiz quadrada. A interação foi decomposta em efeitos aninhados e as comparações múltiplas foram feitas através do teste de Tukey ajustado para o delineamento em medidas repetidas.

A análise de correlação das variáveis acima foi realizada por meio da determinação do coeficiente de correlação de Spearman em cada um dos grupos.

Em todas as análises foi considerado o nível de 5% de probabilidade ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas utilizando software comercial^h.

Resultados

Os animais do Grupo I eram todos da raça Doberman, enquanto os animais do Grupo II eram de diversas raças (Collie, Labrador Retriever, Lhasa Apso, Poodle, SRD e Yorkshire Terrier).

Na avaliação dos valores encontrados para o antígeno do FvW (FvW:Ag) observou-se um pico no MP, com clara evidência de aumento progressivo iniciando no MG1, nos dois grupos estudados (GI e GII). Após o pico observado no MP ocorre diminuição de tais valores para ambos os grupos (Fig 1 e Fig 2). Após essa diminuição, os valores de FvW:Ag encontrados a partir de ML3 permanecem estáveis durante todo o ciclo estral da cadela (anestro, pro estro, estro e diestro), sem apresentar diferenças estatísticas significativas entre momentos (MA, MPE, ME, MD1 e MD2) em ambos os grupos.

Os valores encontrados no MA foram considerados como valores basais pré gestação, pelo fato desta fase do ciclo estral apresentar a menor influência hormonal em cadelas não gestantes.¹³ Na avaliação dos dois grupos isoladamente, os valores médios para FvW:Ag no MP (57,09%) do G1 foram 70% maiores que os encontrados no MA (34,06%), porém sem diferenças estatisticamente significativas, já no GII tais valores foram aproximadamente 124% maiores (MP – 311,73% e MA – 139,30%), com diferença estatisticamente significativa entre MP e MA ($p = 0,05$).

A dosagem de albumina foi realizada para avaliação de alterações no volume plasmático em decorrência da gestação. Como não existiram diferenças estatísticas significativas entre grupos (GI e GII), os valores de albumina de ambos os grupos foram avaliados conjuntamente (Fig 3). Não foram observadas diferenças estatísticas entre momentos nos dois grupos estudados. Ao contrário do ocorrido com o FvW:Ag, os valores de albumina diminuíram durante a gestação, sendo o menor valor encontrado no ML1. Até o ML3 os valores de albumina ainda não haviam retornado aos valores basais pré gestação (MA), e pelo fato de não ter se realizado mensurações entre os momentos ML3 e MA não se sabe ao certo em que período esses valores de albumina voltaram aos valores basais (MA). Os valores de albumina durante o ciclo estral da cadela (anestro, proestro, estro e diestro) oscilaram pouco após o fim da lactação. No GII encontrou-se uma correlação negativa entre o FvW:Ag e albumina ($p = 0,05$; $r = -0,6$), porém o mesmo não ocorreu com o GI.

Os valores de cortisol também não mostraram diferenças estatísticas significativas entre grupos, portanto ambos os grupos (GI e GII) foram avaliados conjuntamente (Fig 4). Ocorreu um aumento da concentração plasmática de cortisol no MP. Os valores encontrados para o cortisol não ultrapassaram os valores de referência para a espécie canina.²⁴ Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre momentos nos dois grupos estudados. Não foi encontrada uma correlação entre FvW:Ag e cortisol nos dois grupos estudados ($p > 0,05$), com valor de r de $-0,1$ e $0,3$, para GI e GII respectivamente.

Discussão

A diminuição dos valores de albumina durante a gestação, com menores valores sendo encontrados no ML1 mostra um provável aumento do volume plasmático durante

a gestação, fato que também foi observado em outro estudo.³⁴ A concentração de albumina diminui, enquanto o volume plasmático aumenta em mulheres grávidas¹⁷, o que também pode ter ocorrido no presente estudo, inclusive com uma correlação significativa entre albumina e FvW:Ag em GII. A diminuição da resistência vascular proporciona a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que leva a expansão do volume plasmático e consequente aumento do débito cardíaco, causando um aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) durante a gestação normal. Este aumento da TFG pode ocasionar uma proteinúria (níveis de até 300mg/dia), que é considerada normal na gestação.¹⁸ A diminuição da albumina plasmática observada durante a gestação pode ter ocorrido pelo aumento do volume plasmático e também pela proteinúria fisiológica que ocorre na gestação. O FvW plasmático é significativamente maior em pacientes com proteinúria,¹⁰ fato que pode explicar a correlação obtida entre FvW e a albumina nos animais de GII. O GI não mostrou essa correlação provavelmente pelo menor aumento do FvW:Ag (animais portadores para DvW). Com isso para se evitar que os valores do FvW:Ag sejam subestimados tem-se sugerido que as concentrações do FvW sejam corrigidas. Essa correção pode ser realizada pela divisão dos valores médios de FvW:Ag pelos valores médios de albumina.³⁴

O aumento do FvW durante o período de gestação ocorreu nos dois grupos, portanto, pode-se afirmar que tanto animais portadores quanto animais não portadores para DvW respondem da mesma forma, ou seja, com aumento na concentração de FvW durante a prenhez com valor máximo encontrado no momento do parto. Este achado corrobora com os achados de outros autores³⁴ que também observaram tal elevação durante a gestação, em animais portadores e não portadores para DvW. O FvW:Ag também aumenta progressivamente durante a gravidez em seres humanos, sendo que os valores mais altos são encontrados no final da gestação e no puerpério precoce,

apresentando diferenças estatísticas significativas em relação a mulheres não gestantes.^{37,47}

Em diversas espécies já foram relatadas alterações em proteínas relacionadas à homeostasia durante o período de gestação, como os seres humanos e cães,^{16,41} éguas,¹⁵ vacas e porcas.¹⁶ Essas alterações nos parâmetros hemostáticos durante a gestação podem ocorrer para manter a integridade da ligação placenta-útero, além de auxiliar nos mecanismos hemostáticos na separação de placenta e útero no momento do parto.³⁴

Os animais do GII apresentaram uma diferença estatística significativa entre MA e MP, sendo que este aumento na concentração do FvW pode ocorrer no período de gestação pelo desenvolvimento da placenta altamente vascularizada que apresenta um grande número de células endoteliais em divisão,¹⁶ este fato pode ter contribuído para esse aumento do FvW:Ag no MP, pois já foi demonstrado que culturas com células endoteliais submetidas à divisão produzem mais FvW que células que não estão se dividindo.¹ O desenvolvimento da vascularização placentária em cadelas aumenta rapidamente entre 28 e 49 dias de gestação, continuando a se desenvolver até o momento do parto,²⁵ acompanhando a elevação do FvW:Ag que obtivemos a partir de MG1. O desenvolvimento da vascularização uterina durante a gestação também pode ter auxiliado no aumento do FvW.³⁴

Os animais de GI não demonstram essa diferença estatística significativa entre MA e MP, apesar de ocorrer uma elevação de 70% entre os dois momentos. Esse fato pode ter ocorrido por esses animais serem portadores para DvW, e com isso apresentarem uma menor habilidade de aumentar a síntese de FvW,³⁴ o que também pode explicar a maior elevação encontrada entre MA e MP no GII (124%).

Nos dois grupos estudados não se observaram diferenças estatísticas significativas entre o momento cinco dias após o parto (ML1) e o MA, mostrando que

essa crescente vascularização placentária e uterina pode ter papel principal nesse aumento na concentração do FvW durante a gestação, pois cinco dias após o parto já não existe diferença estatística significativa com o MA, e a meia vida plasmática do FvW não é muito longa, ficando em torno de 8 a 10 horas após a aplicação de desmopressina em pacientes com DvW.³⁰ Se tal afirmação for verdadeira a ausência de diferença estatística significativa seria esperada nesse caso, pois no parto uma grande parte dessa vascularização seria perdida abruptamente juntamente com a placenta. Essa observação discorda da literatura,³⁴ que demonstrou que os valores de FvW:Ag em cães retornam aos valores basais dentro de 14 dias após o parto, e com isso existiria a sugestão do envolvimento de outros fatores no aumento da concentração do FvW.

A involução uterina em cães ocorre entre 28 e 42 dias após o parto, sendo que esse processo de involução se completa 84 dias após o final da gestação,¹⁴ sugerindo que a concentração do FvW deveria se manter elevada por um período maior de tempo se a vascularização uterina tivesse papel principal nesse aumento. Existe a possibilidade da vascularização uterina e placentária sustentarem os altos níveis do FvW durante a gestação, mas com o parto e conseqüente perda da placenta, a vascularização uterina sozinha não conseguiria mais sustentar esses altos valores. Além desses fatos, segundo outros autores,³⁴ não se pode descartar totalmente a possibilidade de outros fatores se somarem ao aumento da vascularização uterina/placentária na estimulação do aumento do FvW:Ag.

Um fator que pode se somar à vascularização uterina/placentária no aumento dos valores de FvW:Ag durante a gestação é a variabilidade da interação da membrana uterina com a placenta durante o desenvolvimento placentário.³⁴ Em espécies que apresentam maior interação placenta/útero ocorre um maior aumento da concentração do FvW, como observado em seres humanos que podem apresentar um aumento de até

4 vezes no FvW:Ag durante a gestação em relação aos valores encontrados em mulheres não gestantes.⁴¹ Este aumento torna-se necessário, pois em seres humanos, ocorre uma perda maior de tecido materno juntamente com a placenta, com aumento de sangramento no momento do parto, já em cães não existe necessidade de um aumento tão acentuado, pois pelo fato de possuírem uma placenta endoteliocorial (circulação materna separada da circulação fetal) ocorre um menor sangramento no momento do parto,¹¹ corroborando com o aumento de 124% encontrado entre MA e MP, em GII.

Nos dois grupos estudados não se encontraram diferenças estatísticas significativas nos momentos pós lactação (MA, MPE, ME, MD1 e MD2), diferentemente do que ocorre em seres humanos, que apresentam diferenças estatísticas entre as fases do ciclo menstrual,³² apesar de alguns autores afirmarem que tais diferenças não existam.^{22,36}

Segundo alguns autores o aumento da concentração do FvW durante a gestação possivelmente se deva às alterações hormonais, que podem interferir na liberação direta (ligada exclusivamente à síntese, sem armazenamento) do FvW pelas células endoteliais.³⁴ Esses mesmos autores encontraram correlações estatisticamente significativas entre os hormônios reprodutivos (estradiol e progesterona) e o FvW em cadelas gestantes, sendo que o estradiol apresenta uma correlação positiva e a progesterona uma correlação negativa, porém estes mesmos hormônios não se correlacionam com o FvW em cadelas não gestantes durante o ciclo estral. Isso mostra que devem existir outros fatores que atuam conjuntamente com a progesterona e o estradiol para alterar a concentração do FvW, tanto na gestação como no ciclo estral em cadelas.³⁴

Apesar do cortisol sofrer um aumento apenas no peri parto,⁷ sem alterações evidentes durante a gestação, neste trabalho buscou-se uma correlação entre FvW:Ag e

cortisol durante os períodos de gestação, lactação e ciclo estral (cadela não gestantes), pois segundo a literatura³⁴ a concentração do FvW não se altera durante o ciclo estral em cadelas não gestantes, apesar do aumento que ocorre nos níveis de estradiol e progesterona durante tal ciclo. Segundo estes mesmos autores este fato sugere que em cadelas não gestantes a concentração do FvW é independente do estradiol e progesterona.

Os dois grupos estudados não apresentaram uma correlação entre cortisol e concentração de FvW, tanto na gestação e lactação, quanto no ciclo estral de cadelas não gestantes. Isso comprova que o cortisol, apesar de ter sofrido um aumento no MP, não tem correlação alguma com a flutuação do FvW:Ag em cadelas prenhas e em lactação, e também com o ciclo estral de cadelas não prenhas. Segundo alguns autores³⁴ várias observações indicam que outros fatores agem conjuntamente com estradiol e progesterona, tanto durante a gestação, como também na avaliação de cadelas não gestantes. Os mesmos autores citam que outros hormônios podem estar envolvidos no controle do aumento do FvW durante a gestação, entre eles prolactina, vasopressina, ocitocina e cortisol. Porém nenhum destes se correlaciona perfeitamente com as oscilações do FvW:Ag. Existem outras causas de aumento do FvW, entre elas exercício, azotemia, toxemia, doença hepática, entre outras doenças.⁴² Tanto nessas condições, como também durante a gestação, outros mediadores podem induzir a liberação do FvW.³⁴

Nesta pesquisa utilizou-se apenas animais da raça Doberman com DvW, sendo que provavelmente todos os animais apresentem o tipo I da DvW, com isso pode-se afirmar que existe a necessidade de realização de novos estudos envolvendo DvW e gestação, envolvendo um maior número de animais e também animais que possuam os outros tipos da doença. Em seres humanos que apresentam uma leve deficiência de FvW

ocorre um aumento espontâneo do FvW:Ag durante a gestação, com uma completa correção dessa deficiência, enquanto pacientes que apresentam o tipo II ou III da doença necessitam de tratamento de reposição do fator para impedir sangramentos imediatos ou tardios.^{8,23} Um estudo recente realizado em 2010 mostrou diferentes alterações no FvW:Ag durante a gestação. Essa variação ocorreu de acordo com os tipos e mutações de DvW envolvidos, sendo que algumas pacientes conseguiram normalizar os valores de FvW:Ag durante a gravidez, enquanto outras não demonstraram quaisquer alterações.⁶

Com a realização do presente estudo pode-se concluir que o FvW:Ag tem seus valores alterados durante a gestação, tendo um valor máximo no momento do parto, tanto em animais portadores, quanto em animais não portadores para DvW. Os valores de FvW não se alteraram em diferentes fases do ciclo estral subsequente à gestação em cadelas portadoras ou não para DvW. Não há correlação entre cortisol e FvW:Ag durante a gestação, lactação e ciclo estral nos animais estudados. Existe a necessidade de se esclarecer quais fatores estimulam esse aumento, atuando conjuntamente com a progesterona e estradiol (durante a gestação) ou atuando isoladamente em animais não gestantes. A avaliação do FvW em cadelas durante a gestação pode gerar um resultado falso negativo para a DvW, porém essa avaliação pode ser realizada em qualquer período do ciclo estral em cadelas não gestantes.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Brasileiro de Diagnósticos e Especialidades Veterinárias (PROVET Moema) pela realização das dosagens de cortisol.

Fontes e Fabricantes

- a. Vacutainer®, BD, Franklin Lakes, NJ.
- b. Vacuette®, Greiner Bio-one, Kremsmuenster, Osterreich, Austria.
- c. CELL-DYN 3500 R, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.
- d. Sheep anti-canine VWF®, Research Diagnostics Inc., Concord, MA.
- e. Kit albumina®, Celm, Barueri, São Paulo, Brasil.
- f. SB 190®, Celm, Barueri, São Paulo, Brasil.
- g. ABBOTT ANSR®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.
- h. SAS for Windows, v.9.2. - SAS Institute Inc., Cary, NC

Referências

1. Blann AD: 1991, Increased release of von Willebrand factor antigen by endothelial cells whilst in active growth phase. *Cell Biol Int Rep* 15(6): 493-498.
2. Brenner B: 2004, Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 114(5-6): 409-414.
3. Brooks M: 1992, Management of canine von Willebrand's disease. *Probl Vet Med* 4(4): 636-46.
4. Brooks M: 2000, von Willebrand Disease. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, eds. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 5th ed., pp. 509-515. Lea & Febiger, Philadelphia.
5. Budde U, Schneppenheim R: 2001, von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. *Rev Clin Exp Hematol* 5(4): 335-368.
6. Castaman G, Tosetto A, Rodeghiero F: 2010, Pregnancy and delivery in women with von Willebrand's disease and different von Willebrand factor mutations. *Haematologica* 95(6): 963-969.
7. Concannon PW, Butler WR, Hansel W, et al.: 1978, Parturition and Lactation in the Bitch: Serum Progesterone, Cortisol and Prolactin. *Biol Reprod* 19(5): 1113-1118 (1978)
8. Conti M, Mari D, Conti E, et al.: 1986, Pregnancy in women with different types of von Willebrand disease. *Obstet Gynecol* 68(2): 282-5.
9. Cooler BS: 1987, von Willebrand's disease. *In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, eds. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, 2nd ed., pp. 60-96. Lippincott, Philadelphia.
10. Cucuianu M, Trif I, Roman S, et al.: 1989, Plasma von Willebrand factor antigen and activity and platelet aggregability in patients with proteinuria. *Med Interne* 27(4): 263-71.
11. Faber JJ, Thornburg KL: 1983, Structural features of placental exchange. *In: Placental Physiology*, ed. Faber JJ, Thornburg KL, pp. 1-32. New York: Raven Press
12. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM: 2002, Guidelines for the Diagnosis and Management of von Willebrand Disease in Italy. *Haemophilia* 8(5): 607-621.
13. Feldman ED, Nelson RW: 2003, Canine Female reproduction, Ovarian cycle and vaginal cytology. *In: Canine and feline endocrinology and reproduction*, ed. Feldman ED, Nelson RW, 3 ed., pp. 752-775. Philadelphia: Saunders.

14. Feldman ED, Nelson RW: 2003, Canine Female reproduction, Breeding, Pregnancy, and Parturition. *In: Canine and feline endocrinology and reproduction*, ed. Feldman ED, Nelson RW, 3 ed., pp. 775-808. Philadelphia: Saunders.
15. Gentry PA, Feldman BF, O'Neill, et al.: 1992, Evaluation of the haemostatic profile in the pre and post parturient mare, with particular focus on the perinatal period. *Equine Vet* 24(1): 33-6.
16. Gentry PA, Liptrap RM: 1988, Comparative hemostatic protein alterations accompanying pregnancy and parturition. *Can J Physiol Pharmacol* 66(6): 671-678.
17. Haram K, Augensen K, Elsayed S: 1983, Serum protein pattern in normal pregnancy with special reference to acute phase reactants. *Br J Obstet Gynaecol* 90(2): 139-145.
18. Holt JL, Mangos GJ, Brown MA: 2007, Measuring protein excretion in pregnancy. *Nephrology* 12(5): 425-430.
19. Jain NC: 1986, Hematologic Techniques. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, ed. Jain NC, 4 ed., pp. 31-35. Lea & Febiger, Philadelphia.
20. Jain NC: 1986, The dog: Normal Hematology with comments on response to disease. *In: Schalm's Veterinary Hematology*, ed. Jain NC, 4 ed., pp. 103-125. Lea & Febiger, Philadelphia.
21. Johnson GS, Turrentine MA, Kraus KH: 1988, Canine von Willebrand's disease: a heterogeneous group of bleeding disorders. *In: Vet Clin North Am: Hemostasis*. Ed. Feldman BF. 18: 195-229.
22. Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, et al.: 1999, Variations in Coagulation Factors in Women: Effects of Age, Ethnicity, Menstrual Cycle and Combined Oral Contraceptive. *Thromb Haemost* 82(5): 1456-61.
23. Kadir RA, Lee CA, Sabin CA, et al.: 1998, Pregnancy in women with von Willebrand's disease or factor XI deficiency. *Br J Obstet Gynaecol*. 105(3): 314-21.
24. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss, ML: 1997, Appendixes. *In Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, ed. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss, ML, 5 ed. Pp. 895-899. Academic Press, San Diego, California.
25. Kiso Y, Yamashita A, Sasaki F, et al.: 1990, Maternal blood vascular architecture of the dog placenta during the second half of pregnancy. *Jpn J Anim Reprod* 36(2): 120-125.
26. Kohek MBF, Leme CRM, Nakamura IT, et al.: 2002, Effects of EDTA and Sodium Citrate on hormone measurements by fluorometric (FIA) and immunofluorometric (IFMA) methods. *BMC Clin Pathol* 2:2.
27. Kujovich JL: 2005, von Willebrand disease and pregnancy. *J Thromb Haemost* 3(2): 246-53.

28. Littlewood JD: 1991, von Willebrand's Disease in the dog. *Vet Annu* 31: 163-172.
29. Mammen EF: 2002, Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* 28(2): 109-110.
30. Mannucci PM: 1997, Desmopressin (DDAVP) in the Treatment of Bleeding Disorders: The First 20 Years. *Blood* 90(7): 2515-2521.
31. Mattoso CRS, Takahira RK, Beier SL, et al.: 2010, Prevalence of von Willebrand disease in dogs from São Paulo State, Brazil. *J Vet Diagn Invest* 22(1): 55-60.
32. Miller CH, Dilley AB, Drews C, et al.: 2002, Changes in von Willebrand Factor and Factor VIII Levels during the Menstrual Cycle. *Thromb Haemost* 87(6): 1082-1083.
33. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, et al.: 1998, Clinical Significance of Inhibitors in Acquired von Willebrand Syndrome. *Blood* 91(10): 3623-3629.
34. Moser J, Meyers KM, Russon RH, et al.: 1998, Plasma von Willebrand factor changes during various reproductive cycles stages in mixed-breed dogs with normal von Willebrand factor and in Doberman Pinschers with type-I von Willebrand disease. *Am J Vet Res* 59 (1): 111-118.
35. Murray EW, Lillicrap D: 1996, von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management. *Transfus Med Rev* 10(2): 93-110.
36. Önundarson PT, Gudmundsdottir BR, Arnfinnsdottir AV, et al.: 2001, Von Willebrand Factor Does not Vary during Normal Menstrual Cycle. *Thromb Haemost* 85(1): 183-184.
37. Sánchez-Luceros A, Meschengieser, SS, Marchese C, et al.: 2003, Factor VIII and von Willebrand factor changes during normal pregnancy and puerperium. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14(7): 647-651.
38. Sato I, Parry BW: 1998, Effect of Desmopressin on plasma Factor VIII and von Willebrand Factor Concentrations in Greyhounds. *Aust Vet J* 76(12): 809-812.
39. Schwarz HP, Dorner F, Mitterer A, et al.: 1998, Evaluation of Recombinant von Willebrand Factor in a Canine Model of von Willebrand Disease. *Haemophilia* 4(suppl 3): 53-62.
40. Schwarz HP, Schlokot U, Mitterer A, et al.: 2002, Recombinant von Willebrand Factor – Insight into Structure and Function through Infusion Studies in Animals with Severe von Willebrand Disease. *Semin Thromb Hemost* 28(2): 215-226.
41. Stirling Y, Woolf L, North WRS, et al.: 1984, Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 52(2): 176-182.

42. Stokol T, Parry BW: 1993, Canine von Willebrand Disease: A Review. Aust Vet Prac 23: 94-103.
43. Stokol T, Parry BW: 1993, Canine von Willebrand Disease: A Review. Aust Vet Prac 23: 94-103.
44. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: 1995, von Willebrand Disease in Doberman dogs in Australia. Aust Vet J 72(7): 257-262.
45. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: 1995, von Willebrand's disease in Scottish Terriers in Australia. Aust Vet J 72(11): 404-407.
46. White Ii GC, Montgomery RR: 2000, Clinical Aspects of and Therapy for von Willebrand Disease. *In: Hematology Basic Principles and Practice*, eds. Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, et al., 3th ed., pp. 1946-1956. Churchill Livingstone.
47. Wickström K, Edelstam G, Löwbeer CH, et al.: 2004, Reference intervals for plasma levels of fibronectin, von Willebrand factor, free protein S and antithrombin during third-trimester pregnancy. Scand J Clin Lab Invest 64(1): 31-40.

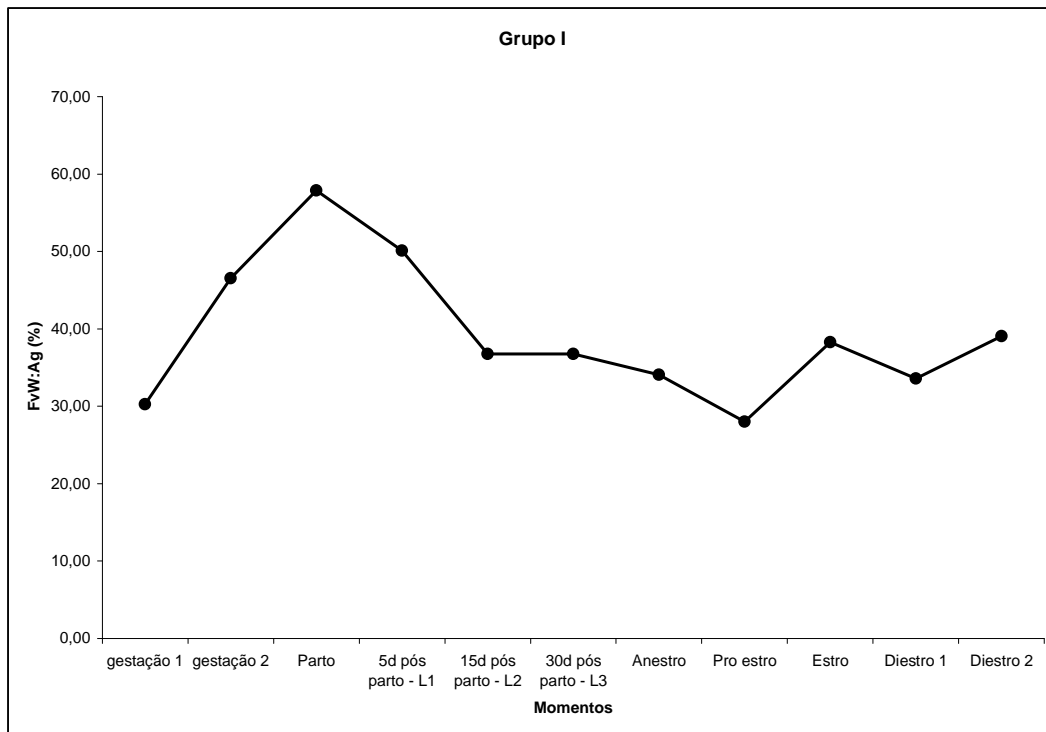


Figura 1. Variação do Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I (portadores para Doença de von Willebrand)

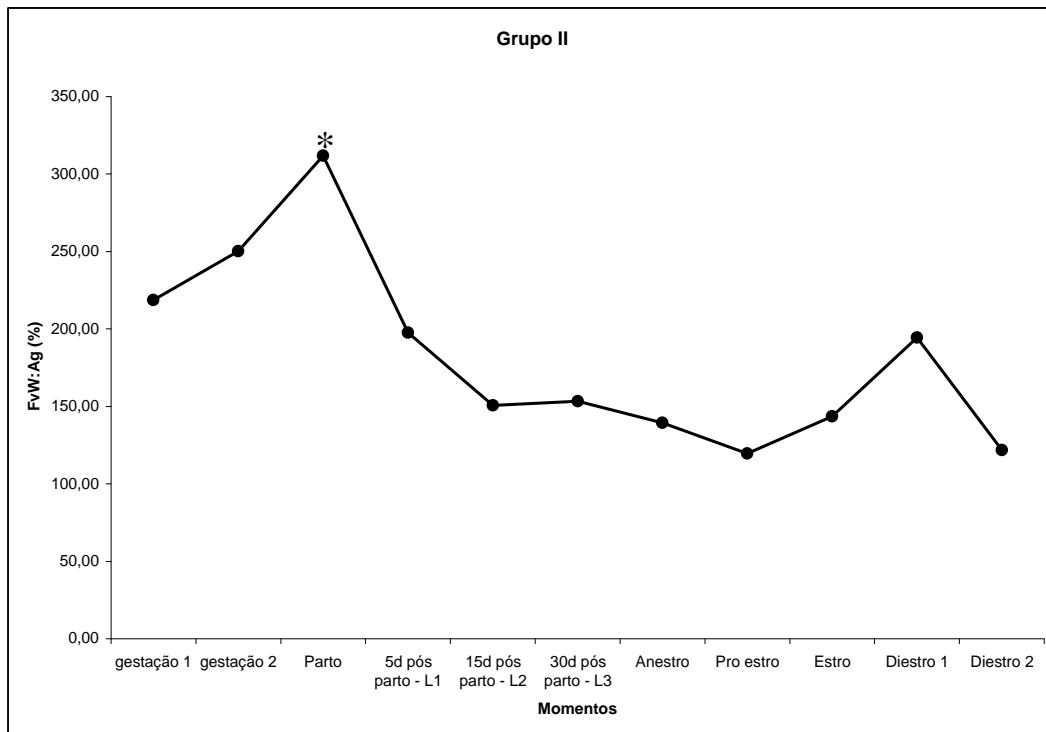


Figura 2. Variação do Antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) durante os momentos estudados nos animais do Grupo II (negativos para Doença de von Willebrand). *Diferença estatística em comparação ao Momento Anestro ($p < 0,05$).

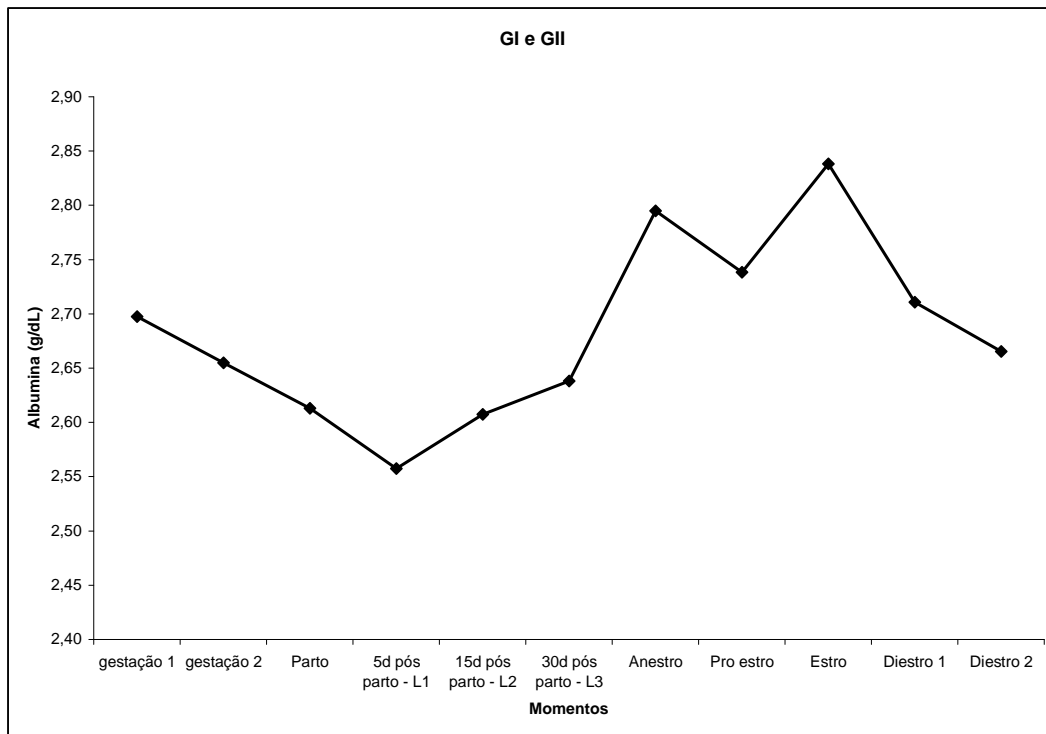


Figura 3. Concentração de Albumina plasmática (g/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I e II.

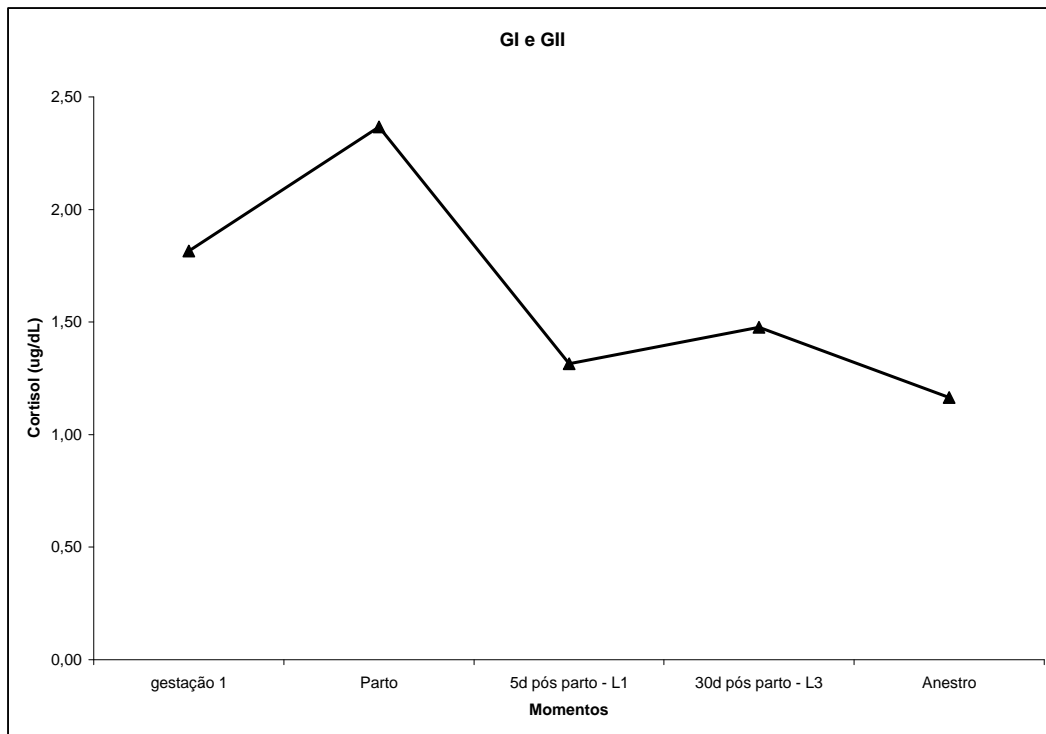


Figura 4. Concentração de Cortisol plasmático (ug/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I e II.

Capítulo 4

- CAPÍTULO 4 -

5-DISCUSSÃO GERAL

Prevalência da DvW em cães da região de Botucatu:

Não foram encontrados dados na literatura sobre a prevalência da DvW em animais sem histórico de alterações da hemostasia. A maior parte dos relatos de prevalência sobre a DvW são realizados em raças específicas, sendo que a maioria destas raças possui alta incidência para um determinado tipo da doença.

Littlewood et al. (1987) relataram 13 casos de DvW no Reino Unido num período de 18 meses, sem avaliação de valores de prevalência ou incidência racial. Raymond et al. (1990) publicaram dados de DvW em 6.337 cães, todos Pastores de Shetland. Brooks et al. (1992) avaliaram achados epidemiológicos em Dobermans, Scottish Terriers e Pastores de Shetland, porém estas raças possuem sabidamente alta incidência para diferentes tipos da DvW. Stokol et al. (1995a e 1995b) estudaram a DvW em Dobermans e Scottish Terriers, respectivamente, na Austrália. Brooks et al. (1996) descreveram 8 casos de DvW entre 335 animais testados, porém apenas na raça Pointer alemão de pêlo arame. Nenhum dos autores citados realizou uma avaliação epidemiológica sem levar em consideração os aspectos raciais. Por este fato, a real prevalência da DvW ainda não é conhecida numa população geral de cães, sem distinção quanto à raça e sem histórico de sangramentos. Outra constatação é que a maioria desses autores utilizou amostras enviadas aos respectivos serviços de hemostasia de suas Universidades, sendo que essas amostras podem ser consideradas tendenciosas, uma vez que a maioria destas são enviadas normalmente por algum tipo de suspeita de alteração na hemostasia, seja clínica ou mesmo de conhecimento prévio pela alta incidência racial. Os dados obtidos nesta pesquisa mostram que a DvW tem uma

prevalência significativa (1,43%), sendo importante na avaliação de distúrbios hemostáticos na região de Botucatu.

Diagnóstico da DvW:

A maioria dos artigos consultados cita o antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) como o teste de escolha para o diagnóstico inicial da DvW (Johnstone e Crane, 1991; Benson et al., 1991; Benson et al., 1992; Slappendel et al., 1992; Burgess e Wood, 2008), porém neste estudo se procurou outros testes que também tivessem capacidade de realizar esse diagnóstico, como TSMO, TTPa e FVIII. Os resultados obtidos confirmaram que esses testes não podem ser considerados para o diagnóstico inicial da DvW, e podem contribuir apenas para uma melhor caracterização da doença em cães.

FvW e gestação:

A concentração do FvW aumenta durante a gestação em seres humanos (Sánchez-Luceros et al., 2003; Brenner, 2004; Kujovich, 2005) e também em cães (Moser et al., 1998), sendo que na espécie canina este aumento ocorre tanto em pacientes portadores, quanto em pacientes não portadores para a DvW. No momento do parto pode ocorrer um aumento de 155% em cães que não possuem a DvW, e de 119% em cães com o tipo I da DvW, quando comparados a valores basais pré-gestação (Moser et al., 1998), porém essa oscilação ainda não foi bem explicada em Medicina Veterinária. Existem fortes indícios de que os hormônios reprodutivos (progesterona e estradiol) tenham correlação com esse aumento, porém existe a possibilidade de outros fatores, estimularem essa variação no FvW (Moser et al., 1998).

O cortisol aumenta consideravelmente no período peri-parto (Concannon et al., 1978). Essa oscilação nos valores de cortisol no momento do parto poderia se correlacionar com o aumento do FvW, que também tem seu ápice nesse momento.

No presente estudo não foi encontrada correlação entre o cortisol e o FvW:Ag durante a gestação, tanto em animais negativos, quanto em animais portadores para a DvW. Isso mostra a necessidade de se avaliar outras variáveis, que podem agir conjuntamente ou mesmo isoladamente aos

hormônios reprodutivos, explicando essa oscilação no FvW durante a gestação. Alguns hormônios podem estar envolvidos no controle do aumento do FvW durante a gestação, entre eles prolactina, vasopressina e ocitocina (Moser et al., 1998).

FvW e ciclo estral de cadelas não gestantes:

O FvW não sofre oscilações durante o ciclo estral de cadelas não gestantes ou lactantes, apesar das grandes oscilações nos níveis de progesterona e estradiol (Moser et al., 1998). Isso comprova que outros fatores devem estar envolvidos no aumento do FvW durante a gestação, pois se essa correlação dependesse apenas dos hormônios reprodutivos, deveria ocorrer oscilação do FvW também durante o ciclo estral de cadelas não gestantes.

Segundo Miller et al. (2002) existem alterações do FvW durante o ciclo menstrual da mulher, com diferenças significativas da fase folicular precoce e tardia em relação ao período da menstruação, já Kadir et al. (1999) e Ölundarson et al. (2001) afirmam que tais diferenças não existem, e que o sangue para o diagnóstico da DvW poderia ser colhido em qualquer fase do ciclo estral em mulheres. Os três estudos não avaliaram as oscilações dos valores de FvW em mulheres com DvW, sendo que pacientes positivos podem se portar de maneira diferente de pacientes negativos para esta doença, sem considerar os diversos tipos da DvW, que seriam outras variáveis a serem estudadas. O simples fato de trabalhos recentes, realizados em Medicina humana mostrarem resultados contrários, justifica a necessidade de realização de novos estudos em Medicina Veterinária, buscando confirmações de que em cães realmente não existem oscilações do FvW durante o ciclo estral.

No estudo conduzido por Moser et al. (1998), não se considerou o ciclo estral subsequente ao parto para avaliação de possíveis alterações do FvW, sendo os animais avaliados em momentos distintos para gestação e ciclo estral de cadelas não gestantes.

O presente estudo buscou essa avaliação, ou seja, acompanhar as cadelas a partir da gestação, passando sequencialmente pelo parto, lactação, anestro, pró estro, estro e diestro não gestacional, sendo que também não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os diversos momentos estudados. Novos estudos poderiam ser realizados, com aumento

do número de momentos estudados, além do envolvimento de animais portadores para a DvW, e da inclusão de animais que apresentem os três tipos da doença (tipo I, Tipo II e tipo III).

6-CONCLUSÕES GERAIS

Analisando os resultados, concluiu-se que:

- A prevalência da DvW em cães sem evidências clínicas de hemorragia na região de Botucatu – São Paulo é de 1,43%, sem evidências de predisposição sexual, ocorrendo uma maior incidência nas raças Dobermann Pinscher e Golden Retriever;
- O vWF:Ag é o teste de escolha para o diagnóstico inicial da DvW, sendo que o TSMO, TTPa e o FVIII têm um valor limitado para o diagnóstico da DvW;
- O FvW:Ag altera seus valores durante a gestação, apresentando um valor máximo no momento do parto, tanto em animais portadores, quanto em animais não portadores para DvW;
- Não há alterações nos valores de FvW nas diferentes fases do ciclo estral subsequentes à gestação;
- Não há correlação entre cortisol e FvW:Ag durante a gestação, lactação e ciclo estral em cães;
- A coleta de amostras para diagnóstico da DvW não é indicada durante a gestação ou lactação, pois pode ocorrer falso positivo, porém essa coleta pode ser realizada em qualquer período do ciclo estral em cadelas não gestantes.

7-BIBLIOGRAFIA

BENSON, R.E., CATALFAMO, J.L., BROOKS, M., DODDS, W.J. A sensitive immunoassay for von Willebrand factor. **J Immunoassay**, v.12, p.371-90, 1991.

BENSON, R.E., CATALFAMO, J.L., DOODS, W.J. A multispecies enzyme-linked immunosorbent assay for von Willebrand's factor. **J Lab Clin Med**, v.119, p.420-27, 1992.

BITHELL, T.C. Hereditary coagulation disorders. In: LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOESTER, J., ATHENS, J.W.E.L. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.1422-1472.

BRASSARD, J.A., MEYERS, K.M. Evaluation of the Buccal Bleeding Time and Platelet Glass Bead Retention as Assays of Hemostasis in the Dog: the Effects of Acetylsalicylic Acid, Warfarin and von Willebrand Factor Deficiency. **Thromb Haemost**, v.65, p.191-195, 1991.

BRENNER, B. Haemostatic changes in pregnancy. **Thromb Res**, v.114, n.5-6, p.409-414, 2004.

BROOKS, M. Management of canine von Willebrand's disease. **Prob Vet Med**, v.4, p.636-46, 1992.

BROOKS, M., DOODS, W.J., RAYMOND, S.L. Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman Pinschers, Scottish Terriers, and Shetland Sheepdogs: 260 cases (1984-1988). **JAVMA**, v.200, n.8, p. 1123-27, 1992.

BROOKS, M., RAYMOND, S., CATALFAMO, J. Severe recessive von Willebrand's disease in German Wirehaired Pointers. **JAVMA**, v.209, n.5, p.926-33, 1996.

BROOKS, M. von Willebrand Disease. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000, p.509-515.

BROOKS, M., CASTILLO-JUAREZ, H., OLTENACU, P. Heritability of plasma von Willebrand factor antigen concentration in German Wirehaired Pointers. **Vet Q**, v.23, p.126-28, 2001.

BUDDE, U., SCHNEPPENHEIM, R. von Willebrand Factor and von Willebrand Disease. **Rev Clin Exp Hematol**, v.5, n.4, p.335-368, 2001.

BURGESS, H., WOOD, D. Validation of a von Willebrand factor antigen enzyme-linked immunosorbent assay and newly developed collagen-binding assay. **Can J Vet Res**, v.72, p.420-427, 2008.

CHEDEAK, J.R., ALBAN, G.M., MAXEY, B. von Willebrand's disease and pregnancy: management during delivery and outcome of offspring. **Am J Obstet Gynecol**, v.155, n.3, p. 618-24, 1986.

CHEN, C.I., FEDERICI, A.B., CRAMER, E.M., CANCIANI, M.T., HARRISON, P., ZHENG, S., MASSÉ, J.M., MANUCCI, P.M., HAYWARD, C.P.M. Studies of Multimerin in Patients with von Willebrand Disease and Platelet von Willebrand Factor Deficiency. **Br J Haematol**, v.103, n.1, p.20, 1998.

CONCANNON, P.W., BUTLER, W.R., HANSEL, W., KNIGHT, P.J., HAMILTON, J.M. Parturition and Lactation in the Bitch: Serum Progesterone, Cortisol and Prolactin. **Biol Reprod**, v.19, n.5, p.1113-18, 1978.

CONTI, M., MARI, D., CONTI, E., MUGGIASCA, M.L., MANNUCCI, P.M. Pregnancy in women with different types of von Willebrand disease. **Obstet Gynecol**, v.68, n.2, p. 282-85, 1986.

COOLER, B.S. IN: COLMAN, R.W., HIRSH, J., MARDER, V.J., SALZMAN, E.W. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott, 1987, p. 60.

DODDS, W.J. Von Willebrand's disease in dog. **Mod. Vet. Pract**, v.65, p.681-686, 1984.

DODDS, W.J. Hemostasis. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic Press, 1997. cap.10, p. 241-283.

FEDERICI, A.B., CASTAMAN, G., MANNUCCI, P.M. Guidelines for the Diagnosis and Management of von Willebrand Disease in Italy. **Haemophilia**, v.8, n.5, p.607-621, 2002.

FORSYTHE, L.T., WILLIS, S.E. Evaluating Oral Mucosa Bleeding Time in Healthy Dogs Using a Spring-Loaded Device. **Can Vet J**, v.30, p.344-345, 1989.

GINSBURG, D., BOWIE, E.J.W. Molecular genetics of von Willebrand disease. **Blood**, v.79, p.2507-19, 1992.

JERGENS, A.E., TURRENTINE, M.A., KRAUS, K.H., JOHNSON, G.S. Buccal Mucosa Bleeding Times of Healthy Dogs and of Dogs in Various Pathologic States, Including Thrombocytopenia, Uremia and von Willebrand's Disease. **Am J Vet Res**, v.48, p.1337-42, 1987.

JOHNSON, G.S., TURRENTINE, M.A., KRAUS, K.H. Canine von Willebrand's Disease. **Vet Clin North Am Small Pract**, v.18, p.195-229, 1988.

JOHNSTONE, I.B., CRANE, S. Quantitation of canine plasma von Willebrand Factor Antigen using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay. **Can J Vet Res**, v.55, p.11-14, 1991.

KADIR, R.A., ECONOMIDES, D.L., SABIN, C.A., OWENS, D., LEE, C.A. Variations in Coagulation Factors in Women: Effects of Age, Ethnicity, Menstrual Cycle and Combined Oral Contraceptive. **Thromb Haemost**, v.82, p.1456-61, 1999.

KRAUS, K.H., JOHNSON, G.S. von Willebrand Disease. in Dogs. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: WB Saunders Com., 1989. cap X, p.445-451.

KUJOVICH, J.L. von Willebrand disease and pregnancy. **J Thromb Haemost**, v3, n.2, p.246-53, 2005.

LITTLEWOOD, J.D., HERRTAGE, M.E., GORMAN, N.T., MCGLENNON, N.J. von Willebrand disease in dogs in the United Kingdom. **Vet Rec**, v.121, p.463-68, 1987.

MAMMEN, E.F. Diagnosis and Management of Congenital von Willebrand Disease. **Semin Thromb Hemost**, v.28, n.2, p.109-110, 2002.

MANNUCCI, P.M. Platelet von Willebrand factor in inherited and acquired bleeding disorders. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, p.2428-2432, 1995.

MARKS, S.L. The Buccal Mucosal Bleeding Time. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.36, p.289-290, 2000.

MATTOSO, C.R.S., TAKAHIRA, R.K., BEIER, S.L., ARAUJO JR, J.P., CORRENTE, J.E. Prevalence of von Willebrand disease in dogs from São Paulo State, **Brazil**. **J Vet Diagn Invest**, v.22, p.55-60, 2010.

MAZURIER, C., MEYER, D. Molecular basis of von Willebrand disease. **Bailliere's Clin Haematol**, v.9, p.229-241, 1996.

MILLER, C.H., GRAHAM, J.B., GOLDIN, L.R., ELSTON, R.S. Genetics of Classic von Willebrand Disease. **Blood**, v.54, p.117-136, 1979.

MILLER, C.H., DILLEY, A.B., DREWS, C., RICHARDSON, L., EVATT, B. Changes in von Willebrand Factor and Factor VIII Levels during the Menstrual Cycle. **Thromb Haemost**, v.87, n.6, p.1082-1083, 2002.

MOHRI, H., MOTOMURA, S., KANAMORI, H., MATSUZAKI, M., WATANABE, S., MARUTA, A., KODAMA, F., OKUBO, T. Clinical Significance of Inhibitors in Acquired von Willebrand Syndrome. **Blood**, v.91, n.10, p.3623-3629, 1998.

MOSER, J., MEYERS, K.M., RUSSON, R.H., REEVES, J.J. Plasma von Willebrand factor changes during various reproductive cycles stages in mixed-breed dogs with normal von Willebrand factor and in Doberman Pinschers with type-I von Willebrand disease. **Am J Vet Res**, v.59, n.1, p.111-118, 1998.

MURRAY, E.W., LILLICRAP D. von Willebrand disease: pathogenesis, classification and management. **Transfus Med Ver**, v.10, p.93-110,1996.

NILSSON, I.M. The History of von Willebrand Disease. **Haemophilia**, v.5, n.2, p.7-11, 1999.

ÖNUNDARSON, P.T., GUDMUNSDOTTIR, B.R., ARNFINNSDOTTIR, A.V., KJELD, M., ÓLAFSSON, O. von Willebrand Factor Does not Vary during Normal Menstrual Cycle. **Thromb Haemost**, v.85, n.1, p.183-184, 2001.

RAYMOND, S.L., JONES, D.W., BROOKS, M.B., DOODS, W.J. Clinical and laboratory features of severe form of von Willebrand disease in Shetland Sheepdogs. **JAVMA**, v.197, n.10, p.1342-46, 1990.

RODEGHIERO, F., CASTAMAN, G., DINI, E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand disease. **Blood**, v.69, p.454–9, 1987.

SABINO, E.P., HOLLIS, N.E., CATALFAMO, J.L. Development of a collagen-binding activity assay as a screening test for type II von Willebrand disease in dogs. **Am J Vet Res**, v.67, N.2, p.242-49, 2006.

SADLER, J.E., GRALNICK, H.R. A new classification for von Willebrand disease. **Blood**, v.84, p.676-679, 1994.

SADLER, J.E., MATSUSHITA, T., DONG, Z., TULEY, E.A., WESTFIELD, L.A. Molecular mechanism and classification of von Willebrand disease. **Thromb Haemost**, v.74, p.161-166, 1995

SADLER, J.E., BLINDER, M. von Willebrand Disease: Diagnosis, Classification, and Treatment. In: COLMAN, R., HIRSH, J., MARDER, V.J., CLOWES, A.W., GEORGE, J.N. **Hemostasis and Thrombosis Basic Principles & Clinical Practice**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.825-835.

SÁNCHEZ-LUCEROS, A., MESCHENGIESER, S.S., MARCHESE, C. VOTTA, R., CASAIS, P., WOODS, A.I., NADAL, M.V., SALVIÚ, M.J., LAZZARI, M.A. Factor VIII and von Willebrand factor changes during normal pregnancy and puerperium. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.14, n.7, p.647-651, 2003.

SATO, I., PARRY, B.W. Effect of Desmopressin on plasma Fator VIII and von Willebrand Factor Concentrations in Greyhounds. **Aust Vet J**, v.76, n.12, p.809-812, 1998.

SCHNEPPENHEIM, R.A. Molecular Approach to the Classification of von Willebrand Disease. **Best Practice & Research. Clin Haematol**, v.14, n.2, p.281-298, 2001.

SCHWARZ, H.P., DORNER, F., MITTERER, A., MUNDT, W., SCHLOKAT, U., PICHLER, L., TURECEK, P.L. Evaluation of Recombinant von Willebrand Factor in a Canine Model of von Willebrand Disease. **Haemophilia**, v.4, n.3, p.53-62, 1998.

SCHWARZ, H.P., SCHLOKAT, U., MITTERER, A., VÁRADI, K., GRITSCH, H., MUCHITSCH, E.M., AUER, W., PICHLER, L., DORNER, F., TURECEK, P.L. Recombinant von Willebrand Factor – Insight into Structure and Function through Infusion Studies in Animals with Severe von Willebrand Disease. **Semin Thromb Hemost**, v.28, n.2, p.215-225, 2002.

SLAPPENDEL, R.J., FRIELINK, R.A.J., MOL, J.A., NOORDZIJ, A., HAMER, R. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for von Willebrand factor antigen (vWF-Ag) in canine plasma. **Vet Immunol Immunopathol**, v.33, p.145-154, 1992.

STOKOL, T., PARRY, B.W. Canine von Willebrand Disease: A Review. **Aust Vet Prac**, v.23, p.94-103, 1993.

STOKOL, T., PARRY, B.W., MANSELL, P.D. von Willebrand's Disease in Dobermann dogs in Australia. **Aust Vet J**, v.72, n.7, p.257-262, 1995a

STOKOL, T., PARRY, B.W., MANSELL, P.D. von Willebrand's Disease in Scottish Terriers in Australia. **Aust Vet J**, v.72, n.11, p.404-407, 1995b.

TRIPLET, D.A. Coagulation and Bleeding Disorders. Review and Update. **Clin Chem**, v.46, p.1260-1269, 2000.

VISCHER, U.M., MOERLOOSE, P. von Willebrand Factor: from Cell Biology to the Clinical Management of von Willebrand Disease. **Crit Rev Oncol Hematol**,; v.30, n.93-109, 1999.

WAGNER, D.D. Cell biology of von Willebrand factor. **Annu Rev Cell Biol**, v.6, p.217-246, 1990.

WHITE II, G.C., MONTGOMERY, R.R. Clinical Aspects of and Therapy for von Willebrand Disease. In: HOFFMAN, R., BENZ JR, E.J., SHATTIL, S.J., FURIE, B., COHEN, H.J., SILBERSTEIN, L.E., MCGLAVE, P. **Hematology Basic Principles and Practice**. 3.ed. Churchill Livingstone, 2000. p.1946-1956.

ANEXOS

Anexo 2

Anexo 2

Normas da Revista Journal Veterinary Diagnostic Investigation - Print ISSN: 1040-6387

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Instructions to Authors

1. Scope and editorial policy

The *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (J Vet Diagn Invest), an international journal published bimonthly in English, is devoted to all aspects of veterinary diagnostic science. The major disciplines are anatomical pathology, bacteriology/mycology, clinical pathology, epidemiology, immunology, laboratory information management, molecular biology, parasitology, public health, toxicology, and virology.

The *Journal* accepts original manuscripts for review with the understanding that the same material or a substantial part thereof is not at present being considered for publication and has not been published elsewhere by another publisher. The corresponding author should secure the approval of all authors and the institution(s) where the work was carried out. A statement to the Editor confirming that such approval has been received should be included in the submission cover letter. Manuscripts will be reviewed by 2 or more persons selected by the Editors.

Upon acceptance for publication, authors will receive a **Copyright Transfer Form** to transfer copyright to the publisher. All articles published in the *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* are protected by copyright that covers the translation rights as well as the exclusive rights of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians to reproduce and distribute the articles.

The *Journal* will not publish any manuscript in which the Copyright Transfer Agreement has not been signed and returned to the Editorial office. Also upon acceptance for publication, authors will receive a **Color Figure Agreement**. If your article contains **color** figures, you are required to fill out, sign, and return this form to verify that you are aware of the additional charges involved in publishing color figures (as of 2008, \$775 per page). Black/white figures do not incur any additional charges.

2. Manuscript preparation

2.1. General format and style

2.1.1. Layout and media. Three manuscript formats are currently accepted for review: Review Articles, Full Scientific Reports, and Brief Communications. Review Articles are strongly encouraged provided they cover subjects of current and broad interest to veterinary laboratory diagnosticians. Authors interested in submitting a review article should contact the Editor-in-Chief (editor@jvdi.org) regarding the proposed title and scope of review prior to consideration by the *Journal*.

Your main document should be in .DOC or .RTF format.

Main document should include your tables but **must not** include embedded figures regardless of whether they are photos or line art drawings.

Pages should be numbered at the bottom center.

Text lines must be numbered from beginning to end; each page should begin with line #1.

Manuscript should be double-spaced *throughout*, using Times New Roman, and font size should be 12 pt.

Figures (photographs, graphs, and other line art drawings) should be in .JPEG or .TIFF format only.

Line art should be submitted at a minimum of 1200 pixels/inch (480 p/cm). Half tones (photographs) should be submitted at a minimum of 300 pixels/inch (120 p/cm).

All parts of the manuscript should be submitted electronically via Manuscript Central™ at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>.

2.1.2. Style. The American form of English should be used, and manuscripts should be written in a style following the current standards for scientific publications. The Editors will return manuscripts that do not meet a minimum standard for written English for revision prior to review. The use of personal pronouns (I, my, our, we, us) should be avoided in the text. Only metric units of measurement are acceptable. All abbreviations may be used after first mention with complete spelling. Arabic numerals should be used except when a number begins a sentence, in which case it should be spelled out in full.

2.2. Detailed layout

2.2.1. Title page. The title page should include the full title of the paper, the authors' full names (example: John D. Doe), the name and location of each author's institution(s), the name, mailing address, and e-mail of the corresponding author to whom galley proofs are to be sent, and a short running title (Review Articles and Full Scientific Reports only) not to exceed 60 characters (including spaces). The title should be concise, must not include any abbreviations, and should fully reflect the content of the manuscript.

2.2.2. Abstract. The abstract should be the second page of the manuscript following the title page. The abstract should be limited to **250 words or fewer**. It should be concise, factual, and be able to stand alone without reference to the text. *Abbreviations and reference citations should not be used in the abstract.*

2.2.3. Key words. For online search purposes, provide an **alphabetical** list of key words or phrases not to exceed 80 characters (including spaces). Key words should appear directly below, and on the same page as, the abstract. *Abbreviations should be spelled out.*

2.2.4. Body of manuscript.

Review Articles should contain: Title page; Abstract and Key words; Introduction; section headings; Acknowledgements (if any); Sources and manufacturers (if any); References; Tables (if any); Figure legends (if any). *Review articles should have appropriate section headings and subheadings chosen by the author.*

Full Scientific Reports should contain the following sequential sections: Title page; Abstract and Key words; Introduction; Materials and methods; Results; Discussion; Acknowledgements (if any); Sources and manufacturers (if

any); References; Tables (if any); Figure legends (if any). *Introduction and Discussion should not contain any subheads.*

Brief Communications should contain: Title page; Abstract and Key words; body of manuscript (*no section or subheadings*); Acknowledgements (if any); Sources and manufacturers (if any); References; Tables (if any); Figure legends (if any). Brief communications should be limited to approximately 12 double-spaced typed pages, including illustrations, tables, and references.

2.2.5. Sources and manufacturers. *Trade names for commercial test kits, equipment, chemicals, etc., should not be included in the text but should be listed in full with the appropriate text citation in the Sources and Manufacturers section.* Generic names of drugs should be used in the text. In the text, sources should be designated by superscript lowercase letters in sequential order. Under the Sources and Manufacturers heading, sources (including manufacturer's name, city, state, and country if other than the U.S.) should be cited in a lettered list to correspond to superscript letters in the text.

2.2.6. References. In the text, references should be identified numerically with superscript numbers. *Names of authors should not be used in the text.*

Examples:

Recent studies^{1,3,5-7} have shown....

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed as previously described.^{6-8,9,10}

In the Reference list, references must be listed alphabetically and numbered consecutively. List all authors when there are 4 or fewer; when there are 5 or more authors, list the first 3 and add "et al." Volume numbers *only* should be used for journals, unless each journal issue begins with page 1, in which case the issue number should appear in parentheses after the volume number. Journal names should be abbreviated per NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>).

Examples:

1. Bowen RA: 1987, Serologic responses of calves to sequential infections with epizootic hemorrhagic disease virus. *Am J Vet Res* 48:1449–1452.
2. Gustafson DP: 1986, Pseudorabies. *In: Diseases of swine*, ed. Dunn HW, 5th ed., pp. 274–289. Iowa State University Press, Ames, IA.

3. Saliki JT, Libeau G, House JA, et al.: 1993, Monoclonal antibody-based blocking ELISA for specific detection and titration of peste-des-petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J Clin Microbiol* 31:1075–1082.

For references in a language other than English, provide an English translation of the title in brackets following the foreign language title. Add the language in which the article appears at the end of the reference (e.g., In German.). If the article has an abstract that is available in English, please state this instead (e.g., Abstract in English.). For example:

1. Eicken K, Frey H-R, Grummer B, et al.: 2004, Epidemiologische Langzeituntersuchungen und Überwachungsmaßnahmen zur Bekämpfung von BVD-Virusinfektionen in einem nordwestdeutschen Rinderzuchtbetrieb.- Ein Fallbericht [Epidemiological long-term investigations and monitoring for the control of BVD virus infections in a northwestern German cattle holding]. *Der Praktische Tierarzt* 85:350–355. In German.

Authors are responsible for the accuracy of all references. Only published material or accepted manuscripts should be listed in references. Personal communications, unpublished observations, abstract-only citations, meeting proceedings, and citations from other non-refereed publications are not acceptable references; they must be cited in the text within parentheses. In general, meeting proceedings and citations from other non-refereed publications should be avoided.

2.2.7. Tables. Tables should appear on separate pages after the References. The table title should appear directly above the table. Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals. All nonstandard abbreviations must be spelled out using table footnotes. References to footnotes should be indicated by the following sequential symbols (*, †, ‡, §, †, #, ¶, **).

2.2.8. Figure legends. Legends must be typed double-spaced on a separate page following the tables. Avoid unnecessary repetition of information already provided in the body of the manuscript. Identify histological stains, and indicate the magnification on electron micrographs with a bar and explain in legend.

2.3. Figures

Figures must be cited consecutively in the text and numbered with Arabic numerals (Fig. 1, Fig. 2, etc.). Simple illustrations should be designed for one

column. Complicated illustrations should be designed to reproduce in two columns.

1-column width is 20 picas or 3.320 inches.

2-column width is 41 picas or 6.807 inches.

Authors are responsible for paying the cost of publishing **color** photographs/illustrations at the rate of **\$775.00 per page**. Black/white images do not incur any additional cost.

Figures must not be embedded in the text document. Acceptable formats are .JPEG and .TIFF. The minimum acceptable resolution is 300 pixels/inch (120 pixels/cm) for half tones (i.e., photographs) and 1,200 pixels/inch (480 pixels/cm) for line art (i.e., graphs and other line drawings). Multiple figure panels should be grouped into a composite figure, with the individual components clearly identified (e.g., **A, B, C**). Figures should be saved as separate files with the figure number (Fig. 1, Fig. 2, etc.) as the file name (*figure numbers and/or titles should not appear as part of the image*). For more information on preparing your figures for publication, please visit the following link: http://www2.allenpress.com/allen_press/apguides/Digital_Art_Spec.pdf.

3. Page charges and galleys

There is a manuscript-processing fee of \$75 for each printed page published in the *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Color figures incur an additional charge of \$775 per page. In addition to the Copyright Transfer Agreement, if you are submitting color figures, a **Color Figure Agreement** must be signed and returned to the Editorial office to verify that you are aware of the additional charges. The Agreement is sent out with all decision letters. If you are unable or unwilling to pay the extra color page charge, you must resubmit all color materials in black and white.

The Corresponding Author will receive galley proofs by e-mail from the Editorial Assistant (editorial@jvdi.org) about 8–10 weeks before the first day of the scheduled publication month. It is important for the Corresponding Author to notify the Editorial Assistant of any change in e-mail address between acceptance and publication of the manuscript. At the time galleys are sent, an

invoice for page charges will also be attached and payment is expected WITHIN 30 DAYS.

4. Reprints

The Editorial office of JVDI does not handle reprints. Reprint requests must be made directly to the printer (Allen Press) using the form supplied with the galleys.

5. New manuscript submission

All manuscripts must be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi> using the following online submission instructions. If you have trouble submitting a manuscript, please contact Manuscript Central customer support at 434-817-2040, ext. 167. Alternatively, consult the Manuscript Central online guide (<http://mcv3help.manuscriptcentral.com/stalkjddfesd/MC3Help.htm>), which provides detailed submission instructions. If you need any other information about manuscript preparation and submission, contact the Editorial Assistant (editorial@jvdi.org).

5.1. Preparing to submit

1 Name your files using simple file names and avoid special characters and spaces. If you are a Mac user, you must also type the three-letter extension at the end of the file name (e.g., .DOC, .RTF, .JPG, .TIF).

2 Manuscript Central supports the following browsers:
Internet Explorer 6.0 or higher for Windows XP
Firefox 2.0 or Safari 1.2.4 for Mac.

5.2. Submission process

1 Go to the Manuscript Central home page at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

2 If you have previously submitted or reviewed a manuscript using Manuscript Central, use your **User ID** and **Password** to log in.

3 If you have forgotten your User ID and Password, enter your e-mail address to receive an e-mail with your account information.

4 If you are not registered, click on the “Create Account” tab in the upper right-hand corner of the home page and follow the on-screen instructions.

5 If you have trouble submitting your manuscript, please contact Manuscript Central customer support at 434-817-2040, ext. 167, or the Editorial Assistant at editorial@jvdi.org; 706-542-4193.

6 Click on the **Author Center**, find the button and click to **submit a new manuscript**, then follow the on-screen instructions. It is useful to have the original text file open so that you can copy and paste into the required fields. You will also be required to provide e-mail addresses for up to 5 of your co-authors. *Please note:* the system only allows up to 5 accounts per manuscript. While Manuscript Central only allows you to list 5 authors, this does **not** have any bearing on the number of authors you may list on your title page. The system will create accounts for the co-authors you list, thereby allowing them to log in and check the manuscript status.

7 If at any step you need to stop the submission process, click on the “Main Menu” link. Everything you have typed into the system will be saved, and the partially completed submission will appear under “Unsubmitted Manuscripts” in your “Author Center.” To return to the submission process you will need to click on the “Continue Submission” button next to the relevant manuscript title.

8 File upload:

Enter individual files using the **Browse** button.

Select the appropriate **File Designation** type (e.g., Main Document, Figure) from the pull-down menu. Choose **Main Document** for your manuscript text file.

Choose **Figure** for all illustrations; a confirmation window will appear and you will be prompted to provide a **File Tag** and a **Figure legend** for each figure. The

File Tag should be Figure 1, Figure 2, etc. Cut and paste the figure legend from your text file. If you do not want a document to be included as part of the consolidated PDF used for peer review, please designate it as a **Supplementary File**.

Upload your files by clicking on **Upload Files**. This may take several minutes. Repeat these steps until you have uploaded all your files.

Once you have uploaded all files, indicate the **Order** in which they should appear in your paper using the drop-down menu to the left of the file names. Then click **Save**.

Click on **PDF** to view your files in PDF format. This PDF will be used for peer review.

If the files have not uploaded to your satisfaction, click **Save and Go Back** to return to the file upload screen where you can remove or redo the order of the files, and repeat the upload process.

9 When you are satisfied with the PDF, click **Save and Continue**. Manuscript Central will check that you have completed all the mandatory fields and that you have viewed the PDF. It will also present you with a summary of all the information you have provided and give you a final chance to edit it. When you have finished reviewing this information click **Submit**.

10 After the manuscript has been submitted you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been successfully submitted. *This email will include the assigned manuscript number that will be used in all correspondence.* If you do not see a confirmation screen and/or receive a confirmation e-mail, your manuscript has not been successfully submitted to the journal and cannot progress to peer review. If this is the case, your manuscript will appear in the “Unsubmitted Manuscripts” section of your “Author Center” awaiting your attention. Please contact Manuscript Central’s customer support (434-817-2040, ext. 167) or the Editorial Assistant if you encounter problems submitting your manuscript.

11 If you return to the **Author Center**, click on **Submitted Manuscripts** to the left of your screen. Find your manuscript title, and locate the **Status** section.

This provides information on your manuscript as it moves through the review process.

6. Revised manuscript submission

1 Go to the Manuscript Central home page at:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>

2 Use your **User ID** and **Password** to log in.

3 Click on **Author Center**, then **Manuscripts with Decisions**.

4 Locate the manuscript you wish to revise and click **Create a Revision**.

5 Respond to the comments made by the Editor and/or Reviewers.
IMPORTANT: All corrections/changes must be made on the file provided in the decision letter.

6 Follow the submission process, providing information when prompted.

7 If at any step you need to stop the revised submission process, click on the “Main Menu” link. Everything you have typed into the system will be saved. When you interrupt the revision submission process, your manuscript moves into the “Revised Manuscripts in Draft” in your “Author Center.” Click on the link to restart your revision process.

8 Please note that all files from your new manuscript submission process are retained by Manuscript Central. Therefore, when uploading your revised files, you must first *delete* your original files and replace them with revised versions.

9 After your revision has been submitted you will see a confirmation screen and receive an e-mail confirmation stating that your manuscript has been

successfully revised. This email will include an appended manuscript number (.R1, .R2) that will be used in all correspondence.

6. Help

If you experience any problems during the online submission process, please consult the Manuscript Central online guide (<http://mcv3help.manuscriptcentral.com/stalkjddfesd/MC3Help.htm>), which provides detailed submission instructions. Alternatively, contact Manuscript Central customer support at 434-817-2040, ext. 167, or contact the Editorial Assistant at editorial@jvdi.org.

Anexo 3

Avaliações individuais dos 350 animais utilizados para estudo de prevalência da DvW.

Quadro 1. Distribuição entre raça e sexo dos 350 animais testados para Doença de Von Willebrand, demonstrando valores absolutos e percentuais da raça, e de machos e fêmeas no total das amostras colhidas.

Raças	Machos	Fêmeas	TOTAL	% TOTAL	% Machos	% Fêmeas
Schnauzer	6	10	16	4.57	1.71	2.86
Dachshund	12	4	16	4.57	3.43	1.14
SRD	16	41	57	16.29	4.57	11.71
Labrador	2	5	7	2.00	0.57	1.43
Pastor Alemão	4	3	7	2.00	1.14	0.86
Poodle	19	42	61	17.43	5.43	12.00
Cocker Spaniel	19	20	39	11.14	5.43	5.71
Springer Spaniel	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Yorkshire Terrier	11	3	14	4.00	3.14	0.86
Maltês	11	13	24	6.86	3.14	3.71
Beagle	3	8	11	3.14	0.86	2.29
Pastor Belga	2	2	4	1.14	0.57	0.57
Rottweiler	3	4	7	2.00	0.86	1.14
Dobermann	1	2	3	0.86	0.29	0.57
West Highland Terrier	3	0	3	0.86	0.86	0.00
Shih Tzu	2	6	8	2.29	0.57	1.71
Fox Paulistinha	1	3	4	1.14	0.29	0.86
Dálmata	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Boxer	2	10	12	3.43	0.57	2.86
Golden Retriever	2	1	3	0.86	0.57	0.29
Lhasa Apso	7	8	15	4.29	2.00	2.29
Welsh Corgi Premboke	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Pug	1	3	4	1.14	0.29	0.86
Bichon Frise	3	2	5	1.43	0.86	0.57
Pit Bull	1	1	2	0.57	0.29	0.29
Pequinês	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Pinscher	4	4	8	2.29	1.14	1.14
Fila Brasileiro	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Husky Siberiano	0	3	3	0.86	0.00	0.86
Chow Chow	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Basset Hound	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Pointer	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Lulu Pomerânia	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Schnauzer Gigante	2	0	2	0.57	0.57	0.00
Border Collie	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Dogue de Bourdeaux	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Akita	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Fox Terrier	1	0	1	0.29	0.29	0.00
Setter Irlandês	0	1	1	0.29	0.00	0.29
Malamute Alaska	1	0	1	0.29	0.29	0.00
TOTAL	146	204	350	100.00	41.71	58.29

Quadro 2. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Beagle.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
22	Beagle	F	173.76
171	Beagle	M	133.24
176	Beagle	F	143.14
197	Beagle	F	194.71
201	Beagle	F	245.63
226	Beagle	M	163.77
258	Beagle	F	152.48
347	Beagle	F	105.25
356	Beagle	F	204.11
Média			168.46
Desvio Padrão			41.98

Quadro 3. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Bichon Frise.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
76	Bichon Frise	M	179.57
135	Bichon Frise	F	226.89
195	Bichon Frise	F	162.19
207	Bichon Frise	M	266.70
213	Bichon Frise	M	152.12
Média			197.49
Desvio Padrão			48.16

Quadro 4. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Boxer.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
73	Boxer	F	104.61
110	Boxer	F	239.96
124	Boxer	F	110.55
154	Boxer	F	197.97
166	Boxer	F	138.72
184	Boxer	M	119.21
247	Boxer	F	74.82
251	Boxer	F	115.27
265	Boxer	F	221.07
322	Boxer	F	82.91
378	Boxer	M	107.34
Média			137.49
Desvio Padrão			56.21

Quadro 5. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Cocker Spaniel.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
12	Cocker Spaniel	M	180.16
18	Cocker Spaniel	M	116.44
30	Cocker Spaniel	F	84.05
35	Cocker Spaniel	M	178.09
52	Cocker Spaniel	F	193.00
56	Cocker Spaniel	M	148.99
72	Cocker Spaniel	M	80.22
96	Cocker Spaniel	F	70.66
104	Cocker Spaniel	M	81.38
152	Cocker Spaniel	M	135.33
178	Cocker Spaniel	F	76.57
185	Cocker Spaniel	M	113.70
198	Cocker Spaniel	F	199.24
202	Cocker Spaniel	F	80.40
205	Cocker Spaniel	M	236.59
217	Cocker Spaniel	M	165.67
225	Cocker Spaniel	M	276.69
235	Cocker Spaniel	F	77.65
243	Cocker Spaniel	M	100.61
272	Cocker Spaniel	F	91.10
276	Cocker Spaniel	M	79.61
283	Cocker Spaniel	F	340.56
288	Cocker Spaniel	F	140.69
318	Cocker Spaniel	F	81.91
335	Cocker Spaniel	M	83.39
352	Cocker Spaniel	M	133.18
361	Cocker Spaniel	F	77.88
365	Cocker Spaniel	F	223.33
371	Cocker Spaniel	M	151.38
Média			137.88
Desvio Padrão			68.41

Quadro 6. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Dachshund.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
7	Dachshund	M	145.49
14	Dachshund	F	143.75
59	Dachshund	F	144.37
60	Dachshund	F	125.87
79	Dachshund	F	288.51
89	Dachshund	F	143.84
143	Dachshund	F	139.48
192	Dachshund	F	198.04
237	Dachshund	F	111.62
261	Dachshund	M	176.25
281	Dachshund	F	199.73
284	Dachshund	F	76.51
286	Dachshund	M	104.01
291	Dachshund	F	115.12
307	Dachshund	F	111.22
Média			148.25
Desvio Padrão			51.51

Quadro 7. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Fox Paulistinha.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
32	Fox Paulistinha	M	183.85
86	Fox Paulistinha	F	115.14
165	Fox Paulistinha	F	131.68
Média			143.56
Desvio Padrão			35.87

Quadro 8. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Husky Siberiano.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
134	Husky Siberiano	F	208.47
222	Husky Siberiano	F	619.80
308	Husky Siberiano	F	150.45
Média			326.24
Desvio Padrão			255.88

Quadro 9. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Labrador.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
9	Labrador	F	239.78
49	Labrador	M	175.52
125	Labrador	F	202.50
194	Labrador	F	89.54
273	Labrador	M	176.91
349	Labrador	F	110.12
Média			165.73
Desvio Padrão			56.49

Quadro 10. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Lhasa Apso.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
44	Lhasa Apso	M	104.95
147	Lhasa Apso	M	245.75
161	Lhasa Apso	F	91.20
167	Lhasa Apso	M	100.82
175	Lhasa Apso	F	178.15
182	Lhasa Apso	F	144.52
193	Lhasa Apso	F	120.00
200	Lhasa Apso	F	159.47
278	Lhasa Apso	F	241.09
303	Lhasa Apso	F	184.32
321	Lhasa Apso	M	152.65
344	Lhasa Apso	M	101.00
357	Lhasa Apso	F	205.52
366	Lhasa Apso	M	112.28
Média			152.98
Desvio Padrão			52.00

Quadro 11. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Maltês.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
20	Maltês	M	71.44
21	Maltês	F	193.94
48	Maltês	F	155.27
77	Maltês	F	187.00
78	Maltês	M	165.57
93	Maltês	F	74.49
114	Maltês	F	92.42
119	Maltês	M	99.31
120	Maltês	M	189.67
140	Maltês	F	75.10
158	Maltês	F	100.95
189	Maltês	F	73.87
214	Maltês	F	142.67
218	Maltês	M	74.72
227	Maltês	M	319.01
236	Maltês	M	184.99
244	Maltês	F	74.63
249	Maltês	M	101.00
260	Maltês	M	218.62
293	Maltês	F	115.12
358	Maltês	F	200.84
370	Maltês	F	133.49
Média			138.37
Desvio Padrão			64.04

Quadro 12. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Pastor Alemão.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
10	Pastor Alemão	M	165.20
62	Pastor Alemão	M	189.92
69	Pastor Alemão	M	140.27
128	Pastor Alemão	F	172.04
270	Pastor Alemão	M	239.90
304	Pastor Alemão	F	151.49
Média			176.47
Desvio Padrão			35.45

Quadro 13. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Pastor Belga.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
23	Pastor Belga	M	158.52
70	Pastor Belga	M	148.65
199	Pastor Belga	F	169.01
268	Pastor Belga	F	129.49
Média			151.42
Desvio Padrão			16.81

Quadro 14. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Pinscher.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
92	Pinscher	M	161.73
111	Pinscher	F	78.85
113	Pinscher	M	74.61
155	Pinscher	F	233.27
262	Pinscher	M	215.13
285	Pinscher	F	108.35
289	Pinscher	M	234.03
369	Pinscher	F	148.27
Média			156.78
Desvio Padrão			66.00

Quadro 15. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Pit Bull.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
83	Pit Bull	M	277.14
364	Pit Bull	F	81.37
Média			179.26
Desvio Padrão			138.43

Quadro 16. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Poodle.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
11	Poodle	F	146.81
13	Poodle	F	155.22
17	Poodle	F	146.81
19	Poodle	F	104.02
39	Poodle	M	113.64
41	Poodle	F	86.40
45	Poodle	M	129.90
61	Poodle	F	83.52
67	Poodle	F	94.69
71	Poodle	M	85.11
75	Poodle	M	125.50
85	Poodle	F	80.33
97	Poodle	F	79.23
103	Poodle	F	165.87
105	Poodle	F	104.05
116	Poodle	F	131.37
130	Poodle	M	157.47
132	Poodle	F	95.72
146	Poodle	F	148.64
168	Poodle	F	99.66
172	Poodle	M	231.88
177	Poodle	F	85.25
187	Poodle	M	159.79
204	Poodle	F	283.33
211	Poodle	M	230.65
215	Poodle	M	255.95
221	Poodle	F	209.49
230	Poodle	F	120.85
232	Poodle	M	87.94
239	Poodle	M	193.97
245	Poodle	F	198.05
248	Poodle	M	78.86
252	Poodle	M	294.63
254	Poodle	F	205.50
274	Poodle	F	138.08
279	Poodle	F	332.23
282	Poodle	F	72.63
299	Poodle	M	215.99
302	Poodle	F	111.22
310	Poodle	F	129.75
314	Poodle	F	143.67
320	Poodle	F	74.80
331	Poodle	F	152.79
337	Poodle	M	126.31

Continua...

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
340	Poodle	M	129.47
346	Poodle	F	139.15
353	Poodle	F	162.42
354	Poodle	F	142.40
359	Poodle	F	141.74
362	Poodle	F	304.96
368	Poodle	F	118.81
Média			149.15
Desvio Padrão			63.88

Quadro 17. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Pug.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
53	Pug	F	181.63
139	Pug	F	305.60
220	Pug	F	304.23
259	Pug	M	250.52
Média			260.49
Desvio Padrão			58.50

Quadro 18. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Rottweiler.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
25	Rottweiler	F	92.52
81	Rottweiler	M	81.53
149	Rottweiler	F	992.95
157	Rottweiler	F	188.65
179	Rottweiler	M	131.89
250	Rottweiler	F	80.80
255	Rottweiler	M	258.08
Média			260.92
Desvio Padrão			329.32

Quadro 19. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Schnauzer.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
6	Schnauzer	F	115.05
34	Schnauzer	F	71.07
36	Schnauzer	M	135.71
88	Schnauzer	F	72.27
121	Schnauzer	M	75.26
174	Schnauzer	M	78.95
190	Schnauzer	M	115.03
257	Schnauzer	M	195.81
312	Schnauzer	M	144.02
313	Schnauzer	F	132.61
329	Schnauzer	M	78.78
330	Schnauzer	M	72.35
334	Schnauzer	M	243.45
351	Schnauzer	M	209.11
Média			124.25
Desvio Padrão			56.86

Quadro 20. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Shih Tzu.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
29	Shih Tzu	F	128.60
131	Shih Tzu	F	144.33
160	Shih Tzu	F	135.86
173	Shih Tzu	M	139.70
309	Shih Tzu	M	153.03
311	Shih Tzu	F	105.43
336	Shih Tzu	F	203.51
367	Shih Tzu	F	157.62
Média			146.01
Desvio Padrão			28.25

Quadro 21. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça SRD.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
8	SRD	M	166.34
31	SRD	M	187.63
47	SRD	F	282.08
54	SRD	F	105.14
55	SRD	M	133.87
57	SRD	F	84.13
63	SRD	M	238.01
64	SRD	M	99.76
68	SRD	M	175.04
90	SRD	F	86.63
91	SRD	M	88.40
122	SRD	M	153.59
138	SRD	F	122.00
145	SRD	F	126.87
169	SRD	F	97.64
186	SRD	F	94.32
188	SRD	M	133.24
206	SRD	F	214.76
208	SRD	F	110.52
209	SRD	F	149.20
210	SRD	M	284.36
216	SRD	F	177.39
219	SRD	F	306.18
224	SRD	F	89.41
229	SRD	F	207.35
233	SRD	F	96.32
238	SRD	F	186.89
242	SRD	F	73.77
256	SRD	F	263.56
263	SRD	F	190.79
264	SRD	F	145.48
267	SRD	F	195.00
269	SRD	F	167.32
271	SRD	F	358.29
275	SRD	F	118.13
280	SRD	M	205.50
287	SRD	F	117.14
294	SRD	M	77.43
295	SRD	F	76.86
300	SRD	F	180.05
315	SRD	F	75.70
327	SRD	F	337.35
332	SRD	M	71.28
333	SRD	F	242.25

Continua...

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
338	SRD	F	81.65
339	SRD	F	265.77
345	SRD	F	75.36
355	SRD	F	242.95
372	SRD	M	139.63
Média			161.19
Desvio Padrão			75.89

Quadro 22. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça West Highland Terrier.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
28	West Highland Terrier	M	115.75
328	West Highland Terrier	M	324.67
376	West Highland Terrier	M	85.12
Média			175.18
Desvio Padrão			130.37

Quadro 23. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) da raça Yorkshire Terrier.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
16	Yorkshire Terrier	F	103.86
24	Yorkshire Terrier	M	96.33
50	Yorkshire Terrier	M	71.09
65	Yorkshire Terrier	M	285.51
74	Yorkshire Terrier	M	134.85
80	Yorkshire Terrier	M	82.68
82	Yorkshire Terrier	F	151.10
94	Yorkshire Terrier	M	127.17
151	Yorkshire Terrier	M	127.96
266	Yorkshire Terrier	F	232.30
306	Yorkshire Terrier	M	181.30
360	Yorkshire Terrier	M	217.73
Média			150.99
Desvio Padrão			65.85

Quadro 24. Valores individuais do FvW:Ag (%) dos animais sadios (FvW:Ag acima de 70%) das raças Akita, Border Collie, Chow Chow, Dálmata, Dobermann, Dogue Bourdeaux, Fila Brasileiro, Fox Terrier, Golden Retriever, Malamute do Alaska, Pequinês, Pointer, Setter Irlandês, Schnauzer Gigante, Springer Spaniel.

NºAmostra	Raça	Sexo	FvW:Ag (%)
277	Akita	F	165.88
203	Border Collie	M	113.37
137	Chow Chow	M	140.72
38	Dálmata	M	127.49
223	Dobermann	F	101.52
228	Dogue Bourdeaux	F	124.31
117	Fila Brasileiro	F	356.90
292	Fox Terrier	M	101.34
43	Golden Retriever	M	181.58
377	Malamute Alaska	M	128.80
87	Pequinês	F	143.14
148	Pointer	M	80.59
323	Setter Irlandês	F	78.79
183	Schnauzer Gigante	M	91.00
15	Springer Spaniel	M	137.82

Quadro 25. Valores individuais, média e desvio padrão do FvW:Ag (%), TSMO (s), TTPA (s) e Atividade do Fator VIII (s) dos animais suspeitos (FvW:Ag entre 50 e 70%).

Raça	Nº amostra	Sexo	FvW:Ag (%)	TSMO (s)	TTPA (s)	FVIII (%)
Basset Hound	144	M	66.77	102	16	74.42
Beagle	27	M	66.18	100	16	115.00
Beagle	123	F	53.55	48	15	122.38
Boxer	42	F	66.63	95	16	74.42
Cocker Spaniel	112	M	53.02	99	15	84.28
Cocker Spaniel	118	F	54.51	60	17	79.20
Cocker Spaniel	126	F	58.84	78	13	89.68
Cocker Spaniel	159	M	63.33	106	14	84.28
Cocker Spaniel	191	F	62.81	111	15	74.42
Cocker Spaniel	212	F	58.41	96	14	84.28
Cocker Spaniel	297	F	67.94	78	16	101.55
Cocker Spaniel	316	F	63.49	65	15	84.28
Cocker Spaniel	317	F	67.54	55	17	65.72
Cocker Spaniel	325	M	65.28	45	12	95.43
Dachshund	290	M	68.43	86	12	95.43
Dobermann	26	M	61.33	142	17	84.28
Fox Paulistinha	40	F	63.67	86	17	84.28
Golden Retriever	163	M	66.46	90	16	101.55
Labrador	246	F	61.81	84	13	79.20
Lhasa Apso	170	M	61.38	85	14	74.42
Lulu Pomerania	162	F	63.80	98	13	84.28
Maltês	100	M	68.21	50	14	115.00
Maltês	150	M	65.25	112	12	95.43
Pastor Alemão	102	F	60.67	150	15	84.28
Poodle	51	F	59.84	70	17	74.42
Poodle	127	F	58.99	112	13	95.43
Poodle	180	M	60.35	61	13	89.68
Poodle	181	M	55.46	74	13	89.68
Poodle	196	M	61.31	85	13	101.55
Poodle	234	F	54.72	45	17	74.42
Poodle	240	F	57.08	58	13	95.43
Poodle	305	F	69.55	88	16	95.43
Poodle	324	F	51.40	72	17	84.28

Continua...

Raça	Nº amostra	Sexo	FvW:Ag (%)	TSMO (s)	TTPA (s)	FVIII (%)
Schnauzer	296	M	60.62	98	15	89.68
Schnauzer	319	M	61.07	69	17	84.28
Schnauzer Gigante	326	M	62.65	98	13	84.28
SRD	37	F	62.95	52	20	74.42
SRD	109	F	54.03	45	11	95.43
SRD	142	M	51.92	125	15	108.07
SRD	231	M	64.07	99	17	69.94
SRD	241	F	58.79	78	13	84.28
SRD	253	F	65.39	100	15	95.43
SRD	298	F	51.16	85	14	89.68
Welsh Corgi Premboke	46	M	63.94	154	17	74.42
Yorkshire	58	M	55.55	135	17	74.42
Média			61.11	87.20	14.89	87.83
Desvio Padrão			5.05	27.48	1.92	12.48

Quadro 26. Valores de referência para TTPA (s), utilizando 8 animais e também um Pool (4 animais), sendo que todas as amostras utilizadas mostraram FvW:Ag > 70% (Animais sadios para DvW).

	TTPA (s)		Média
	análise 1	análise 2	
Pool	16	17	16.5
Animal 1	14	13	13.5
Animal 2	13	14	13.5
Animal 3	16	18	17
Animal 4	14	15	14.5
Animal 5	12	12	12
Animal 6	12	13	12.5
Animal 7	13	15	14
Animal 8	17	20	18.5
Média	14.11	15.22	14.67
Desvio padrão	1.83	2.64	2.19

Quadro 27. Valores percentuais das raças sobre todas as amostras colhidas (350 animais), para animais sadios, suspeitos e portadores para Doença de von Willebrand.

Raça	Nº animais	Normal (%)	Suspeito (%)	Portadores (%)
Akita	1	100	0	0
Basset Hound	1	0	100	0
Beagle	11	81.82	18.18	0
Bichon Frise	5	100	0	0
Border Collie	1	100	0	0
Boxer	12	91.67	8.33	0
Chow Chow	1	100	0	0
Cocker Spaniel	39	74.36	25.64	0
Dachshund	16	93.75	6.25	0
Dálmata	1	100	0	0
Dobermann	3	33.33	33.33	33.33
Dogue Bourdeaux	1	100	0	0
Fila Brasileiro	1	100	0	0
Fox Paulistinha	4	75	25	0
Fox Terrier	1	100	0	0
Golden Retriever	3	33.33	33.33	33.33
Husky Siberiano	3	100	0	0
Labrador	7	85.71	14.29	0
Lhasa Apso	15	93.33	6.67	0
Lulu Pomerânia	1	100	0	0
Malamute Alaska	1	100	0	0
Maltês	24	91.67	8.33	0
Pastor Alemão	7	85.71	14.29	0
Pastor Belga	4	100	0	0
Pequinês	1	100	0	0
Pinscher	8	100	0	0
Pit Bull	2	100	0	0
Pointer	1	100	0	0
Poodle	61	83.61	14.25	1.64
Pug	4	100	0	0
Rottweiler	7	100	0	0
SRD	57	85.96	12.28	1.75
Schnauzer	16	87.5	12.5	0
Schnauzer Gigante	2	50	50	0
Setter Irlandês	1	100	0	0
Shih Tzu	8	100	0	0
Springer Spaniel	1	100	0	0
Welsh Corgi Premboke	1	0	100	0
West Highland Terrier	3	100	0	0
Yorkshire Terrier	14	85.71	7.14	7.14

Anexo 4

Gráficos representativos, divididos por grupo, das variáveis albumina e cortisol no estudo de gestação e FvW.

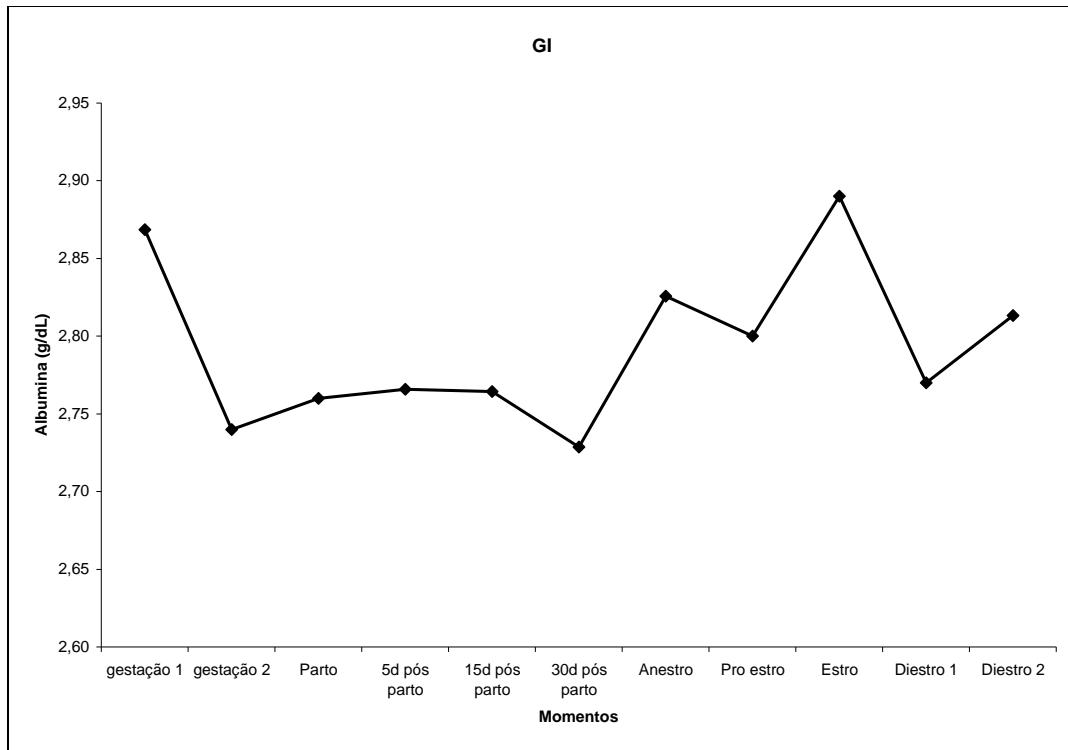


Figura 1. Concentração de Albumina plasmática (g/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I.

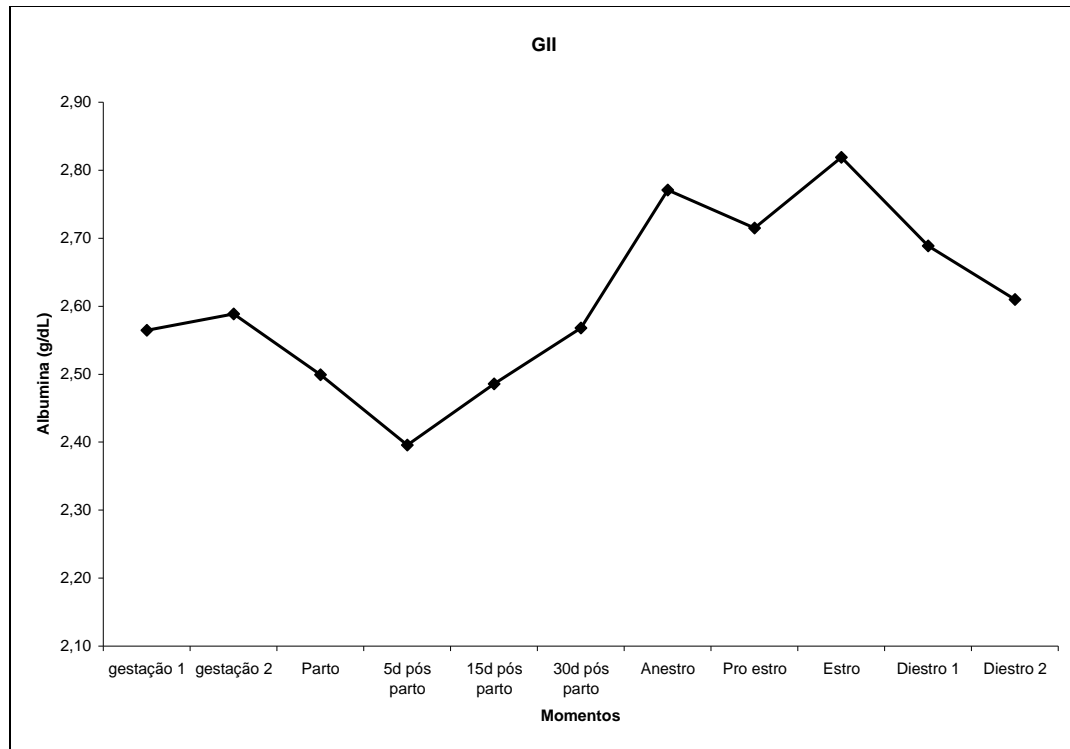


Figura 2. Concentração de Albumina plasmática (g/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo II.

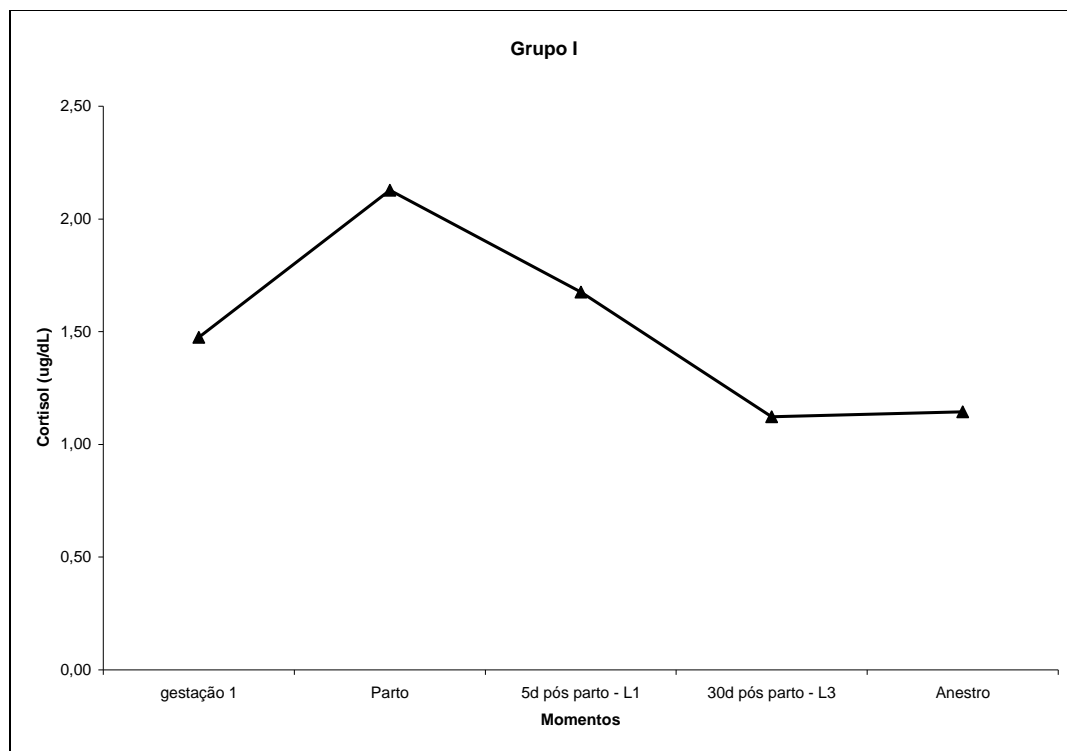


Figura 3. Concentração de Cortisol plasmático (ug/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo I.

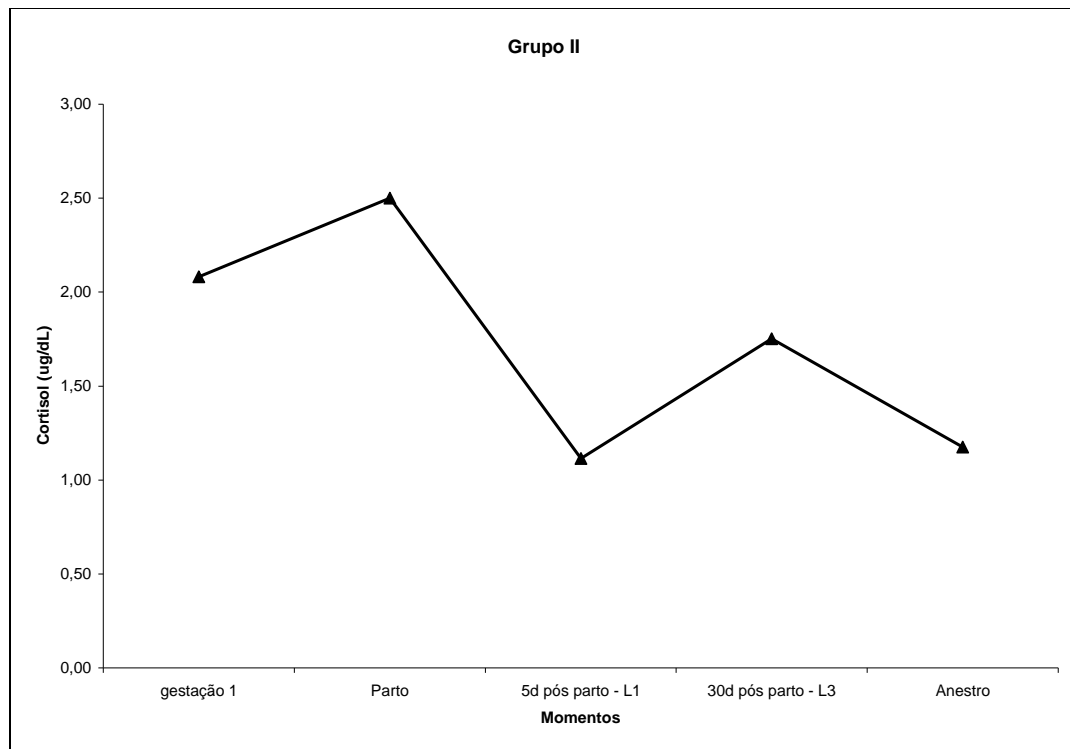


Figura 4. Concentração de Cortisol plasmático (ug/dL) durante os momentos estudados nos animais do Grupo II.