

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
CAMPUS DE BOTUCATU

Dissertação de Mestrado

TÍTULO: Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada primária e secundária a *E. canis* sob tratamento com micofenolato de mofetila

TATIANA GERAISSATE GORENSTEIN

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina K. Takahira

BOTUCATU – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
CAMPUS DE BOTUCATU

RISCO TROMBÓTICO EM CÃES COM ANEMIA HEMOLÍTICA  
IMUNOMEDIADA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA A *E. CANIS* SOB  
TRATAMENTO COM MICOFENOLATO DE MOFETILA

TATIANA GERAISATE GORENSTEIN

Dissertação de mestrado  
apresentada junto ao programa de  
pós-graduação em Medicina  
Veterinária para obtenção do título  
de mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina K.  
Takahira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gorenstein, Tatiana Geraissate.

Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada primária e secundária a *E. canis* sob tratamento com micofenolato de mofetila / Tatiana Geraissate Gorenstein.  
- Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Regina Kiomi Takahira  
Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Anemia hemolítica. 3. Ehrlichia canis. 4. Hemostasia. 5. Trombofilia.

Palavras-chave: AHIM; *E. canis*; hemostasia; hipercoagulabilidade; tromboelastometria.

Nome do autor: Tatiana Geraissate Gorenstein

Título: Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada primária e secundária a *E. canis* sob tratamento com micofenolato de mofetila

### **Comissão examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Kiomi Takahira**

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-Unesp-Botucatu/SP

---

**Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado**

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ-Unesp-Botucatu/SP

---

**Prof. Dr. Paulo César Jark**

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Unicastelo-Descalvado/SP

Data da defesa: 30 de julho de 2018

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela benção de exercer essa profissão, pelos desafios que nos fortalece, pelo amparo e luz.

Ao meu companheiro Bruno Ferrante, pela compreensão e amor em todos os grandes e pequenos momentos, por compartilhar as adversidades e vitórias. Pela presença, mesmo fisicamente distante.

Aos meus pais Heloisa Maria Lordello Geraissate Gorenstein e Oscar Boris Gorenstein por sempre apoiarem e acreditarem em seus filhos, mesmo que esse apoio os levasse para longe de casa e da convivência diária. Pelos sacrifícios que possibilitaram nossas conquistas. Pelo amor e dedicação a nossa família.

Aos meus irmãos Marcos Geraissate Gorenstein e Rafael Geraissate Gorenstein por me tornarem a pessoa que sou hoje, pelos ensinamentos sobre a vida.

À orientadora Regina Kiomi Takahira por tanto conhecimento compartilhado, pela clareza e tranquilidade com que me guiou neste trabalho.

Aos residentes do laboratório de patologia clínica Roberta Basso, Ivânio Borba Júnior, Nayara Limonta, Grazielly Cunha e Gisele Kammer pela amizade, pessoas especiais sempre dispostas a ajudar. Aos técnicos Adriana Lopes e Marcos Montanha pelo carinho com que me receberam.

Aos residentes do serviço de moléstias infecciosas Fábio Vinicius Portilho, Bruna Colhado, Carolina Polo, Aline Beatriz Silva, Natália Paschoal, Ivan Mori, Isabelle Placa e Lucieny Sierra por me permitirem fazer parte da rotina e família de vocês, pelos bons momentos compartilhados. Ao Professor Antônio Carlos Paes por acreditar em meu trabalho.

Aos amigos de pós-graduação Sâmea Joaquim, Giulia Latosinski, Bruna dos Santos, Pedrita Assunção, Vitor Yunes, Daniele Silvano, Maurício Wilmsen e Felipe Gazza pelo apoio, torcida, por dividirem os momentos de dificuldades e incertezas.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo amparo em forma de bolsa (processo 2016/23403-1), permitindo a dedicação a esse trabalho.

À Universidade Estadual Paulista Campus Botucatu, por permitir a realização desse trabalho. Aos professores da pós-graduação Henrique, Malu, Paes e Pantoja, pela formação profissional e pessoal. Aos funcionários, pelos sorrisos do dia a dia.

Aos animais que fizeram parte deste trabalho: Belinha, Cora, Pitucha, Fred, Ravena, Duque, Maru, Morena, Sorriso, Preta, Lilica e Nina. Pelo olhar simples e puro de cada um. Aos seus tutores pela dedicação.

*“...perdida em minhas meditações, agradei no silêncio de meus pensamentos o tempo que ele passara a conversar comigo, mais que a arte que me transmitira, pois descobri que o que os outros têm de mais precioso a nos oferecer é o tempo, ao qual a morte dá seu valor. ”*

Ingrid Betancourt

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

% - por cento

µL – microlitros

°C – graus Celsius

AHIM – anemia hemolítica imunomediada

ALB – albumina

ALT – alanina amino transferase

CFT – tempo de formação do coágulo

CID – coagulação intravascular disseminada

CT – tempo de coagulação

EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético

EXTEM® – Ativador de fator tecidual

*E. canis* – *Ehrlichia canis*

et al – e colaboradores

FA – fosfatase alcalina

g/dL – gramas por decilitro

GGT – gama glutamil transferase

GLOB – globulina

Hct- hematócrito

Ig A – imunoglobulina A

Ig G – imunoglobulina G

Ig M – imunoglobulina M

INTEM® – Ativador de contato

MCF – firmeza máxima do coágulo

mg/dL – miligramas por decilitro

M – momento

mL – mililitros

mm – milímetros

PT – proteína total

q – quartil

RPC – relação proteína/creatinina urinária

s – segundos

SRD – sem raça definida

Sobrev. – sobreviventes

TAD – teste de antoglobulina direta

TEG – tromboelastografia

TEM – tromboelastometria

TP – tempo de protrombina

TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada

U/L – unidade internacional por litro



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Distribuição dos animais que vieram a óbito e sobreviventes de acordo com sexo, idade, raça e etiologia da AHIM. .... 33

Tabela 2 -Mediana, primeiro quartil (1q), terceiro quartil (3q) dos parâmetros da hematimetria, plaquetas e leucócitos totais, dos cães sobreviventes (n=7), nos momentos 1(M1) e ..... 34

Tabela 3 -Mediana, primeiro quartil (1 q) e terceiro quartil (3 q) da concentração sérica de ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), ALT (U/L), FA (U/L), GGT (U/L), PT (g/dL), ALB (g/dL) ..... 34

Tabela 4 -Mediana, primeiro quartil (1q), terceiro quartil (3q) e mediana da contagem absoluta de reticulócitos (/ $\mu$ L) de cães que vieram a óbito (n=5), cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e intervalo de referência..... 35

Tabela 5 -Resultado do teste de aglutinação em salina de cães que vieram a óbito (n=5) e cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) ..... 35

Tabela 6 -Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) da relação proteína / creatinina urinária (RPC) e densidade urinária de cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2), cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência ..... 35

Tabela 7 -: Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de protrombina (PT) e tromboplastina ativada (TTPa) dos cães sobrevivente (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2), cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência. .... 35

Tabela 8 -Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo alfa ( $\alpha$ ), firmeza máxima do ..... 36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem do aparelho do tromboelastometria (arquivo pessoal).....	22
Figura 2: Representação esquemática da análise pela tromboelastometria.....	23
Figura 3: Parâmetros da tromboelastometria .....	24
Figura 4: Paciente canino em estado de hipercoagulabilidade (arquivo pessoal).....	24
Figura 5: Paciente canino em estado de hipocoagulabilidade (arquivo pessoal).....	24
Figura 6: Esquematização dos momentos e tratamento em relação ao tempo.....	26
Figura 7: Distribuição dos animais que vieram a óbito e sobreviventes, de acordo com a enfermidade, sexo e raça.....	33

## Sumário

RESUMO .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
1.1 Anemia hemolítica imunomediada primária .....	14
1.1.1 Prevalência .....	14
1.1.2 Fisiopatologia .....	15
1.1.3 Manifestações clínicas .....	16
1.1.4 Diagnóstico.....	16
1.1.5 Tratamento .....	18
1.1.6 Prognóstico .....	19
1.2 <i>Ehrlichia canis</i> .....	19
1.2.1 <i>E. canis</i> e Anemia hemolítica imunomediada .....	21
1.3 Tratamento e Risco Trombótico .....	21
1.4 Estado de hipercoagulabilidade e diagnóstico.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1. Seleção dos animais .....	25
4.2 Colheita de amostras .....	26
4.3 Exames laboratoriais.....	27
4.3.1 Hemograma, contagem de reticulócitos e aglutinação em salina .....	27
4.3.2 Bioquímica sérica .....	28
4.3.3 Urinálise e razão proteína/creatinina urinária.....	28
4.4 Exames para diagnóstico de doenças infecciosas .....	28
4.4.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	28
4.4.2 Sorologia Leptospirose.....	28
4.5 Exames para avaliação hemostática.....	29
4.5.1 Tromboelastrometria .....	29
4.5.2. Tempo de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) .....	29
4.6 Exames de imagem.....	29
4.6.1 Avaliação ultrassonográfica abdominal .....	29
4.7 Classificação entre AHIM primária e secundária .....	29
4.8 Análise estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>6.DISSCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO:.....</b>	<b>40</b>

<b>8. REFERÊNCIAS:</b> .....	40
<b>9. NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO</b> .....	46
<b>10. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	55
<b>11. ANEXOS</b> .....	78
<b>Anexo 1:</b> Atestado de aprovação do Comitê de ética no uso de animais .....	78
<b>Anexo 2:</b> Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos tutores dos animais participantes do Projeto .....	79

GORENSTEIN T.G.; Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada primária e secundária a *E. canis* sob tratamento com micofenolato de mofetila. Botucatu, 2018. 79p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu.

## RESUMO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é o distúrbio imunológico de maior prevalência em cães. Caracteriza-se como uma hipersensibilidade do tipo II, que leva a destruição prematura de hemácias. Dentre as principais complicações, o estado de hipercoagulabilidade predispondo a coagulação intravascular disseminada e o tromboembolismo pulmonar é a mais importante, sendo a causa de óbito em mais de 80% dos casos. A AHIM primária não pode ser associada a causa predisponente óbvia, além de apresentar predisposição racial, portanto trata-se de um diagnóstico de exclusão. A AHIM secundária está relacionada a diversos agentes, dentre eles os infecciosos, destacando-se a erlichiose; neoplásicos; medicamentosos e os causados por defeitos intrínsecos. O diagnóstico de AHIM é realizado através da constatação de um ou mais desses sinais: moderada a grave anemia (hematócrito < 30 - 25%), evidências de hemólise (hemoglobinúria ou bilirrubinúria) e presença de anticorpos na hemácia (caracterizado a partir da autoaglutinação, esferocitose, teste de Coombs positivo ou citometria de fluxo). O tratamento é direcionado a supressão da resposta imune, sendo os corticosteroides e outros imunossupressores, tais como ciclosporina e micofenolato de mofetila, os fármacos de predileção. Objetivou-se com esta pesquisa esclarecer se há alteração do risco trombótico após o início da terapia imunossupressora com micofenolato de mofetila por meio da tromboelastometria em animais com AHIM primária e secundária a *E.canis*. Os animais em estudo foram submetidos a hemograma, contagem de reticulócitos, pesquisa de esferocitose, bioquímico sérico, exame de urina, relação proteína creatinina urinária, testes de coagulação, tromboelastometria; PCR para *E. sp*, *E. canis* e *B. canis*; sorologia para *Leptospira spp* e ultrassonografia abdominal. Foram selecionados 12 cães com diagnóstico de AHIM e realizado exame tromboelastométrico em dois momentos: antes do início do tratamento com micofenolato de mofetila, quando o paciente fazia uso de doxiciclina, omeprazol e prednisolona (M1) e após a adição do micofenolato de mofetila ao protocolo acima citado, quando houve melhora clínica e hematológica (M2). Cinco animais vieram a óbito antes do momento 2. A comparação entre as médias dos dois momentos do grupo dos sobreviventes foi avaliada pelo teste de Wilcoxon e para a comparação entre o momento 1 do grupo de sobreviventes e de óbitos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney, ambos ao nível de 5% de significância. Nas condições em que foi realizado o presente estudo, é possível concluir que não há diminuição do risco trombótico entre os animais tratados com micofenolato de mofetila; os animais que apresentaram menor coagulabilidade apresentaram pior prognóstico e a contagem de reticulócitos apresentou melhor valor prognóstico do que a contagem de hemácias, no momento do diagnóstico.

Palavras chaves: AHIM, *E. canis*, hemostasia, hipercoagulabilidade, tromboelastometria

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Anemia hemolítica imunomediada primária

Dentre os distúrbios imunológicos em cães, as doenças hematológicas são as mais frequentes. A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é o distúrbio imunológico de maior prevalência em cães que se caracteriza como uma hipersensibilidade do tipo II, levando a destruição prematura de hemácias (McALESS, 2010). O índice de mortalidade varia de acordo com a literatura entre 26 a 70% (PEREIRA, 2014). Dentre as principais complicações, o estado de hipercoagulabilidade predispondo a coagulação intravascular disseminada e tromboembolismo pulmonar é a mais importante, sendo a causa de óbito em mais de 80% dos casos (FENTY et al, 2011).

O mecanismo pelo qual a AHIM leva a hipercoagulação e predispõe ao tromboembolismo ainda não foi esclarecido. Acredita-se que a liberação de tromboplastina a partir de hemácias lisadas, ativação plaquetária, hipóxia, liberação de mediadores inflamatórios e lesão endotelial contribuam para o processo. O uso de corticosteroides e terapia imunossupressora também foi sugerido como uma causa potencial para a hipercoagulabilidade. As complicações tromboembólicas foram associadas como importante causa de morte em animais tratados para AHIM (FENTY et al, 2011). Carr e colaboradores (2002) avaliaram 72 animais tratados para AHIM e o tromboembolismo foi confirmado em 80% dos pacientes necropsiados. Vários órgãos foram afetados, possivelmente como consequência da coagulação intravascular disseminada (CID).

#### 1.1.1 Prevalência

A AHIM primária não pode ser associada a causa predisponente óbvia, além de apresentar predisposição racial, portanto trata-se de um diagnóstico de exclusão (FENTY et al, 2011).

A AHIM secundária está relacionada a diversos agentes, dentre eles os infecciosos (erlichiose, babesiose, leptospirose, dilofilariose, histoplasmose), neoplásicos (linfoma, hemangiossarcoma, leucemia linfóide, carcinoma pulmonar e gástrico e sarcoma), medicamentosos (sulfas, penicilinas, cefalosporinas, levamizol, dipirona, clorpromazina), os causados por defeitos

intrínsecos (deficiência de fosforo, deficiência de piruvato e fragilidade osmótica hereditária) e os de origem diversa (ingestão de alho e cebola, picada de abelha e vacinação) (BALCH; MACKIN, 2007).

As raças mais acometidas na AHIM primária, segundo a literatura estrangeira, são os Cockers Spaniel, Bichon Frise, Pincher e Collies. As fêmeas são mais predispostas que machos, podendo haver influência hormonal (MILLER et al, 2004).

A média de idade dos animais acometidos é de seis anos, mas pode ocorrer do primeiro ano de vida até os 13 anos de idade (BALCH; MACKIN, 2007).

### 1.1.2 Fisiopatologia

As hemácias de cães saudáveis têm vida média de 100 a 120 dias (BALCH; MACKIN, 2007). Os mecanismos envolvidos no envelhecimento e destruição fisiológica das hemácias ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a lesão oxidativa; a destruição por anticorpos aderidos á membrana da hemácia e a alteração de membrana, por exposição de fosfolipídeos, levando a sinalização e destruição por macrófagos, contribuam para esse processo. Em condições normais, aproximadamente 80 a 90 % dessa destruição ocorre no baço, fígado e medula óssea, sendo considerada uma hemólise extravascular. Por esse motivo não há quantidades significativas de hemoglobina livre no plasma do meio intravascular (GLADER, 2009).

Na anemia hemolítica imunomediada, a remoção ocorre de forma precoce e patológica, por meio de uma reação imunológica tipo II. Essa destruição ocorre de forma direta ou pela fagocitose de hemácias opsonizadas por imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) ou complemento ou ambos (McALESSI, 2010). A hemólise pode ser intravascular ou extravascular, entretanto a hemólise extravascular é predominante, sendo o baço e o fígado órgãos primários da eritrofagocitose (REIMER et al, 1999).

A hemólise intravascular ocorre quando a cascata do sistema complemento é ativada, geralmente mediada pela IgM, por meio do influxo de fluidos extracelulares para o eritrócito, ocasionando a ruptura da célula quando ela ainda está na circulação sanguínea. Esse processo resulta na liberação de

hemoglobina livre no sangue, hemoglobinemia, e, conseqüentemente hemoglobinúria (BALCH; MACKIN, 2007).

A hemólise extravascular é dependente dos fagócitos do sistema monocítico-macrofágico presentes no baço, no fígado e na medula óssea, capazes de retirar da circulação as hemácias revestidas por anticorpos e pelo complemento. Em geral são processos mediados por IgG, menos frequentemente por IgA e certos componentes do complemento (C3b e C4b). Esse processo resulta na hiperbilirrubinemia, uma vez que a hemoglobina entra no metabolismo da bilirrubina. Esses são considerados os quadros hemolíticos mais comuns, brandos e de melhor prognóstico em cães (PEREIRA, 2014).

Pode haver azotemia pré-renal e, no caso de hemólise intravascular grave, azotemia renal. A injúria renal aguda pode ser causada pela deposição de imunocomplexos ou pelo efeito tóxico direto da hemoglobina livre nas células dos túbulos renais (THRALL et al, 2015). Em estudo realizado por Moraes (2011) que avaliou as complicações hematológicas e renais e risco trombótico em cães com AHIM, observaram-se indícios de lesão renal no momento do diagnóstico, caracterizado pelo aumento de relação proteína creatinina urinária e proteinúria.

#### 1.1.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas dependem do tempo de aparecimento (agudo ou crônico), da intensidade da anemia e dos mecanismos compensatórios; mais comumente os animais apresentam letargia, anorexia, palidez e icterícia de mucosas, vômito, diarreia, intolerância a exercícios, síncope, taquipneia e taquicardia. Essas alterações podem estar associadas a linfadenomegalia; hepatomegalia; esplenomegalia; distúrbios hemostáticos primários, secundários ou mistos como a CID (PEREIRA, 2014).

#### 1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado a partir da exclusão de outras causas de anemia e por meio da constatação de um ou mais desses sinais: moderada a grave anemia (hematócrito < 30 - 25%), evidências de hemólise (bilirrubinúria, hemoglobinúria ou hiperbilirrubinemia) e presença de anticorpos na hemácia (caracterizada por autoaglutinação, esferocitose ou teste de Coombs positivo)



(McALESSI, 2010). A Citometria de fluxo também avalia a presença de anticorpos aderidos a eritrócitos, permitindo detecção de baixos níveis de imunoglobulinas quando comparado ao teste de Coombs (PEREIRA, 2014).

O paciente clássico de AHIM tem anemia moderada a grave, altamente regenerativa (manifestado por reticulocitose, policromasia e anisocitose). Entretanto, um terço dos pacientes apresentam, no momento do diagnóstico, anemia não regenerativa. Muitos destes pacientes têm início agudo da doença e, portanto, não têm tempo suficiente para desenvolver resposta regenerativa adequada, ao passo que outros pacientes apresentam anticorpos contra células eritroides precursoras da medula óssea. Leucocitose neutrofílica, com desvio a esquerda também é frequentemente um achado hematológico, decorrentes de lesão tecidual; hiperplasia mieloide estimulada por citocinas e aumento da liberação medular decorrente da alta resposta regenerativa e diminuição da migração destas células para tecidos com baixa perfusão e lesões necróticas. A esferocitose está presente em 89 a 95 % dos casos (BALCH; MACKIN, 2007).

O teste de Coombs (teste de antiglobulina direta-TAD) baseia-se na detecção de anticorpos e/ou complemento ligados à superfície das hemácias, possui sensibilidade de aproximadamente 60 % (CARR, 2002). Segundo Morley e colaboradores (2008), o método da citometria de fluxo apresenta maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico de AHIM. Entretanto em trabalho realizado por Martorelli (2016) avaliando a caracterização da anemia em cadelas com piometra por meio da citometria de fluxo observou-se aumento da marcação de anticorpos aderidos à superfície das hemácias no momento pós-operatório da ovariosalpingohisterectomia, sem que os animais apresentassem hemólise ou agravamento da anemia. Resultados falsos negativos e falsos positivos no TAD e na citometria de fluxo têm sido atribuídos ao tratamento prévio com glicocorticoides e transfusões sanguíneas (HONECKMAN et al, 1996).

A avaliação de autoaglutinação no sangue é um teste simples, com alta especificidade e baixa sensibilidade (PEREIRA, 2014).

A urinálise é utilizada para avaliação de hemólise, através da bilirrubinúria ou hemoglobínúria (PEREIRA, 2014). O perfil bioquímico pode revelar a gravidade da lesão tecidual causada pela hipóxia ou pela deposição de

imunocomplexos, levando ao aumento de enzimas hepáticas e renais, respectivamente (McCULLOUGH, 2003).

#### 1.1.5 Tratamento

O tratamento é direcionado a supressão da resposta imune. Glicocorticoides, ciclosporina, azatioprina, micofenolato de mofetila e leflunomida são os imunossupressores mais utilizados. Imunoglobulina intravenosa é utilizada em casos mais graves. A terapia requer longos períodos de tratamento, sendo necessários em alguns casos transfusões sanguíneas, fluidoterapia e antibioticoterapia como tratamento suporte (WHELAN, 2009 e WANG, 2013).

Os glicocorticoides como a prednisona e a dexametasona são os fármacos de predileção. Alguns pacientes respondem ao tratamento sem necessitar de associações de outras drogas imunossupressoras. Eles atuam diminuindo a destruição de glóbulos vermelhos através da inibição da fagocitose e da produção de imunoglobulinas (BALCH; MACKIN, 2007). A prednisona ou prednisolona é administrada nas doses de 1 a 2 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas. Animais que não podem receber medicação por via oral podem se beneficiar da dexametasona na fase inicial da terapia, por via subcutânea ou intravenosa, nas doses de 0,3 a 0,9 mg/kg, a cada 24 horas (PEREIRA, 2014).

A associação de outros agentes imunossupressores ao protocolo terapêutico deve ser considerada quando os glicocorticoides falham em induzir a remissão, causam efeitos colaterais inaceitáveis ou quando não podem controlar a doença mesmo se administrados em doses elevadas. Os fármacos devem ser iniciados em combinação aos glicocorticoides. Casos mais agressivos de AHIM devem iniciar protocolo terapêutico já em associação ao imunossupressor (BALCH; MACKIN, 2007).

O micofenolato de mofetila é um imunossupressor utilizado em humanos transplantados e que sofrem de doença reumatoide. Em cães tem sido destinado para o tratamento de doenças imunomediadas, como a miastenia gravis (BALCH; MACKIN, 2007). No organismo ele é convertido em ácido micofenólico,

que restringe a proliferação de linfócitos T e B e diminuí a produção de linfócitos T citotóxico, por meio da inibição da inosina monofosfato desidrogenase, enzima que atua na biossíntese de purina nos linfócitos B e T, especificamente na via *de novo*, essencial para a síntese de DNA e RNA e, conseqüentemente, proliferação celular (RANG et al, 2011). A dose recomendada é de 10 a 20 mg/kg/dia, por via oral, dividida em 2 a 3 doses (BALCH; MACKIN, 2007). Efeitos adversos incluem perda de peso, diarreia, papilomatose e reação alérgica. As vantagens de seu uso estão na sua rápida ação e o fato de não causar hepatotoxicidade e mielossupressão como os demais imunossupressores (WANG et al, 2013). Devido ao alto custo desse fármaco ele é reservado a casos refratários de AHIM. Estudos que comprovam sua eficácia em cães ainda são escassos, entretanto seu uso na rotina clinica já está bem estabelecido (BALCH; MACKIN, 2007).

#### 1.1.6 Prognóstico

O prognóstico é reservado, a resposta completa ao tratamento pode levar semanas a meses, e alguns pacientes podem necessitar de tratamento contínuo ao longo da vida (BALCH; MACKIN, 2007).

O índice de mortalidade varia de acordo com a literatura entre 26 a 70 %. Apesar desta variabilidade, há consenso de que a doença tromboembólica é a maior causa de morte (PEREIRA, 2014). Anormalidades de coagulação, principalmente a coagulação intravascular disseminada e os estados de hipercoagulabilidade, particularmente o tromboembolismo pulmonar, estão relacionados ao óbito em AHIM primárias. Clinicamente é muito difícil reconhecer essas anormalidades, sendo a tromboelastometria a forma mais completa de avaliar a hemostasia do plasma e componentes celulares, predizendo sobre quando o paciente entra em risco trombótico (GOGGS et al, 2011).

### 1.2 *Ehrlichia canis*

A erlichiose monocítica canina é causada por bactéria intracelular obrigatória, a *Ehrlichia canis*, que invade o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, multiplicando-se em macrófagos por fissão binária e disseminando-se pelo corpo. A transmissão se dá pela picada do carrapato *Rhipicephalus*

*sanguineus* ao realizar repasto sanguíneo em cães infectados e, posteriormente, em animais hípidos (SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

Após um período de incubação de 8 a 20 dias, três fases da doença podem se desenvolver: aguda, subclínica e crônica. Nas fases aguda e crônica os sinais clínicos mais comuns são: depressão, letargia, anorexia, febre, perda de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, petéquias subcutâneas ou em mucosas e equimoses, podendo haver sangramentos espontâneos. Na fase subclínica, o animal permanece assintomático, podendo evoluir para a fase crônica. A alteração hematológica mais comumente observada é a trombocitopenia, ocorrendo em mais de 90% dos casos, devido a consumo por vasculite, diminuição do tempo de meia-vida plaquetária, sequestro esplênico e destruição periférica mediado por anticorpos anti-plaquetários (HARRUS, 2015). Ainda podem ser observadas leucopenia e anemia arregenerativa leves, nas fases agudas e subclínicas. Cães em fase crônica podem apresentar pancitopenia moderada a severa, com comprometimento da medula óssea (HARRUS, 2015 e SANTARÉM E AGUIAR, 2016).

O diagnóstico é realizado por meio da associação de sinais clínicos e alterações hematológicas, presença de mórulas em esfregaço sanguíneo, sorologia, cultivo celular ou detecção molecular por reação em cadeia pela polimerase (PCR). O PCR apresenta alta especificidade e sensibilidade (SANTARÉM E AGUIAR, 2016) e é considerado o diagnóstico definitivo (HARRUS e WANER, 2010).

O tratamento de eleição é a doxiciclina, entretanto a dosagem e o período de tratamento varia de acordo com o autor. Harrus (2015) preconiza o uso de 5 mg/Kg, a cada 12 horas ou 10 mg/Kg, a cada 24 horas, durante 3 a 4 semanas. Santarém e Aguiar (2016), preconizam o uso de 15 mg/kg, a cada 24 horas, durante 21 a 28 dias, principalmente em casos crônicos. O uso de corticosteroides é indicado quando há evidências de alterações imunomediadas como trombocitopenia importante e anemia hemolítica (HARRUS, 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

### 1.2.1 *E. canis* e Anemia hemolítica imunomediada

Em estudo retrospectivo, realizado no município de Botucatu, sobre principais alterações hematológicas na fase aguda da erlichiose, Bulla e colaboradores (2004) demonstraram que 82,6 % dos animais avaliados apresentavam anemia, sendo que desses 17,8 % foram classificados como anemia intensa, sugerindo que causas multifatoriais possam estar envolvidas, dentre elas aumento de destruição eritrocitária, além da anemia da inflamação. Frank and Breitschwerdt (1999) realizaram estudo com 62 cães portadores de *E. canis*, desses animais 15 foram avaliados quanto a presença de anticorpos anti-eritrocitários, sendo dois positivos. Ambos trabalhos sugerem que cães acometidos por *E. canis* podem apresentar anemia hemolítica imunomediada.

## 1.3 Tratamento e Risco Trombótico

Em estudo realizado por Romão (2013) que avaliou risco trombótico em cães hípidos submetidos a tratamento com prednisona, em doses anti-inflamatórias e imunossupressoras, concluiu-se que houve diminuição dos níveis de antitrombina, sem, no entanto, predizer sobre o risco trombótico. Adicionalmente Rose e colaboradores (2011) avaliaram o risco trombótico em seis beagles saudáveis, que receberam administração via oral de prednisona nas doses de 1 mg/kg e 4mg/kg, uma vez ao dia, por 2 semanas e observaram indícios de hipercoagulabilidade por meio do tromboelastografia, independente da dose.

Em estudo realizado por Thomason e colaboradores (2018) que avaliou o efeito do micofenolato de mofetila na hemostasia primária e secundária de oito cães saudáveis, recebendo a dose de 10 mg/kg, a cada 12 horas, durante 7 dias, via oral; observou-se que não houve aumento de função plaquetária ou coagulabilidade nesses cães, concluindo que este fármaco não predispõe a hipercoagulabilidade ou risco trombótico.

## 1.4 Estado de hipercoagulabilidade e diagnóstico

A tromboelastometria (ROTEM®) e a tromboelastografia (TEG®) são capazes de avaliar de modo global a função hemostática do sangue de forma mais completa, por meio de técnica utilizada *in vitro* que diagnostica estados de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade, antes mesmo das manifestações clínicas. Elas realizam a mensuração de todo processo de coagulação desde o início da interação plaqueta-fibrina, da agregação plaquetária e da formação do coágulo, até sua eventual lise (KOL e BORJESSON, 2010).

O sistema ROTEM® possui um computador integrado para análise automatizada e quatro canais para aferições simultâneas (Figura 1).

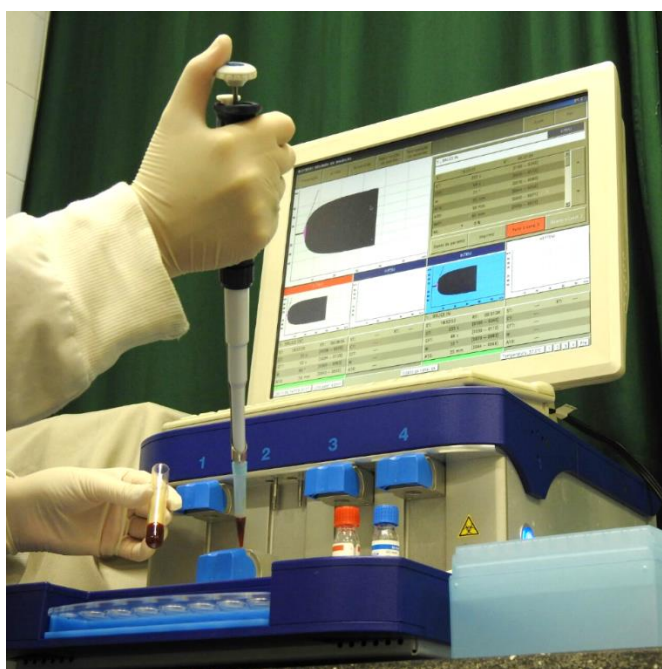


Figura 1: Imagem do aparelho do tromboelastometria (arquivo pessoal)

O princípio da tromboelastometria envolve a incubação de sangue total a 37 °C em um copo cilíndrico acoplado a um pino de aço, que faz uma rotação em 4º 75' em relação ao copo. Então, por meio de uma leitura óptica, essa movimentação envia uma representação gráfica da formação do coágulo, desde a iniciação, a máxima formação, até sua eventual lise (CROCHEMORE et al, 2017).

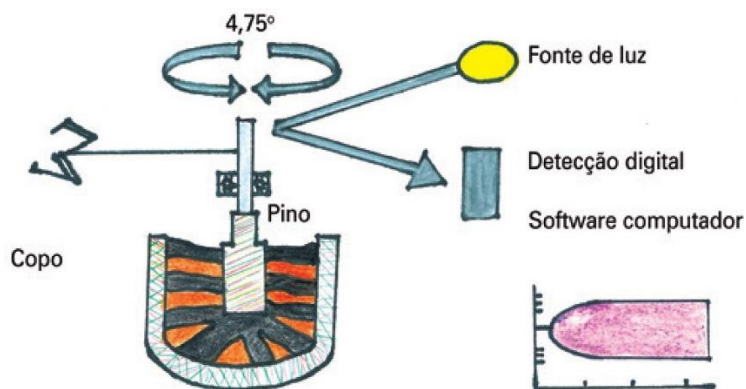


Figura 2: Representação esquemática da análise pela tromboelastometria

Fonte: CROCHEMORE et al, 2017

As variáveis analisadas pelo equipamento são tempo, dinâmica, tamanho e firmeza do coágulo, expressos por meio dos quatro principais parâmetros (Figura 3):

-CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina, trata-se da iniciação do coágulo, da formação inicial de trombina e da polimerização do coágulo, quando esse atinge a amplitude de 2 mm. Avalia os fatores de coagulação.

-CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de um coágulo estável, quanto esse atinge a amplitude de 20 mm; representa a cinética da formação de trombina, polimerização da fibrina e estabilização do coágulo por meio do envolvimento das plaquetas, fibrinogênio e fator XIII.

- Ângulo  $\alpha$ : velocidade da formação do coágulo; a angulação descreve o estado de coagulabilidade do paciente, quanto mais obtuso maior a tendência a hipercoagulação.

-MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo, quando esse atinge a amplitude máxima, envolve a interação entre plaquetas, fibrinogênio e fator XIII

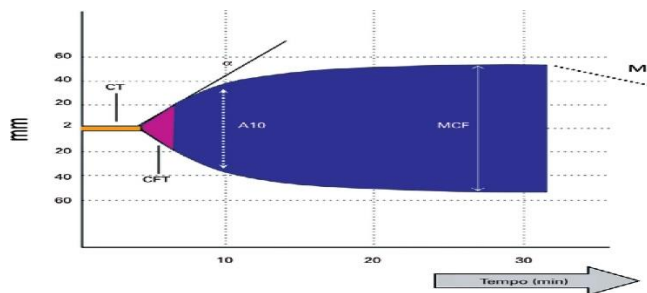


Figura 3: Parâmetros da tromboelastometria  
 Fonte: CROCHEMORE et al, 2017

O estado de hipercoagulação é caracterizado pela diminuição do tempo de coagulação (CT) e do tempo de formação do coágulo (CFT), aumento do ângulo  $\alpha$  e da firmeza máxima do coágulo (MCF). O estado de hipocoagulação é caracterizado pelo oposto, ou seja, prolongamento do CT e CFT e diminuição do ângulo  $\alpha$  e MCF (GOGGS et al, 2014).

Para melhor visualização segue exemplo de gráfico de paciente canino apresentando hipercoagulabilidade (figura 4) e hipocoagulabilidade (figura 5), avaliados na via intrínseca (Intem) e extrínseca (Extem).

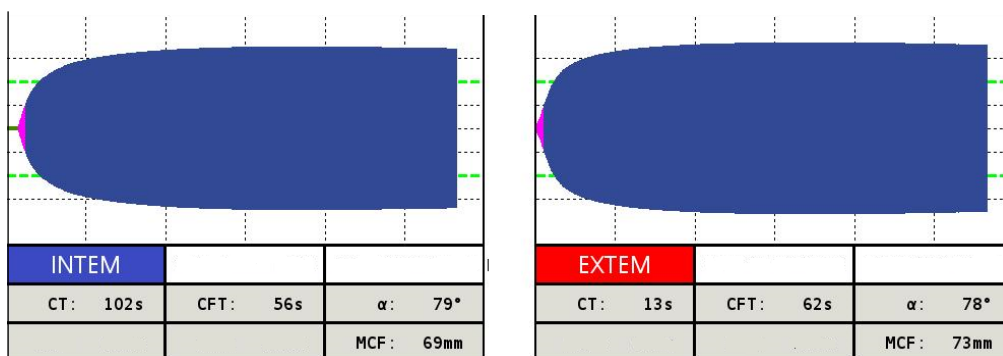


Figura 4: Paciente canino em estado de hipercoagulabilidade (arquivo pessoal)

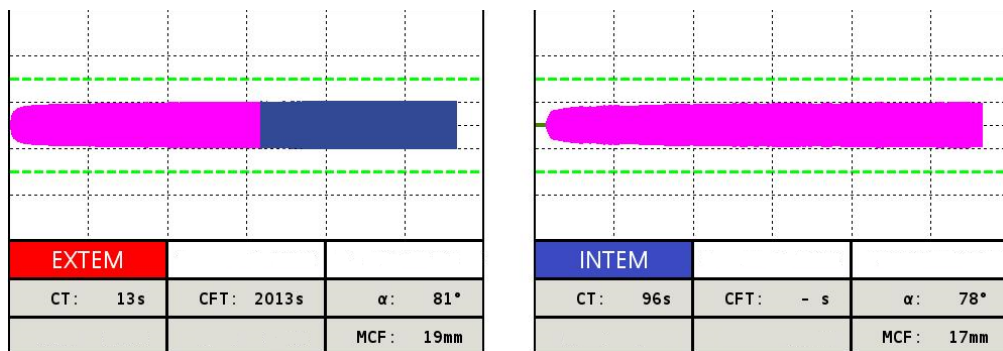


Figura 5: Paciente canino em estado de hipocoagulabilidade (arquivo pessoal)



Nesses exemplos observa-se a importância da amplitude máxima, representada pelo parâmetro MCF e do ângulo  $\alpha$ , na avaliação visual. Nota-se que no paciente da figura 5, o estado de hipocoagulabilidade é tão grave que não há formação de coágulo, constatado pela ausência do gráfico de cor azul, na via intrínseca. Fica evidente que o coágulo formado na primeira figura é forte e estável; ao passo que no segundo, quando formado na via extrínseca, é frágil.

## 2. JUSTIFICATIVAS

Visto que a principal causa de óbito em AHIM é secundária a complicações hemostáticas, o presente trabalho se faz viável e importante por ajudar a esclarecer se há alteração do risco trombótico após início de terapia imunossupressora com micofenolato de mofetila em pacientes com AHIM primária ou secundária a *E. canis*. Além disso, a tromboelastometria é o meio mais confiável e seguro para diagnóstico do risco trombótico.

## 3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar o risco trombótico de pacientes caninos com anemia hemolítica imunomediada primária e secundária a *E. canis* antes e após o tratamento imunossupressor com micofenolato de mofetila por meio da tromboelastometria, bem como determinar possíveis indicadores prognósticos.

A hipótese é de que os animais estejam em hipercoagulação no momento do diagnóstico e que, após o tratamento, eles tendam a diminuir esse estado hipercoagulatório.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção dos animais

O projeto foi submetido a avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 194/2016) e elaborado um termo de “Consentimento Livre e

Esclarecido” fornecido aos proprietários para conhecimento dos procedimentos de colheita de sangue e urina a serem realizados.

Foram selecionados 12 animais com sinais de anemia hemolítica imunomediada, oriundos da rotina clínica do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP.

A seleção dos animais foi realizada a partir da análise dos exames hematológicos, bioquímicos e de urina. Foram incluídos os cães que apresentavam anemia moderada a grave (hematócrito  $\leq 25\%$ ), com sinais de hemólise imunomediada como presença de esferocitose, aglutinação em salina positiva, bilirrubinúria e/ou hemoglobinúria. Foram excluídos vários cães que apresentaram qualquer outras co-morbidades não relacionadas a anemia hemolítica como dermatites, doença renal crônica, doenças pulmonares e cardíacas, doenças endócrinas, doenças articulares e neoplasia de qualquer origem.

#### 4.2 Colheita de amostras

As amostras de sangue e urina foram colhidas em dois momentos diferentes. O primeiro momento (M1), com hematócrito inferior ou igual a 25%, quando o paciente estava sob o seguinte protocolo terapêutico: omeprazol 1 mg/kg, a cada 24 horas; doxiciclina 15 mg/kg, a cada 24 horas e prednisolona 2 mg/kg, a cada 12 horas; durante 3 a 5 dias. Logo após o momento 1 foi adicionado ao protocolo terapêutico o micofenolato de mofetila 10 mg/kg, a cada 12 horas. E o segundo momento (M2), quando o hematócrito atingiu a contagem igual o superior a 30%. O intervalo médio de tempo entre o momento 1 e 2 foi de 17 dias (7 a 22 dias). Nos animais que vieram a óbito as amostras foram colhidas apenas no momento 1, pois apesar de terem iniciado o tratamento com micofenolato de mofetila, não sobreviveram até o momento 2.

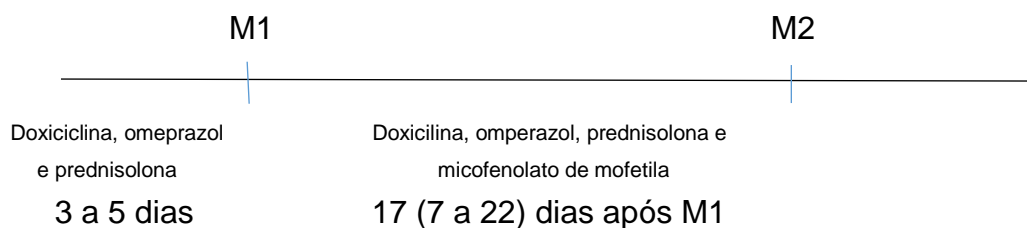


Figura 6: Esquematização dos momentos e tratamento em relação ao tempo

O sangue foi colhido impreterivelmente da veia jugular. Foram colhidos 2,0 ml de sangue com anticoagulante EDTA K3 7,2 % para hemograma, contagem de reticulócitos, teste de aglutinação em salina e reação em cadeia de polimerase (PCR) de *Ehrlichia sp*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*; 3,0 mL de sangue sem anticoagulante para as dosagens bioquímicas e sorologia de *Leptospira spp*, previamente ao tratamento. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 rpm para obtenção do soro.

Para a tromboelastometria, tempo de protrombina (TP) e tempo tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram colhidos dois tubos de 1,8 mL de sangue com citrato de sódio a 3,2 %. Após 15 minutos da coleta foi realizada análise tromboelastométrica de um dos tubos. O segundo tubo foi submetido a centrifugação e o plasma foi congelado e armazenado em -80°C até a realização da dosagem de TP e TTPa.

A urina foi colhida via cateterismo ou cistocentese, totalizando o volume de 10 mL. A urinálise foi realizada imediatamente após a colheita, bem como a dosagem de creatinina e proteína urinária.

### 4.3 Exames laboratoriais

#### 4.3.1 Hemograma, contagem de reticulócitos e aglutinação em salina

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário da UNESP de Botucatu em contador hematológico (Poch 100iV Diff - Roche®). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em conjunto com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido (Laborclin®).

Para a determinação da contagem de reticulócitos foi utilizada a técnica manual em esfregaços sanguíneos após coloração com Novo Azul de Metileno e incubação em banho-maria a 37°C por 15 minutos.

Para o teste de aglutinação em salina, foi usado 50 µL de salina a temperatura ambiente e 10 µL de sangue total, a lâmina foi colocada em câmara úmida por 15 minutos, seguindo a leitura microscópica.

#### 4.3.2 Bioquímica sérica

Os testes bioquímicos alanina amino-transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT), ureia, creatinina, proteína total sérica (PT), albumina (ALB) e globulinas (GLOB) foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada (Roche® - Cobas Mira Plus) utilizando kits comerciais (Bioclin ®).

#### 4.3.3 Urinálise e razão proteína/creatinina urinária

A urinálise foi realizada no Laboratório Clínico Veterinário da UNESP de Botucatu, compreendendo exame físico, químico (Combur-Test® – Roche) e sedimentoscopia em microscópio óptico (40x). A dosagem de proteína e creatinina urinárias foram realizadas em equipamento de bioquímica automatizada (Roche® - Cobas Mira Plus) utilizando kits comerciais (Bioclin ®)

### 4.4 Exames para diagnóstico de doenças infecciosas

#### 4.4.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os PCRs para *Ehrlichia sp* e *Babesia canis* foram encaminhados para o Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário da UNESP de Botucatu. Os animais que foram positivos para *Ehrlichia sp* foram testados para *Ehrlichia canis*.

#### 4.4.2 Sorologia Leptospirose

A sorologia para leptospirose foi realizada pelo laboratório de diagnóstico de zoonoses da FMVZ UNESP de Botucatu, pelo método de soroaglutinação microscópica, contemplando os seguintes sorovares: *L. australis*; *L. bratislava*; *L. autumnalis*; *L. canicola*; *L. cynopteri*; *L. djasiman*; *L. grippotyphosa*; *L. copenhagen*; *L. icterohaemorrhagiae*; *L. pomona*; *L. pyrogenes*; *L. hardjo*; *L. canicola botucatu*.

## 4.5 Exames para avaliação hemostática

### 4.5.1 Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM® (Delta, Pentapham, Munique, Alemanha) mantido a 37°C. Dois canais foram utilizados simultaneamente, em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2mol/L (startem®); a ativação da coagulação foi realizada em cada canal, separadamente, com a adição dos reagentes intem® (20 µL, fosfolipídios de 26 tromboplastina parcial, Pentapham, Munique, Alemanha) para avaliação da via intrínseca e extem® (20 µL, fosfolipídios de 26 tromboplastina tecidual, Pentapham, Munique, Alemanha) para avaliação da via extrínseca.

O intervalo de referência utilizado foi estabelecido pelo laboratório de hemostasia da FMVZ, por meio do método robusto no qual trabalhou-se com 20 animais saudáveis, utilizando como parâmetros a mediana, valores máximos e mínimos, com índice de confiabilidade de 90 % (FRIEDRICHS et al, 2012).

### 4.5.2. Tempo de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa)

O TP e o TTPa foram realizados em coagulômetro (ClotTimer® Laser Sensor, Sorocaba, Brasil) em triplicata, utilizando os kits específicos (Clot®, Sorocaba, Brasil) para cada teste.

## 4.6 Exames de imagem

### 4.6.1 Avaliação ultrassonográfica abdominal

O exame ultrassonográfico foi realizado por meio do aparelho Esaot, modelo Mylab 70 Vet® pelo serviço de diagnóstico por imagem da FMVZ-Unesp.

## 4.7 Classificação entre AHIM primária e secundária

Os animais diagnosticados com AHIM primária foram negativos nos exames para doenças infecciosas, não apresentaram histórico de doenças crônicas, não foram medicados ou vacinados nos 3 meses anteriores a doença.

Em exame ultrassonográfico não apresentaram nenhuma alteração sugestiva de doenças neoplásicas.

Os animais diagnosticados com AHIM secundária a *E. canis* diferenciam-se dos acima citados apenas por apresentarem PCR positivo para *E. canis*.

Animais que foram positivos para *E. sp* e negativos para *E. canis* foram excluídos.

#### 4.8 Análise estatística

Para o dimensionamento amostral foi realizada a comparação dos dois momentos de avaliação, considerando o modelo de medidas repetidas no mesmo animal, estabeleceu-se um número mínimo de sete animais; por meio de nível 5 % de significância para as comparações e um poder de 80 % para o teste estatístico utilizado.

A variável resposta não mostrou aderência a distribuição normal pelo teste Shapiro Wilks, portanto consideraram-se a mediana, primeiro quartil e terceiro quartil de cada variável. Para comparação entre os dois momentos do grupo de sobreviventes foi utilizado o teste não paramétrico de Willcox e para a comparação entre o momento 1 do grupo de sobreviventes e o grupo de óbitos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney (NORMAN e STREINER, 2008). As análises foram realizadas pelo software Graph Pad Prism 6 ® e os resultados foram discutidos no nível de 5 % de significância.

## 5. RESULTADOS

Foram selecionados 12 animais. Destes, cinco vieram a óbito antes do término da pesquisa, sendo todas fêmeas com média de idade 3 anos (11 meses a 7 anos); duas sem raça definida, uma Boxer, uma Pinscher miniatura e uma Terrier brasileiro. Duas cadelas foram diagnosticadas com AHIM primária e três com AHIM secundária a erlichiose, a média de sobrevivida foi de sete dias (2 -14 dias) após o início do tratamento.

Entre os sete animais sobreviventes, quatro foram machos e três fêmeas, média de idade 5 anos (8 meses a 13 anos), seis não tinham raça definida e um

Poodle. Destes, cinco apresentaram AHIM secundária a erlichiose e dois AHIM primária.

Dentre os animais avaliados quatro foram negativos para *Ehrlichia sp*, oito foram positivos para *E. canis*. Todos os animais avaliados foram negativos para *Babesia canis*. Nenhum animal foi reagente para sorologia de Leptospirose.

A Figura 5 e a Tabela 1 ilustram a distribuição dos animais que vieram a óbito e sobreviventes, de acordo com o sexo, a raça e etiologia da AHIM.

Dentre os 12 animais apenas uma fêmea era castrada (1/12).

As alterações mais observadas foram: ixodidiose 66,6 %; vômito 58,3 %; mucosas hipocoradas 58,3 %; hipertermia 58,3%; icterícia 41,6%; aumento de linfonodos 41,6%; desidratação 33,3% e diarreia 33,3 %.

Quatro animais (4/12) receberam transfusão de concentrado de hemácias no início do tratamento, após momento 1 (M1), destes três vieram a óbito antes do momento 2.

Cinco animais apresentaram esferocitose (5/12). Os animais sobreviventes apresentaram anemia mais intensa, com diferença estatística significativa quando comparada a contagem de hemácias. Eles também apresentaram reticulocitose e leucocitose mais intensas que os que vieram a óbito, no momento M1, porém sem diferença significativa. A avaliação hematológica dos pacientes sobreviventes e dos que vieram a óbito encontra-se nas Tabelas 2,4 e 5

Na avaliação bioquímica observou-se aumento de albumina e diminuição de proteína total, entre os animais sobreviventes, de M1 para M2; entretanto não houve diferença estatística significativa. A atividade sérica das enzimas hepáticas (ALT e FA) aumentaram de M1 para M2 no grupo de sobreviventes, ainda assim foram menores quando comparada com o grupo de óbito. A avaliação bioquímica encontra-se na Tabela 3.

No exame de urina oito (8/12) animais apresentaram bilirrubinúria moderada a intensa; onze (11/12) animais apresentaram sangue oculto e presença de hemácias na urina. Nenhum paciente apresentou densidade urinária abaixo do valor de referência. Os sobreviventes apresentaram aumento de RPC em M1 que se normalizou em M2 (Tabela 6).

Na avaliação hemostática observaram-se valores maiores de TTPA no grupo que foi a óbito em comparação ao M1 dos sobreviventes. Adicionalmente, na avaliação por tromboelastometria, o grupo de óbito apresentou valores menores de CT e MCF, tanto na via intrínseca quanto extrínseca, em comparação ao grupo de sobreviventes. Os animais sobreviventes apresentaram valores maiores de ângulo  $\alpha$  e MCF, tanto em M1 quanto em M2, em relação aos valores de referência (Tabela 7 e 8).

Seis pacientes foram avaliados por exame ultrassonográfico abdominal, três vieram a óbito antes da realização do exame e três não retornaram no dia agendado para avaliação. Dentre os pacientes examinados, três foram diagnosticados com AHIM e três com *E. canis*. Todos apresentaram esplenomegalia e alteração em ecogenicidade de parênquima hepático, apenas um apresentou hepatomegalia. Nenhum paciente apresentou alterações sugestivas de neoplasia em nenhum dos órgãos abdominais.



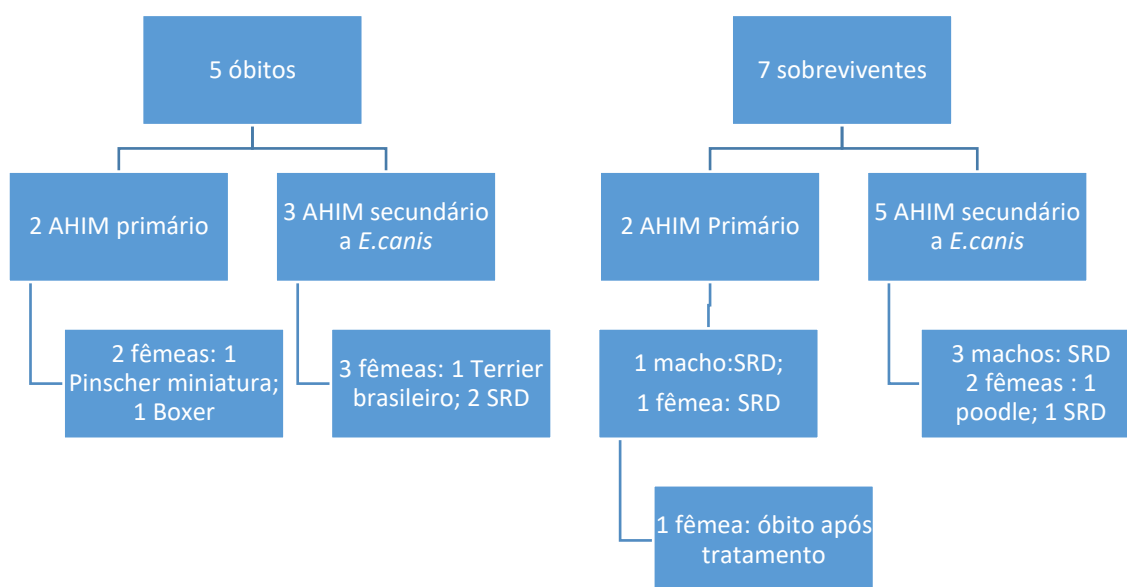


Figura 7: Distribuição dos animais que vieram a óbito e sobreviventes, de acordo com a enfermidade, sexo e raça.

Tabela 1 -Distribuição dos animais que vieram a óbito e sobreviventes de acordo com sexo, idade, raça e etiologia da AHIM.

Animal	Sexo	Idade	Raça	PCR <i>E. canis</i>	Óbito	Sobrevida
1	fêmea	1 ano e 6 meses	SRD	negativo	não *	
2	macho	3 anos	SRD	negativo	não	
3	fêmea	1 ano e 6 meses	SRD	positivo	não	
4	fêmea	14 anos	Poodle	positivo	não	
5	macho	2 anos	SRD	positivo	não	
6	macho	8 meses	SRD	positivo	não	
7	macho	11 anos	SRD	positivo	não	
8	fêmea	11 meses	SRD	positivo	sim	14 dias
9	fêmea	3 anos	Terrier brasileiro	positivo	sim	3 dias
10	fêmea	7 anos	SRD	positivo	sim	2 dias
11	fêmea	6 anos	Pinscher	negativo	sim	2 dias
12	fêmea	7 anos	Boxer	negativo	sim	14 dias

\*Animal fez parte do grupo de sobreviventes, completando momento 2, veio a óbito após 2 meses do início do tratamento

Tabela 2 -Mediana, primeiro quartil (1q), terceiro quartil (3q) dos parâmetros da hematimetria, plaquetas e leucócitos totais, dos cães sobreviventes (n=7), nos momentos 1(M1) e 2 (M2); dos cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência

	Sobreviventes M1		Sobreviventes M2		Óbito		Referência
	Mediana (1q - 3q)		Mediana (1q - 3q)		Mediana (1q - 3q)		
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	1.780 (1.300 - 2.200) *		4.200 (3.610 - 5.400)		2.780 (1.890 - 3.755)*		5,5 – 8,50
Hemoglobina (g/dL)	5.100 (3.800 - 6.100)		10.800 (9.700 - 12.200)		6.400 (4.650 - 7.700)		12,0 - 18,0
Hematócrito (%)	17 (15 – 19)		33 (32 – 35)		20 (15 – 23)		37,0 - 55,0
Plaquetas (/μL)	27.775 (10.000 - 228.000)		374.000 (290.000 - 59.800)		65.650 (15.000 - 193.500)		160.000 – 430.000
Leucócitos (/μL)	40.600 (11.500 - 67.600)		13.100 (6.300 - 24.400)		17.900 (6.500 - 44.245 )		6.000 – 17.000

\*Variável que apresentou diferença estatística (p<0,05) quando comparado os grupos sobreviventes M1 e óbito, demais variáveis não apresentaram diferença estatística significativa

Tabela 3 -Mediana, primeiro quartil (1 q) e terceiro quartil (3 q) da concentração sérica de ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), ALT (U/L), FA (U/L), GGT (U/L), PT (g/dL), ALB (g/dL) e GLOB (g/dL) de cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2); dos cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência

	Sobreviventes M1			Sobreviventes M2			Óbito			Referência
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q	
Ureia	74,20	61,50	122,4	40,80	27,0	46,8	67,80	24,75	141,1	21,4 - 59,9
Crea	0,6	0,5	1,12	0,69	0,46	0,90	0,30	0,20	0,55	0,5 - 1,5
ALT	154,0	57,0	456,0	229,0	143,0	414,0	344,0	118,0	3.367,0	21,0 - 73,0
FA	182,0	70,0	607,0	270,0	193,0	438,0	302,0	160,0	907,0	20,0 - 156,0
GGT	2,0	0,80	4,0	19,0	8,0	24,0	4,0	1,85	14,0	1,2 - 6,4
PT	8,0	5,6	10,8	6,3	6,3	7,0	5,2	4,7	7,9	5,4 - 7,1
ALB	2,3	1,5	2,5	3,7	2,6	3,3	2,10	1,45	2,35	2,6 - 3,3
GLOB	5,8	3,1	9,3	3,0	2,7	3,7	3,6	3,0	5,5	2,7 - 4,4

ALT: alanina amino-transferase; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil-transferase; PT: proteína total; ALB: albumina; GLOB: globulina. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 4 - Mediana, primeiro quartil (1q), terceiro quartil (3q) e mediana da contagem absoluta de reticulócitos (/ $\mu$ L) de cães que vieram a óbito (n=5), cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2) e intervalo de referência

	Reticulócitos por microlitro			Referência
	Mediana	1q	3q	
Óbito	41.000	7.450	236.835	Regeneração acima de 60.000
Sobreviventes M1	185.320	56.710	194.000	
Sobreviventes M2	84.400	3.620	127.000	

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos

Tabela 5 - Resultado do teste de aglutinação em salina de cães que vieram a óbito (n=5) e cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2)

	positivo	negativo
Óbito	3	2
Sobreviventes M1	6	1
Sobreviventes M2	1	6

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos

Tabela 6 - Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) da relação proteína / creatinina urinária (RPC) e densidade urinária de cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2), cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência

Parâmetro	Sobreviventes M1	Sobreviventes M2	Óbito	Referência
RPC	1,80 (1,03-2,50)	0,44 (0,26-3,03)	2,11 (1,99-2,65)	0,2 - 0,5
densidade	1,028 (1,018-1,050)	1,020 (1,018-1,042)	1,024 (1,023-1,033)	1,015 -1,045

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos

Tabela 7 - Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de protrombina (PT) e tromboplastina ativada (TTPa) dos cães sobrevivente (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2), cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência.

Parâmetro	Sobreviventes M1	Sobreviventes M2	Óbito	Referência
TP (s)	8,3 (6,9 - 9,0)	7,9 (7,4 - 8,5)	7,1 (6,9 - 7,4)	6,4 a 7,4
TTPa (s)	12,5 (11,6 - 13,5)	13,6 (12,2 - 14,6)	29,9 (11,7 - 53,0)	9 a 11

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos

Tabela 8 -Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo alfa ( $\alpha$ ), firmeza máxima do coágulo (MCF) de cães sobreviventes (n=7) nos momentos 1 (M1) e 2 (M2), cães que vieram a óbito (n=5) e intervalo de referência

Parâmetro	INTEM®				EXTEM®			
	Sobrev.M1	Sobrev.M2	Óbito	Referência	Sobrev.M1	Sobrev.M2	Óbito	Referência
CT	94 (66 - 129)	102 (70 - 119)	219 (85 - 466)	141 (35 - 208)	18 (14-24)	13 (9 - 24)	13 (11 - 42)	58 (33 - 180)
CFT	38 (34 - 105)	56 (29 - 68)	39 (0 - 137)	91 (59 - 199)	35 (19-103)	60 (39 - 67)	14 (6 - 623)	99 (64 - 233)
Ângulo $\alpha$	82 (81 - 84)*	79 (76 - 84)	74 (32 - 80)*	73 (55 - 79)	83 (82-87)	78 (78 - 83)	83 (75 - 87)	72 (57 - 80)
MCF	67 (58 - 76)	69 (68 - 77)	42 (15 - 72)	59 (47 - 65)	68 (53 - 77)	74 (73 - 79)	54 (19 - 77)	62 (40 - 73)

INTEM® = Ativador de contato; EXTEM® = Ativador de fator tecidual; Sobrev.= sobreviventes CT (s) = Tempo de coagulação; CFT (s) = Tempo de formação do coágulo;  $\alpha$  (°) = Ângulo  $\alpha$ ; MCF (mm) = Firmeza máxima do coágulo

\*Variável que apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado o grupo sobrevivente M1 com o óbito, na via intrínseca. Demais variáveis não apresentaram diferença estatística significativas

## 6.DISCUSSÃO

Quatro cães foram diagnosticados com AHIM primária (33%), destes três eram fêmeas e um macho. Esse resultado condiz com a maior prevalência em fêmeas (MILLER et al, 2004). A média de idade dos cães acometidos foi 4,4 anos.

Oito cães foram diagnosticados com AHIM secundária a erlichiose (67%). Provavelmente o número maior de cães com AHIM secundária a erlichiose se deva ao fato de a pesquisa ter sido realizada no hospital veterinário de Botucatu, onde os animais atendidos provêm dessa cidade ou região, área endêmica para hemoparasitoses.

Dentre os animais diagnosticados com AHIM primária, três (75%) vieram a óbito, dentre os com AHIM secundária três (37,5%) vieram a óbito. Observa-se que a AHIM secundária a hemoparasitose apresenta melhor prognóstico quando comparado com a primária, neste estudo. Até o momento não há registros literários sobre prognóstico comparando animais acometidos por AHIM primária e secundária a hemoparasitose; entretanto em estudo de metanálise sobre lesão renal aguda em cães e gatos, realizada por Legatti e colaboradores (2018), observou-se maior taxa de mortalidade em animais cuja a etiologia da doença renal era não infecciosa.

Dentre os animais avaliados 41,6 % apresentaram esferocitose, contradizendo estudos de Balch e Mackin (2007), que referem esferocitose presente em 89 a 95 % dos casos. Por outro lado, a aglutinação em salina foi positiva em 75 % dos casos, demonstrando, neste estudo, maior relevância quanto ao diagnóstico de AHIM.

Ao contrário do esperado, quando comparada a contagem de hemácias dos animais que vieram a óbito com os sobreviventes, no primeiro momento, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), demonstrando que os animais que sobreviveram não foram os com maior contagem de hemácias. Entretanto, quando comparada a contagem de reticulócitos entre os mesmos grupos, apesar de não haver significância estatística, foi observada mediana quatro vezes maior

no grupo dos sobreviventes em M1, sugerindo que a reticulocitose seja mais importante que a intensidade da anemia no momento do diagnóstico, em relação ao prognóstico.

Após o tratamento, os animais apresentaram aumento das atividades sérica das enzimas hepáticas ALT e FA, provavelmente devido ao uso da prednisolona por período prolongado, uma vez que ela tem metabolização hepática e os cães produzem uma isoforma de FA induzida por corticosteroide, ambos acarretando em seu aumento (SILVA, 2014). Os cães que vieram a óbito apresentaram valores maiores dessas enzimas quando comparada as medianas e quartis, entretanto não foi observado significância estatística.

Em M1 dos sobreviventes a ureia está aumentada, normalizando após tratamento, o que pode ser atribuído a causas pré renais como desidratação e/ou hemorragia gastroentérica (MEUTEN, 2012).

Observou-se aumento da albumina de M1 para M2, fato que pode ser atribuído por esta ser uma proteína negativa de fase aguda, aumentando após o tratamento, com a diminuição da inflamação sistêmica (CARR et al, 2004). Já a proteína total diminuiu entre estes momentos, provavelmente devido a imunossupressão que leva a diminuição de imunoglobulinas, no caso das AHIM primárias (PEREIRA, 2014) e a diminuição de antígenos, no caso das AHIM secundária a *E. canis* (SANTARÉM E AGUIAR, 2016).

Apesar de não haver diferença estatística entre os momentos, em M1 os valores de RPC são acima da referência, enquanto que em M2 há normalização do valor. A glomerulopatia observada em M1 pode ser resultado da deposição de imunocomplexos, que ocorre na maior parte das doenças infecciosas e imunomediadas (CAVALCANTE et al, 2014). Em estudo realizado por Moraes (2011), que avaliou função renal em 87 cães com AHIM, 51,8% dos animais apresentaram aumento de RPC. Já em M2, após o tratamento, observou-se resolução do quadro. Nenhum animal avaliado era doente renal crônico, evidenciado pela densidade urinária em associação aos valores séricos de creatinina.

Tanto na via intrínseca, quanto na extrínseca, em M1 e M2 dos sobreviventes, observou-se diminuição de CFT e aumento do ângulo  $\alpha$  e MCF, caracterizando estado de hipercoagulabilidade.

Quando comparado o ângulo  $\alpha$ , na via intrínseca, dos pacientes sobreviventes em M1 com o grupo de óbito houve diferença significativa, demonstrando que os pacientes que vieram a óbito apresentavam menor coagulabilidade no momento do diagnóstico. Além disso, apesar de não significativo ( $p > 0,05$ ), quando comparados os momentos M1 dos pacientes sobreviventes com os que vieram a óbito, na via intrínseca, observou-se aumento da mediana do tempo de coagulação (CT) e diminuição da mediana da firmeza máxima do coagulo (MCF) no grupo de óbito (Tabela 8). Esses achados sugerem que os animais que apresentaram menor coagulabilidade, tiveram pior prognóstico. O mesmo foi observado por GOGGS e colaboradores (2012), que concluíram que a hipocoagulação no momento da hospitalização de cães com AHIM era um fator negativo, amparando a hipótese de que a coagulopatia por consumo é a responsável pelo prognóstico desfavorável. Ou seja, acredita-se que a ativação constante da coagulação sanguínea, estimulada pela inflamação e lesão endotelial provocada pela AHIM, possa levar ao consumo de fatores de coagulação e plaquetas, propiciando o estado de hipocoagulabilidade e que, os pacientes que são hospitalizados nessa fase, apresentam menores chances de sobreviver.

Os testes plasmáticos de coagulação TP e TTPa, que estão correlacionados com a via extrínseca e intrínseca, respectivamente, não apresentaram diferenças significativas, entretanto os valores maiores de TTPa no grupo de óbito em relação ao M1 dos sobreviventes colaboram com o achado do Rotem, indicando hipocoagulação.

Quando comparados os momentos M1 e M2 dos pacientes sobreviventes, nas vias intrínseca e extrínseca, tanto do TP e TTPa, quanto da tromboelastometria, não foram observadas diferenças significativas. Esta falta de significância pode ser explicada pelo pequeno tamanho amostral, pois em um estudo semelhante realizado por Goggs e colaboradores (2012), no qual foram avaliados 30 cães com AHIM em três momentos diferentes: admissão hospitalar,

após três dias de tratamento e após cinco dias de tratamento, através do tromboelastograma (TEG), observou-se aumento da hipercoagulabilidade ao longo do tratamento. Entretanto o tratamento não foi padronizado, como proposto neste estudo, pois a terapêutica foi individualizada para cada paciente, os fármacos usados foram: prednisolona ou dexametasona associado a ciclosporina, azatioprina ou micofenolato de mofetila.

Os animais do presente estudo mantiveram o estado hipercoagulatório após o tratamento, fato evidenciado pela ausência de diferença estatística entre os momentos M1 e M2. Entretanto, o pequeno número amostral e o uso prolongado de corticosteroide, que leva a estado de hipercoagulação, podem interferir nesses resultados. Neste sentido mais estudos seguindo tratamento padronizado com tamanho amostral maior são sugeridos, a fim de se esclarecer se há alteração do estado hipercoagulatório ao longo do tratamento.

## 7. CONCLUSÃO:

Nas condições em que foi realizado o presente estudo, é possível concluir que não há diminuição do risco trombótico entre os animais tratados com micofenolato de mofetila. Os animais que apresentaram menor coagulabilidade no momento do diagnóstico, apresentaram pior prognóstico. E que a contagem de reticulócitos apresenta melhor valor prognóstico do que a contagem de hemácias, no momento do diagnóstico.

## 8. REFERÊNCIAS:

BALCH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. **The Compendium on continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 29. N. 4, p. 217-225, 2007.



BULLA C.; TAKAHIRA R.K.; PAPANOTTO T.; LANGRAFE L.; PAES P.R.O.; LOPES R.S. Fase aguda da ehrlichiose monocítica canina: um estudo retrospectivo de 10 anos. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 2, n. 6, p. 82-85, 2004.

CARR A. P., PANCIERA D. L., KIDD L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, p. 504-509, 2002.

CAVALCANTE C.Z.; MOSKO P.R. E.; MARTORELLI C. R. Glomerulopatia. In: JERICÓ M. M.; DE ANDRADE NETO J.P.; KOGIKA, M.M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1ª edição Rio de Janeiro: Roca. Cap 161, p.1416-1427, 2014.

CROCHEMORE T.; PIZA F. M. T.; RODRIGUES R.R.; GUERRA J.C.C.; FERRAZ L.J.R.; CORRÊA T.D. A new era of thromboelastometry. **Einstein** v. 15, n. 3, p.380-385, 2017.

FENTY R.K.; DELAFORCADE A. M.; SHAW S.P; O´TOOLE T. E. Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of tromboelastography. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n.4, p. 463-467, 2011.

FRANK J.R.; BREITSCHWERDT B.E. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from north Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p 194-201, 1999.

FRIEDRICHS K.R; HARR K. E; FREEMAN K.P; SZLADOVITS B.; WALTON R.M; ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference

intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 41, n. 4, p.441-453, 2012.

GLADER B. Destruction of erythrocytes. In: GREER J. P., FOERSTER J.; RODGERS G.M.; PARASKEVAS F.; GLADER B.; ARBER D. A.; MEANS JR R. T.; **Wintrobe's Clinical Hematology**. 12<sup>a</sup> edição, Philadelphia: Wolters Kluwer. Cap 8, p. 156-161, 2009.

GOGGS R, WIINBERG B., KJELGAARD-HANSEN M., CHAN D.L, Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia using tromboelastography. **The Veterinary Journal**, v. 191, p. 347-353, 2012.

GOGGS, R.; BRAINARD, B.; LAFORCADE, A.M.; FLATLAND, B.; HANEL, R.; MCMICHAEL, M.; WIINBERG, B. Partnership on Rotational Viscoelastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** v.24, n.1, p. 1-22, 2014.

HARRUS S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, v. 204, p. 239-240, 2015.

HARRUS S.; WANER T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 292-296, 2011.

HONECKMAN A. L.; KNAPP, D. W.; REAGAN, W. J. Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian**. v. 18, n.2, p.113-124, 1996.

KOL A.; BORJESSON D.L. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology**. V 39, n. 4, p. 405-416, 2010.

LAGATTI S.A.M; DIB R.E.; LAGATTI E.; BOTAN A.G.; CAMARGO S.E.A; AGARWALL A.; BARETTI P.; PAES A.C. Acute Kidney injury in cats and dogs: A proportional meta-analysis of case series studies. *PloS one*. V. 13, n.1, p. e0190772, 2018.

MARTORELLI, F. N. Caracterização da anemia em cadelas com piometra. 2016. 70 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.**

MEUTEN D. Laboratory evaluation and interpretation of the urinary system. In: THRALL M.A.; WEISER G.; ALLISON R.W.; CAMPBELL T.W.; **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2ª edition. Wiley-Blackwell. Cap.23, p.323-378, 2012.

MILLER S.A., HOHENHAUS A. E., HALE A. S., Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 232-235, 2004.

McALESS T. J. Immune-mediated haemolytic anaemia in 110 dogs in Victoria, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 1-2, p. 25-28, 2010.

McCULLOUGH S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 1295-1315, 2003.

MORAES L. F. Avaliação das complicações hematológicas e renais e do risco tromboembólico de cães com AHIM. 2011. 85 f. **Dissertação (Mestrado em**

**Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.**

MORLEY, P.; MATHES, M.; GUTH, A.; DOW, S. Anti-erythrocyte antibodies and disease associations in anemic and nonanemic dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 886-892, 2008.

NORMAN, G.R.; STREINER, D. L. Biostatistics: the base Essentials. **Mosby Year Book**. 3ª edição St Louis: BC Decker. Cap 8 e 28, p. 72-89 e 316, 2008.

PEREIRA M. P. Anemia Hemolítica Imuno-mediada. In: JERICÓ M. M.; DE ANDRADE NETO J.P.; KOGIKA, M.M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1ª edição, Rio de Janeiro: Roca. Cap 201, p.1832-1841, 2014.

RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J.M.; FLOWER R.J.; HENDERSON G. Farmacologia. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier. Cap 26, p. 318-330, 2011.

REIMER E. M.; TROY G.C.; WARNICK L.D. Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 35, p.384-394, 1999.

ROMÃO F.G.; CAMPOS E. F.; MATTOSO C.R.S.; TAKAHIRA R. K. Hemostatic profile and thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized controlled trial. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 09, p 268-272, 2013.

ROSE L.J.; DUNN M.E.; ALLEGRET V.; BÉDARD C.; Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy beagles dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 426-434, 2011.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C (Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, p. 95-111, 2016.

SILVA, R.D. Avaliação laboratorial do sistema hepatobiliar. In: JERICÓ M. M.; DE ANDRADE NETO J.P.; KOGIKA, M.M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca. Cap 122, p.1030-1035, 2014.

THOMASON J. M; ARCHER T. M; WILLS R.W; MACKIN A.J. Effects of imunossuppressive agents on the hemostatic system in normal dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p. 01-09, 2018.

THRALL M.A. Regenerative Anemia. In: THRALL M.A; WEISER G.; ALLISON R.W.; CAMPBELL T.W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2<sup>a</sup> edition. Wiley-Blackwell. Cap.08, p.87-94, 2012.

WANG A.; SMITH J.R.; CREEVY K.E. Treatment of canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia with mycophenolate mofetil and glucocorticoids: 30 cases (2007 to 2011). **British Small Animal Veterinary Association**, v. 54, n. 8, p. 399-404, 2013.

WHELAN M. F.; O'TOOLE T. E.; CHAN D. L.; ROZANSKI E. A.; DELAFORCADE A. M.; CRAWFORD S. L.; COTTER S. M. Use of human immunoglobulin in addition to glucocorticoids for the initial treatment of dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 2, p 158-164, 2009.

## 9. NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO

O Artigo Científico será enviado para a revista “BMC Veterinary Research”.

### Research article

#### Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [editorial policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

*BMC Veterinary Research* strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature’s [information on recommended repositories](#). Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the [Editorial Policies Page](#).

Authors who need help depositing and curating data may wish to consider uploading their data to [Springer Nature’s Data Support Services](#) or contacting our [Research Data Support Helpdesk](#). Springer Nature’s Data Support Services provide data deposition and curation to help authors follow good practice in sharing and archiving of research data. The services provide secure and private submission of data files, which are curated and managed by the Springer Nature Research Data team for public release, in agreement with the submitting author. These services are provided in partnership with figshare. Checks are carried out as part of a submission screening process to ensure that researchers who should use a specific community-endorsed repository are advised of the best option for sharing and archiving their data. Use of the Data Support Services is optional and does not imply or guarantee that a manuscript will be accepted.

#### Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

#### Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design

- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
  - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

### **Abstract**

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

### **Keywords**

Three to ten keywords representing the main content of the article.

### **Background**

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

### **Results**

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

### **Discussion**

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

### **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

### **Methods**

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

### **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

### **Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### ***Ethics approval and consent to participate***

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.



### ***Consent for publication***

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

### ***Availability of data and materials***

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly

available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].

- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].<sup>[Reference number]</sup>

### ***Competing interests***

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

### ***Funding***

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

### ***Authors' contributions***

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

### ***Acknowledgements***

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

### ***Authors' information***

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other

relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

## Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice

**Web links and URLs:** All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

### Example reference style:

#### *Article within a journal*

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

#### *Article within a journal (no page numbers)*

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 2013;11:63.

#### *Article within a journal by DOI*

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

#### *Article within a journal supplement*

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

*Book chapter, or an article within a book*

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

*OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)*

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

*Complete book, authored*

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

*Online document*

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999.

*Online database*

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

*Supplementary material/private homepage*

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

*University site*

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

*FTP site*

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

*Organization site*

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

*Dataset with persistent identifier*

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

**Figures, tables and additional files**

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

1 10. ARTIGO CIENTÍFICO

2

3 Thrombotic risk by tromboelastometry in dogs with primary immune-  
4 mediated hemolytic anemia and secondary to *Ehrlichia canis*  
5 infection under treatment with mycophenolate mofetil

6

7 Tatiana Geraissate Gorenstein, Fábio Vinicius Ramos Portilho, Natália Paschoal Calobrizi,  
8 Daniele Silvano Gonçalves, Antônio Carlos Paes and Regina Kiomi Takahira

9 Department of Clinical Veterinary, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,  
10 São Paulo State University, Brazil. taty\_gorenstein@hotmail.com;  
11 fv\_portilho@hotmail.com; nrpaschoal@gmail.com; danielesilvano@gmail.com;  
12 paesacmi@fmvz.unesp.br; takahira@fmvz.unesp.br

13

14

15 \*corresponding author: taty\_gorenstein@hotmail.com

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 Abstract

27 Background

28

29 Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most prevalent immune  
30 disorder in dogs. Among the main complications, the state of hypercoagulability,  
31 which predisposes dogs to disseminated intravascular coagulation and  
32 pulmonary thromboembolism, is the most important and a leading cause of death  
33 in more than 80% of cases. Treatment is directed towards immune response  
34 suppression, for which corticosteroids and immunosuppressants are frequently  
35 used. This study aimed to clarify whether the thrombotic risk changes after the  
36 initiation of immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil, through  
37 thromboelastometry, in animals with primary IMHA and secondary to *E. canis*  
38 infection.

39

40 Results

41

42 The animals in this study did not exhibit coagulability state changes during the  
43 treatment. Patients that died showed lower coagulation at the time of diagnosis,  
44 higher erythrocyte count, and less reticulocytosis than surviving patients.

45

46 Conclusion

47



48 No change in the coagulation state of animals treated with mycophenolate mofetil  
49 was observed. The animals that showed lower coagulation at the time of  
50 diagnosis exhibited a worse prognosis, and the reticulocyte count showed a  
51 better prognostic value than the red blood cell count at the time of diagnosis.

52

53 Keywords: IMHA, *E. canis*, thromboelastometry

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

## 70 INTRODUCTION

71 Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most prevalent immune  
72 disorder in dogs. This condition is characterized as a type II hypersensitivity and  
73 leads to the premature destruction of red blood cells [1,2]. Primary IMHA cannot  
74 be associated with an obvious predisposition, besides breed predilection,  
75 because of this it is a diagnostic exclusion. Secondary IMHA is related to several  
76 agents, and among the infectious ones, ehrlichiosis stands out [2,3]. The  
77 treatment is directed towards immune response suppression, for which  
78 glucocorticoids and mycophenolate mofetil are frequently used [3,4]. Among the  
79 main complications, hypercoagulability, which predisposes dogs to disseminated  
80 intravascular coagulation and pulmonary thromboembolism, is the most  
81 important and leading cause of death in more than 80% of cases [5,6]. The  
82 mechanism by which IMHA leads to hypercoagulability and predisposes dogs to  
83 thromboembolism remains elusive. The release of thromboplastin from lysed  
84 erythrocytes, platelet activation, hypoxia, the release of inflammatory mediators,  
85 endothelial injury, and altered blood viscosity are believed to contribute to the  
86 process. The use of corticosteroids has also been suggested as a potential cause  
87 of hypercoagulability [5].

88 Hypercoagulation diagnosis is made through thromboelastometry  
89 (ROTEM®)/thromboelastography (TEG®), which assesses the hemostasis  
90 function of the blood in a complete way, through an *in vitro* technique that

91 diagnoses hypocoagulability and hypercoagulability states, before clinical  
92 manifestations [7,8].

93         Since the main cause of death from IMHA is secondary hemostatic  
94 complications, this work aimed to clarify whether thrombotic risk changes upon  
95 initiation of immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. The goal of  
96 this study was to evaluate the thrombotic risk of canine patients with primary  
97 immuno-mediated hemolytic anemia and secondary to *E. canis* infection before  
98 and after immunosuppressive treatment with mycophenolate mofetil, using  
99 thromboelastometry, and to assess possible prognostic indicators. We  
100 hypothesized that the animals were in a higher coagulation state at the time of  
101 diagnosis, which would reduce after treatment.

102

## 103 MATERIALS AND METHODS

### 104 Animals

105         The project was submitted for evaluation by the Ethics Committee on the  
106 Use of Animals (protocol no. 194/2016), and an informed consent form was  
107 provided to the owners for the blood and urine sampling procedures.

108         Twelve animals with immune-mediated hemolytic anemia symptoms of  
109 both sexes (eight females and four males), aged between 11 months and 14  
110 years (mean four years), were selected from the FMVZ-UNESP Veterinary  
111 Hospital clinic. Among the selected animals, one female was castrated.

112         Animal selection was based on hematological, biochemical, and urine  
113 tests. Dogs with moderate to severe anemia (hematocrit  $\leq$  25%), with symptoms  
114 of immune-mediated hemolysis, such as spherocytosis, positive saline  
115 agglutination, bilirubinuria and/or hemoglobinuria, were included. Various dogs

116 that exhibited other non-hemolytic anemia comorbidities were excluded. The  
117 latter included dermatitis, chronic kidney disease, cardiac and pulmonary  
118 diseases, endocrine diseases, joint diseases, and neoplasia of any origin, which  
119 were evaluated through detailed anamnesis, physical examination, serum  
120 biochemical evaluation (creatinine, urea, alanine aminotransferase, alkaline  
121 phosphatase, gamma glutamyl transferase, total protein and albumin), and  
122 ultrasound. In addition, animals that were positive for babesia on polymerase  
123 chain reaction (PCR) and leptospirosis serology-reactive were also excluded.

124         Blood and urine samples were collected at two different moments. The first  
125 sample (M1) was collected at the time of diagnosis, with hematocrit less than or  
126 equal to 25%, and the second (M2), after treatment with mycophenolate mofetil,  
127 when the hematocrit was greater than or equal to 30%. M0 was considered the  
128 time of hospital admission. The animals met the inclusion criteria at M1, when the  
129 tests results were compiled, the diagnosis was established, and an inadequate  
130 response to the following therapeutic protocol was verified: omeprazole 1 mg/kg,  
131 every 24 hours; doxycycline 15 mg/kg, every 24 hours and prednisolone 2 mg/kg,  
132 every 12 hours; for three to five days. The protocol performed at M1 was  
133 maintained at M2, and mycophenolate mofetil 10 mg/kg was added every 12  
134 hours for seven to 22 days (mean of 17 days), until the hematocrit reached a  
135 value greater than or equal to 30%. For the animals that died, the samples were  
136 collected only at time M1, because although they started the treatment, they did  
137 not survive until M2.

138

139 Sample Collection

140 Blood samples were collected from the jugular vein; 2.0 mL of blood was  
141 collected, with 7.2% EDTA K3 as anticoagulant, and used for blood count,  
142 reticulocyte count, saline agglutination test, and PCR of *Ehrlichia* sp., *E canis*,  
143 and *Babesia canis*. Three milliliters of blood was collected without anticoagulant  
144 for *Leptospira* spp. serology prior to treatment. The sample without anticoagulant  
145 was centrifuged at 3,000 rpm to obtain serum.

146 For thromboelastometry, prothrombin time (PT), and activated partial  
147 thromboplastin time (aPTT), two tubes of 1.8 mL of blood were collected, with  
148 3.2% sodium citrate. After 15 minutes of collection, a thromboelastometric  
149 analysis of one of the tubes was performed. The second tube was centrifuged,  
150 and the plasma was frozen and stored at -80 °C until PT and aPTT were dosed.

151 A total volume of 10 mL of urine was collected via catheterization or  
152 cystocentesis. Urinalysis was performed immediately after collection.

153

#### 154 Laboratory tests

155 Hemogram, reticulocyte count, and saline agglutination

156 Blood counts were performed at the Veterinary Clinical Laboratory of  
157 UNESP – Botucatu, in a hematological counter (Poch 100iV Diff - Roche ®). The  
158 differential leukocyte count was determined for 100 cells, along with erythrocyte,  
159 leukocyte, and platelet morphology evaluations from blood smears that were  
160 stained with fast panoptic (Laborclin®).

161 For the reticulocyte count determination, a manual technique was used  
162 based on blood smears that were stained with New Methylene Blue and  
163 incubated in a water bath at 37°C for 15 minutes. Fifty microliters of saline solution  
164 at room temperature and 10 µL of whole blood were used for the saline

165 agglutination test. The slide was placed in a humid chamber for 15 minutes,  
166 following microscopic reading.

#### 167 Urinalysis

168 Urinalysis was performed at the Veterinary Clinical Laboratory of UNESP  
169 of Botucatu and consisted of physical, chemical (Combur-Test® - Roche), and  
170 sediment microscopy in an optical microscope (40x).

#### 171 Diagnostic tests for infectious diseases

##### 172 Polymerase chain reaction (PCR)

173 The PCRs for *Ehrlichia* sp. and *Babesia canis* were sent to the Molecular  
174 Veterinary Diagnostic Laboratory of UNESP of Botucatu. Animals that were  
175 positive for *Ehrlichia* sp. were tested for *E. canis*.

176

##### 177 Leptospirosis Serology

178 Leptospirosis serology was carried out at the zoonoses diagnostic  
179 laboratory of the FMVZ UNESP of Botucatu, through the microscopic serum  
180 agglutination method with the following serovars: *L. australis*; *L. bratislava*; *L.*  
181 *autumnalis*; *L. canicola*; *L. cynopteri*; *L. djasiman*; *L. grippotyphosa*; *L.*  
182 *copenhagen*; *L. icterohaemorrhagiae*; *L. pomona*; *L. pyrogenes*; *L. hardjo*; *L.*  
183 *canicola botucatu*.

184

185 Hemostatic evaluation exams

186 Thromboelastometry

187           Thromboelastometry was performed on the ROTEM® (Delta, Pentapham,  
188 Munich, Germany) apparatus, which was maintained at 37°C. Two channels were  
189 used simultaneously: 300 µL of recalcified citrated whole blood and 20 µL of 0.2  
190 M calcium chloride (startem®) were added to each, and the clotting activation  
191 was performed in each channel separately, with the addition of the intem®  
192 reagents (20 µL, 26 partial thromboplastin phospholipids, Pentapham, Munich,  
193 Germany) for the intrinsic pathway evaluations and extem® reagents (20 µL, 26  
194 tissue thromboplastin phospholipids, Pentapham, Munich, Germany) for extrinsic  
195 pathway evaluations.

196           The reference interval was established by the FMVZ hemostasis  
197 laboratory, through a robust method that involved 20 healthy animals and the  
198 following parameters: median, maximum, and minimum values, with a confidence  
199 interval of 90% [9].

200

201 Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin (aPTT)

202           PT and aPTT were performed in a coagulometer (ClotTimer® Laser  
203 Sensor, Sorocaba, Brazil) in triplicate, using the specific kits (Clot®, Sorocaba,  
204 Brazil) for each test.

205

206 Image exams

207 Abdominal ultrasound evaluation

208           Ultrasound examination was performed using the Esaot Mylab 70 Vet ®  
209 imaging unit from the FMVZ-Unesp imaging service.

210

211 Statistical analysis

212           Samples were dimensioned based on a comparison of the two evaluation  
213 moments, considering the model of repeated measures in the same animal. A  
214 minimum of seven animals were used to achieve a 5% significance value for  
215 comparisons and an 80% power for the statistical tests.

216           The response variable did not adhere to a normal distribution by the  
217 Shapiro-Wilk test. Therefore, the median, first quartile, and third quartile of each  
218 variable were considered. The Willcox nonparametric test was used to compare  
219 the two moments of the surviving group, and the nonparametric Mann-Whitney  
220 test was used to compare the moment 1 of the surviving group with the death  
221 group [10]. Analyses were performed by Graph Pad Prism 6 ® software, and the  
222 results were discussed at the 5% significance level.

223

224 RESULTS

225           Twelve animals were selected (Figure 2), of which, five died before the  
226 end of the study. The latter were all females, with a mean age of 3 years (11  
227 months to 7 years). Two of these animals were of mixed breed, one was a boxer,  
228 one a miniature pinscher, and one a Brazilian terrier. Two females were  
229 diagnosed with primary IMHA and three with IMHA secondary to ehrlichiosis. The  
230 average survival was seven days (2-14 days) after the beginning of the treatment.



231           Among the seven survivors, four were males and three were females, with  
232 a mean age of 5 years (8 months to 13 years), six were mixed breed, and one  
233 was a poodle. Of these, five presented IMHA secondary to ehrlichiosis and two  
234 exhibited primary IMHA.

235           Within the evaluated animals, four were negative for *Ehrlichia* sp. and eight  
236 were positive for *E. canis*. One animal was excluded from the study because it  
237 was positive for *E. sp.* and negative for *E. canis*.

238           The most frequent manifestations were: ixodidiosis 66.6%, vomiting  
239 58.3%, pale mucosas 58.3%, hyperthermia 58.3% jaundice 41.6%, lymph node  
240 enlargement 41.6%, dehydration 33.3%, and diarrhea 33.3%.

241           Four animals (4/12) received a red blood cell transfusion at the beginning  
242 of treatment, after moment 1 (M1). Three of these animals died before moment 2  
243 (M2).

244           The hematologic evaluations, reticulocyte counts, and clotting times of the  
245 surviving animals and of those that died are shown in Table 1. The  
246 thromboelastometric evaluation is displayed in Table 2.

247           In the urinalysis, eight (8/12) animals showed moderate to severe  
248 bilirubinuria, and eleven (11/12) exhibited occult blood and the presence of red  
249 blood cells in the urine.

250           Six patients were evaluated by abdominal ultrasonography, three died  
251 before the test, and three did not return on the day scheduled for evaluation.  
252 Among the patients examined, three were diagnosed with IMHA and three with  
253 *E. canis*. All animals presented splenomegaly and alteration in echogenicity of  
254 hepatic parenchyma, and one animal showed hepatomegaly. No patient  
255 exhibited changes that are relevant to neoplasia in any of the abdominal organs.

256

## 257 DISCUSSION

258 Four dogs, three females and one male, were diagnosed with primary  
259 IMHA (33%). This result is consistent with the higher prevalence in females [11].  
260 The mean age of the affected dogs was 4.4 years.

261 Eight dogs were diagnosed with IMHA secondary to ehrlichiosis (67%).  
262 The large number of dogs with IMHA secondary to ehrlichiosis is probably due to  
263 the fact that this study was performed in Brazil, a tropical country. In addition, the  
264 municipality of Botucatu is endemic for hemoparasites. This result is at odds with  
265 studies from other countries, where primary IMHA is more common than  
266 secondary IMHA [1,3,6]. Among the animals diagnosed with primary IMHA, 75%  
267 (3/4) died. Among those with secondary IMHA, 37.5% (3/8) deaths were  
268 observed. Thus, in this study, animals with IMHA secondary to hemoparasites  
269 presented a better prognosis than animals with primary IMHA.

270 In contrast to the expected results, red blood cell counts were higher in the  
271 death animals comparing with the surviving animals at the first moment,  
272 demonstrated by a significant statistical difference ( $p < 0.05$ ), which shows the  
273 animals that survived were not those with the highest red blood cell counts.  
274 However, when comparing reticulocyte counts between the same groups,  
275 although there was no statistical significance, a higher median was observed in  
276 the group of survivors in M1, suggesting that reticulocytosis is more important  
277 than the intensity of anemia at diagnosis, relative to prognosis.

278 The thromboelastometry plot shows that the state of hypercoagulability  
279 associated with a decreased clotting time (CT) and clot formation time (CFT) and  
280 an increased angle  $\alpha$  and maximum clot firmness (MCF), while the state of

281 hypocoagulability was characterized by the opposite findings, i.e., prolongation  
282 of CT and CFT and decreased angle  $\alpha$  and MCF [12]. In the intrinsic and extrinsic  
283 pathways of the survivors at M1 and M2, there was a decrease of CFT and an  
284 increase of  $\alpha$  angle and MCF, which are characteristic of hypercoagulability.

285         When comparing the angle  $\alpha$ , in the intrinsic pathway, of patients that  
286 survived at M1 with the death group, a significant difference was observed, which  
287 shows that the patients that died had lower coagulability at the time of diagnosis.  
288 In addition, although not significant ( $p>0.05$ ), a higher median CT and a lower  
289 median maximum clot firmness (MCF) were observed in the death group, which  
290 reinforces our finding that the animals that exhibited lower clotting at moment 1  
291 (M1) had worse prognoses. The same was observed by GOGGS and  
292 collaborators (2012) [13], who concluded that hypocoagulability at the time of the  
293 hospitalization of dogs with IMHA was a negative factor. This supports the  
294 hypothesis that consumption coagulopathy is responsible for the unfavorable  
295 prognosis.

296         Plasma clotting tests PT and aPTT, which correlate with the extrinsic and  
297 intrinsic pathways, respectively, did not show significant differences. However,  
298 the higher aPTT values in the death group compared to those of the M1 survivors  
299 are consistent with the Rotem results, which indicate hypocoagulation.

300         When comparing the M1 and M2 moments of the surviving patients in the  
301 intrinsic and extrinsic pathways of PT and aPTT, and thromboelastometry, no  
302 significant differences were observed. This lack of significance can be explained  
303 by the small sample size, since in a similar study by Goggs et al. (2012) [13], in  
304 which 30 dogs with IMHA were evaluated through thromboelastograms (TEGs),  
305 an increase in hypercoagulability was observed throughout the treatment.

306 However, the therapeutic protocol of Goggs et al. was not standardized, as  
307 proposed in this study, and the therapies were individualized for each patient  
308 using the following drugs: prednisolone or dexamethasone associated with  
309 cyclosporine, azathioprine, or mycophenolate mofetil. Furthermore, the authors  
310 evaluated the animals three times between admission and the fifth day of  
311 treatment, rather than after hematocrit increase when occur the reduction of  
312 thromboplastin release from lysed erythrocytes, of platelet activation, of hypoxia,  
313 of release of inflammatory mediators and of endothelial lesion the main factors  
314 involved in the hypercoagulability state, as in the present study.

315         Moreover, the use of corticosteroids may also alter the thrombotic state of  
316 healthy patients. In a study conducted by Rose et al. (2011) [14] who evaluated  
317 the thrombotic risk in six healthy beagles that received oral administration of  
318 prednisone at doses of 1 mg/kg and 4 mg/kg, once a day for two weeks, evidence  
319 of hypercoagulability was observed by thromboelastogram, independent of the  
320 dose.

321         The animals in this study maintained their hypercoagulability state after the  
322 treatment, evidenced by the absence of a statistical difference between the M1  
323 and M2 measurements. However, the small sample size and prolonged use of  
324 corticosteroids, which leads to hypercoagulation, may interfere with these results.  
325 Therefore, further studies that follow standardized treatments with larger sample  
326 size are needed to clarify whether hypercoagulability changes throughout the  
327 treatment.

328

329

## 330 CONCLUSIONS

331 Under the conditions of this study, it is possible to conclude that there was  
332 no decrease in the thrombotic risk among animals treated with mycophenolate  
333 mofetil. The animals that exhibited lower coagulability at the time of diagnosis  
334 showed worse prognosis. Furthermore, reticulocyte count has a better prognostic  
335 value than red blood cell count at the time of diagnosis.

336

## 337 LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

338 % - percent

339 °C – degrees Celsius

340 ALB – albumin

341 ALT – alanine aminotransferase

342 AP – alkaline phosphatase

343 aPTT – activated partial thromboplastin time

344 CFT – clot formation time

345 CT– Clotting time

346 DIC – disseminated intravascular coagulation

347 *E. canis* – *Ehrlichia canis*

348 EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

349 EXTEM® – Tissue factor activator

350 g/dL – grams per deciliter

351 GGT – gamma glutamyl transferase

352 Hct – hematocrit

353 IMHA – Immune-mediated hemolytic anemia

354 INTEM® – Contact Activator

355 M – moment

356 MB – mixed breed

357 MCF – maximum clot firmness  
358 mg/dL – milligrams per deciliter  
359 mL – milliliters  
360 mm – millimeters  
361 PT – prothrombin time  
362 q – quartile  
363 s – seconds  
364 surv.- survivors  
365 TEG – thromboelastography  
366 TEM – thromboelastometry  
367 U/L – international unit per liter  
368  $\mu$ L – microliters

369

## 370 CONFLICT OF INTEREST

371 The authors state that there is no conflict of interest.

## 372 AUTHORS' CONTRIBUTIONS

373 TGG and RKT designed the study. TGG, FVRP, NPC, and ACP performed  
374 the animal care and sampling. DSG carried out the sampling of healthy animals  
375 for the reference values. TGG and RKT performed the laboratory analyses,  
376 analysis of the results, literature review, and article preparation. All authors have  
377 read and approved the final version of this article.

378

## 379 ACKNOWLEDGEMENTS

380 We thank the Research Support Foundation of the State of São Paulo  
381 (FAPESP, process 2016/23403-1) for financial support in the form of a  
382 scholarship and research assistance.

383

384

385 REFERENCES:

386

387 1. McAless T. J. Immune-mediated haemolytic anaemia in 110 dogs in Victoria,  
388 Australia. *Australian Vet J.* 2010; 88(1-2):25-8.

389 doi: 10.1111/j.1751-0813.2009.00537.x

390 2. Balch A, Mackin A. Canine immune-mediated hemolytic anemia:  
391 pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Cont Educ Vet.*  
392 2007; 29 (4):217-55.

393 3. Giger U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In:  
394 Ettinger SJ, Feldman EC, eds *Textbook of Veterinary Internal Medicine.*  
395 Philadelphia: WB Saunders Co.; 2005. p. 1886-907.

396 4. Wang A, Smith JR, Creevy KE. Treatment of canine idiopathic imune-  
397 mediated haemolytic anaemia with mycophenolate mofetil and  
398 glucocorticoids: 30 cases (2007 to 2011). *Br S A Vet Assoc.* 2013; 54  
399 (8):399-404. doi: 10.1111/jsap.12107

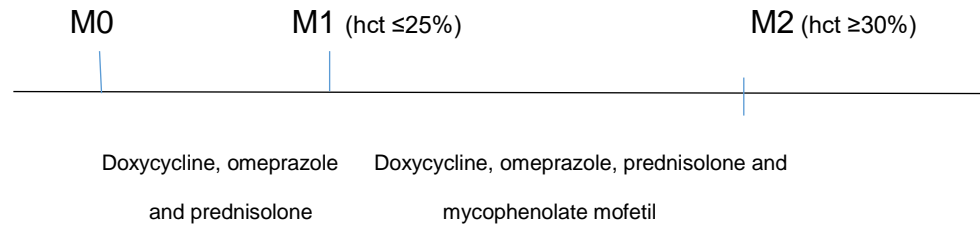
400 5. Fenty RK, Delaforcade AM, Shaw SP, O'Toole TE. Identification of  
401 hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia  
402 by means of tromboelastography. *Am Vet Medical Assoc.* 2011;238 (4):463-

403 7

- 404 6. Carr AP, Panciera DL, Kidd L. Prognostic factors for mortality and  
405 thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a  
406 retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med.* 2002;16:504-9.
- 407 7. Kol A, Borjesson DL. Application of thrombelastography/thromboelastometry  
408 to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol.* 2010;39(4) 405-16.  
409 doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00263.x
- 410 8. Sinnott VB, Otto CM. Use of tromboelastography in dogs with immune-  
411 mediated hemolytic anemia: 39 cases (2000^2008). *J Vet Emerg Crit Care.*  
412 2009;19(5):484-488.  
413 doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00455.x
- 414 9. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B. ASVCP reference  
415 interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary  
416 species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012;41:441-53.doi:  
417 10.1111/vcp.12006
- 418 10. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistic: the base essentials.* Mosby Year  
419 Book. Sto Louis: BC Decker, 2008, 8: 72-89 .
- 420 11. Miller SA, Hohenhaus AE, Hale AS. Case-control study of blood type, breed,  
421 sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Am*  
422 *Vet Med Assoc.* 2004; 224(2):232-5.
- 423 12. Goggs R, Brainard B, Laforcade AM, Flatland B, Hanel R, McMichel M,  
424 Wiinberg B. Partnership on Rotational Viscoelastic Test Standardization  
425 (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in  
426 veterinary medicine. *J Vet Emerg Crit Care.* 2014; 24(1):1-22.  
427 doi: 10.1111/vec.12144



- 428 13. Googs R, Wiinberg B, Kjelgaard-Hansen M, Chand DL. Serial assessment  
429 of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia  
430 using tromboelastography. *Vet J.* 2012; 191:347-53.
- 431 14. Rose LJ, Dunn ME, Allergret V, Bédard C. Effect of prednisone  
432 administration on coagulation variables in healthy beagles dogs. *Vet Clin*  
433 *Pathol.* 2011;40 (4):426-34. doi:10.1111/j.1939-165X.2011.00364.x
- 434



*Figure 1: Scheme of the moments and treatments with respect to time.*

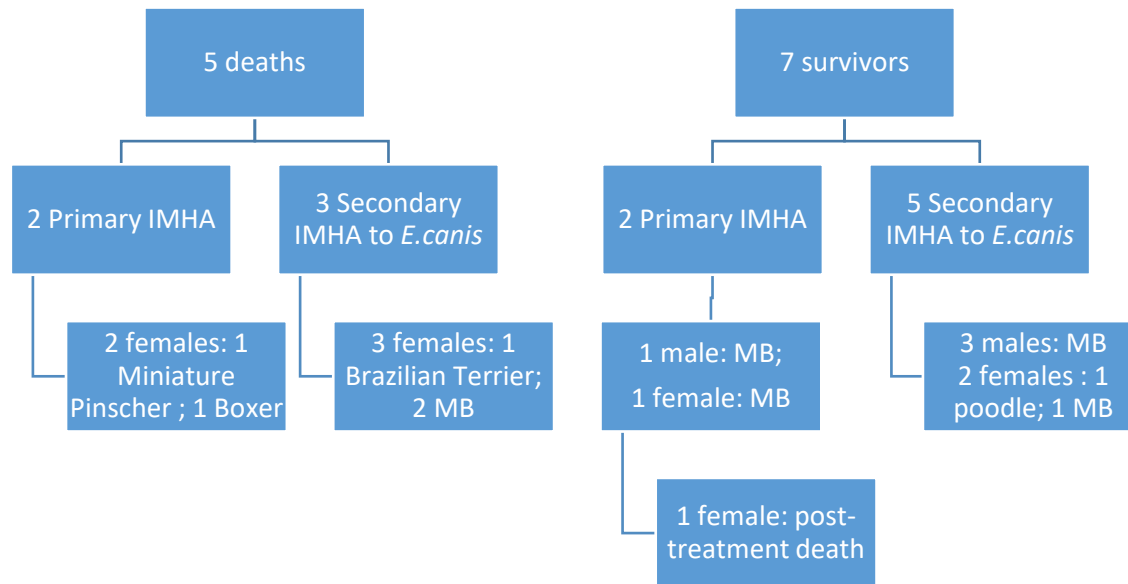


Figure 2: Distribution of animals that died and survived, according to disease, sex, and race.

Table 1 – Summary measures of hemogram, absolute reticulocyte count, PT and aPTT and reference interval

	Survivors M1	Survivors M2	Death	Reference
	Median (1q - 3q)	Median (1q - 3q)	Median (1q - 3q)	
Blood Cells (x10 <sup>6</sup> /μL)	1,780 (1,300 – 2,200) *	4,200 (3,610 – 5,400)	2,780 (1,890 – 3,755)*	5,5 – 8,50
Hemoglobin (g/dL)	5,100 (3,800 – 6,100)	10,800 (9,700 – 12,200)	6,400 (4,650 – 7,700)	12,0 – 18,0
Hematocrit (%)	17 (15 - 19)	33 (32 - 35)	20 (15 - 23)	37,0 – 55,0
Platelets (/μL)	27,775 (10,000 – 228,000)	374,000 (290,000 – 59,800)	65,650 (15,000 – 193,500)	160,000 – 430,000
Leukocytes (/μL)	40,600 (11,500 – 67,600)	13,100 (6,300 – 24,400)	17,900 (6,500 – 44,245 )	6,000 – 17,000
Reticulocytes (/μL)	185,320 (56,710 – 194,000)	84,400 (3,620 – 127,000)	41,000 (7,450 – 236,835)	Regeneration
PT (s)	8.3 (6.9 – 9.0)	7.9 (7.4 – 8.5)	7.1 (6.9 – 7.4)	6.4 to 7.4
aPTT (s)	12.5 (11.6 – 13.5)	13.6 (12.2 – 14.6)	29.9 (11.7 – 53.0)	9 to 11

1q= first quartile; 3q= third quartile; PT= prothrombin time; aPTT= activated thromboplastin; M1= moment 1; M2 = moment 2

\* Variable that showed statistical difference (p<0.05) when the group surviving M1 was compared with those that died; other variables did not exhibit significant statistical differences.

Table 2 - Median, first quartile, and third quartile of CT, CFT,  $\alpha$  angle and MCF

Parameter	INTEM®				EXTEM®			
	Surv. M1	Surv. M2	Death	Reference	Surv. M1	Surv.M2	Death	Reference
CT	94 (66-129)	102 (70-119)	219 (85-466)	141 (119; 158)	18 (14-24)	13 (9-24)	13 (11-42)	58 (42; 99)
CFT	38 (34-105)	56 (29-68)	39 (0-137)	91 (81; 114)	35 (19-103)	60 (39-67)	14 (6-623)	99 (75; 121)
$\alpha$ angle	82 (81-84)*	79 (76-84)	74 (32-80)*	73 (69; 75)	83 (82-87)	78 (78-83)	83 (75-87)	72 (68;76)
MCF	67 (58-76)	69 (68-77)	42 (15-72)	59 (56; 62)	68 (53-77)	74 (73-79)	54 (19-77)	62 (58; 64)

INTEM® = Contact Activator; EXTEM® = Tissue Factor Activator; CT (s) = Clotting time; CFT (s) = Clot formation time;  $\alpha$  (°) =  $\alpha$  angle; MCF (mm) =

Maximum clot firmness; M1= moment 1; M2 = moment 2; Surv.= survivor

\* Variable that showed statistical difference ( $p < 0.05$ ) when the group surviving M1 was compared with those that died, in the intrinsic pathway; other variables did not exhibit significant statistical differences.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Atestado de aprovação do Comitê de ética no uso de animais



## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada primária sob tratamento com micofenolato de mofetila." **Protocolo CEUA 0194/2016**, a ser conduzido por Tatiana Geraissate Gorenstein, responsável/orientador Regina Kiomi Takahira, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	09/01/2017 a 09/01/2018
<b>Nome Comum/ Espécie / Linhagem</b>	CANINA/ CANIS LUPUS FAMILIARIS / Não se aplica
<b>Raça</b>	Não se aplica
<b>Nº de animais machos</b>	0
<b>Nº de animais fêmeas</b>	0
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	7
<b>Peso médio de animais machos</b>	0
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	0
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Idade</b>	0 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	Proprietários , São Paulo

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 08/12/2016**

**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

## Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos tutores dos animais participantes do Projeto



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Campus de Botucatu

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado "Risco trombótico em cães com anemia hemolítica imunomediada secundária a *Ehrlichia canis* sob tratamento com imunossupressor", de responsabilidade de Tatiana Geraissate Gorenstein.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica: será realizado a colheita de 10ml de sangue, por meio da veia jugular, para análise da cascata de coagulação por meio do tromboelastograma. Serão necessárias duas coletas em momentos diferente: no início do tratamento com imunossupressor e após, quando a contagem de hematócrito atingir 30 %.

Nome do animal ou Número de animais de produção: \_\_\_\_\_

NOME DO

RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_