

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GERAÇÃO DE TROMBINA EM CÃES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA PROTEINÚRICA

DANIELE SILVANO GONÇALVES

BOTUCATU – SP

Maio - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GERAÇÃO DE TROMBINA EM CÃES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA PROTEINÚRICA

DANIELE SILVANO GONÇALVES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
DOUTORADO.

Orientador: Regina K. Takahira

Co-orientadores: Priscylla T. C. G.
Okamoto e Marcos Jun Watanabe

BOTUCATU – SP

Maio - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gonçalves, Daniele Silvano.

Geração de trombina em cães com doença renal crônica
proteinúrica / Daniele Silvano Gonçalves. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Coorientador: Priscylla Tatiana Chalfun

Guimarães-Okamoto

Coorientador: Marcos Jun Watanabe

Capes: 50503030

1. Trombofilia. 2. Proteinúria. 3. Trombose. 4.
Coagulação sanguínea. 5. Cães - Doenças.

Palavras-chave: Coagulação; Hipercoagulabilidade;
Proteinúria; Trombose.

Nome do Autor: Daniele Silvano Gonçalves

**Título: Geração de trombina em cães com doença renal crônica
proteínúrica**

Comissão examinadora

Profª. Drª. Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Profª Drª. Marília Martins Melo

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias

Escola de Veterinária / UFMG

Profª. Drª. Fabíola de Oliveira Paes Leme

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias

Escola de Veterinária / UFMG

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Luiz H. de A. Machado

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Data da defesa:

17 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão ... **A vida**, por tantas emoções, desafios e realizações que me fazem hoje, melhor que ontem.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** juntamente ao programa de pós-graduação desta faculdade, por me aceitarem no quadro discente e permitirem a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

À **Prof^a Marília Martins Melo** da Escola de Veterinária da UFMG. Por prontamente ajudar a promover a minha ligação com a **Prof^a Maria das Graças Carvalho e a pós-doutorando Rita Carolina Figueiredo Duarte**, da Faculdade de Farmácia da UFMG. Estas, minha gratidão por abrirem as portas e possibilitarem a execução deste trabalho.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira**, pela paciência e disponibilidade apesar da nossa distância.

Aos co-orientadores, **Marcos Jun Watanabe e a Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto**, desde o início em 2016... pelas horas de conversa com palavras de carinho e apoio indispensáveis para a realização de mais um sonho.

Aos colegas de pós-graduação, **Bruna, Tati, Pedrita, Victor e Priscila** pelo apoio concedido durante estes anos.

Aos meus apoios, **Gustavo Sanches, Claudi Gonçalves, Juçara Maria Silvano Gonçalves e Fernando Silvano Gonçalves**. Pela presença, na maioria das vezes virtual, mas nunca me deixaram desistir, nem mesmo nos momentos mais adversos.

À diretoria do **TECSA LABORATÓRIOS, Luiz Eduardo Ristow, Otávio Valério e Afonso Perez**. O trabalho engrandece o homem, e estar nesta equipe me tornou uma pessoa melhor. Minha gratidão pelo aprendizado e pela colaboração durante a realização do doutorado.

Às amigas-irmãs, **Núbia Rafaela Regne e Erika Mello**, pelo apoio em todos os momentos dessa caminhada.

Ao colega M.V. Marthin Raboch Lempek, pelo apoio e a ponte entre mim e a UFMG.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AT - Antitrombina

CAT - *Calibrated Automated Thrombogram*®

CT – Clotting time

DRC – Doença Renal Crônica

ETP - Endogenous Thrombin Potential (Potencial de Trombina Endógeno)

IRIS - International Renal Interest Society

MCF – Firmeza máxima do coágulo

MP(s) – Micropartícula(s)

PAS - pressão arterial sistólica

PC – Proteína C

PDFs – Produtos de degradação da fibrina

PLP – Plasma livre de plaquetas

PS – Proteína S

RPC - Razão proteína/creatinina urinária

TA2 – Tromboxano A2

TEM - Tromboelastometria

TF – Fator tecidual

TGT – Teste de geração de trombina

TP – Tempo de protrombina

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada

vWF – Fator de von Willebrand

LISTA DE TABELAS

	Página
TRABALHO CIENTÍFICO 1	
Table 1. Cell blood count of healthy and proteinuric CKD dogs.....	18
Table 2. Serum biochemistry and UPC of healthy and proteinuric CKD dogs...	19
Table 3. Coagulation assays of healthy and proteinuric CKD dogs.....	19
TRABALHO CIENTÍFICO 2	
Tabela 1. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o tempo da doença.....	34
Tabela 2. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o peso.....	34
Tabela 3. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o tempo da doença.....	35
Tabela 4. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o peso.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Parâmetros da curva de Geração de Trombina utilizando o método Trombograma Automatizado Calibrado (CAT - <i>Calibrated Automated Thrombogram</i> ®) – Duarte et al., 2017.....	12
 TABALHO CIENTÍFICO 2	
Figura 1. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães saudáveis e com DRC graus III e IV proteinúrica.....	32
Figura 2. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o sexo.....	32
Figura 3. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme grau de proteinúria.....	33
Figura 4. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme grau de anemia.....	33
Figura 5. Parâmetros da Tromboelastometria de cães saudáveis e com DRC graus III e IV proteinúrica.....	34
Figura 6. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o sexo.....	35
Figura 7. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o grau de proteinúria.....	35
Figura 8. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o grau de anemia.....	35

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Doença Renal Crônica (DRC)	3
2.2. Alterações Hemostáticas e DRC	5
2.3. Geração de Trombina	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivos específicos	13
4. HIPÓTESE	13
CAPÍTULO 2	14
5. TRABALHO CIENTÍFICO 1.....	14
CAPÍTULO 3	25
6. TRABALHO CIENTÍFICO 2.....	25
7. DISCUSSÃO GERAL	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
9. CONCLUSÕES	45
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	54
Anexo 1 – Atestado do Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	54

RESUMO

Daniele Silvano Gonçalves - **Geração de trombina em cães com doença renal crônica proteinúrica**. Botucatu, 2019, 65p, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP.

Cães com doença renal crônica (DRC) apresentam risco de eventos tromboembólicos, porém o mecanismo que leva à hipercoagulabilidade e ao risco na população de cães é desconhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar as possíveis tendências trombóticas e sua correlação com o estadiamento da DRC em cães. Trata-se de um estudo observacional transversal de casos-controle de cães atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, com sinais clínicos compatíveis com DRC. Os animais incluídos neste estudo foram cães de tutores voluntários, com diagnóstico de DRC proteinúrica (n=19) e animais saudáveis (n=20). Foram avaliados hemograma, perfil bioquímico renal, hepático, lipídico e proteínas, urinálise e razão proteína/creatinina urinária, fibrinogênio, TP, TTPa, tromboelastometria (TEM) e o teste de geração de trombina (TGT). Não houve diferença na geração de trombina entre os grupos, refutando a hipótese de que a geração de trombina contribui para o estado de hipercoagulabilidade em cães com DRC e proteinúria. O fibrinogênio aumentado é o principal achado encontrado em cães com DRC, corroborando com os achados de hipercoagulabilidade na TEM. Estudos adicionais são necessários para explorar uma possível contribuição da trombogenicidade para as manifestações clínicas da DRC.

Palavras-chave: Hipercoagulabilidade, proteinúria, trombose, coagulação.

ABSTRACT

Daniele Silvano Gonçalves - **Thrombin generation in dogs with proteinuric chronic kidney disease**. Botucatu, 2019, 65p, School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University – UNESP.

Dogs with chronic kidney disease (CKD) are at risk thromboembolic events, but the mechanism leading to hypercoagulability and the population of dogs at risk are unknown. The aim of this study is to evaluate the possible thrombotic tendencies and their correlation with the staging of CKD in dogs. This is a observational cross-section study of client-owned dogs presented to Small Animal Clinical Service at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University, with clinical signs compatible with proteinuric CKD. The animals included this study were client-owned dogs with a diagnosis of proteinuric CKD (n=19) and healthy case-matched controls (n=20). Complete blood counts, renal, hepatic, lipidic and proteins serum biochemistry profile, urinalysis and urinary ratio protein/creatinine, fibrinogen, PT, aPTT, and thrombin generation test were evaluated. There was no difference in generation of thrombin between groups, refuting the hypothesis that thrombin generation is required for the state of hypercoagulability in dogs with CKD and proteinuria. Increased fibrinogen is the main finding found in dogs with CKD, corroborating with the findings of hypercoagulability in thromboelastometry. Studies are mandatory for the evaluation of thrombogenicity for clinical manifestations of DRC.

Key words: Hypercoagulability; Proteinuria; Thrombosis; Coagulation.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida como a presença de anormalidades estruturais ou funcionais de um ou ambos os rins. É considerada a doença renal mais comum em cães, mas as estimativas de prevalência variam amplamente. Embora a DRC seja um distúrbio progressivo, o diagnóstico e tratamento precoces podem modificar a taxa de progressão e melhorar a qualidade e a sobrevida do paciente (O'NEILL et al., 2013).

Distúrbios de hemostasia são complicações comuns na DRC que podem predispor tanto à trombose quanto à hemorragia. O processo complexo de coagulação pode refletir de maneiras diferentes nas manifestações clínicas da DRC (EBERST; BERKOWITZ, 1994). Em humanos, a DRC e suas complicações hemostáticas têm sido bastante estudadas (WATTANAKIT; CUSHMAN, 2009; PAVORD; MYERS, 2011; TRAPPENBURG et al., 2012). Porém, muitas informações ainda são conflitantes quanto a ocorrência de hiper ou hipocoagulabilidade sanguíneas, e os trabalhos em cães com DRC ainda são escassos (PRIHIRUNKIT et al., 2010; DONAHUE et al., 2011; FALCO et al., 2013), de forma que sua relevância clínica ainda não está bem esclarecida.

O risco de trombose em pacientes com DRC tem como referência a tríade de Virchow com os pilares que envolvem seu processo: a estase sanguínea, hipercoagulabilidade sanguínea e lesão endotelial (WATTANAKIT; CUSHMAN, 2009). Outro fator a ser considerado é a proteinúria e conseqüentemente a perda de anticoagulantes naturais, como a antitrombina (PRIHIRUNKIT et al., 2010). O risco hemorrágico é multifatorial, mas a persistência do quadro urêmico e suas conseqüências hemostáticas têm sido investigadas (SOHAL et al., 2006).

Métodos tradicionalmente utilizados têm sensibilidade satisfatória para hipocoagulabilidade moderada e grave, mas não para estados de hipercoagulabilidade ou hipocoagulabilidade leve. Tais métodos fornecem apenas informações sobre o início do processo de coagulação, portanto, o resultado do teste não é representativo de todo o processo de formação do

coágulo, como mensurado quando utilizado o Teste de Geração de Trombina (TGT) (WOLBERG, 2007; LECUT et al., 2015).

O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), avaliam o processo inicial da coagulação, quando apenas 5% da trombina total está formada (WOLBERG, 2007; LECUT et al., 2015). Portanto, TP e TTPa refletem apenas o início do processo de coagulação, enquanto que a formação de trombina e da fibrina continua ocorrendo (LIPETS; ATALLAKHANOV, 2015; LECUT et al., 2015). Uma quantidade maior de trombina é gerada durante as fases de amplificação e propagação do sistema hemostático, resultando em aumento exponencial da trombina, que é inativada por anticoagulantes fisiológicos, tais como alfa-2-macroglobulina, antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS) (BERNTORP e SALVAGNO, 2008; LECUT et al., 2015). Portanto, as fases de amplificação e de propagação não são avaliadas em testes convencionais.

Os estudos realizados em cães com avaliação do Teste de Geração de Trombina abordaram o hiperadrenocorticismo (ROSE et al., 2013), hemofilia (MADSEN et al., 2017), terapia com heparina (ALLEGRET et al., 2011, GARABOIVIN et al., 2017), corticoterapia (ROSE et al., 2011) e neoplasias (GRUBER et al., 2016). Não há relatos do TGT na avaliação de cães com doença renal crônica (DRC).

O método Trombograma Automatizado Calibrado - *Calibrated Automated Thrombogram*® (CAT), referência para avaliar o potencial endógeno de geração de trombina, não foi descrito em cães com DRC. O objetivo deste trabalho foi mensurar os níveis plasmáticos de trombina de cães com DRC proteinúrica e comparar aos de cães saudáveis. Pretende-se com este trabalho, contribuir para a melhoria no entendimento da fisiopatologia e prognóstico das alterações hemostáticas na DRC.

Sabendo-se da importância do Teste de Geração de Trombina como uma potencial ferramenta, uma vez que o mesmo pode informar sobre o potencial de trombina formada (potencial trombótico), supõe-se que cães com DRC e proteinúria apresentem maior Potencial Endógeno de Geração de Trombina (ETP). Além disso, com a mensuração do ETP pretende-se auxiliar a conduzir medidas profiláticas, agregando valor ao presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença Renal Crônica (DRC) e Hemostasia

A doença renal crônica (DRC) acomete principalmente cães idosos, porém pode ocorrer em todas as idades e consiste na perda funcional e estrutural dos rins de forma progressiva e irreversível (BARTGES, 2012).

Segundo a International Renal Interest Society (IRIS, 2017), a DRC é classificada em quatro estádios com base na creatinina. Sendo estágio 1: creatinina <1,4mg/dL; estágio 2: 1,4 – 2,0 mg/dL; estágio 3: 2,1 – 5 mg/dL; estágio 4: > 5 mg/dL. Realizadas em animais em jejum e hidratados.

A DRC também é subclassificada (IRIS, 2017) de acordo com o grau de proteinúria. Realiza-se a razão entre a proteína e a creatinina (RPC) urinária a partir de uma urina com sedimento pobre e estéril. Resultados de RPC <0,2 o paciente DRC é subclassificado como não-proteinúrico; RPC de 0,2 – 0,5: proteinúrico limítrofe; RPC >0,5: DRC proteinúrico. Também há uma subclassificação de acordo com a pressão arterial sistólica (PAS), para avaliar risco de danos ou complicações em órgãos alvo.

A avaliação da Dimetilarginina Simétrica (SDMA) também tem sido aplicada para classificação e estadiamento da DRC, como um biomarcador mais sensível da função renal. Um aumento persistente do SDMA acima de 14 µg/dL sugere estágio 1 da DRC, SDMA ≥25 µg/dL pode indicar estágio 2 da DRC, no estágio 3 pacientes podem apresentar SDMA ≥45 µg/dL. Como a metodologia utilizada ainda não foi padronizada, sendo necessários mais estudos utilizando-se valores de SDMA juntamente com os de creatinina, o marcador já muito estabelecido no diagnóstico e monitoramento de DRC canina (IRIS, 2017).

O processo de hemostasia ocorre em uma série de eventos dinâmicos e interligados. As interações ocorrem entre os vasos sanguíneos, plaquetas, vias da coagulação e o sistema fibrinolítico, que culminam com a formação do tampão plaquetário após uma lesão vascular. Essa lesão ativa o fator tecidual, que ativa o fator VII, que em cascata ativa os fatores X e IX resultando na conversão da protrombina em trombina e formação de um tampão hemostático ainda susceptível à fibrinólise. Concomitantemente, as plaquetas são ativadas, bem como os fatores V, VIII e XI, amplificando a geração de trombina e consequentemente a conversão do fibrinogênio em fibrina. Anticoagulantes

endógenos (antitrombina, proteína C (PC) e proteína S (PS) e o inibidor do fator tecidual) agem simultaneamente para interromper a cascata de coagulação modulando a formação do coágulo. O processo de hemostasia segue com a remoção do coágulo formado pela ação da plasmina que é capaz de clivar a fibrina (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Smith (2009) propôs um novo conceito de hemostasia o qual incorpora o papel das células. Requer a participação de dois tipos celulares diferentes: uma célula portadora do Fator Tecidual (TF) e as plaquetas. A avaliação deste novo modelo sugere que a coagulação realmente ocorra *in vivo* em diferentes fases sobrepostas. Didaticamente, este modelo é dividido em três fases, a fase de iniciação ocorre na célula portadora de TF. Após a lesão tecidual a célula portadora de TF é exposta ao sangue circulante. Uma pequena quantidade de FIXa e trombina são geradas. Na fase de amplificação a pequena quantidade de trombina gerada na célula portadora de TF ativa as plaquetas, libera o vWF e leva à ativação de FV, FVIII e FXI (SMITH, 2009).

As várias enzimas geradas nas fases iniciais se reúnem na superfície da membrana procoagulante da plaqueta ativada para formar a tenase intrínseca, resultando na geração de FXa na superfície das plaquetas. O complexo de protrombinase se forma e resulta em uma explosão de geração de trombina diretamente na plaqueta promovendo a propagação da coagulação. A trombina desempenha um papel central na hemostasia, e é gerada em pequenas quantidades durante a fase de iniciação, depois em maiores quantidades na superfície das plaquetas na fase de propagação. Também se torna anticoagulante via ativação da PC mediada pela trombomodulina, bem como atua na fibrinólise, afetando a estrutura do coágulo pela ativação do FXIII e pelo fator inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (SMITH, 2009).

No modelo baseado em células, as superfícies de membrana desempenham um papel importante no controle da coagulação e na regulação da reação localizada apenas no foco da lesão. O TF é a única proteína da coagulação que está permanentemente ligada à superfície da membrana (BUTENAS, 2012). Outras proteínas da coagulação (por exemplo, FVII, FIX, FX, protrombina, PC, PS, proteína Z) contêm resíduos de ácido glutâmico (Gla) que permitem a ligação da proteína a uma superfície de membrana via interação entre cálcio e fosfolípidios carregados negativamente (SMITH, 2009).

A contribuição das micropartículas (MPs) para a hemostasia, atualmente, tem investigação intensiva. MPs são vesículas intactas derivadas de células que são envolvidas por membranas. Surgem quando as células ativadas ou apoptóticas liberam fragmentos de membrana. Citocinas (como fator de necrose tumoral e interleucina-6), trombina, estresse de cisalhamento e hipóxia podem estimular a formação de MP. Em condições normais, as MPs são, principalmente, derivadas de células endoteliais, plaquetas e monócitos, mas em certos estados de doença, as MPs podem surgir de granulócitos e eritrócitos (MOREL et al., 2008). As MPs contêm proteínas da superfície celular semelhantes às aquelas encontradas em suas células progenitoras, por exemplo, monômeros de vWF ultra grandes em MPs derivadas de células endoteliais, P-selectina em MP derivadas de plaquetas, TF em MPs derivadas de monócitos) que podem participar de reações de coagulação, especialmente quando o MP expressa uma membrana pró-coagulante (SMITH, 2009). O aumento da quantidade de MPs circulantes pode contribuir para as coagulopatias em vários distúrbios como sepse, doenças cardiovasculares, trombose venosa, embolia pulmonar, entre outras (PICCIN et al., 2007).

2.2. Alterações Hemostáticas e DRC

A persistência do quadro azotêmico e/ou urêmico juntamente com outras alterações como diminuição dos fatores de coagulação, trombocitopenia, anormalidades envolvendo a antitrombina, PC, PS e fibrinólise predis põem a uma série de alterações hemostáticas que podem levar ao risco trombótico ou hemorrágico (EBERST; BERKOWITZ, 1994), demonstrando um mecanismo multifatorial de pacientes nefropatas.

Alterações funcionais plaquetárias podem causar o prolongamento do tempo de sangramento observado em pacientes humanos com uremia, uma vez que os defeitos na agregação contribuem para o retardo na formação do tampão hemostático e na adesão plaquetária (MANNUCCIO; TRIPODI, 2012). Em geral, o envolvimento plaquetário no distúrbio hemorrágico em pacientes urêmicos é multifatorial, comprometendo as funções de agregação, adesão e secreção. Pesquisas anteriores já identificaram possíveis mecanismos envolvidos nesta hipofunção, como a deficiência nas proteínas do citoesqueleto (actina), prejudicando as funções de mobilidade, secreção e diminuindo a

contratilidade e a adesão plaquetárias (EBERST; BERKOWITZ, 1994, MALYSKO et al., 2005, KAW e MALHORRA, 2006). A avaliação da função plaquetária pode ser realizada de forma isolada pelo teste *in vitro* de agregação plaquetária. (HARRISON, 2005; COLLET e MONTALESCOT, 2009).

Mischke e Schulze (2004) verificaram a diminuição da agregação plaquetária frente a diferentes agonistas (ADP, colágeno, ristocetina, etc) e Sohal et al. (2006) constataram uma redução na capacidade de ligação dos receptores de membrana plaquetária (GPIIb-IIIa) ao fator de von Willebrand e ao fibrinogênio, em condições urêmicas, contribuindo para menor adesão plaquetária. Além disso, o quadro urêmico promove alteração na conformação dos receptores GPIIb-IIIa. Em contra partida, o aumento do fibrinogênio diminui a agregação plaquetária devido à redução na disponibilidade dos receptores para ação do ADP (MEADE et al., 1985). A via da cicloxigenase também é inibida em pacientes urêmicos, pois Zeck e colaboradores (2013) verificaram menor liberação de ATP pelas plaquetas quando utilizado ácido araquidônico no teste de agregação plaquetária em pacientes urêmicos, mas não quando utilizado o colágeno.

Forsythe e colaboradores (1989) avaliaram 22 cães urêmicos, os quais não apresentaram alterações na agregação plaquetária quando comparados aos cães controle. Ballard e Marcus (1972) também não encontraram alterações na agregação plaquetária em humanos urêmicos que comumente apresentam quadros hemorrágicos. Zwaginga e colaboradores (1991) verificaram contrariedade nos resultados de agregação plaquetária, frente a testes que mimetizavam fluxo sanguíneo ou não. Na presença de fluxo, as plaquetas eram incapazes de agregar-se, o que não ocorreu no teste de agregação plaquetária sem fluxo. Marques e colaboradores (2010) demonstraram alterações em proteínas responsáveis pela interação entre plaquetas, no citoesqueleto e devido aos produtos do estresse oxidativo comprometendo sua funcionalidade por meio da análise proteômica de plaquetas em condições urêmicas.

Os nefropatas podem apresentar trombocitopenia, porém raramente atingem níveis que representem risco hemorrágico, mas é um fator que pode contribuir para a tendência hemorrágica. Uma das hipóteses para a trombocitopenia inclui atividade trombopoiética reduzida (GAFTER et al., 1987).

A destruição plaquetária também é outro fator observado em diversas doenças ou síndromes associadas a doenças renais. Estes processos podem ser localizados, regionais ou sistêmicos. Normalmente, a destruição plaquetária está relacionada a doenças imunomediadas que ocasionam um pior prognóstico ao quadro renal (LINDSAY e CLARK, 1982).

A anemia do tipo não regenerativa é comumente encontrada em animais com DRC. Esta anemia apresenta uma etiologia multifatorial, porém é primariamente associada à deficiência de eritropoietina causada pela perda da função das células justa glomerulares, além das hemácias apresentarem meia-vida mais curta (MACDOUGALL, 2007). A anemia também parece contribuir para a fisiopatologia do distúrbio hemorrágico, pois com a diminuição do volume globular dentro dos vasos, as plaquetas estarão dispersas dificultando a sua adesão ao endotélio (BALLARD e MARCUS, 1972; EBERST; BERKOWITZ, 1994; SOHAL et al., 2006), uma vez que o fluxo alto dentro do vaso estimula a ativação plaquetária (WHITE, 2012).

As condições associadas à hipocoagulabilidade e/ou hipercoagulabilidade em animais anêmicos ainda está em discussão (KOL e BORJESSON, 2010). A anemia pode produzir artefatos de tendências a hipercoagulabilidade na tromboelastometria (TEM), devido às hemácias terem o papel de “diluir” os fatores de coagulação no plasma e refletir na dinâmica das plaquetas dentro dos vasos. A hipercoagulabilidade não foi verificada em métodos hemostáticos tradicionais (TP, TTPa) concomitantes à realização da TEM (SMITH et al., 2012; MCMICHAEL et al., 2014). Brooks e colaboradores (2014) verificaram que as variáveis da TEM são influenciadas pela viscosidade sanguínea e não pelo hematócrito *in vitro*.

A trombose também pode estar relacionada com a doença renal crônica e é um processo multifatorial, envolvendo hiperagregabilidade das plaquetas, aumento na concentração dos fatores de coagulação, hiperfibrinogenemia e redução da atividade fibrinolítica (MALYSZKO et al., 2005).

A hiperagregabilidade das plaquetas também pode ocorrer nos animais com DRC. A hipoalbuminemia pode contribuir neste ponto, pois aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico, normalmente ligado à albumina, o que leva a maior produção de tromboxano A₂ (TA₂) nas plaquetas, estimulando a agregação plaquetária (SINGHAL e BRIMBLE, 2006) e aumentando o risco

trombótico nos animais com DRC. Essa condição ocorre, pois o TA2 é um agonista da agregação plaquetária, assim como a trombina produzida na superfície de plaquetas ativadas, o que amplifica a resposta de ativação plaquetária (COLLET e MONTALESCOT, 2009). Embora a TEM não seja a ferramenta mais adequada para avaliar a função plaquetária, Falco e colaboradores (2013) verificaram que as plaquetas podem apresentar um potencial de contribuição para a hipercoagulabilidade nos cães nefropatas.

Em humanos, as MPs de plaquetas aumentam em pacientes com DRC (FAURE et al., 2006). As causas podem ser a uremia, disfunção vascular crônica e a aterosclerose que frequentemente acompanha a DRC (TRAPPENBURG et al., 2012). Além disso, a excreção renal comprometida de MPs pode ser um fator agravante, uma vez que já se verificou MPs na urina (VANDERPOL et al., 2010). Porém em cães, não há relatos sobre a participação de MPs em distúrbios hemostáticos na DRC.

Em contra partida, apesar das MPs aumentadas em pacientes com DRC, a avaliação da geração de trombina em humanos com DRC não apresentou alterações. Apenas quando avaliados separadamente, foi possível verificar que a geração de trombina é dependente das MPs. Porém ao avaliar a geração de trombina das MPs isoladamente, os pacientes com DRC apresentaram menor Potencial Endógeno de Geração de Trombina (ETP - *Endogenous Thrombin Potential*), ou seja, as MPs tem trombogenicidade prejudicada (TRAPPENBURG et al., 2012).

Biomarcadores inflamatórios (proteína C reativa, interleucina-6) e pró-coagulantes (fator VII, VIII, dímeros-D, complexo plasmina-antiplasmina) foram encontrados em níveis elevados em pacientes humanos com insuficiência renal (SHILIPAK et al., 2003). O mecanismo pode ser o aumento na produção, a redução na excreção ou ambos (GORDGE et al., 1988). Keller e colaboradores (2008) também observaram uma forte correlação entre a função renal diminuída e a elevação de biomarcadores inflamatórios e pró-coagulantes, como o fibrinogênio. Kerlin e colaboradores (2015) verificaram que a hiperfibrinogenemia e a deficiência de antitrombina eram dependentes do grau de proteinúria em ratos induzidos a síndrome nefrótica.

Lang e colaboradores (2009) verificaram que a firmeza máxima do coágulo (MCF), quando avaliada pelo extem® e fibtem®, aumenta de maneira

dependente à concentração do fibrinogênio e independente da contagem de plaquetas. Cães com coagulação intravascular disseminada também apresentaram associação com o aumento do fibrinogênio e a hipercoagulabilidade sanguínea (WIINBERG et al., 2008), sugerindo que o aumento do fibrinogênio em pacientes com DRC pode ser um fator para maior risco trombótico. Assim como observado por Gonçalves (2016), cães com DRC e proteinúria apresentaram hipercoagulabilidade caracterizada pelo aumento do MCF na TEM e associação com hiperfibrinogenemia.

A hiperfibrinogenemia também contribui para hiperagregação plaquetária, assim como a hipercolesterolemia que ocorre na DRC (SINGHAL e BRIMBLE, 2006), apesar de anteriormente citarmos a participação do fibrinogênio na redução da agregação plaquetária e seu papel na trombogênese (MEADE et al., 1985). Essas informações demonstram que o equilíbrio entre os mecanismos hemostáticos em pacientes com DRC é bastante controverso.

Os anticoagulantes naturais como a AT também podem ser fatores participantes na predisposição ao tromboembolismo, pois esta encontra-se diminuída em humanos com síndrome nefrótica e com hipercoagulabilidade (LAU et al., 1980; VAZIRI et al., 1984) e em ratos com síndrome nefrótica (KERLIN et al., 2015) e em cães com DRC (PRIHIRUNKIT et al., 2010). Essa diminuição é devida, provavelmente, à perda urinária desta proteína. O risco trombótico ocorre quando o nível de AT atinge menos de 60% do normal (HACKNER e SCHAER, 2010; KUZI et al., 2010). O contrário foi observado com relação à PC e a PS, as quais se encontraram aumentadas (PRIHIRUNKIT et al., 2010; DONAHUE et al., 2011), o que sugere uma forma de proteção à condição de hipercoagulabilidade.

Ao final do processo de coagulação sanguínea, a fibrinólise tem o papel de desfazer o coágulo formado após exercer a função de cessar o sangramento. Porém, falhas neste processo também contribuem para o desenvolvimento de tromboembolismo (LISMAN et al., 2005). O nível de plasminogênio em pacientes nefróticos também é baixo devido à perda urinária desta substância (LAU et al., 1980). O plasminogênio é convertido em plasmina, uma protease capaz de clivar a fibrina polimerizada produzindo fragmentos denominados genericamente de produtos da degradação da fibrina e do fibrinogênio (PDFs), além dos dímeros-D, oriundos exclusivamente da

degradação da fibrina estável (SMITH, 2010). A diminuição do plasminogênio em pacientes com DRC contribui para o quadro de hipercoagulabilidade sanguínea juntamente com os demais fatores anteriormente citados.

Pesquisas recentes verificaram um perfil de hipercoagulabilidade em cães com proteinúria associada à nefropatia por meio da TEM (FALCO et al., 2013; LENNON et al., 2013; GONÇALVES, 2016). Falco et al (2013) observaram que os animais com proteinúria associada à azotemia apresentavam alterações tromboelastométricas sugestivas de hipercoagulabilidade mais consistentes e, portanto, maior risco trombótico, que os cães com proteinúria sem azotemia. Jacob e colaboradores (2005) verificaram maior risco de desenvolver crise urêmica e morte nos animais que apresentaram $RPC > 2$ em cães com DRC, quando comparados aos animais com $RPC < 2$. Ambos os trabalhos corroboram na avaliação da RPC, que o grau de azotemia e tempo de evolução da doença são informações importantes para determinar o prognóstico desses pacientes e devem ser avaliados em conjunto (LENNON et al., 2013).

Kerlin e colaboradores (2015) verificaram correlação da capacidade trombótica e do grau de proteinúria em ratos com síndrome nefrótica experimental. A geração de trombina e a TEM foram correlacionadas com o grau de proteinúria. Foram observadas correlações positivas entre o potencial endógeno de trombina (ETP) e o grau de proteinúria, bem como, o ângulo alfa e o grau de proteinúria. Sugerindo que a proteinúria e a hipoalbuminemia podem ser desenvolvidos como biomarcadores clinicamente significativos da hipercoagulabilidade, podendo direcionar uma terapia anticoagulante.

Outras doenças como a parvovirose (OTTO et al., 2000) e a anemia hemolítica imunomediada (FENTY et al., 2011), além da nefropatia com proteinúria (DONAHUE e OTTO, 2005) têm sido associadas a um estado de hipercoagulabilidade em cães pela avaliação da TEM e/ou TEG. Estudos com hiperadrenocorticism (ROSE et al., 2013), blastomicose sistêmica (MCMICHAEL et al., 2015), e após administração de baixa dose de prednisona (ROSE et al., 2011) a hipercoagulabilidade também foi identificada pela TEM bem como com aplicação do TGT. Estudos em cães com neoplasia mamária (GRUBER et al., 2016) também relatam hipercoagulabilidade quando avaliados pelo TGT. Em contra partida, Dengate e colaboradores (2016), avaliaram cães

com trombose clinicamente diagnosticada e não observaram alterações significativas no TGT.

2.3. Geração de Trombina

Atualmente, os testes mais utilizados na prática clínica veterinária para avaliação da hemostasia secundária são os testes de TP, TTPa e dosagem de fibrinogênio (DONAHUE e OTTO, 2005). Esses testes utilizam a formação de fibrina como ponto final na avaliação da coagulação sanguínea, e isso se deve à sua facilidade de mensuração. No entanto, tais testes falham na estimativa do potencial de trombina uma vez que apenas 5% da trombina gerada já é suficiente para transformar o fibrinogênio em fibrina, levando então ao ponto final da reação (LECUT et al., 2015). Em função desta propriedade, os níveis de trombina são subestimados por esses exames de triagem. Um modelo para a hemostasia foi proposto, que inclui as células no processo hemostático, e atualmente, assume-se que a trombina é o principal regulador da hemostasia (SMITH, 2009).

O Teste de Geração de Trombina (TGT) consiste na avaliação contínua da geração de trombina no plasma após adição de ativadores. O fator tecidual é utilizado como ativador e o uso de baixas concentrações desse componente, em presença de cálcio, permite um processo lento da geração de trombina. Isso permite a avaliação dos processos de iniciação, amplificação e propagação do modelo celular de hemostasia. O resultado final é uma curva, chamada de trombograma, cuja área deve refletir o potencial endógeno de trombina (ETP) do paciente. Para obtenção dessa curva, mensura-se a fluorescência em função da formação ou inibição da trombina em tempo real, em plasma adicionado de fator tecidual, fosfolípidos e cloreto de cálcio (MARCHETTI, 2008). O substrato é consumido durante a reação e então a velocidade de formação do produto diminui em função da diminuição da concentração do substrato enzimático. Portanto, a intensidade de fluorescência não é linear em relação à concentração do fluoróforo, e o resultado é uma curva não linear (HEMKER et al., 2013).

O potencial de geração de trombina pode ser quantificado e caracterizado pelo método de CAT® em cães hípidos, o qual pode ser uma ferramenta útil para entender as alterações hemostáticas em diferentes condições patológicas e seu potencial de hipo ou hipercoagulabilidade (CUQ et al., 2018). O TGT é

um teste cuja aplicação na veterinária tem sido recentemente relatado (ALLEGRET et al., 2011; ROSE et al., 2013; GRUBER et al., 2016; GARA-BOIVIN et al., 2017; CUQ et al., 2018).

Muitos ensaios tem avaliado a correlação entre os parâmetros da TGT e o risco de sangramento e trombose venosa e arterial em medicina (BERNTORP e SALVAGNO, 2008; NINIVAGGI et al., 2012). De todos os parâmetros do trombograma, o ETP parece ser o mais amplamente empregado, com melhor correlação ao fenótipo clínico, como descrito por Lipets e Ataulakhanov (2015).

A curva de geração de trombina pode ser descrita com quatro parâmetros principais (figura 1), que são ETP (*Endogenous Thrombin Potential*), *lag-time*, *peak* e *peak time*. O potencial de trombina endógeno (ETP) ou área sob a curva representa o trabalho enzimático total realizado pela trombina. O *lag time* é definido como o tempo necessário para a concentração de trombina atingir 1/6 do pico de concentração (início da detecção da fluorescência), o *peak* é o pico máximo de fluorescência e representa a concentração máxima de trombina e o *time to peak* é o tempo para se atingir o pico de trombina (HEMKER et al., 2003; CASTOLDI e ROSING, 2011; MARCHETTI et al., 2012).

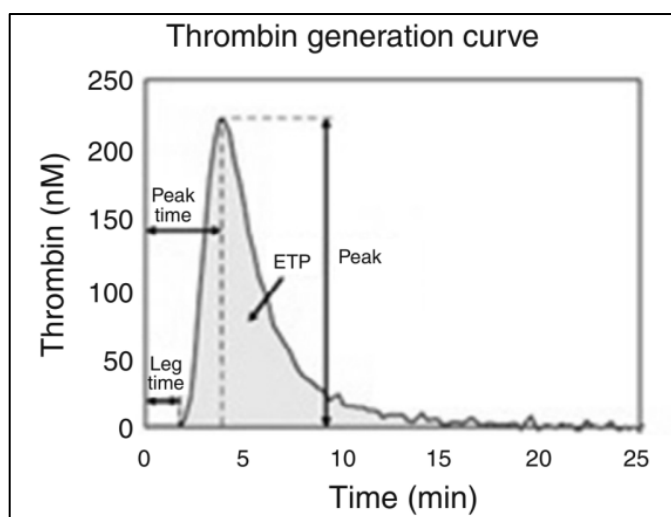


Figura 1: Parâmetros da curva de Geração de Trombina utilizando o método Trombograma Automatizado Calibrado (CAT - *Calibrated Automated Thrombogram*®) – Duarte et al., 2017.

Todos esses parâmetros fornecem informações importantes a respeito da hiper ou hipocoagulabilidade dos pacientes. O equipamento utilizado

normalmente é acoplado a um software, que recebe todas as informações e converte em dados que levam à formação da curva de geração de trombina. A sensibilidade desse teste permite a detecção de estados tanto de hipo quanto de hipercoagulabilidade. O TGT vem sendo usado na avaliação da hemostasia em várias situações tais como cirrose, sepse, câncer, doença falciforme, doença arterial oclusiva, hemofilias, entre outros (ZAGO et al., 2013). No entanto, seu uso se limita ainda à pesquisa uma vez que o teste ainda requer padronização para utilização em medicina veterinária.

O TGT é um teste que pode ser usado como uma nova ferramenta para a investigação *in vivo* dos aspectos hemostáticos em função da doença, podendo ser útil também na investigação de novos alvos terapêuticos na prevenção de eventos tromboembólicos e/ou hemorrágicos (DIERI et al., 2012). Além disso, o TGT é capaz de refletir muitas funções do sistema de coagulação sanguínea. Em plasma livre de plaquetas (PLP) evidencia todas as deficiências de fatores da coagulação (com exceção do fator XIII), e é sensível à ação de anticoagulantes orais, todos os tipos de heparina, inibidores diretos da trombina e todos os fármacos anticoagulantes testados. A hiperprotrombinemia e deficiência de antitrombina, PS ou PC, bem como a resistência à ativação da PC aumentam a geração de trombina (HEMKER et al., 2003).

3. OBJETIVOS

Avaliar o papel da geração de trombina em cães com DRC e proteinúria.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar o Potencial de Geração de Trombina em cães com DRC e proteinúria.
- Correlacionar os resultados do TGT com os testes convencionais de hemostasia (tempo de tromboplastina parcial ativado, tempo de protrombina e concentração de fibrinogênio).

4. HIPÓTESE

Cães com DRC e proteinúria apresentam maior Potencial Endógeno de Geração de Trombina e hipercoagulabilidade.

Capítulo 2

5. TRABALHO CIENTÍFICO 1

1 **Thrombin Generation in Dogs with Proteinuric Chronic Kidney Disease**

2
3 Daniele S. Gonçalves^{1*}, Priscylla T. C. Guimarães-Okamoto¹, Maria G. Carvalho²;
4 Rita C. F. Duarte²; Regina K. Takahira¹

5
6 ¹From the Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine
7 and Animal Science, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu-SP, Brazil

8 ²From the Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy,
9 Minas Gerais Federal University (Ufmg), Belo Horizonte-MG, Brazil

10 Corresponding author: Gonçalves, D.S., DVM, FMVZ – Unesp, District of Rubião
11 Júnior, s/n, Postal code 560, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil; e-mail:
12 danielesilvano@gmail.com.

13 Local: Veterinary Hospital of School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao
14 Paulo State University (Unesp), Botucatu-SP, Brazil, District of Rubião Júnior,
15 Botucatu/SP, Brazil.

16
17 **Background:** Dogs with chronic kidney disease (CKD) are at risk of thromboembolic
18 events, but the mechanism leading to hypercoagulability and the population of dogs
19 at risk are unknown.

20 **Hypothesis/Objectives:** Dogs with proteinuric CKD have greater Endogenous
21 Potential for Thrombin Generation and hypercoagulable state compared with healthy
22 case-matched controls.

23 **Animals:** Client-owned dogs with a diagnosis of proteinuric CKD (n = 19) and
24 healthy case-matched controls (n = 20).

25 **Methods:** Prospective case-controlled study of client-owned dogs presented to Small
26 Animal Clinical Service at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of
27 São Paulo State University in Botucatu, Brazil, with clinical signs compatible with

28 CKD. Complete blood counts, serum biochemistry renal and hepatic profile,
29 fibrinogen, PT, aPTT, and thrombin generation were evaluated.

30 **Results:** Preliminary results show there is no difference in the of thrombin generation
31 between groups.

32 **Conclusions and Clinical Importance:** There are no evidence that thrombin
33 generation contribute to hypercoagulable state in dogs with proteinuric CKD. The
34 conventional test PT was lower in CKD dogs, suggesting that extrinsic via is most
35 involved in hypercoagulable state. Additional studies are needed to explore a
36 possible contribution of thrombogenicity to the clinical manifestations of CKD.

37 **Key words:** Canine; Proteinuria; Thrombosis; Coagulation.

38

39 **Abbreviations:**

40 CAT - Calibrated automated thrombography

41 CBC – Cell blood count

42 CKD – Chronic kidney disease

43 EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

44 ETP - Endogenous thrombin potential

45 aPTT – Activated partial thromboplastin time

46 PT – Prothrombin time

47 TEM – Thromboelastometry

48 TG - Thrombin generation

49 UPC – Urine protein:creatinine ratio

50

51 **Introduction**

52 Hemostatic tests such as prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (PTT),
53 and platelet function tests are not sensitive enough to detect hypercoagulable states
54 in human and veterinary patients.^{1,2} In recent years, viscoelastic testing methods
55 such as thromboelastometry (TEM) have been increasingly used to identify hyper-
56 and hypocoagulable states in dogs.³⁻⁴ Thrombin plays a central role in hemostasis
57 and thrombosis, and is involved in all in vivo hemostatic pathways.^{1,5} Its formation
58 rate can reflect the potential hemostatic activity in plasma.^{6,7} Thrombin generation

(TG) test has been experimentally used in medicine to assess anticoagulant therapy and reversal efficacy^{8,9} and also correlated with bleeding tendencies or hypercoagulability in chronic renal disease, thrombocytopenia or sepsis^{9,10} TG test by Calibrated automated thrombography (CAT) method is a assay, that has been used to detect alterations in hemostasis and is sensitive to hyper and hypocoagulability states.⁷ TG is monitored automatically using a fluorogenic thrombin substrate and continuous comparison to a simultaneously run calibrator. Performing thrombin generation in platelet-poor plasma primarily describes the activity of the pro- and anticoagulant proteins that culminate in thrombin generation. Because thrombin generation is a plasma-based assay, results are not influenced by erythroid mass.¹¹ A thrombin generation curve, the thrombogram is generated and 4 variables are measured.⁶ *Endogenous Thrombin Potential* (ETP) is the area under the curve and represents the total thrombin generation capacity of the patient. The lag time represents the initiation of the coagulation.^{6,12} The peak thrombin generation (peak) is the maximum concentration of thrombin measured in the well, and time to peak (ttpeak) represents a delay in achieving that maximal concentration, representing the amplification phase of the cell-based model of hemostasis.^{11,12} Veterinary literature regarding the use of thrombin generation assays is sparse. Previous studies of this technique show that the test detects hypocoagulability in dogs receiving anticoagulant therapy^{13,14} and can detect hypercoagulability in patients receiving prednisone therapy or affected by blastomycosis or hyperadrenocorticism.^{15,16,17} However, in a recent study, dogs with thromboembolic disease had longer lag time than group of healthy dogs.¹⁸ The purpose of this study was to determine whether dogs with Proteinuric Chronic Kidney Disease (CKD) were hypercoagulable as compared to healthy control animals from a similar environment.

84

85 **Materials and Methods**

86 **Experimental Design:** This is an observational and cross-sectional study, which dog
87 samples were analysed presented to the Small Animal Clinical Service at the School
88 of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University in
89 Botucatu, Brazil, between March, 2014 and February, 2016, after approved by the
90 Institutional Animal Care and Use Committee (protocol 33/2014).

91

92 **Animals:** 19 dogs with stage III and IV CKD following IRIS (Internacional Renal
93 Interest Society)¹⁹ guidelines were evaluated. The inclusion criteria were renal
94 azotemia (serum creatinine > 2mg/dL, after stabilisation), urinare protein:creatinine
95 ratio (UPC) >1.0 and imaging findings (eg, small irregular kidneys, decreased
96 corticomedullary distinction). Dogs were excluded if there were evidence of
97 neoplasia, infection disease, cardiogenic shock, congestive heart insufficiency,
98 hepatopathy, nephrolithiasis, hemoparasites or disease that influences hemostasis.
99 In the same period 20 healthy dogs from volunteer owners composed the control
100 group. The healthy dogs were assessed for same analyses, and they also should not
101 have previous disease.

102

103 **Blood Collection and Handling Analysis:** Blood was collected a single time
104 preferably via venipuncture from a jugular vein using an 20g needle attached to a
105 syringe, and was immediately transferred into EDTA K3, and citrate tubes, the latter
106 at a ratio 9:1 for blood: 3.2% sodium citrate then mixed thoroughly by gentle repeated
107 inversion. The urine samples were collected by urethral catheterization or
108 cystocentesis for immediately analysed (urinalysis and protein creatinine ratio).
109 The CBC was performed by an automatic counter^a. The sample for plasma obtaining
110 was centrifuged immediately at 1700g for 10 minutes, and then removed and stored
111 at -80°C for analysis.

112

113 **Thrombin generation**

114 TG was performed by CAT technich^b by the Hemker method⁶ according to the
115 manufacturer's instructions. This assay evaluates the time course of thrombin
116 generation and inhibition in real time, interrogating the continuing generation of
117 thrombin that occurs after formation of the fibrin clot.⁷ Samples were evaluated using,
118 tissue factor^c (PPP-Reagent Low® and High®), α^2 M-Thrombin Calibrator reagent
119 and CaCl₂/fluorogenic substrate (FluCa® kit) reagents. Thrombin generation was
120 evaluated for one hour. Data collected from the thrombinoscope^d software included
121 lag time, time to peak, peak, and *Endogenous Thrombin Potential* (ETP).

122

123 **PT, aPTT and fibrinogen (mg/dL):** PT and aPTT were determined by semi-
124 automated coagulometer^e in duplicate according to the manufacturer's instructions^f
125 for each test. Fibrinogen concentration was estimated by Clauss's method^g.

126 **Statistical Analysis:** The sample size (n) estimateⁿ was performed considering a
 127 80% statistical power. GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, Inc/ La
 128 Jolla, CA) was used for statistical analysis. Data were tested for normality by a
 129 Shapiro-Wilk test. The CBC, biochemistry, CAT and conventional tests variables
 130 were compared between groups using Mann-Whitney U Test. Correlation between
 131 conventional tests and thrombin generation test was analysed using the Spearman
 132 Rho test. Data were expressed as median (range). Statistical significance was set at
 133 $P < .05$.

134

135 **Results**

136 Nineteen dogs diagnosed with proteinuric CKD were analyzed for this study. Eleven
 137 were females, and 8 were males, with an average of eight years (8 ± 3 years). The
 138 control group was also comprised of 20 dogs. Gender distribution for this group was
 139 10 females and 10 males, with an average age of five years ($5 \pm 2,5$ years).

140 The proteinuric CKD group presented anemia (Ht: 27%, $P < .001$), normocytic (VCM:
 141 70fL, $P = .17$), normochromic anemia (CHCM: 33, $P < .001$) and platelets within the
 142 reference values ($P = .80$). The animals from CKD group had higher leukocyte counts
 143 ($11 \times 10^3/\mu\text{L}$, $P < .05$), but both groups were within the reference limits. Eleven (11/20)
 144 dogs were classified as having Stage III CKD and 8 were at Stage IV CKD according
 145 to the IRIS¹⁹ guidelines. Albumin levels were significantly lower in the CKD group
 146 (2.3g/dL, $P < .001$) than in the control group. UPC varied between 1.4 and 12.4 in the
 147 proteinuric CKD group, with 16/19 animals presenting $\text{UPC} > 1.6$.

148 Dogs with proteinuric CKD presented lower prothrombin times ($P < .001$) and show
 149 higher fibrinogen levels ($P < .001$). The thrombin generation did not difference
 150 between grupos (Table 3).

151

152 Table 1. Cell blood count of healthy and proteinuric proteinuric CKD dogs.

Parameters	CKD (n=19)		Healthy dogs (n=20)		P
	Median	(2q - 3q)	Median	(2q - 3q)	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)*	3.70	(3.2 - 4.5)	7.35	(6.9 - 7.8)	<.001
Hemoglobin (g/dL)*	8.8	(7.2 - 9.6)	17.5	(16.3 - 18.4)	<.001
Hematocrit (%)*	27	(22 - 30)	51	(46 - 54)	<.001
MCV (fL)	70	(68 - 73)	69	(66 - 71)	0.17
MCHC (%)*	33	(32 - 33)	35	(33 - 35)	<.001

Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	276	(205 - 358)	280	(220 - 370)	0.80
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)**	11	(9.0 - 15.6)	9	(7.2 - 11.5)	<.05

*indicates a significant difference (*P<.001/ **P<.05).

153

154 Table 2. Serum biochemistry and UPC of healthy and proteinuric CKD dogs.

Parameters	CKD (n=19)		Healthy dogs (n=20)		P
	Median	(2q-3q)	Median	(2q-3q)	
Urea (mg/dL)*	228	(161 - 286)	33	(28 - 48)	<.001
Creatinine (mg/dL)*	5.1	(4.1 - 6.6)	0.9	(0.7 - 1.1)	<.001
Serum protein (g/dL)**	5.7	(4.9 - 6.2)	6.2	(5.8 - 6.5)	<.05
Albumin (g/dL)*	2.3	(2.0 - 2.6)	3.5	(3.3 - 3.6)	<.001

UPC: Urinary Protein/Creatinine; CKD: Chronic Kidney Disease; *indicates a significant difference (*P<.001/ **P<.05).

155

156 Table 3. Coagulation assays of healthy and proteinuric CKD dogs.

Parameters	CKD (n=19)		Healthy dogs (n=20)		P
	Median	(2q - 3q)	Median	(2q - 3q)	
Thrombin generation					
Lag (minutes)	2.3	(2.0 - 2.7)	2.0	(2.0 - 2.6)	0.54
ETP (nM/min)	254.2	(190.1 - 349.0)	212.2	(180.9 - 291.3)	0.22
Peak (nM)	80.3	(62.9 - 108.1)	69.5	(54.8 - 92.9)	0.27
Ttpeak (minutes)	4.3	(4.0 - 4.7)	4.5	(4.0 - 5.2)	0.41
aTTP (seconds)	12.5	(11.1 - 14.0)	11.5	(11.1 - 12.4)	0.08
PT (seconds)*	8.1	(7.8 - 8.6)	9.6	(8.9 - 10.3)	<.001
Fibrinogen (mg/dL)*	483.7	(442 - 495)	312.6	(259 - 356)	<.001

157 *indicates a significant difference (*P<.001/ **P<.05).

158

159 **Discussion**

160 TG by CAT assay did not detect differences between proteinuric CKD and
 161 healthy dogs. The hypercoagulable profile characterized in human samples by
 162 decreased lag time and ttpeak with increased peak and ETP was not observed here,
 163 despite ability of CAT to detect risk of venous thrombosis^{7,9}. Limited veterinary
 164 studies of small size have demonstrated this hypercoagulable profile, although it has
 165 not been associated with a risk for thrombosis in canine patients^{15,17}. In this

166 population of dogs with proteinuric CKD, the findings using the CAT were higher ETP
167 and peak. Interestingly, an increased ETP and peak of thrombin generation has
168 previously been described in dogs with blastomycosis, a condition associated with
169 hypercoagulability¹⁶. Proteinuric CKD dogs has previously been described with
170 hypercoagulability by thromboelastometry²⁰. The TGT findings in this study,
171 probably, are explained by the association of the reduction factors of natural
172 anticoagulants in CKD proteinuric dogs, as well as hyperfibrinogenemia in these
173 patients.

174 The concentrations of TF used for the CAT assay described herein were LOW
175 (1pM) and HIGH (5pM) than previously published^{16,20,21}. However, the application of
176 high concentration of TF did not allow the detection of thrombin generation because
177 the samples coagulated before the beginning of the reading. One of the test study
178 limitations was the storage time of the samples, for more than 12 months. In addition,
179 some were refrozen and then analyzed. Defrosting promotes platelet disruption and
180 its fragments contribute to increased coagulation, activating factor V²³. While this
181 hampers comparison of results with other studies, the concentration is the same for
182 healthy and affected dogs here, suggesting that the evaluation by high TF was
183 affected due to interference of sample storage time and freezing and thawing of
184 samples.

185 The study here is limited by the lack of additional testing for markers of systemic
186 hypercoagulability and consumptive processes. Measurement of specific coagulation
187 factor activities and markers of fibrinolysis (eg, d-dimer), would have helped to
188 attribute the hemostasis profile in proteinuric CKD dogs. This was not possible in this
189 patient group, and limits the information gathered here. The present study did not
190 look at TEM in comparison to CAT. While this would have been ideal, comparisons
191 between TEM and CAT in dogs with thrombosis¹⁸, blastomycosis¹⁶ and
192 hyperadrenocorticism¹⁷ were previously performed. Thrombin generation was only
193 measured in PPP, and therefore, platelet contribution was not assessed.

194 Increased fibrinogen concentrations and increased clot strength were showed in
195 dogs with protein-losing nephropathy³, kidney diseases²⁴ and proteinuric CKD²⁰. The
196 thrombin generation test was not affected by fibrinogen concentration⁷. In this
197 proteinuric CKD population, it would appear that were an increased fibrinogen
198 concentration and without significant difference for TG. Given the known platelet
199 dysfunction in CKD, increased fibrinogen appears to be responsible for the observed

200 hypercoagulability as a compensatory mechanism to normalize hemostasis in the
201 presence of platelet dysfunction^{25,26,27}. Although we did not have platelet function in
202 this study, platelet hypofunction has been observed in dogs with proteinuric CKD²⁰. It
203 is important to consider that fibrinogen, probably, may also be associated with the
204 inflammatory process in these dogs.

205 Elevated fibrinogen levels have been shown to correlate with myocardial
206 complications in patients with Stage 5 CKD.²⁸ This supports the theory that
207 hyperfibrinogenemia and associated increased clot strength as assessed by
208 increased MA, is mechanistic in the physiologic coagulopathy and the complications
209 with thrombosis in CKD patients clinically. Additionally, the conventional test PT was
210 lower in CKD dogs, suggesting that extrinsic via is most involved in hypercoagulable
211 state.

212 Several limitations in this study warrant discussion. While our control group was
213 chosen to exclude any patients with comorbid conditions, they are significantly
214 younger than the CKD group. Including the small sample size, while statistically
215 significant differences between the healthy and proteinuric CKD dogs were
216 established, the limited power of the study makes these results susceptible to bias.
217 These important clinical outcomes could be improved upon with a larger, multicenter,
218 prospective evaluation.

219

220 **Conclusions**

221 Dogs with proteinuric CKD don't have hypercoagulability detectable by Thrombin Generation
222 Test in this study. Therefore, further clinical studies are needed to characterize better the
223 alterations on Thrombin Generation and the clinical relevancies.

224

225 **References**

- 226 1 Smith SA, The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency*
227 *and Critical Care* 2009;19:3-10.
- 228 2 Brooks MB, Catalfamo JL. "Current Diagnostic Trends in Coagulation Disorders
229 Among Dogs and Cats. *Veterinary Clinical Small Animal* 2013;43:1349-1372.
- 230 3 Lennon M, Hanel RM, Walker JM, Vaden SL. Hypercoagulability in dogs with
231 protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *Journal of*
232 *Veterinary Internal Medicine* 2013;27:462-468.

- 233 4 McMichael MA, Smith SA, Galligan A, Swanson KS. *In vitro* hypercoagulability on
234 whole blood thromboelastometry associated with *in vivo* reduction of circulating
235 red cell mass in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2014;43:154-163.
- 236 5 Hanel RM, Chan DL, Conner B, et al. Systematic evaluation of evidence on
237 veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. *Journal of*
238 *Veterinary Emergency and Critical Care* 2014;24:47-56.
- 239 6 Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous Registration of
240 Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin
241 Potential. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;70:617-624.
- 242 7 Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated Automated Thrombin
243 Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology and Thrombosis of*
244 *Haemostasis* 2003;33:4-15.
- 245 8 Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*
246 2011;127:21-25.
- 247 9 Dieri RA, Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: What have we learned? *Blood*
248 *Reviews* 2012;26:197-203.
- 249 10 Trappenburg MC, Schilfgaarde MV, Frerichs FCP, et al. Chronic renal failure is
250 accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle
251 numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant*
252 2012;27:1446-1453.
- 253 11 Brooks AC, Guillaumin J, Cooper ES, Couto C. Effects of hematocrit and red
254 blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings.
255 *Transfusion* 2014;54:727-734.
- 256 12 Lipets EN, Ataulakhanov FI. Global assays of hemostasis in the diagnostics of
257 hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thrombosis Journal*
258 2015;13:1-15.
- 259 13 Allegret V, Dunn ME, Bédard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs
260 by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* 2011;40:24-31.
- 261 14 Gara-Boivin C, Del Castillo JRE, Dunn ME, Bédard C. *In vitro* effects of dalteparin
262 on thrombin generation in canine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*
263 2017;46:442-450.
- 264 15 Rose LJ, Dunn ME, Allegret V, Bédard C. Effect of prednisone administration on
265 coagulation variables in healthy Beagle dogs. *Veterinary Clinical Pathology*
266 2011;40:426-434.

- 267 16 Mcmichel MA, O'Brien M, Smith SA. Hypercoagulability in Dogs with
268 Blastomycosis . Journal of Veterinary Internal Medicine 2015;29:499-504.
- 269 17 Rose LJ, Dunn ME, Bédard C. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on
270 Coagulation Parameters. Journal Veterinary Internal Medicine 2013;27:207-211.
- 271 18 Dengate NAL, Morel-Kopp AC, Beatty JA, et al. Differentiation between dogs with
272 thrombosis and normal dogs using the overall hemostasis potential assay.
273 Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2016;26:446-452.
- 274 19 IRIS, Staging of Chronic Kidney Disease, modified 2018. [http://www.iris-](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf)
275 [kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf). Accessed 2018.
- 276 20 Gonçalves, DS. Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em
277 cães com doença renal crônica [dissertation]. Botucatu (SP): Sao Paulo State
278 University (Unesp); 2016.
- 279 21 Cuq B, Blois SL, Wood RD, Monteithg, Abrams-Ogg AC, Bedard C, Wood GA.
280 Reproducibility, stability, and biological variability of thrombin generation using
281 calibrated automated thrombography in healthy dogs. Veterinary Clinical
282 Pathology 2018;47:218-226.
- 283 22 Madsen DE, Nichols TC, Merricks EP, Waters EK, Wiinberg B. Global
284 measurement of coagulation in plasma from normal and haemophilia dogs using
285 a novel modified thrombin generation test – Demonstrated in vitro and ex vivo.
286 Plosone 2017;12:1-16.
- 287 23 Seghatchian J, Krailadsiri P. The Platelet Storage Lesion. Transfusion Medicine
288 Reviews 1997;11:130-144.
- 289 24 Falco S, Zanatta R, Bruno B, Maurella C, Scalone A, Tarducci A, Borrelli A.
290 Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with
291 kidney diseases. Acta Veterinaria Brno 2013;82:209-214.
- 292 25 Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thurmel K. Haemostasis in chronic
293 kidney disease. Nephrology Dialysis Transplantation 2014;29:29-40.
- 294 26 Holloway DS, Vagher JP, Caprini JA, Simon NM, Mockros LF.
295 Thrombelastography of blood from subjects with chronic renal failure.
296 Thrombosis Research 1987;45:817-825.
- 297 27. Velik-Salchner C, Haas T, Innerhofer P, Steif W, Nussbaumer W, Klingler A,
298 Klima G, Martinowitz U, Fries D. The effect of fibrinogen concentrate on
299 thrombocytopenia. J Journal of Thrombosis and Haemostasis 2007;5:1019-1025.

300 28 Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno
301 G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Seminara G, Stancanelli B, Nicocia G, Buemi M.
302 Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage
303 renal failure. Journal of Internal Medicine 2003;254:132-139.

304

305 **Footnotes**

306 ^a Sysmex® - Poch - 100iV – Miami, Estados Unidos

307 ^b Fluoroskan Ascent Analyser, Thermo Scientific, Shangai, China

308 ^c Diagnostica Stago, Assiernes, France

309 ^dThrombinoscope BV®, Maastricht, Netherlands

310 ^e Chrono-log®, Chicago, Estados Unidos

311 ^f ClotTimer® Laser Sensor, Sorocaba, Brasil

312 ^g Labtest®, Minas Gerais, Brasil

313 ^h Statstodo Trading Pty Ltd

Capítulo 3

6. TRABALHO CIENTÍFICO 2

1 **ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TESTES DE GERAÇÃO DE**
2 **TROMBINA E TROMBOELASTOMETRIA EM CÃES COM DOENÇA RENAL**
3 **CRÔNICA PROTEINÚRICA**

4 Daniele Silvano. Gonçalves¹ - e-mail: danielesilvano@gmail.com

5 Silvano Salgueiro Geraldes¹ – e-mail: silvanoport@hotmail.com

6 Rita Carolina Figueiredo Duarte² – ritacarolinafd@gmail.com

7 Maria das Graças Carvalho² – mgcwanner@gmail.com

8 Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto¹ – e-mail:
9 tatiana.okamoto@unesp.br

10 Regina Kiomi Takahira¹ – e-mail: regina.takahira@unesp.br

11

12 ¹From the Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary
13 Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu-
14 SP, Brazil

15 ²From the Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of
16 Pharmacy, Minas Gerais Federal University (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil
17 Corresponding author: Gonçalves, D.S., DVM, FMVZ – Unesp, District of
18 Rubião Júnior, s/n, Postal code 560, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil; e-mail:
19 danielesilvano@gmail.com.

20 Local: Veterinary Hospital of School of Veterinary Medicine and Animal
21 Science, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu-SP, Brazil, District of
22 Rubião Júnior, Botucatu/SP, Brazil.

23

24 **Resumo**

25 **Introdução:** Os pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam um
26 potencial hemostático paradoxal, pois apresentam episódios de sangramento,
27 mas também são propensos à trombose. Poucos estudos avaliaram as
28 propriedades viscoelásticas sanguíneas em cães com doenças renais,

29 entretanto, a hipercoagulabilidade já foi observada nestes pacientes. Ressalta-
30 se ainda que a função plaquetária e sua participação neste processo ainda não
31 foi totalmente esclarecida. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar e
32 comparar o Teste de Geração de Trombina (TGT) e as propriedades
33 viscoelásticas sanguíneas medidas pela tromboelastometria (TEM) em cães
34 com DRC proteinúrica.

35 **Resultados:** Além da diferença entre os cães saudáveis e os com DRC
36 proteinúrica observados na TEM, a estratificação dos animais doentes revelou
37 que cães com até 20 kg apresentaram valores aumentados de firmeza máxima
38 do coágulo e ângulo α . As demais subclassificações não apresentaram
39 diferenças estatísticas significantes. O teste de geração de trombina não foi
40 capaz de diferenciar os grupos doente e saudável. Entretanto, quando os
41 nefropatas foram analisados de forma estratificada, foram observados
42 aumentos do ETP e da concentração máxima de trombina (*peak*) pelo TGT em
43 fêmeas e em cães com maior peso e com mais de 30 dias de diagnóstico da
44 DRC.

45 **Conclusões:** Uma análise conjunta dos dados revelou que a TEM conseguiu
46 discriminar melhor os cães saudáveis daqueles com DRC. No entanto, quando
47 houve estratificação da amostra de cães com DRC, observou-se certa
48 concordância de resultados para os dois métodos, ambos sinalizando para um
49 discreto estado de hipercoagulabilidade.

50
51 **Palavras-chave:** Tromboelastografia, geração de trombina, doença renal
52 crônica, hemostasia, trombose, hemorragia.

53 54 **Abreviações**

55 DRC – Doença Renal Crônica

56 TGT – Teste de Geração de Trombina

57 TEM - Tromboelastometria

58 TP – Tempo de protrombina

59 TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada

60 CAT – *Calibrated Automated Thrombogram*

61 ETP – *Endogenous Thrombin Potential*

62 MCF – Maximum Clot Firmness

63 CT – Clotting time

64

65 **Introdução**

66 Os pacientes com doença renal crônica (DRC) têm um potencial
67 hemostático paradoxal, com taxas aumentadas de sangramento, mas são
68 propensos à trombose^{1,2}. Acredita-se que o aumento do sangramento seja
69 causado principalmente pela disfunção plaquetária, com contribuições
70 adicionais de alterações na cascata de coagulação, óxido nítrico e fibrinólise,
71 além da anemia^{3,4,5}. Entretanto, os mecanismos que favorecem o estado pró-
72 trombótico não são claros.

73 Poucos estudos avaliaram em cães com doenças renais as propriedades
74 viscoelásticas sanguíneas e a hipercoagulabilidade^{6,7}. A função plaquetária^{8,9} e
75 sua participação na hipercoagulabilidade não foi ainda totalmente esclarecida.
76 Além disso, não há relatos do potencial de geração de trombina em cães com
77 DRC. Todavia, em humanos, alterações na geração de trombina em pacientes
78 com DRC não foram observadas¹⁰.

79 O Teste de Geração de Trombina (TGT) consiste na avaliação contínua
80 da geração de trombina no plasma após adição de ativadores, como o fator
81 tissular (FT)¹¹. O TGT é capaz de medir o potencial de geração de trombina
82 como um todo e não de forma segmentada como o fazem os métodos
83 coagulométricos convencionais. Testes convencionais como tempo de
84 protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) não são
85 capazes de detectar alterações hemostáticas, portanto, são falhos na
86 estimativa do potencial de trombina. Sabe-se que apenas 5% da trombina
87 gerada já é suficiente para transformar o fibrinogênio em fibrina, levando então
88 ao ponto final da reação de TP e TTPa¹². Em função desta propriedade, os
89 níveis de trombina são subestimados por esses exames de triagem. A trombina
90 tem sido amplamente estudada e um novo modelo para a cascata de
91 coagulação baseado em superfícies celulares foi proposto, no qual a trombina
92 é o principal regulador¹³.

93 A TEM consiste em um ensaio hemostático viscoelástico amplamente
94 utilizado em cenários clínicos, uma vez que se aproxima mais das

95 características de coagulação in vivo em comparação com os testes
96 coagulométricos convencionais. Consiste na mensuração e registro de todo
97 processo de coagulação, desde o início da interação plaqueta-fibrina, da
98 agregação plaquetária e do desenvolvimento do coágulo, até sua eventual lise,
99 sendo capacitada a detectar tanto o estado de hipocoagulabilidade sanguínea
100 com risco hemorrágico, quanto à hipercoagulabilidade com risco trombótico¹⁴.
101 O estado de hipercoagulabilidade já foi caracterizado em cães pelo
102 encurtamento de CT (*Clotting Time*), aumento de MCF (*Maximum Clot*
103 *Firmness*), e ângulo alfa¹⁵.

104 Estudos clínicos são necessários para melhor caracterização do perfil
105 hemostático em cães com doença renal crônica, haja vista a prevalência de
106 DRC de 0,37% a 3,74% em várias populações de cães^{16, 17}. Além das várias
107 complicações como anemia, hiperparatireoidismo secundário renal, gastrite
108 urêmica, e hipertensão¹⁶, a DRC pode cursar também com alterações
109 hemostáticas o que, indubitavelmente, agrava a doença.

110 Diante da lacuna existente no que se refere ao perfil hemostático em cães
111 com DRC, o objetivo do presente estudo foi investigar alterações hemostáticas
112 nesses cães com DRC proteinúrica, por meio de testes que permitem a
113 avaliação global da hemostasia, com vistas a estabelecer um perfil hemostático
114 comparativo valendo-se das duas metodologias.

115

116 **Material e Métodos**

117 **Delineamento experimental**

118 Este foi um estudo observacional transversal, realizado em cães atendidos na
119 rotina do Hospital Veterinário da FMVZ - UNESP entre março de 2014 e
120 fevereiro de 2016, iniciado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de
121 Animais (protocolo no 33/2014).

122

123 **Animais.** Foram utilizados 19 cães com doença renal crônica (DRC) em
124 estágios III e IV, classificados conforme IRIS¹⁸. O critério de inclusão foi à
125 presença de azotemia renal (creatinina sérica > 2mg/dL), razão
126 proteína/creatinina urinária (RPC) > 1,0 e achados característicos na
127 ultrassonografia (p.ex. rins pequenos e irregulares, perda da definição
128 corticomedular renal). Foram excluídos deste grupo os animais que

129 apresentavam neoplasia, doenças infecciosas concomitantes, insuficiência
130 cardíaca congestiva, hepatopatia, nefrolitíase, além de animais em choque ou
131 outra doença que viesse a mascarar e/ou influenciar os resultados dos exames
132 hemostáticos. Animais que fizessem uso de eritropoietina ou medicamentos
133 que interferissem no processo hemostático também foram excluídos do estudo.
134 Os animais com DRC foram subclassificados conforme idade (até 5 anos e > 5
135 anos), sexo, peso (até 20 kg e > 20 kg), grau de proteinúria (RPC até 2,5 e >
136 2,5), grau de anemia (hemoglobina até 8 g/dL e > 8 g/dL) e histórico da doença
137 (até 30 dias e > 30 dias) para análise comparativa do trombograma e TEM. As
138 subclassificações foram determinadas conforme distribuição da população
139 amostral.

140 No mesmo período, 20 cães saudáveis provenientes de proprietários
141 voluntários foram analisados. A seleção dos animais saudáveis foi realizada
142 por meio de hemograma, perfil bioquímico (ureia, creatinina, proteína e frações,
143 ALT, FA, GGT e colesterol e frações), urinálise (incluindo RPC), sendo
144 incluídos aqueles com resultados dentro dos limites de referência^{19,20} e
145 ausência de doença pregressa.

146

147 **Colheita e processamento das amostras.** A colheita de sangue foi realizada
148 em momento único preferencialmente por venopunção jugular com agulha de
149 20G e seringa de 10mL, imediatamente, transferida para tubos com EDTA K3 e
150 citrato de sódio 3,2%, na proporção uma parte de citrato de sódio para 9 partes
151 de sangue. As amostras de urina foram coletadas por cateterismo ou
152 cistocentese e imediatamente analisadas. O hemograma foi realizado em
153 contador hematológico^a, imediatamente após a coleta. As amostras de plasma
154 foram centrifugadas a 1700g por 10 minutos e então mantidas a -80°C até o
155 momento da análise.

156

157 **Geração de trombina.** O trombograma foi realizado em um fluorímetro^c pelo
158 método de CAT (*Calibrated Automated Thrombogram*) desenvolvido por
159 Hemker et al.,¹¹ utilizando reagentes padronizados^d, e de acordo com as
160 instruções do fabricante. Em suma, 80 µL de cada amostra foi colocada nos
161 poços de uma microplaca de ELISA e, em seguida, foram adicionados 20 µL do
162 reagente desencadeador da ativação da coagulação (PPP-Low ou PPP-High

163 *Tissue Factor*). Para cada plasma testado foi feito um poço contendo o mesmo
164 volume de plasma, porém substituindo o agente desencadeador da coagulação
165 por 20 µL do reagente calibrador (*Thrombin calibrator- α2* macroglobulina
166 ligada à trombina). Em seguida, a microplaca foi incubada por 10 minutos à
167 37°C e, então, 20 µL do agente desencadeador da reação com cloreto de
168 cálcio e o agente fluorogênico (FluCa® kit) foram dispensados
169 automaticamente em cada poço pelo fluorímetro. A geração de trombina foi
170 avaliada usando os comprimentos de onda de 390 nm e 460nm para detectar
171 fluorescência durante uma hora. Os dados foram coletados do *software*
172 *Thrombinoscope*^e BV e incluíram o *lagtime* (corresponde ao tempo de
173 coagulação), *peak* (concentração máxima de trombina), *time to peak*
174 (representa o tempo até o máximo de trombina gerada) e *endogenous thrombin*
175 *potential* (ETP) que representa a quantidade de trombina formada em 60
176 minutos.

177

178 **Tromboelastometria:** Três canais foram utilizados simultaneamente para fazer
179 a TEM. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado
180 recalcificado e 20 µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L (startem^b) sendo que a
181 ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal,
182 empregando-se o reagente extem^b (20 µL, tromboplastina tecidual). Foram
183 avaliadas as seguintes variáveis no aparelho ROTEM Delta^b mantido a 37°C
184 durante duas horas: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial
185 de fibrina; Ângulo α: velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada
186 (nível de fibrinogênio); e MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da
187 força/resistência do coágulo.

188

189 **Análise estatística.** O cálculo^f do tamanho amostral (n) foi realizado
190 considerando um poder estatístico de 80%. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado
191 para avaliar a normalidade dos dados. Para a comparação entre os grupos foi
192 aplicado o teste Mann-Whitney U. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para
193 comparar a mediana entre os grupos e o teste de Dunn foi utilizado para ajustar
194 os valores p resultantes de comparações múltiplas. As análises foram
195 realizadas com GraphPad Prism version 5.01 ao nível de 5% de significância.

196

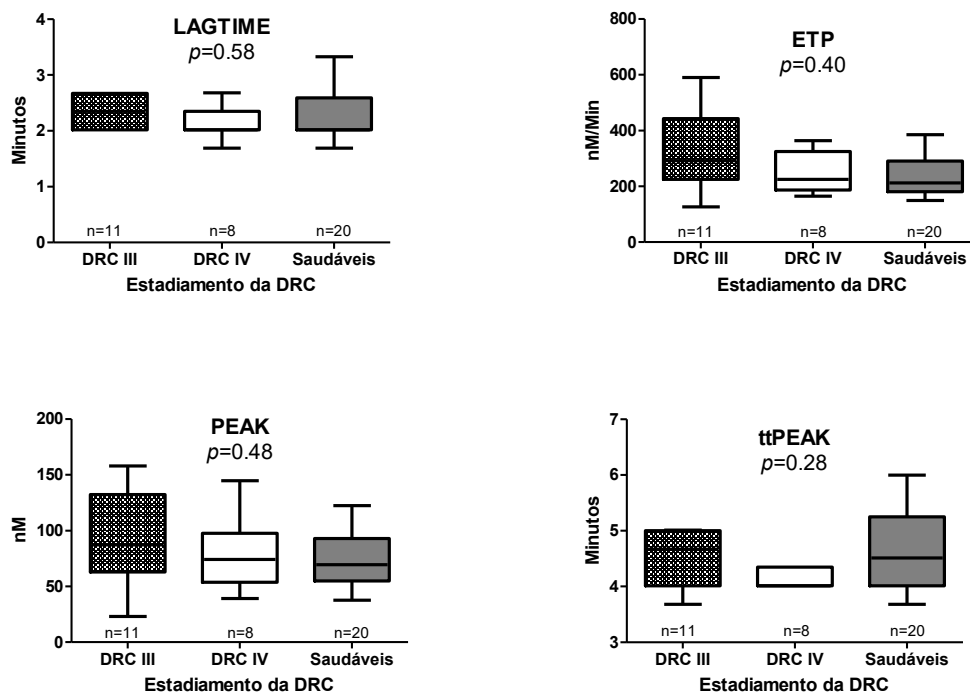
197 Resultados

198 Dezenove cães diagnosticados com DRC proteinúrica foram analisados
199 neste estudo, sendo onze fêmeas e oito machos. A idade média foi de oito
200 anos (8 ± 3 anos). O peso médio dos cães foi de $20(\pm 11,7)$ kg. As raças
201 avaliadas foram Dálmata (1), Weimaraner (1), Yorkshire (1), Rottweiler (1),
202 Pastor Alemão (1), Boxer (1) e sem raça definida (13).

203 O grupo saudável foi composto por 20 cães, 10 fêmeas e 10 machos, com
204 uma idade média de cinco anos ($5 \pm 2,5$ anos). As raças avaliadas foram
205 Border Collie (1), Dachshund (1), Fox Terrier (1), Labrador (6), Lhasa Apso (1),
206 Pitbull (4), Poodle (1), Redhiller (1), Shitzu (1), Yorkshire (1) e sem raça
207 definida (2). A partir dos resultados deste grupo foram obtidos valores de
208 referência para o TGT e a TEM, admitindo um intervalo de confiança de 95%.

209 O grupo DRC proteinúrico em relação aos animais saudáveis, apresentou
210 anemia (Ht: 27% $p < 0,001$, Hb: 8,4g/dL $p < 0,001$), entre normocítica (VCM: 70fL,
211 $p = 0,17$), anemia normocrômica (CHCM: 33, $p < 0,001$) e plaquetas dentro dos
212 valores de referência ($p = 0,80$). O grupo DRC apresentou maior contagem de
213 leucócitos ($11 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $p < 0,05$) em relação ao grupo saudável, mas ambos os
214 grupos estavam dentro dos limites de referência. Onze (11/19) cães foram
215 classificados com DRC em estágio III e 8/19 DRC em estágio IV de acordo com
216 as diretrizes do IRIS¹⁷. Os níveis de albumina foram significativamente
217 reduzidos no grupo DRC (2,3 g/dL, $p < 0,001$) comparados ao grupo saudável.
218 A RPC variou entre 1,4 e 12,4 no grupo DRC proteinúrico, com 16/19 animais
219 apresentando $\text{UPC} > 1,6$.

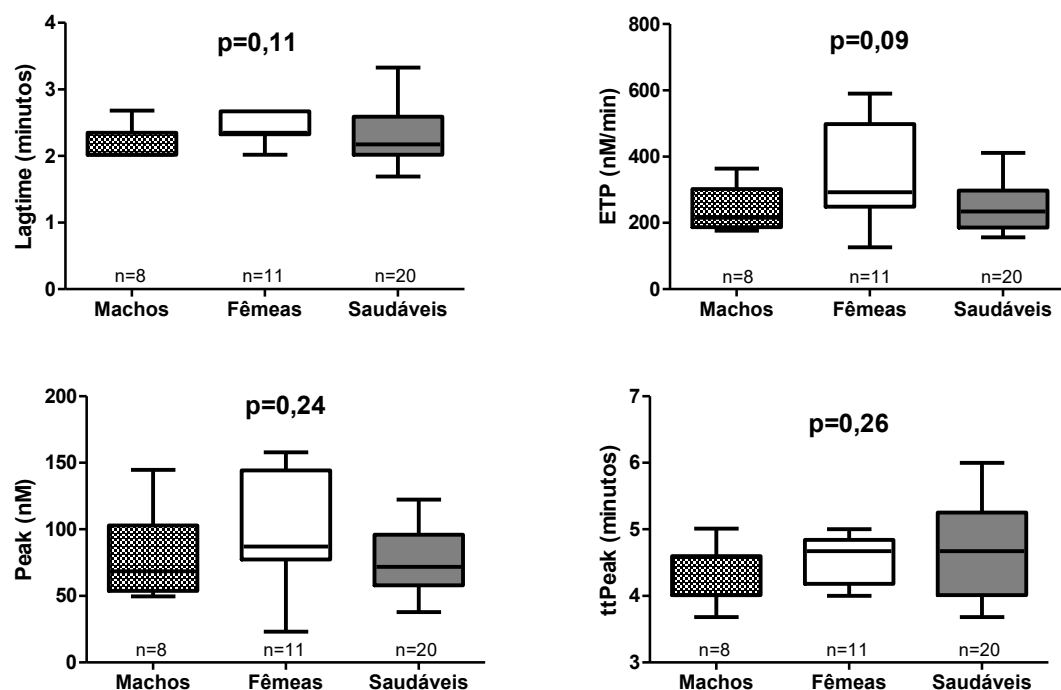
220 Na TEM, os animais com até 20 kg apresentaram valores aumentados de
221 MCF e ângulo α . As demais subclassificações não apresentaram diferenças
222 estatísticas significantes.



223

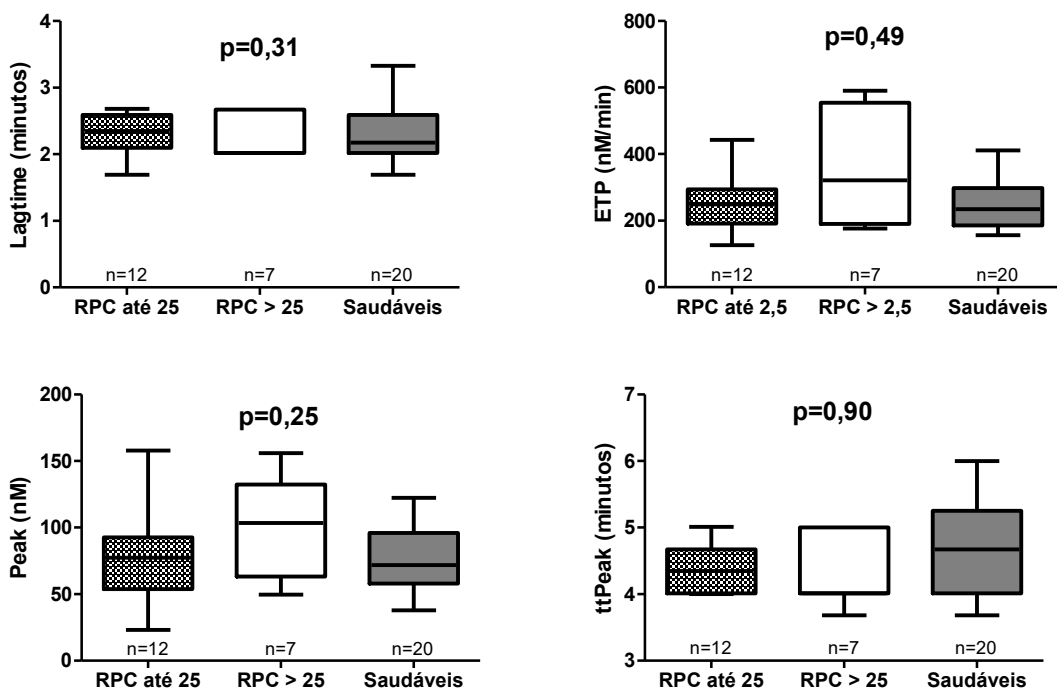
224 Figura 1. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães saudáveis e com DRC graus
 225 III e IV proteinúrica (ETP – Endogenous Thrombin Potential)

226



227

228 Figura 2. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica,
 229 classificados conforme o sexo (ETP – Endogenous Thrombin Potential).



230

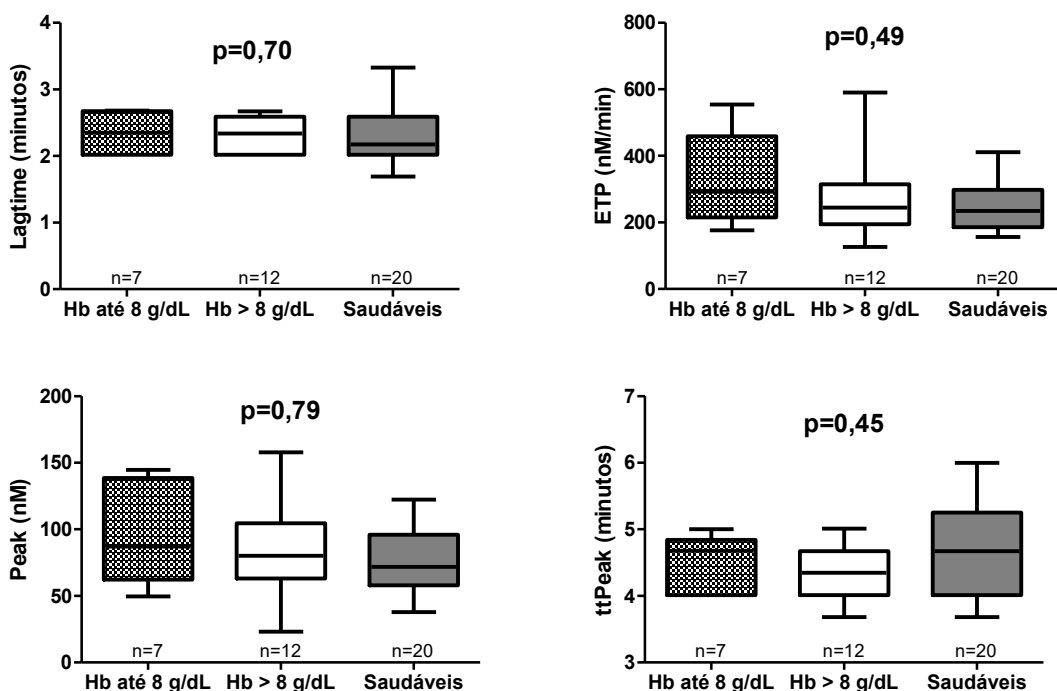
231

232

233

234

Figura 3. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme grau de proteinúria (ETP – Endogenous Thrombin Potential; RPC – razão proteína/creatinina urinária).



235

236

237

238

Figura 4. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme grau de anemia (ETP – Endogenous Thrombin Potential).

239 Tabela 1. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC
240 proteinúrica, classificados conforme o tempo da doença.

	Lagtime (minutos)	ETP (nM/min)	Peak (nM)	ttpeak (minutos)
Valor de referência	2.1-2.5	213-284	66-88	4.3-5.0
Até 30 dias (n=6)	2.3 (1.9-2.4)	268 (181-379)	84 (48-114)	4.3 (4.3-4.8)
> 30 dias (n=13)	2.2 (2.0-2.7)	302 (174-383)	89 (53-148)	4.0 (4.0-4.2)
P	0.93	0.82	0.82	0.05

241 ETP – Endogenous Thrombin Potential; Hb – Hemoglobina; valores expressos em mediana,
242 primeiro (1q) e terceiro quartis (3q).

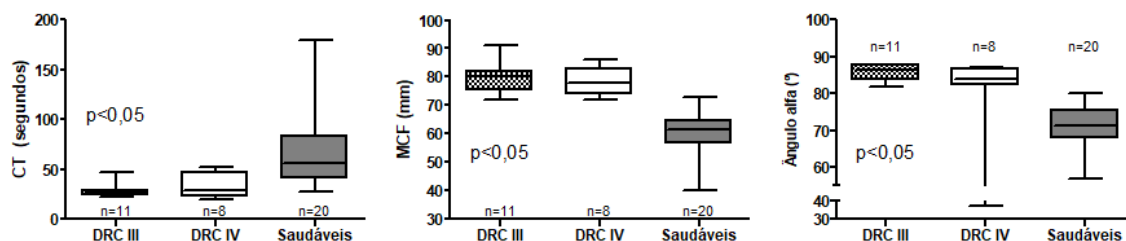
243

244 Tabela 2. Parâmetros do Teste de Geração de Trombina de cães com DRC
245 proteinúrica, classificados conforme o peso.

	Lagtime (minutos)	ETP (nM/min)	Peak (nM)	ttpeak (minutos)
Valor de referência	2.1-2.5	213-284	66-88	4.3-5.0
Até 20 kg (n=8)	2.2 (2.0-2.7)	241 (168-496)	77 (42-126)	4.7 (4.1-4.9)
>20 kg (n=11)	2.3 (2.0-2.3)	273 (204-360)	84 (66-134)	4.0 (4.0-4.3)
P	0.79	0.65	0.44	0.07

246 ETP – Endogenous Thrombin Potential; valores expressos em mediana, primeiro (1q) e
247 terceiro quartis (3q).

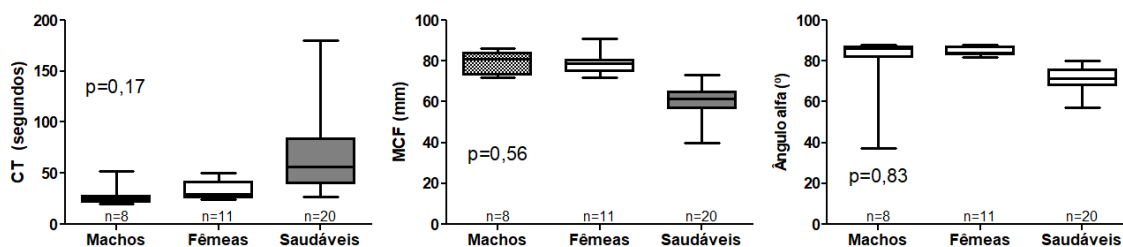
248



249

250 Figura 5. Parâmetros da Tromboelastometria de cães saudáveis e com DRC graus III e IV
251 proteinúrica (EXTEM® - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza
252 máxima do coágulo).

253



254

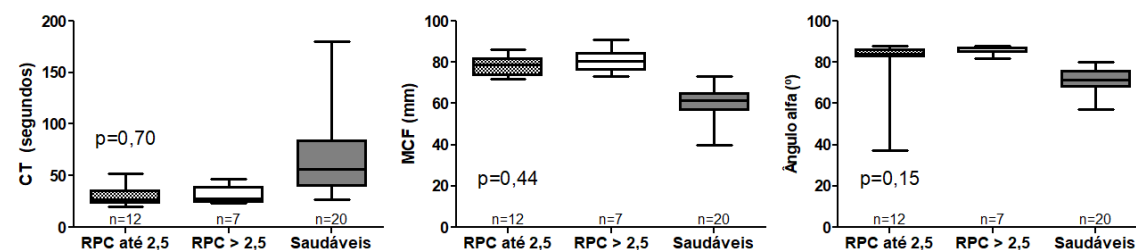
255

256

257

258

Figura 6. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o sexo (EXTEM[®] - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza máxima do coágulo.).



259

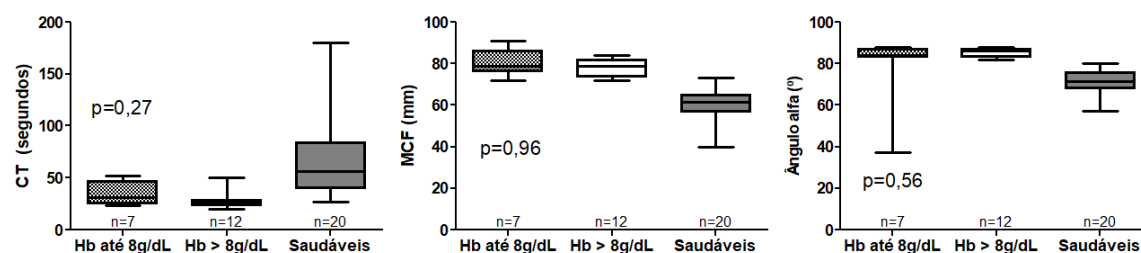
260

261

262

263

Figura 7. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o grau de proteinúria (EXTEM[®] - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza máxima do coágulo; RPC – razão proteína/creatinina urinária).



264

265

266

267

268

Figura 8. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o grau de anemia (EXTEM[®] - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza máxima do coágulo; Hb – Hemoglobina).

269

270

Tabela 3. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica, classificados conforme o tempo da doença.

EXTEM [®]	CT	MCF	Ângulo α
Valor de referência	48 – 83	57 – 64	69 – 74
Até 30 dias (n=6)	28 (24-48)	79 (72-84)	85 (84-87)
\geq 30 dias (n=13)	27 (25-44)	76 (73-81)	82 (59-85)
p	0.78	0.78	0.08

271 EXTEM[®] - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza máxima do
 272 coágulo; valores expressos em mediana, primeiro (1q) e terceiro quartis (3q).

273

274 Tabela 4. Parâmetros da Tromboelastometria de cães com DRC proteinúrica,
 275 classificados conforme o peso.

EXTEM [®]	CT	MCF	Ângulo α
Valor de referência	48 – 83	57 – 64	69 – 74
Até 20 kg (n=8)	27 (23-31)	82 (79-84)	87 (86-87)
>20 kg (n=11)	26 (24-46)	75 (72-78)	83 (82-85)
p	0.77	0.02	0.02

276 EXTEM[®] - Ativador de fator tecidual; CT - Tempo de coagulação; MCF - Firmeza máxima do
 277 coágulo; valores expressos em mediana, primeiro (1q) e terceiro quartis (3q).

278

279 **Discussão**

280 Este estudo visou compreender melhor as alterações hemostáticas devido
 281 a DRC em cães nos estágios III e IV por meio da utilização de dois testes de
 282 avaliação global da hemostasia, incluindo o TGT e a TEM. Além disso, não há
 283 relatos do potencial de geração de trombina em cães com DRC.

284 De todos os parâmetros do TGT, o potencial de trombina endógeno (ETP)
 285 parece ser o mais amplamente empregado, com melhor correlação ao fenótipo
 286 clínico²¹. No entanto, de acordo com nossos resultados, nenhum parâmetro do
 287 TGT realizado com fator tissular em baixa concentração (1 pM) foi capaz de
 288 discriminar entre grupo saudável e cães com DRC (Tabela 1). Apesar de não
 289 significativo, é importante caracterizar que cães com DRC III tiveram maiores
 290 valores de ETP ($p=0.40$) e *peak* ($p=0.48$). Os achados do TGT são,
 291 provavelmente, explicados pela associação dos fatores de redução dos
 292 anticoagulantes naturais pela proteinúria na DRC, bem como da
 293 hiperfibrinogenemia nesses pacientes.

294 Todavia, quando os animais doentes foram estratificados quanto às
 295 diversas variáveis, alguns achados merecem ser discutidos. Dessa forma,
 296 fêmeas apresentaram ETP com tendência à elevação ($p=0.09$) em comparação
 297 aos machos. Isso pode ser explicado parcialmente devido a fatores hormonais
 298 que podem contribuir para aumento da geração de trombina. Uma vez que em

299 humanos, mulheres que utilizam contraceptivos orais apresentam o potencial
300 de geração de trombina potencializado²², pode-se inferir que diferentes
301 hormônios possam influenciar de forma diferente no perfil hemostático.

302 Pacientes com anemia grave (hemoglobina < 8g/dL) apresentaram ETP
303 numericamente maior que os demais, apesar do valor de $p=0,49$. Em humanos,
304 há aumento do potencial endógeno de trombina com o aumento do
305 hematócrito, pela maior exposição dos fosfolípidos de membrana²³. O aumento
306 do ETP observado neste estudo pode ser compreendido, pela maior exposição
307 das plaquetas. A anemia normocítica e normocrômica na DRC ocorre
308 proporcional ao grau de deficiência em eritropoetina, ao mesmo tempo em que
309 ocorrem lesões endoteliais mais significativas provocadas pelo agravamento da
310 doença renal¹⁶. Dessa forma, em decorrência de tais lesões, haveria ativação
311 de plaquetas e do mecanismo hemostático, sendo a principal superfície de
312 ativação para a geração de trombina²⁴. Além disso, a diminuição da
313 competência do sistema da anticoagulação natural (devido à proteinúria),
314 fatores favorecedores de maior geração de trombina. A viscosidade do sangue
315 é independente do volume de eritrócitos²⁵, mesmo com a presença da anemia
316 a hipercoagulabilidade ficou caracterizada nos pacientes com DRC.

317 A proteinúria estava presente em todos os pacientes com DRC, porém
318 animais com perda mais intensa de proteínas (RPC > 2,5), apresentaram maior
319 potencial de geração de trombina ($p=0,49$) (Tabela 3). Apesar de não haver
320 diferença significativa, o aumento numérico pode ser explicado, pelo menos
321 parcialmente, pela ocorrência de expressiva lesão renal o que facilitaria a perda
322 de antitrombina na urina²⁶. A proteína S, também é um anticoagulante natural e
323 sua perda urinária também ocorre na DRC. Sabe-se que apenas 40% da PS
324 desempenha a função anticoagulante (PS livre), enquanto o restante circula
325 ligada a C4bBP (proteína ligadora de C4b), a qual aumenta nos processos
326 inflamatórios como é o caso da DRC. O processo inflamatório contribui para a
327 redução da PS livre (anticoagulante) e maior formação do complexo PS-
328 C4bBP, contribuindo mais para a geração de trombina²⁶, e consequente estado
329 de hipercoagulabilidade.

330 De acordo com o tempo de doença, foi observado no presente estudo que
331 aqueles cães com > 30 dias de diagnóstico apresentaram *tpeak* menor
332 ($p=0,05$) em comparação aos com diagnóstico recente, o que sinaliza para uma

333 maior rapidez para atingir o pico da reação. Isso poderia estar relacionado com
334 um discreto aumento, embora não significativo, na geração de trombina,
335 justificável pelo agravamento da doença com o passar do tempo.

336 O sobrepeso e/ou obesidade já foi associado como fator preditivo de
337 evento trombótico em humanos²⁷. Com relação à variável peso, no presente
338 estudo foi observado que cães doentes com maior peso apresentaram *ttpeak*
339 com tendência à redução ($p=0.07$) em comparação àqueles com menor peso.
340 Isso poderia estar relacionado também com um discreto aumento, embora não
341 significativo, na geração de trombina justificável pelo maior peso.

342 Quando os resultados da TEM foram comparados entre os grupos,
343 diferenças significativas foram observadas para os parâmetros CT, MCF e
344 ângulo α (Tabela 7). Tal fato sinaliza para uma discriminação melhor entre cães
345 doentes e saudáveis. A TEM parece ser mais eficiente para a detecção de
346 alterações hemostáticas do que o TGT nos grupos estudados por nós. Partindo
347 do princípio que a TEM é sensível às alterações dos níveis de fibrinogênio e
348 que o TGT não o é, pode-se admitir que provavelmente os níveis desta
349 proteína coagulante estivessem mais elevados nos animais com DRC, o que é
350 bastante compatível com a fisiopatologia da doença renal^{16,17}. Não se pode
351 excluir também o papel dos elementos figurados do sangue neste processo de
352 investigação de alterações hemostáticas em cães com DRC, os quais
353 contribuiriam com exposição de fator tecidual potencializando a ativação da
354 cascata de coagulação e consequente formação de fibrina.

355 Quando os animais com DRC foram estratificados quanto à idade, sexo,
356 grau de proteinúria e grau de anemia, tais variáveis não foram capazes de
357 influenciar no perfil hemostático revelado pela TEM. Tal fato talvez seja
358 explicado pelo poder limitado do tamanho amostral que não foi capaz de
359 acusar pequenas diferenças intrasubgrupos.

360 Apesar das limitações de informações nas fichas clínicas dos pacientes, o
361 histórico permite avaliar há quanto tempo o paciente com DRC sofre com as
362 alterações fisiopatológicas decorrentes da doença. Segundo os nossos dados
363 de TEM, observou-se uma tendência ($p=0.08$) a aumento do ângulo α em
364 função do menor tempo da doença, bem como no cães até 20 kg ($p=0,02$).
365 Apesar do angulo alfa não ser específico, pode estar sinalizando para aumento
366 da função plaquetária, da concentração de fibrinogênio e/ou dos fatores de

367 coagulação¹⁴. Além disso, o diagnóstico recente da doença e menor tempo de
368 tratamento, poderiam refletir mais graves alterações hemostáticas devido ao
369 período de tratamento e compensação do paciente. O escore corporal dos
370 animais não foi incluído, sendo um limitante para interpretação no subgrupo
371 com relação ao peso. Considerando as diversas raças incluídas no estudo e
372 que cães SRD apresentam portes diversos, não podemos atribuir este achado
373 a ausência de sobrepeso nesses pacientes.

374 A TEM foi capaz de detectar aumento do MCF e ângulo α nos cães com
375 DRC, em comparação aos saudáveis. Tal observação pode ter grande
376 relevância clínica quanto ao protocolo terapêutico antitrombótico. No entanto,
377 estudos mais robustos são necessários para se entender melhor as alterações
378 hemostáticas em cães com DRC.

379 Uma análise conjunta dos dados revela que a TEM conseguiu discriminar
380 melhor entre cães saudáveis e com DRC. No entanto, quando houve
381 estratificação da amostra de cães doentes, observou-se certa concordância de
382 resultados para os dois métodos utilizados para avaliação da hemostasia.
383 Dessa forma, cumpre ressaltar que tanto o TGT quanto a TEM acusaram
384 alterações hemostáticas. Sugerindo hipercoagulabilidade até 30 dias de
385 diagnóstico bem como naqueles cães com menos de 20 kg, principalmente na
386 TEM.

387 Considerando o contexto multifatorial das alterações hemostáticas na
388 DRC, são necessários mais estudos clínicos para compreender melhor e
389 determinar os valores preditivos dos testes hemostáticos globais no risco
390 trombotico ou hemorrágico da DRC. Tal conhecimento poderia se reverter em
391 ações terapêuticas profiláticas adequadas em tais pacientes contribuindo para
392 uma melhor qualidade de vida e maior sobrevida.

393 A tromboelastometria é uma ótima ferramenta para avaliação
394 hemostática, porém sua aplicabilidade fica restrita a centro de atendimento
395 intensivo e hospitais, devido ao tempo curto para processamento da amostra.
396 Em contra partida, o teste de geração de trombina permite o armazenamento
397 de amostras de plasma citratado para posterior análise, permitindo sua
398 realização em laboratórios. Porém uma técnica não substitui a outra, ambas se
399 complementam.

400

401 Conclusões

402 A tromboelastometria é mais sensível para detectar a
403 hipercoagulabilidade em cães com DRC. Entretanto, o teste de geração de
404 trombina tem melhor aplicabilidade por permitir o armazenamento da amostra
405 em longo prazo.

406

407 Referências

- 408 1. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thürmel K. Haemostasis in
409 chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:29-40.
- 410 2. Eberst ME, Berkowitz LR. Hemostasis in renal disease: pathophysiology
411 and management. *The American Journal of Medicine* 1994;96:168-179.
- 412 3. Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born
413 method in normal and uraemic dogs. *The Veterinary Journal* 2004;168:270-
414 275.
- 415 4. Sohal AS, Gangji AS, Crowther MA, Treleaven D. Uremic bleeding:
416 pathophysiology and clinical risk factors. *Thrombosis Research*
417 2006;118:417-422.
- 418 5. Marques M, Sacristán D, Mateos-Cáceres PJ, Herrero J, Arribas MJ,
419 González-Armengol JJ, Villegas A, Macaya C, Barrientos A, López-Farré
420 AJ. Different protein expression in normal and dysfunctional platelets from
421 uremic patients. *Journal Nephrology* 2010;23:90-101.
- 422 6. Falco S, Zanatta R, Bruno B, Maurella C, Scalone A, Tarducci A, Borrelli A.
423 Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with
424 kidney diseases. *Acta Veterinaria Brno* 2013;82:209-214.
- 425 7. Lennon M, Hanel RM, Walker JM, Vaden SL. Hypercoagulability in dogs
426 with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography.
427 *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013;27:462-468.
- 428 8. Gonçalves, DS. Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas
429 em cães com doença renal crônica [dissertação]. Botucatu (SP):
430 Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2016.
- 431 9. Dudley A, Byron JK, Burkhard MJ, Warry E, Guillaumin J. Comparison of
432 platelet function and viscoelastic test results between healthy dogs and
433 dogs with naturally occurring chronic kidney disease. *American Journal*
434 *Veterinary Research* 2017;78:589-600.

- 435 10. Trappenburg MC, Schilfgaarde MV, Frerichs FCP, Spronk HMH, Cate HT,
436 Fijter CWH, Terpstra WE, Leyte A. Chronic renal failure is accompanied
437 by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers
438 with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant*
439 2012;27:1446-1453.
- 440 11. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated Automated Thrombin
441 Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology and*
442 *Thrombosis of Haemostasis* 2003;33:4-15.
- 443 12. Lecut C, Peters P, Massion PB, Gothot A. Is there a place for thrombin
444 generation assay in routine clinical laboratory? *Annales de biologie Clinique*
445 2015;72:137-149.
- 446 13. Smith SA, The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary*
447 *Emergency and Critical Care* 2009;19:3-10.
- 448 14. Kol A, Borjesson L. Application of thrombelastography/thromboelastometry
449 to veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology* 2010;39:405-416.
- 450 15. Hanel RM, Chan DL, Conner B, Gauthier V, Holowaychuk M, Istvan S,
451 Walker JM, Wood D, Goggs R, Wiinberg B. Systematic evaluation of
452 evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data
453 reporting. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2014;24:47-
454 56.
- 455 16. Polzin, D. J. Chronic kidney disease in small animals. *The Veterinary*
456 *Clinics of North America. Small animal practice* 2011;41:15–30.
- 457 17. O'Neill DG, Elliott J, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt
458 DC. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices:
459 prevalence, risk factors, and survival. *Journal Veterinary Internal Medicine*
460 2013;27:814-821.
- 461 18. IRIS, Staging of Chronic Kidney Disease, modificado 2018. [http://www.iris-](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf)
462 [kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf). Acessado
463 2018.
- 464 19. Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the dog.
465 In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa:
466 Willey-Blackwell; 2010. p.799-810.
- 467 20. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Blood analyte reference values in small
468 and some laboratory animals In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML,

- 469 editors. *Clinical Biochemistry Of Domestic Animals*. California: Elsevier;
470 2008. p.81-115.
- 471 21. Lipets EN, Ataulakhanov FI. Global assays of hemostasis in the
472 diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk.
473 *Thrombosis Journal* 2015;13:1-15.
- 474 22. Brummel-Ziedins KE, Vossen CY, Butenas S, Mann KG, Rosendaal FR.
475 Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis. *Journal of*
476 *Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:2497–2505 .
- 477 23. Horne MK, Cullinane AM, Merryman PK, Hoddeson EK. The effect of red
478 blood cells on thrombin generation. *British Journal Haematology*
479 2006;133:403-408 .
- 480 24. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin
481 generation. *Thrombosis Research* 2013;131:377-382.
- 482 25. Brooks AC, Guillaumin J, Cooper ES, Couto C. Effects of hematocrit and
483 red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic
484 tracings. *Transfusion* 2014;54:727-734.
- 485 26. Prihirunkit K, Lekcharoensuk C, Pooripanpipat S, Tipsawek S. Alteration of
486 some natural anticoagulants in dogs with chronic renal failure.
487 *Comparative Clinical Pathology* 2011;20:217–221.
- 488 27. Beijers HJBH, Ferreira I, Spronk HMM, Bravenboer B, Dekker JM, Nijpels
489 G, Cate H, Stehouwer CDA. Body Composition as Determinant of
490 Thrombin Generation in Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*
491 *Vascular Biology* 2010;30:2639-2647.

492

493 Notas:

494 ^a Sysmex® - Poch - 100iV – Miami, Estados Unidos;

495 ^b Pentapham, Munique, Alemanha;

496 ^c Fluoroskan Ascent Analyser, Thermo Scientific, Shanghai, China

497 ^d Diagnostica Stago, Assiernes, France

498 ^e Thrombinoscope BV®, Maastricht, Netherlands

499 ^f Statstodo Trading Pty Ltd;

500

7. DISCUSSÃO GERAL

Não há relatos da avaliação de cães com doença renal crônica pela geração de trombina. A realização deste trabalho vem ampliar as aplicações já exploradas dessa ferramenta na medicina veterinária.

A geração de trombina já foi validada para aplicação em cães (CUQ et al., 2018) e se mostrou eficiente na avaliação de cães com hiperadrenocorticismo (ROSE et al., 2013), na avaliação terapêutica com glicocorticoides (ROSE et al., 2011), processos neoplásicos (GRUBER et al., 2016), da anticoagulação promovida pela aplicação de heparina (ALLEGRET et al., 2011) e na avaliação terapêutica com plasma de pacientes hemofílicos (MADSEN et al., 2017). Porém da presença de trombose a geração de trombina não apresentou alterações (DENGATE et al., 2016).

A geração de trombina pelo método CAT é uma técnica para medir a produção de trombina. Muitas outras variáveis são medidas porém a mais importante é o ETP, que representa a quantidade de trombina na amostra ao longo do tempo. O aumento da ETP sugere um aumento do potencial trombótico, enquanto diminuiu ETP sugere hipocoagulabilidade (HEMKER et al., 2003). Esta ferramenta vem possibilitar caracterizar os achados de hipercoagulabilidade em cães com doença renal e proteinúria (ADAMS et al., 2008; JALAL et al., 2010; LITTMAN M.P. 2011).

O TGT não detectou diferenças entre cães com DRC proteinúrico e saudáveis. Estudos veterinários com limitado tamanho amostrais demonstraram também o perfil de hipercoagulabilidade, embora não tenham sido associados a risco de trombose (ROSE et al., 2011; ROSE et al., 2013). Na população de cães estudada os resultados do TGT foram maiores para o ETP e *peak*, mesmo não havendo significância estatística. Curiosamente, os aumentos de ETP e do *peak* já foram descritos em cães com blastomicose, uma condição associada à hipercoagulabilidade (MCMICHAEL et al., 2015). Os achados do TGT são, provavelmente, explicados pela associação dos fatores de redução dos anticoagulantes naturais pela proteinúria na DRC, bem como da hiperfibrinogenemia nesses pacientes.

Cães com DRC proteinúrica foram previamente descritos com hipercoagulabilidade por TEM (GONÇALVES, 2016). As concentrações de fator tecidual utilizadas para o ensaio CAT foram Low (1pM) e High (5pM) conforme

publicações anteriores (MCMICHAEL et al., 2015; MADSEN et al., 2017; CUQ et al., 2018). No entanto, a aplicação de alta concentração de TF não permitiu a detecção da geração de trombina, pois as amostras coagularam antes do início da leitura. Uma das limitações deste estudo foi o tempo de armazenamento das amostras por mais de 12 meses. Em estudos veterinários anteriores, o armazenamento de amostras variaram de 2 a 31 meses (ALLEGRET et al., 201; ROSE et al., 2011; ROSE et al., 2013). Além disso, algumas amostras foram recongeladas e depois analisadas. O descongelamento promove a ruptura das plaquetas e seus fragmentos contribuem para o aumento da coagulação, ativando o fator V (SEGHATCHIAN, et al 1997). Enquanto isso dificulta a comparação dos resultados com outros estudos, a concentração de *Low* foi a mesma para cães saudáveis e DRC, sugerindo que a avaliação por *High* TF foi afetada devido à interferência do tempo de armazenamento da amostra.

O aumento das concentrações de fibrinogênio e o aumento da força do coágulo foram evidenciados em cães com nefropatia e proteinúria (LENNON et al., 2013), doenças renais (FALCO et al., 2013) e DRC proteinúrica (GONÇALVES, 2016). O teste de geração de trombina não é afetado pela concentração de fibrinogênio (HEMKER et al., 2003). O aumento do fibrinogênio já foi observado em estudos anteriores (GONÇALVES, 2016) em cães com DRC, e neste estudo não houve diferença significativa para TG.

Em humanos, a conhecida disfunção plaquetária na DRC, o aumento do fibrinogênio parece ser responsável pela hipercoagulabilidade observada como mecanismo compensatório para normalizar a hemostasia na presença de disfunção plaquetária (LUTZ et al., 2014; HOLLOWAY et al., 1987; VELIK-SALCHNER²⁷ et al., 2007). Níveis elevados de fibrinogênio têm se mostrado correlacionados com complicações miocárdicas em humanos com DRC no estágio 5 (ZOCCALI et al., 2003). Isso apoia a teoria de que a hiperfibrinogenemia está associada a maior coagulação, avaliada pelo aumento da MCF, sendo a mecânica da patofisiologia das coagulopatia e das complicações como trombose em pacientes com DRC.

As técnicas aplicadas neste estudo são ótimas ferramentas para avaliação da hemostasia, porém a aplicação prática de ambas tem características distintas. A TEM utiliza sangue total em citrato, por esse motivo,

exige cuidado na manipulação e transporte da amostra, bem como um processamento rápido de no máximo em 2 horas após a coleta. Esta característica faz da TEM um ferramente útil em centros de atendimento intensivo e hospitalar. Porém não permite sua aplicação em laboratórios comerciais, devido a viabilidade da amostra. Em contra partida, o TGT por utilizar plasma citratado, permite a coleta e armazenamento da amostra a longo prazo sem comprometer os resultados. Portanto, esta é uma técnica aplicável a laboratórios independentes, pois garante que médicos veterinários colem as amostras e enviem com segurança.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não haverem diferenças estatísticas significativas, os achados de geração de trombina em cães com DRC e proteinúria sugerem ser mais sensíveis as variáveis clínico patológicas dos pacientes, sendo o ETP o parâmetro mais sensível. A TEM foi capaz de detectar a hipercoagulabilidade nos cães com doença renal crônica, porém para realizar associações causais com os achados clínicos são necessários ensaios clínicos randomizados para o auxílio clínico, como medidas terapêuticas profiláticas aos eventos trombóticos.

9. CONCLUSÃO

Cães com DRC não apresentam diferença nos parâmetros do Teste de Geração de Trombina quando comparados a animais saudáveis.

A tromboelastometria é mais sensível para identificar hipercoagulabilidade em cães com DRC.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.J.; IRISH, A.B.; WATTS, G.F.; OOSTRYCK, R.; DOGRA, G.K. Hypercoagulability in chronic kidney disease is associated with coagulation activation but not endothelial function. *Thrombosis Research*, v.123, n.2, p.374–380, 2008.
- ALLEGRET, V.; DUNN, M.E.; BÉDARD, C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology*, v.40, n.1, p.24-31, 2011.
- BALLARD, H.S.; MARCUS, A.J. Primary and Secondary platelet aggregation in uraemia. *Scandinavian Journal of Haematology* v.9, p.198-203, 1972.
- BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America*. Small animal practice, v.42, n.4, p.669–92, 2012.
- BERNTORP, E.; SALVAGNO, G.L. Standardization and Clinical Utility of Thrombin-Generation Assays. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.34, p.670-682, 2008.
- BROOKS, A.C.; GUILLAUMIN, J.; COOPER, E.S.; COUTO, C.G. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. *Transfusion* v.54, n.3, p.727-734, 2014.
- BUTENAS, S. Tissue Factor Structure and Function. *Scientifica*, v.2012, p.1-15, 2012.
- CASTOLDI, E.; ROSING, J. Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*, v.127, s.3, p.s21-25, 2011.
- COLLET, J.P.; MONTALESCOT, G. Platelet function testing and implications for clinical practice. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, v.14, n.3, p.157–69, 2009.
- CUQ, B.; BLOIS, S.L.; WOOD, R.D.; MONTEITH, G.; ABRAMS-OGG, A.C.; BEDARD, C.; WOOD, G.A. Reproducibility, stability, and biological variability of thrombin generation using calibrated automated thrombography in healthy dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v.47, p.218-226, 2018.
- DIERI, R.A.; LAAT, B.; HEMKER, H.C. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews*, v.26, p.197-203, 2012.
- DONAHUE, S. M.; BROOKS, M.; OTTO, C. M. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein losing nephropathy. *Veterinary Emergency and Critical Care Society*, v.21, n.4, p.346–355. 2011.

DONAHUE, S.M.; OTTO, C.M. Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.15, n.1, p.9–16, 2005.

EBERST, M. E.; BERKOWITZ, L. R. Hemostasis in Renal Disease: Pathophysiology. *The American Journal of Medicine*, v.96, p.168–179, 1994.

FALCO, S.; ZANATTA, R.; BRUNO, B.; MAURELLA, C.; SCALONE, A.; TARDUCCI, A.; BORRELLI, A. Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with kidney diseases. *Acta Veterinaria Brno*, v.82, p.209-214, 2013.

FAURE, V.; DOU, L.; SABATIER, F.; CERINI, C.; SAMPOL, J.; BERLAND, Y.; BRUNET, P.; DIGNAT-GEORGE, F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.4, p.566-573, 2006.

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 thromboelastography. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.238, p.463-467, 2011.

FORSYTHE, L.T.; JACKSON, M.L.; MERIC, S.M. Whole blood platelet aggregation in uremic dogs. *American Journal Veterinary Research* v. 50, n. 10, p. 1754-1757, 1989.

GAFTER, U.; BESSLER, H.; MALACHI, T.; ZEVIN, D.; DJALDETTI, M.; LEVI, J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. *Nephron* v.45, p.207-210, 1987.

GARA-BOIVIN, C.; DEL CASTILLO, J.R.E.; DUNN, M.E.; BÉDARD, C. *In vitro* effects of dalteparin on thrombin generation in canine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, v.46, n.3, p.442-450, 2017.

GONÇALVES, DS. Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2016.

GORDGE, M.P.; FAINT, R.W.; RYLANCE, P.B.; NEILD, G.H. Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure. *Thrombosis and Haemostasis* v.60, n.1, p.83-87, 1988.

GRUBER, E.J.; CATALFAMO, J.L.; STOKOL, T. Role of tissue factor expression in thrombin generation by canine tumor cells. *American Journal Veterinary Research*, v.77, p.404-412, 2016.

HACKNER, S.G.; SCHAER, B.D. Thrombotic Disorders In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 87, p. 668-678.

HANEL, R.M.; CHAN, D.L.; CONNER, B.; GAUTHIER, V.; HOLOWAYCHUK, M.; ISTVAN, S.; WALKER, J.M.; WOOD, D.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* v.24, n.1, p. 47-56, 2014.

HARRISON, P. Platelet function analysis. *Blood reviews*, v.19, n.2, p.111–23, 2005.

HEMKER, H.C.; GIESEN, P.; AL DIERI, R.; REGNAULT, V.; SMEDT, E.; WAGENVOORD, R.; LECOMPTE, T.; BÉGUIN, S. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiology and Thrombosis of Haemostasis*, v.33, p.4-15, 2003.

HEMKER, H.C.; WIELDERS, S.; KESSELS, H.; BÉGUIN, S. Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin Potential. *Thrombosis and Haemostasis*, v.70, n.4, p.617-624, 1993.

HOLLOWAY, D.S.; VAGHER, J.P.; CAPRINI, J.A.; SIMON, N.M.; MOCKROS, L.F. Thrombelastography of blood from subjects with chronic renal failure. *Thrombosis Research*, v.45, p.817-825, 1987.

IRIS, Staging of Chronic Kidney Disease, modified 2018. http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf. Acessado em 2018.

JACOB, F.; POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; NEATON, J.D.; KIRK, C.A.; ALLEN, T.A.; SWANSON, L.L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* v.226, n.3, p.393-400, 2005.

JALAL, D.I.; CHONCHOL, M.; TARGHER, G. Disorders of Hemostasis Associated with Chronic Kidney Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.36, p.34-40, 2010.

KAW D.; MALHOTRA D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis*. v.19, n.4, p.317-322, 2006.

KELLER, C.; KATZ, R.; CUSHMAN, M.; FRIED, L. F.; SHLIPAK, M. Association of kidney function with inflammatory and procoagulant markers in a diverse cohort: a cross-sectional analysis from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *BMC nephrology*, v.9, p.9, 2008.

KERLIN, B.A.; WALLER, A.P.; SHARMA, R.; CHANLEY, M.A.; NIEMAN, M.T.; SMOYER, W.E. Disease Severity Correlates with Thrombotic Capacity in Experimental Nephrotic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.26, n.12, p.3009-3019, 2015.

KOL, A.; BORJESSON, D. L. Application of thrombelastography / thromboelastometry to veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39, n.4, p.405–16, 2010.

- KUZI, S.; SEGEV, G.; HARUVI, E.; AROCH, I. Plasma Antithrombin Activity as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Dogs: A Retrospective Study of 149 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n.3, p. 587-596, 2010.
- LANG, T.; JOHANNING, K.; METZLER, H.; PIEPENBROCK, S.; SOLOMON, C.; RAHE-MEYER, N.; TANAKA, K.A. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. *Anesthesia & Analgesia* v.108, n.3, p.751-758, 2009.
- LAU, S. O.; TKACHUCK, J. Y.; HASEGAWA, D. K.; EDSON, J. R. Plasminogen and antithrombin III deficiencies in the childhood nephrotic syndrome associated with plasminogenuria and antithrombinuria. *The Journal of Pediatrics*, v.96, p.390–392, 1980.
- LECUT, C.; PETERS, P.; MASSION, P.B.; GOTHOT, A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? *Annales de biologie Clinique*, v.72, n.2, p.137-49, 2015.
- LENNON, M.; HANEL, R.M.; WALKER, J.M.; VADEN, S.L. Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, n.3, p. 462-468, 2013.
- LINDSAY, R.M.; CLARK, W.F. Platelet destruction in renal disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.8, n.2, p.138-155, 1982.
- LIPETS, E.N.; ATAULLAKHANOV, F.I Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thrombosis Journal*, v.13, n.4, 2015.
- LISMAN, T.; DE GROOT, P. G.; MEIJERS, J. C. M.; ROSENDAAL, F. R. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood*, v.105, n.3, p.1102-1105, 2005.
- LITTMAN, M.P. Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Veterinary Clinical Small Animal*, v.41, p.31-62, 2011.
- LUTZ, J.; MENKE, J.; SOLLINGER, D.; SCHINZEL, H.; THURMEL, K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.29, p.29-40, 2014.
- MACDOUGALL, I.C. Anaemia of chronic kidney disease. *Medicine* v.35, n.8, p.457-460, 2007.
- MADSEN, D.E.; NICHOLS, T.C.; MERRICKS, E.P.; WATERS, E.K.; WIINBERG, B. Global measurement of coagulation in plasma from normal and haemophilia dogs using a novel modified thrombin generation test – Demonstrated *in vitro* and *ex vivo*. *PLoS ONE*, v.12, n.4, 2017.

MALYSZKO J.; MALYSZKO J.S.; MYSLIWIEC M.; BUCZKO W. Hemostasis in chronic renal failure. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*. v.50, p.126-131, 2005.

MANNUCCIO, P.M.; TRIPODI, A. Hemostatic defects in liver and renal dysfunction. *American Society of Hematology*, p.168-173, 2012.

MARQUES, M.; SACRISTÁN, D.; MATEOS-CÁCERES, P.J.; HERRERO, J.; ARRIBAS, M.J.; GONZÁLEZ-ARMENGOL, J.J.; VILLEGAS, A. MACAYA, C.; BARRIENTOS, A.; LÓPEZ-FARRÉ, A.J. Different protein expression in normal and dysfunctional platelets from uremic patients. *Journal Nephrology*, v.23, n.1, p.90-101, 2010.

MCMICHAEL, M.A.; SMITH, S.A.; GALLIGAN, A.; SWANSON, K.S. *In vitro* hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* v.43, n.2, p.154-163, 2014.

MCMICHEL, M.A.; O'BRIEN, M.; SMITH, S.A. Hypercoagulability in Dogs with Blastomycosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.29, p.499-504, 2015.

MEADE, T.W.; VICKERS, M.V.; THOMPSON, S.G.; SEGATCHIAN, M.J. The effect of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation. *Thrombosis Research* v.38, p. 527-534, 1985.

MISCHKE, R.; SCHULZE, U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *The Veterinary Journal*, v.168, p.270-275, 2004.

MOREL, O.; MOREL, N.; FREYSSINET, J.; TOTI, F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets*, v.19, n.1, p.9-23, 2008.

NINIVAGGI, M.; APITZ-CASTRO, R.; DARGAUD, Y.; DE LAAT, B.; HEMKER, H.C.; LINDHOUT, T. Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clinical Chemistry*, v.58, n.8, p.1252-1259, 2012.

O'NEILL, D.G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D.B; MCGREEVY, P.D. Chronic Kidney Disease in Dogs in UK Veterinary Practices: Prevalence, Risk Factors, and Survival *Journal Veterinary Internal Medicine* v.27, p.814-821, 2013.

OTTO, C.M.; RIESER, T.M.; BROOKS, M.B.; RUSSELL, M.W. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.217, n.10, p.1500-1504, 2000.

PAVORD, S.; MYERS, B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. *Blood Reviews* v.25, p.271-278, 2011.

PICCIN, A.; MURPHY, W.G.; SMITH, O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*, v.21, p.157-171, 2007.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*, v.41, n.1, p.15–30, 2011.

PRIHIRUNKIT, K.; LEKCHAROENSUK, C.; POORIPANPIPAT, S.; TIPSAWEK, S. Alteration of some natural anticoagulants in dogs with chronic renal failure. *Comparative Clinical Pathology*, v.20, n.3, p.217–221, 2011.

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

ROSE, L.J.; DUNN, M.E.; BÉDARD, C. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on Coagulation Parameters. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v.27, p.207-211, 2013.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; NEMI, C. Hematology Techniques In: Schalm's Veterinary Hematology. 3. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1975, cap. 2, p. 20-86.

SEGHATCHIAN, J.; KRAILADSIRI, P. The Platelet Storage Lesion. *Transfusion Medicine Reviews*, v.11, p.130-144, 1997.

SHLIPAK, M.G.; FRIED, L.F.; CRUMP, C.; BLEYER, A.J.; MANOLIO, T.A.; TRACY, R.P.; FURBERG, C.D.; PSATY, B.M. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency *Circulation: Journal of the American Heart Association* v.107, n.1, p.87-92, 2003.

SINGHAL R.; BRIMBLE K.S. Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: pathophysiology and clinical management. *Thrombosis Research*, v.118, n.3, p.397–407, 2006.

SMITH S.A.; MCMICHAEL, M.A.; GILOR, S.; GALLIGAN, A. J.; HOH, C.M. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *American Journal of Veterinary Research*, v.73, n.6, p. 789-798, 2012.

SMITH, S.A. Overview of Hemostasis. In: Schalm's Veterinary Hematology. 6. ed. Iowa: *Blackwell Publishing*, 2010. cap.84, p. 635-653.

SMITH, S.A. The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.19, n.1, p.3-10, 2009.

SOHAL, A.S.; GANGJI, A.S.; CROWTHER, M.A.; TRELEAVEN, D. Uremic bleeding: pathophysiology and clinical risk factors. *Thrombosis Research*, v.118, p.417-422, 2006.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap.5, p.213-262.

TRAPPENBURG, M.C.; SCHILFGAARDE, M.V.; FRERICHS, F.C.P.; SPRONK, H.M.H.; CATE, H.T.; FIJTER, C.W.H.; TERPSTRA, W.E.; LEYTE, A. Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant*, v.27, p.1446-1453, 2012.

VANDERPOL, E.; HOEKSTRA, A.G.; STURK, A.; OTTO, C.; VANLEEUVEN, T.G. NIEUWLAND, R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.8, p.2596-2607, 2010.

VAZIRI, N.D.; PAULE, P.; TOOHEY, J.; HUNG, E.; ALIKHANI, S.; DARWISH, R.; PAHL, M.V. Acquired Deficiency and Urinary Excretion of Antithrombin III in Nephrotic Syndrome. *Archive Internal Medicine* v.144, p.1802-1803, 1984.

VELIK-SALCHNER C.; HAAS T.; INNERHOFER P.; STEIF W.; NUSSBAUMER W.; KLINGLER A.; KLIMA G.; MARTINOWITZ U.; FRIES D. The effect of fibrinogen concentrate on thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasi*, v.5, p.1019-1025, 2007.

WATTANAKIT, K.; CUSHMAN, M. Chronic kidney disease and venous thromboembolism: epidemiology and mechanisms. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v.15, n.5, p.408-412, 2009.

WHITE, C. Coagulation: *Advanced Renal Therapies Symposium* p.113-118, 2012.

WIINBERG,B.; JENSEN, A.L.; JOHANSSON, P.I.; ROZANSKI, E.; TRANHOLM, M.; KRISTENSEN, A.T. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* v.22, p.357-365, 2008.

WOLBERG, A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood reviews*, v.21, p.131-142, 2007.

ZECK, J.; SCHALLHEIM, J.; LEW, S.; DEPALMA, L. Whole Blood Platelet Aggregation and Release Reaction Testing in Uremic Patients. *BioMed Research International* v.1, p. 1 - 6, 2013.

ZOCCALI, C.; MALLAMACI, F.; TRIPEPI, G.; CUTRUPI, S.; PARLONGO, S.; MALATINO, L.S.; BONANNO, G.; RAPISARDA, F.; FATUZZO, P.; SEMINARA, G.; STANCANELLI, B.; NICOCIA, G.; BUEMI, M. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *Journal of Internal Medicine*, v.254, p.132-139, 2003.

ZWAGINGA, J.J.; JSSELDIJK, M.J.W.I.; GROOT, P.G.; VOS, J.; BOSKUIL, R.L.J.; SIXMA, J.J. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorder can be attributed to factors in plasma. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, v.11, n.3, p.733-744, 1991.

ANEXOS

Anexo 1 – Atestado do Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

**A T E S T A D O**

Atesto que o subprojeto intitulado "**Potencial de geração de trombina em cães com doença renal crônica**" faz parte do Projeto "Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica", **Protocolo CEUA 033/2014**, aprovado em 11 de abril de 2014, a ser conduzido por **Daniele Silvano Gonçalves**, para fins de Doutorado, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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.

Botucatu, 27 de agosto de 2018.

Prof. Ass. Dr. José Nicolau Próspero Puoli Filho
Presidente da CEUA/FMVZ