

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GERAÇÃO DE TROMBINA EM CÃES COM HIPERADRENOCORTICISMO  
ENDÓGENO

SILVIA EUGENIA VARGAS MORA

BOTUCATU – SP  
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GERAÇÃO DE TROMBINA EM CÃES COM HIPERADRENOCORTICISMO  
ENDÓGENO

SILVIA EUGENIA VARGAS MORA

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para obtenção  
de título de Mestre

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Assoc. Regina  
Kiomi Takahira

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

Mora, Silvia Eugenia Vargas.

Geração de trombina em cães com hiperadrenocorticismo endógeno / Silvia Eugenia Vargas Mora. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Trombina. 3. Hemostasia.  
4. Hiperadrenocorticismo. 5. Trombose.

Palavras-chave: Canino; Hemostasia; Hipercoagulação;  
Hipercoortisolemia; Trombose.

Nome do Autor: Silvia Eugenia Vargas Mora

Título: GERAÇÃO DE TROMBINA EM CÃES COM  
HIPERADRENOCORTICISMO ENDÓGENO

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Carvalho**

Membro Titular

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Farmácia- UFMG – Belo Horizonte/MG

**Dr<sup>a</sup>. Viviani De Marco Bernardes**

Membro Titular

Naya Especialidades Veterinárias

Clínica Veterinária de Especialidades – São Paulo/SP

Data da defesa: 8 de dezembro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder saúde e sabedoria para cumprir mais uma meta de vida. Por me providenciar dessa força diária que tanto precisei, e, principalmente, por me permitir viver este sonho ao lado da minha família. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, **Mauricio e Heidi**, pelo apoio e amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e por serem meu porto seguro. Sem vocês nada seria possível. Meu amor por vocês é infinito.

Aos meus irmãos, **Ale e Mauricio**, pelo apoio, a amizade e os conselhos. Sou abençoada por ter vocês na minha vida. Amo muito vocês.

A **Gustavo**, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em momentos tão difíceis. Fico grata por ter encontrado você no meio deste caminho.

Ao meu amigo, colega e ex chefe, **Javier Coen**, por sempre acreditar em mim e me incentivar a ser melhor. Obrigada por ser meu primeiro mentor e exemplo de dedicação e superação.

À **Profª Regina Kiomi Takahira**, por me aceitar como orientada apesar do desafio que isso podia significar. Obrigada pela paciência, o profissionalismo e todo o conhecimento compartilhado. Admiro você.

À **Daniela Silvano**, por promover a parceria com a **Profª Maria das Graças Carvalho** e a pós-doutoranda **Rita Carolina Figueiredo Duarte**, que gentilmente abriram as portas do seu laboratório e possibilitaram a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão pelos ensinamentos e constante disposição de ajudar desse jeito tão cálido e humano.

À **Drª Viviani de Marco** e a **Drª. Priscila Assis Lopes**, pela parceria, apoio e competência, que foram essenciais no desenvolvimento deste experimento. Obrigada pela paciência, esforço e dedicação.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, **Bruna, Victor, Felipe e Roberta** pelo apoio durante todo este processo. Obrigada por me acolherem e fazerem me sentir em casa, ficarei eternamente grata.

Por fim, a todos aqueles que de uma ou outra forma contribuíram com a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACTH:** Hormônio adrenocorticotrópico

**ALT:** Alanina-aminotransferase

**AT:** Antitrombina

**CAT:** Trombograma Calibrado Automatizado

**dL:** decilitro

**DM:** Diabetes mellitus

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FA:** Fosfatase alcalina

**FIXa:** Fator IX ativado

**FvW:** Fator de von Willebrand

**FVIIa:** Fator VII ativado

**FVIII:** Fator VIII

**FXa:** Fator X ativado

**GGT:** Gama glutamil transferase

**GT:** Geração de trombina

**HAC:** Hiperadrenocorticismo

**mg:** miligramas

**mL:** mililitro

**MPs:** Microparticulas

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

**PAI:** Fator inibidor do ativador de plasminogênio

**TAT:** Complexo trombina antitrombina

**TEG:** Tromboelastografia

**TEM:** Tromboelastometria

**TF:** Fator tecidual

**TGT:** Teste de geração de trombina

**TM:** Trombomodulina

**TP:** Tempo de protrombina

**TTPa:** Tempo de tromboplastina parcial ativada

**pM:** Picomolar

**PPP:** Plasma pobre em plaquetas

**PRP:** Plasma rico em plaquetas

**RPC:** Relação proteína:creatinina urinária



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>FIGURA 1.</b> Princípio do método de CAT.....	13
<b>FIGURA 2.</b> Parâmetros da curva de geração de trombina.....	14
<b>TABLE 1.</b> Parameters of thrombin generation assay using low and high concentrations of tissue factor in dogs with hyperadrenocorticism and healthy control .....	42
<b>TABLE 2.</b> Hemostatic profile in dogs with hyperadrenocorticism and healthy controls.....	43
<b>TABLE 3.</b> Selected hematological and biochemical parameters in dogs with hyperadrenocorticism and control group.....	44
<b>FIGURE 1</b> Correlation between cortisol levels and fibrinogen concentration in dogs with hyperadrenocorticism .....	45
<b>FIGURE 2.</b> Correlation between fibrinogen levels and hematocrit values .....	45
<b>FIGURE 3.</b> Correlation between cortisol levels and antithrombin activity .....	46

## SUMÁRIO

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	4
1.1 INTRODUÇÃO .....	6
1.2. REVISÃO DE LITERATURA .....	8
<b>1.2.1 Hemostasia</b> .....	8
<b>1.2.2 Teste de geração de trombina</b> .....	10
<b>1.2.3 Hiperadrenocorticism</b> .....	14
<b>1.2.3.1 Diagnóstico</b> .....	15
<b>1.2.3.2 Hipercoagulabilidade</b> .....	17
1.3 JUSTIFICATIVA .....	19
2. TRABALHO CIENTÍFICO .....	20
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
3.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	6
Introdução .....	6
Revisão de literatura.....	8
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	20
Trabalho científico.....	20
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	47
Considerações finais.....	47
Referências bibliográficas .....	48
Anexos I.....	54
Anexos II.....	55

Silvia Eugenia Vargas Mora – **Geração de Trombina em Cães com Hiperadrenocorticismo Endógeno**. Botucatu, 2020, 55p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica – Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O estado de hipercoagulabilidade é uma condição grave que pode levar a um quadro de trombose e/ou coagulação intravascular disseminada. Diversas doenças estão associadas com seu desenvolvimento, porém, os exames de hemostasia convencionais são pouco sensíveis na detecção do risco trombótico. Um dos testes mais estudados nos últimos anos é a geração de trombina, método que consegue avaliar o potencial endógeno da hemostasia global. O hiperadrenocorticismo (HAC) é uma endocrinopatia de ocorrência comum em cães que pode desencadear um estado de hipercoagulabilidade secundária ao hipercortisolismo. Os mecanismos fisiopatológicos são diversos e alguns deles ainda não são bem compreendidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade do teste de geração de trombina (TGT) para detectar alterações compatíveis com hipercoagulabilidade em cães com hiperadrenocorticismo endógeno, assim como correlacionar com um perfil hemostático compreendido por fibrinogênio, antitrombina (AT), dímero-D, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), e exames gerais de rotina para desvendar possíveis mecanismos protrombóticos. A maioria dos cães apresentou pelo menos uma alteração no perfil hemostático e/ou TGT. O TGT realizado em altas concentrações de fator tissular mostrou incremento de ETP ( $P= 0.0239$ ) e peak ( $P= 0.0281$ ) nos cães com HAC. O fibrinogênio ( $P= <0.0001$ ) e AT ( $P = 0.0444$ ), apresentaram um aumento significativo no grupo com HAC, e o TP ( $P = 0.0046$ ) e TTPa ( $P = 0.0002$ ) uma diminuição. Os níveis basais de cortisol se correlacionaram de forma positiva com os níveis de fibrinogênio ( $r = 0.4503$ ;  $P = 0.0355$ ) e de forma negativa com os níveis de AT ( $r = -0.4580$ ;  $P = 0.0280$ ). O fibrinogênio e o hematócrito se correlacionaram negativamente ( $r = -0.4853$ ;  $P = 0.0076$ ). O estudo mostrou que os cães com HAC endógeno

apresentam uma maior geração de trombina, no entanto, o TGT realizado com baixa concentração de fator tissular não foi adequada para detectar essas alterações. O grau de hipercortisolemia influencia os níveis de AT e fibrinogênio. A proteinúria parece não determinar os níveis de AT e os cães com HAC mostraram uma diminuição do TP e TTPa.

**Palavras chave:** Hipercoagulação. Hemostasia. Trombose. Hipercortisolemia. Canino

Silvia Eugenia Vargas Mora – **Geração de Trombina em Cães com Hiperadrenocorticismo Endógeno**. Botucatu, 2020, 55p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The hypercoagulable state is a serious condition that can lead to thrombosis and/or disseminated intravascular coagulation. Several diseases are associated with its development; however, conventional coagulation tests are unable to detect thrombotic risk. For the past few years, the thrombin generation test (TGA) has become one of the most studied methods for evaluating global hemostasis. Hyperadrenocorticism (HAC) is a common canine endocrinopathy that have been associated with hypercoagulability. However, the pathophysiological mechanisms are diverse and some of them are still misunderstood. The objective of this study was to evaluate the applicability of TGA for detecting compatible alterations with a hypercoagulable tendency and to correlate with an hemostatic profile comprised of fibrinogen, antithrombin (AT), D-dimer, prothrombin time (PT) activated partial thromboplastin time (aPPT), and routine laboratory tests for elucidating possible prothrombotic mechanisms. The majority of dogs (80.6%) presented at least one alteration of the hemostatic profile and/or TGA parameters. TGA at high concentration of activator showed significantly higher ETP ( $P= 0.0239$ ) and peak ( $P= 0.0281$ ) in Cushing patients. Fibrinogen ( $P = <0.0001$ ) and AT ( $P = 0.0444$ ) activity were significantly higher in the HAC group, while PT ( $P = 0.0046$ ) and aPTT ( $P = 0.0002$ ) were lower. Basal cortisol levels correlated positively with fibrinogen levels ( $r = 0.4503$ ;  $P = 0.0355$ ) and negatively with AT values ( $r = -0.4580$ ;  $P = 0.0280$ ). Fibrinogen and hematocrit values showed a negative correlation ( $r = -0.4853$ ;  $P = 0.0076$ ). Our study showed that dogs with HAC presented higher thrombin generation, however, TGA performed with lower concentrations of tissue factor were inadequate for assessing hypercoagulability. Degree of hypercortisolism influences AT and fibrinogen levels. Proteinuria does not appear to determine AT activity and dogs with HAC showed a significantly shortened PT and aPTT.

**Key words:** Hypercoagulability. Hemostasis. Thrombosis. Hypercortisolism.  
Canine

### 1.1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo complexo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo sob condições fisiológicas normais. O equilíbrio entre os processos pró-coagulantes e anticoagulantes evita perdas sanguíneas e a formação patológica de trombos após lesão vascular (ZAIDI; GREEN, 2016). O sistema hemostático é conformado basicamente por elementos celulares (plaquetas, leucócitos, eritrócitos, células endoteliais, remanentes microvasculares ou micropartículas) e proteínas (fatores e cofatores de coagulação e proteínas anticoagulantes). Quando a coagulação é ativada, as células e as membranas interagem com os fatores de coagulação, formando complexos que contribuem na formação de moléculas de fibrina (DAHLBACK, 2000).

Os distúrbios hemostáticos podem ser de origem congênita ou adquirida e dependendo do mecanismo envolvido, pode resultar em quadros de trombose ou hemorragias. A trombose surge pela alteração de um ou vários fatores tais como o fluxo sanguíneo, a integridade endotelial, a coagulação e/ou a fibrinólise. Embora a ocorrência deste distúrbio ainda não foi estabelecida, as doenças associadas com a formação de trombos são diversas (BOSWOD, LAMB; WHITE, 2000).

O hiperadrenocorticismismo (HAC) ou síndrome de Cushing é uma endocrinopatia relativamente comum em cães e incomum em gatos, ocasionada pela secreção crônica de glicocorticoides. A exposição constante a hipercortisolemia, produz efeitos multisistêmicos que desenvolvem complicações e sinais clínicos variados (NICHOLS, 1997). Uma complicação frequente, porém, subdiagnosticada, é o tromboembolismo do sistema arterial ou venoso. A incidência e patogênese ainda não foram definidas, mas acredita-se que esses pacientes estejam num estado de hipercoagulabilidade (PARK *et al.*, 2013). Diferentes estudos analisaram os possíveis mecanismos hipercoagulantes associados ao HAC canino, no entanto, os resultados são discrepantes.



Muitos dos processos hemostáticos, tanto fisiológicos quanto patológicos, ainda não são bem compreendidos. Conhecimentos básicos como o modelo de coagulação, foram evoluindo à medida que foram geradas novas informações. A compreensão do papel das células na hemostasia permitiu o desenvolvimento do modelo celular da coagulação, que por sua vez, ajudou na concepção da hemostasia global e o papel central da trombina na coagulação.

A atividade da trombina no sítio da lesão é determinante na extensão das reações hemostáticas e trombóticas, portanto, a estimacão do potencial de geracão, tem uma correlacão estreita com estados de hipo e hipercoagulabilidade. Toda vez que houver uma diminuicão na geracão de trombina haverá um efeito antitrombótico e hemorrágico, e toda vez que houver um aumento, o desenvolvimento de trombose será mais provável (HEMKER; BÉGUIN 1995). Os testes convencionais avaliam apenas o início da coagulação e, por tanto os seus resultado não refletem o processo integral da formacão do coagulo. O Trombograma Calibrado Automatizado (CAT) criado por Hemker *et al.*, mensura o potencial *in vitro* da geracão de trombina, conseguindo avaliar todas as fases da coagulação.

Já foram realizados trabalhos que avaliam os efeitos do HAC canino na coagulação sanguínea, inclusive, foram utilizados testes de hemostasia global como a tromboelastografia (TEG) e o teste de geracão de trombina (TGT). Porém, falhas relacionadas à seleçãõ do grupo controle, o número amostral e a ausência de testes básicos de hemostasia, limitaram a análise de resultados (ROSE; DUNN; BÉDARD, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade do TGT na detecçãõ de alterações hemostáticas relacionadas com o estado de hipercoagulabilidade em cães com HAC. Assim como correlacionar os achados do TGT com um perfil hemostático que compreende fibrinogênio, antitrombina (AT), dímero-D, Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), além de exames gerais de rotina com o fim de desvendar possíveis mecanismos protrombóticos. Como hipótese, foi estabelecido que cães com HAC apresentam alterações nos parâmetros de TGT sugestivos de uma tendênciã à hipercoagulabilidade quando comparados com o grupo controle.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Hemostasia

O sistema hemostático é a primeira linha de defesa contra danos vasculares porquanto envolve a interação de diferentes componentes que garantem a normalidade do fluxo sanguíneo e a prevenção de hemorragia ou estados de hipercoagulabilidade (ZAIDI; GREEN, 2016). Os principais componentes deste sistema são as plaquetas, os vasos sanguíneos, as células endoteliais, o fator de von Willebrand (FvW), os fatores de coagulação, os anticoagulantes endógenos (antitrombina, proteína C, proteína S e o inibidor do fator tecidual), além do sistema fibrinolítico (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Tradicionalmente, a hemostasia foi dividida em 3 fases, a hemostasia primária, a hemostasia secundária e a fibrinólise. A hemostasia primária compreende as plaquetas e sua interação com o endotélio vascular. Enquanto a hemostasia secundária envolve os fatores de coagulação e a sua ativação culminando na formação de fibrina, que posteriormente será destruída pela plasmina resultante da ativação do plasminogênio. Esta última etapa do processo hemostático constitui a fibrinólise (BICK, 2002).

A hemostasia secundária foi organizada como um modelo de cascata que inclui as vias intrínseca, extrínseca e comum da coagulação. No modelo, cada fator de coagulação existe como uma proenzima que depois será transformada em enzima ativa. A via intrínseca é caracterizada pela conversão consecutiva dos fatores XII, XI, IX e VIII, enquanto a via extrínseca, consiste na formação do complexo entre o fator tecidual (TF), e o fator VII ativado (FVIIa). As duas vias convergem e resultam na ativação do fator X (FXa), dando início à via comum e a consequente conversão de protrombina em trombina. (PETERSON; COUTO; WELLMAN, 1995). Alterações na via extrínseca e comum da coagulação, podem ser identificadas mediante o tempo de protrombina (TP), enquanto as alterações na via intrínseca e comum, mediante o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (SMITH, 2009).

O modelo de cascata foi criado com o fim de compreender a conversão enzimática, a função do cálcio e a interpretação dos testes hemostáticos mais utilizados, porém, ele não explica o funcionamento da hemostasia *in vivo*. Nos

últimos anos, foi desenvolvido um conceito de hemostasia baseado no papel das células. Estudos mostraram que cada superfície celular apresenta diferentes propriedades relacionadas com a coagulação, incluindo receptores de proteínas que ligam os componentes do sistema hemostático à superfície celular (HOFFMAN; MONROE, 2001).

O modelo baseado em células sugere que a hemostasia ocorre em 3 fases sobrepostas com a participação de dois tipos celulares, as células portadoras de TF e as plaquetas (SMITH, 2009). O TF, também conhecido como tromboplastina ou fator III (FIII), é uma proteína de membrana expressa principalmente pelas células extra vasculares (pericitos, células do músculo liso e fibroblastos da adventícia), no entanto, também tem sido encontrada em algumas células circulantes, principalmente monócitos e células tumorais (DRAKE; MORRISSEY; EDGINGTON, 1989; SMITH, 2009).

A primeira fase, conhecida como fase de iniciação, ocorre uma vez que acontece dano vascular e o plasma entra em contato com a célula portadora de TF. O FVIIa circulante formará um complexo junto com o TF, levando à ativação dos fatores IX e X. A consequente ativação do FV pelo FXa, vai gerar uma pequena quantidade de trombina, insuficiente para a formação do coágulo, porém, suficiente para amplificar o sinal pro coagulante (HOFFMAN, 2003; SMITH, 2009). Ao mesmo tempo, o FXa que foi dissociado da membrana, será inibido pela ação da antitrombina (AT) ou pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Acredita-se que as reações responsáveis pela iniciação, ocorrem constantemente fora da vasculatura, portanto, são sempre mantidos pequenos níveis de trombina e de fatores ativados no estado basal de animais sadios (HOFFMAN, 2003).

Como resultado do dano vascular, alguns componentes hemostáticos tais como, as plaquetas, o FVIII e o fator de von Willebrand (FvW), saem da vasculatura e entram em contato com a trombina que está sendo gerada nas células portadoras de TF. Durante esta fase, chamada de fase de amplificação, a trombina é ligada às plaquetas, produzindo uma exposição dos receptores de fatores de coagulação e a liberação do conteúdo granular. Enquanto isso são geradas as formas ativas dos fatores V, VIII e XI, e o FvW é liberado do FVIII permitindo uma maior adesão e agregação plaquetária (HOFFMAN, 2003)

Em seguida, durante a fase de propagação, o FIXa e o FVIIIa, são ligados na superfície da plaqueta para formar o complexo “tenase”, (FXa, FVIIIa, FX e cálcio) que leva à rápida ativação do FX e à formação de outro complexo chamado de “protombinase” (FVa, FXa e cálcio). Finalmente será gerada uma quantidade maior de trombina necessária na formação do coágulo de fibrina (HOFFMAN; MONROE, 2001).

O sistema proteína C/ proteína S /trombomodulina (TM) é um dos mecanismos mais importantes no controle da atividade pro coagulante. A trombina difundida na circulação é acoplada com a TM presente na superfície das células endoteliais sadias. Este complexo ativará a proteína C que logo se ligará com a proteína S, resultando na inativação dos fatores Va e VIIIa. A principal função deste sistema é prevenir a geração de trombina nas células endoteliais sadias e restringir sua função apenas ao foco da lesão (HOFFMAN, 2003).

As micropartículas (MPs) são vesículas derivadas de células envolvidas por membrana e tem mostrado uma alta expressão de TF e propriedades pro coagulantes. As MPs surgem a partir de uma célula apoptótica que libera fragmentos de membrana, estimulada principalmente por citocinas, trombina, estresse de cisalhamento ou hipóxia. Em condições normais, as MPs são derivadas de células endoteliais, plaquetas e monócitos, porém, na presença de algumas doenças podem se derivar de eritrócitos ou granulócitos. As características de superfície vão ser semelhantes àquelas encontradas em suas células progenitoras, permitindo a participação em reações de coagulação. Em algumas enfermidades tais como a diabetes mellitus, sepse e doença cardiovascular, tem sido mostrado uma alta concentração de MPs (SMITH, 2009), cujo aumento pode produzir uma acumulação exacerbada de TF no trombo e uma conseqüente coagulação patológica (MCMICHAEL, 2012).

### **1.2.2 Teste de geração de trombina (TGT)**

Atualmente, a maioria dos testes de hemostasia disponível tem uma sensibilidade satisfatória para estados moderados e graves de hipocoagulabilidade, porém, não conseguem avaliar os estados de hipercoagulabilidade ou hipocoagulabilidade discretos. Tais métodos utilizam a formação do coágulo como ponto final na avaliação da hemostasia, onde apenas

5% da trombina total foi gerada (WOLBERG, 2007). Mensurações mediante o uso de TP e o TTPa, avaliam somente a fase de iniciação da coagulação, portanto, o resultado não representa a capacidade total da geração de trombina (GT) (LIPETS; ATAULLAKHANOV, 2015; WOLBERG, 2007).

Com base no mais recente modelo de coagulação, assume-se que a trombina é o principal regulador da hemostasia. Suas características pró-coagulantes e anticoagulantes, permitem que a estimacão do potencial endógeno de trombina consiga refletir estados de hipo e hipercoagulabilidade. Atualmente, os marcadores de GT *in vivo* mais utilizados são os fragmentos de protrombina 1 e 2 (F1+2), o dímero-D, o complexo trombina anti-trombina e os fibrinopeptídeos A. Esses testes possuem uma alta relevância clínica, no entanto, têm a desvantagem de detectar traços da coagulação que já ocorreram ou que estão acontecendo ativamente (LIPETS; ATAULLAKHANOV, 2015).

Em resposta a essas desvantagens têm sido implementadas técnicas que avaliam a hemostasia global e o risco trombótico. A tromboelastometria (TEM) ou tromboelastografia (TEG), é a metodologia mais antiga utilizada até hoje e consiste na avaliação do efeito dos componentes celulares e plasmáticos na formação do coágulo. A técnica mais recente é o teste de geração de trombina (TGT), apesar deste teste remontar a 1953, idealizado por Macfarlane e Biggs, às limitações tecnológicas da época limitaram seu sucesso. Nos últimos anos a técnica foi aperfeiçoada por Hemker *et al.*, 2003, 2006, os quais desenvolveram o método de CAT (Calibrated Automated Thrombography). Diferente dos marcadores *in vivo* já mencionados, o método de CAT avalia a GT *ex vivo* com o objetivo de determinar o potencial endógeno do sistema hemostático (HEMKER *et al.*, 2003).

O TGT consiste na avaliação contínua da geração de trombina mediante a dosagem da sua atividade proteolítica sobre um substrato fluorogênico de baixa afinidade (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Para isso, à amostra de plasma se adiciona fator tissular (em baixa e/ou em alta concentração) com fosfolípidos, além de um substrato fluorogênico contendo cloreto de cálcio (BERNTORP; SALVAGNO, 2008). A trombina gerada pela reação vai clivar o substrato fluorogênico, liberando assim um fluoróforo proporcional à quantidade de trombina presente (HEMKER *et al.*, 2003).

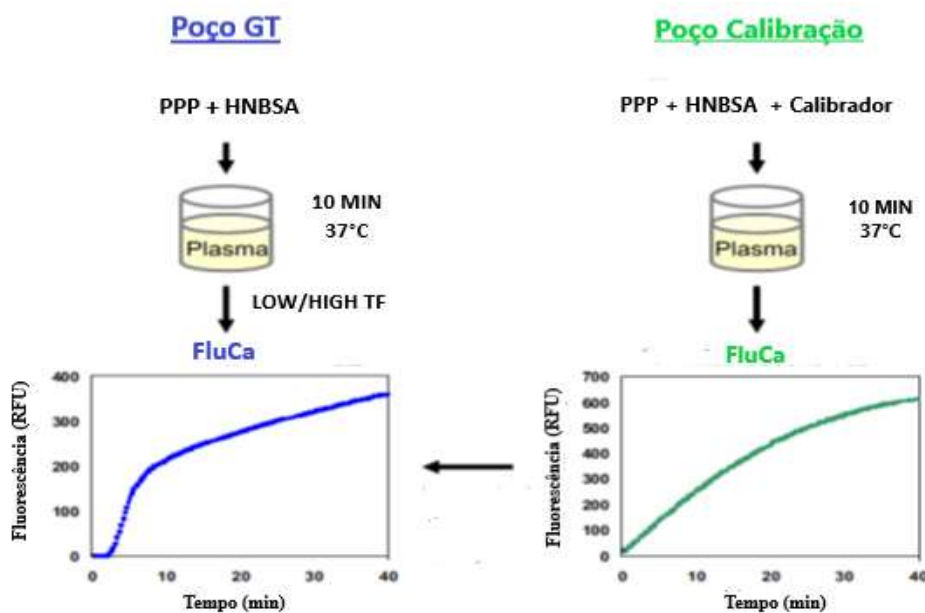
As medições são realizadas numa placa de 96 poços mediante o uso de um fluorímetro (Fluoroscán, Thermo Scientific) que requer, além do poço onde é realizado a amostra teste, um poço onde a amostra de plasma é adicionada a um calibrador de concentração conhecida (trombina ligada à  $\alpha_2$ -macroglobulina). Este calibrador consiste em uma forma de trombina que não é clivada por proteases plasmáticas (CASTOLDI & ROSING, 2011). As unidades da fluorescência geradas (RFU) são convertidas em concentrações de trombina (nM) com ajuda do software Thrombinoscope BV, gerando assim a curva final ou trombograma (HEMKER *et al.*, 2003, 2006). A Figura 1 apresenta o princípio do TGT pelo método de CAT.

A partir da curva são inferidos os seguintes parâmetros: *lag time* (min), *peak* (nM) time to peak (min) e o potencial endógeno de trombina (ETP). O *lag time* é definido como o tempo que a trombina tarda em alcançar 1/6 da sua concentração máxima. A fase finaliza com a formação do trombo pelo que é considerada análoga ao tempo de coagulação. O *peak*, é o pico máximo de fluorescência ou concentração máxima de trombina que pode ser alcançado e o time to peak (*TTpeak*), corresponde ao tempo que demora até atingir esse pico, ou seja, a velocidade da geração de trombina (TRIPODI, 2016). Finalmente, a área embaixo da curva é representada pelo ETP, parâmetro que descreve a quantidade total de trombina gerada em 60 minutos, sob a utilização de dois condutores opostos (pró- e anticoagulante) atuando no plasma. A Figura 2 apresenta os parâmetros do TGT pelo método de CAT. O estado hemostático é inferido mediante a avaliação destes parâmetros. Uma diminuição do ETP e do *peak* junto com uma prolongação do *lag time*, indicam estado de hipocoagulação. Enquanto uma redução do *lag time* e incremento do ETP e do *peak*, indica um estado de hipercoagulabilidade (BERNTORP; SALVAGNO, 2008).

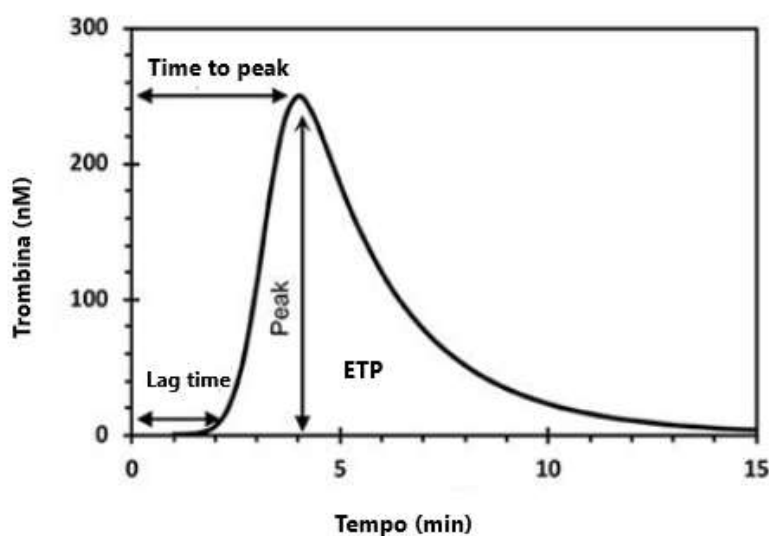
Quanto maior for a quantidade de TF adicionada, mais rápida será a reação, reduzindo a sensibilidade para os fatores da via intrínseca. Enquanto quantidades menores (1-5pM), a sensibilidade será maior para os fatores VIII, IX e XI (HEMKER *et al.*, 2003). A mensuração poder ser realizada tanto em plasma pobre em plaquetas (PPP) quanto em plasma rico em plaquetas (PRP). Em PPP, é possível detectar deficiências em qualquer fator de coagulação (com a exceção do FXIII) e avaliar os efeitos de qualquer tratamento anticoagulante. Já em PRP, a sensibilidade será maior para a doença de von Willebrand, hipofibrinogenemia,

trombocitopenia e efeitos terapêuticos dos inibidores plaquetários (BRINKMAN, 2015; HEMKER *et al.*, 2003). Com relação às técnicas, o método cromogênico deve ser realizado com plasma desfibrinado e o método fluorogênico pode usar tanto PRP quanto PPP, tendo a vantagem de que o fibrinogênio não influencia nos resultados (HEMKER *et al.*, 2000). Sob a premissa de que a coagulação *in vivo* acontece na presença de células sanguíneas, Ninivaggi *et al.* (2012) propuseram um ensaio fluorogênico utilizando sangue total.

Atualmente no mercado existem diferentes marcas comerciais: o Trombograma Calibrado Automatizado (Trombinoscopia/Stago), o Teste de Geração de Trombina (Siemens), e o Technothrombin TGA (Technoclone). As técnicas se diferenciam principalmente na concentração dos reagentes empregados e na utilização de substratos cromogênicos ou fluorogênicos (CATE, 2018).



**Figura 1.** Princípio do método de CAT. No poço de GT, a coagulação é desencadeada pelo fator tecidual (TF), fosfolípidios e  $\text{CaCl}_2$  (FluCa). No poço de calibração, é adicionado o calibrador de trombina e o  $\text{CaCl}_2$ . A atividade da trombina é monitorada em ambos poços a través da conversão do substrato fluorogênico adicionado ao plasma.



**Figura 2.** Parâmetros da curva de geração de trombina.

Várias aplicações possíveis têm sido observadas para os ensaios de geração de trombina, como a avaliação quanto ao risco hemorrágico ou trombótico em diversas condições patológicas, investigações sobre a fisiopatologia de doenças envolvendo a coagulação, auxílio no manejo clínico de pacientes com doenças hemorrágicas ou em uso de terapia anticoagulante, e na pesquisa e desenvolvimento de fármacos antitrombóticos.

### 1.2.3 Hiperadrenocorticismismo

O hiperadrenocorticismismo (HAC) ou síndrome de Cushing é uma endocrinopatia comum em cães e incomum em gatos, produzida por uma exposição crônica a altas concentrações de glicocorticoide (FELDMAN *et al.*, 2015). O desenvolvimento pode ser espontâneo ou de origem exógeno, este último causado pela administração excessiva e prolongada de glicocorticoides. No desenvolvimento espontâneo, as causas são classificadas como ACTH-dependente e ACTH-independente. A primeira associada à secreção exagerada de ACTH por um microadenoma hipofisário ou por um carcinoma produtor de ACTH que resulta em hiperplasia adrenal bilateral e aumento na produção de glicocorticoides (FELDMAN *et al.*, 2015; RAMSEY; RISTIC, 2013). O HAC ACTH-independente é ocasionado pela presença de um tumor adrenocortical primário,



uma hiperplasia macronodular adrenal, ou de origem alimentar. No HAC dependente de adrenal, o tumor (frequentemente unilateral) produz uma secreção excessiva de cortisol que gera um feedback negativo na hipófise e consequente diminuição nos níveis de ACTH (RAMSEY; RISTIC, 2013). Cerca do 85% dos casos são de origem hipofisária, sendo considerada a causa mais comum de HAC (FELDMAN, 1983).

A síndrome de Cushing acontece principalmente em cães de meia idade a idosos, sem existência comprovada de predisposição de gênero. Pode acometer tanto animais puros quanto cães sem raça definida. Embora vários autores tenham mencionado um risco maior em algumas raças, a predisposição estatística apenas foi comprovada nos Poodle, Boxers e Dachshunds (FELDMAN *et al*, 2015).

A maioria das células expressam receptores de glicocorticoides, permitindo que o cortisol exerça efeitos multissistêmicos que se resumem a sinais clínicos e alterações laboratoriais variadas. A sintomatologia clássica do HAC consiste em poliúria, polidipsia, polifagia, distensão abdominal, perda de massa muscular, pele de aparência fina, e alterações dermatológicas tais como alopecia e calcinose cutânea. O quadro pode ser de aparição rápida ou progressiva, sendo reportados períodos de remissão em alguns casos (PETERSON *et al*, 1982). Ainda, a hipercortisolemia crônica pode levar à disfunção de diferentes órgãos. A hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes mellitus, pancreatite, pielonefrite, glomerulonefrite, e tromboembolismo pulmonar são algumas das complicações secundárias mais frequentes (NICHOLS, 1997). Todo paciente com suspeita de HAC deve passar por uma avaliação geral prévia à realização de testes específicos, que incluem hemograma, bioquímica sérica, urinálise, e ultrassom abdominal.

### **1.2.3.1 Diagnóstico**

O estímulo na eritropoiese e os efeitos imunomoduladores do cortisol podem levar a uma eritrocitose e leucograma de estresse (neutrofilia, linfopenia, monocitose e eosinopenia), que junto com a trombocitose, constituem as alterações hematológicas mais frequentes.

O incremento de FA ocasionado pelo estímulo da isoenzima induzida por corticosteroides, é a alteração bioquímica mais comum, sendo reportada em 80-

90% dos casos (TESKE *et al*, 1989). A atividade da GGT sofre também um aumento associado ao estímulo direto dos glicocorticoides, porém a prevalência é ainda desconhecida (GILOR; GRAVES, 2011).

O HAC é caracterizado por causar uma hepatopatia vacuolar secundária ao hipercortisolismo, a qual ocasiona um aumento nos níveis séricos de ALT e AST produto da inflamação hepatocelular, o acúmulo de glicogênio e/ou a interferência do fluxo sanguíneo. Alguns autores sugerem que 30% dos casos apresenta aumento dos ácidos biliares, o que dificultaria a diferenciação entre doença hepática primária e HAC (RAMSEY; RISTIC, 2007)

A hiperlipidemia é frequentemente observada nos casos de HAC e pode estar representada por hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia. A hipercolesterolemia está presente em 90% dos casos (FELDMAN *et al*, 2015) e tem sido associado ao aumento do colesterol LDL. Enquanto a hipertrigliceridemia, encontra-se em proporção similar e tem sido relacionada ao aumento na síntese hepática e secreção de VLDL, assim como à diminuição da atividade da lipase lipoproteica (BARRIE *et al*, 1993; JERICÓ *et al*, 2009). Um terço dos casos pode apresentar hiperglicemia de discreta a moderada em decorrência do efeito antagonista do cortisol à insulina (FELDMAN *et al*, 2015; RAMSEY; RISTIC; 2007). Outras alterações menos frequentes incluem a hipofosfatemia, hipernatremia e hipocalcemia (GILOR, GRAVES, 2011).

Em 85% dos casos, a urinálise apresenta densidade urinária baixa (<1.020), e metade desenvolve proteinúria de moderada a severa que pode ser tanto de origem glomerular quanto tubular (SMETS *et al*, 2012; CARAGALESCO *et al*, 2017). Embora alguns casos apresentem hiperglicemia, a glicosúria não está diretamente relacionada ao HAC e deve-se considerar uma diabetes mellitus concomitante quando presente (FELDMAN *et al*, 2015).

O teste de eleição para a confirmação do diagnóstico de HAC é o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (TSBDD). O protocolo consiste em uma primeira coleta para dosagem dos níveis séricos basais de cortisol e uma segunda coleta 8 horas após a aplicação endovenosa do glicocorticoide a 0.01mg/kg. Normalmente, o efeito da dexametasona seria suprimir a produção de cortisol mediante a diminuição da secreção de ACTH. Animais com HAC são resistentes a esse efeito e, portanto, manifestam níveis de cortisol pós-dexametasona acima dos valores de referência. Uma terceira amostra pode ser

coletada 4 horas após aplicação de dexametasona com o fim de determinar a origem do HAC. O teste de estimulação com ACTH é outra opção de uso frequente no diagnóstico, porém possui uma menor sensibilidade. A diferença do TSBDD, a sua aplicabilidade é mais indicada no diagnóstico de HAC exógeno e para monitorar o tratamento. (FELDMAN *et al*, 2015; PETERSON 2007).

### **1.2.3.2 Hipercoagulabilidade**

O excesso de glicocorticoides pode ter efeitos diretos ou indiretos na vasculatura e no sistema hemostático, desenvolvendo um risco trombótico que pode ser potenciado pela presença de alterações metabólicas concomitantes (ISIDORI, *et al.*, 2015). Portanto, uma complicação frequente do HAC é a trombose ou tromboembolismo do sistema venoso e/ou arterial, observando-se com maior frequência no leito vascular pulmonar, aórtico e esplênico (BOSSWOOD; LAMB, 2000; HARDIE *et al.*, 1995; RESPESS *et al.*, 2012). Em humanos, estudos revelaram que pacientes com HAC tem uma chance dez vezes maior de sofrer trombose (STUJIVER, *et al.*, 2011), predisposição que aumenta naqueles que foram submetidos à cirurgia (REITMEYER; VANCE; LAWS, 2002). Em cães, a obesidade, a hipertensão, o incremento no hematócrito (estase vascular) e períodos prolongados de repouso, são alguns dos fatores de risco presentes na síndrome de Cushing (FELDMAN *et al.*, 2015).

Vários são os estudos que sugerem uma tendência à hipercoagulabilidade no HAC canino, porém muitos dos resultados são incongruentes. Diversas teorias são baseadas no aumento da atividade procoagulante, diminuição na fibrinólise ou ambos. Em humanos a maioria dos estudos mostraram um aumento do FVIII e no FvW (COELHO *et al*, 2014), sendo o FVIII o único que mostrou um aumento consistente e que foi normalizado após o tratamento (JACOBY *et al.*, 2001). O hipercortisolismo produz um incremento inespecífico na síntese de proteína em diferentes tecidos, efeito que explicaria o incremento na concentração de alguns dos fatores de coagulação (FELDMAN *et al.*, 1986). Feldman *et al.* (1986), e Jacoby *et al.* (2001) encontraram um aumento significativo dos fatores II, V, VII, IX, X, XII e fibrinogênio em cães, no entanto, não acharam alteração nenhuma do FVIII.

Em cães, a hipercortisolemia tem sido associada com trombocitose, porém alguns trabalhos não encontraram diferença estatística em relação ao

grupo controle (ROMÃO *et al.*, 2013; KLOSE; CREEVY; BRAINARD, 2011). Os glicocorticoides exercem um efeito permissivo na eritropoiese, e acredita-se que exista um mecanismo similar na trombopoiese. Além da contagem, a atividade das plaquetas também pode ser alterada observando-se um aumento na agregação plaquetária e, por conseguinte, um incremento no risco trombótico (ROMÃO *et al.*, 2013; KOL *et al.*, 2013).

As alterações metabólicas típicas do HAC podem produzir dano vascular, resultando na ativação da cascata de coagulação. Em humanos, a aterosclerose é associada com dislipidemias, principalmente quando envolvem o incremento nas lipoproteínas de baixa densidade (KLOSE; CREEVY; BRAINARD, 2011). Enquanto a hipertensão é associada a dano endotelial e alteração do fluxo sanguíneo (PACE *et al.*, 2013). Num estudo realizado em ratos com hipertensão e/ou hiperlipidemia, foi evidenciado um estado de hipercoagulabilidade caracterizado por hiperfibrinogemia, sendo a hiperlipidemia a alteração que exerceu maior efeito (GOMIBUCHI, 2007). A hiperfibrinogemia também foi evidenciada em cães e tem mostrado uma correlação positiva com alterações de TEM, no entanto, apenas os níveis de fibrinogênio normalizaram após a resolução clínica. Isto sugere que o estado de hipercoagulabilidade pode ser influenciado por mais de um mecanismo (KOL *et al.*, 2013).

A hipofibrinólise, ocasionada pelo incremento do fator inibidor do plasminogênio (PAI) ou da  $\alpha_2$  antiplasmina é outro dos mecanismos propostos. O incremento pode estar associado ao excesso de glicocorticoides ou à hiperglicemia consequente de uma diabetes mellitus concomitante (WONG; KOCH; BEHLING-KELLY, 2017; FATTI *et al.*, 2000). Estudos realizados em humanos com HAC tem evidenciado um aumento persistente do dímero-D (COELHO *et al.*, 2014), produto da fibrinólise que é frequentemente utilizado como indicador de coagulação ativa. Contudo, não foi demonstrada ainda a relevância deste parâmetro na suspeita de risco trombótico no HAC canino (PACE *et al.*, 2013).

Na síndrome de Cushing, a proteinúria tem uma incidência de 44-75% em cães sem infecção urinária. A mesma pode estar associada à presença de glomerulonefrite, glomerulosclerose, aumento no tamanho dos poros glomerulares, alteração da permeabilidade ou amiloidose (NICHOLS, 1997). Embora alguns estudos tenham mostrado diminuição de antitrombina (AT) em

pacientes com glomerunefrite, outros revelaram níveis normais em presença de proteinúria (JACOBY *et al.*, 2001; PACE *et al.*, 2013). O complexo trombina antitrombina (TAT) é produzido rapidamente depois da produção de trombina e tem sido utilizado como marcador subclínico de trombose. O aumento sugere um incremento na geração de trombina e, por conseguinte, um incremento na ativação da coagulação. Alterações nos níveis de TAT foram reportadas em pacientes com HAC, em presença de níveis normais ou diminuídos de AT (JACOBY *et al.*, 2001; PACE *et al.*, 2013).

### **1.3 JUSTIFICATIVA**

Apesar da hipercoagulabilidade ser uma complicação potencialmente fatal associada a diversas doenças, ela é subdiagnosticada devido à falta de testes hemostáticos que avaliem o processo completo da coagulação. Dentro dos fatores predisponentes à trombose, o hipercortisolismo é um dos mais relevantes na endocrinologia veterinária, porém, um dos menos estudados até hoje. A alta prevalência do HAC canino e sua correlação com o tromboembolismo pulmonar, leva à necessidade de testes que facilitem a instauração de um tratamento profilático, pois compreendendo a patogênese e detectando os pacientes em risco, a escolha da profilaxia será mais certa.

As alterações hemostáticas na síndrome de Cushing tem sido objeto de pesquisa nos últimos anos, porém os dados obtidos são limitados e pouco conclusivos. Em cães, a maioria das pesquisas utilizam um único marcador hemostático e/ou fibrinolítico, medindo apenas algumas partes da hemostasia. Diferente dos testes tradicionais, o método de CAT consegue avaliar o risco trombótico, sendo que o produto final dosado é o resultado da interação entre as proteases e seus inibidores. O Trombograma Calibrado Automatizado, é uma metodologia relativamente recente que avalia a hemostasia global. Porém, as informações sobre sua aplicabilidade na medicina veterinária ainda são escassas. Pretende-se mediante este estudo caracterizar o perfil hemostático, o que poderá contribuir na seleção de critérios para a instauração de tratamentos antitrombóticos profiláticos em cães com HAC, assim como constituir uma referência para futuros estudos sobre a aplicabilidade do TGT na medicina veterinária.

## **2. TRABALHO CIENTÍFICO**

Revista “Research in Veterinary Science”. Link de acesso para instruções de formatação:

[https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/623070?generatepdf=true](https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623070?generatepdf=true)

## Original article

### Thrombin generation assay and its role for predicting thrombotic risk in naturally occurring canine hyperadrenocorticism

Silvia Eugenia Vargas Mora <sup>a\*</sup>, Felipe Gazza Romão <sup>a</sup>, Bruna dos Santos <sup>b</sup>, Maria das Graças Carvalho <sup>c</sup>, Rita Carolina Figueiredo Duarte<sup>c</sup>, Viviani De Marco Bernardes <sup>d</sup>, Priscila Assis Lopes <sup>d</sup>, Regina Kiomi Takahira <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> *Department of Veterinary Clinics, São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo 18618-681 Brazil.*

<sup>b</sup> *Department of , University of São Paulo (USP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo, São Paulo 05508-270 Brazil.*

<sup>c</sup> *Department of Clinical and Toxicology Analyses, Federal University of Minas Gerais (UFMG), School of Pharmacy, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 Brazil.*

<sup>d</sup> *Naya Veterinary Specialty Center, São Paulo, São Paulo 04608-003 Brazil.*

\*Corresponding author. +55(14)997820769

E-mail adress: [sevm201@gmail.com](mailto:sevm201@gmail.com) (S.E.V. Mora)

## Highlights

- Dogs with hyperadrenocorticism present higher thrombin generation than healthy dogs.
- Low concentrations of activator in TGA are unsuitable for detecting hypercoagulability in canine hyperadrenocorticism.
- Degree of hypercortisolism influences antithrombin and fibrinogen levels.
- Antithrombin levels and proteinuria are not correlated.
- Dogs with hyperadrenocorticism present higher levels of antithrombin and fibrinogen and shortened PT and aPTT

## Abstract

Canine hyperadrenocorticism is a common endocrinological disorder caused by chronic secretion of glucocorticoid, often associated to a hypercoagulable state and secondary thrombosis. Thrombin is the key regulator of coagulation and its generation can be estimated by a thrombin generation assay (TGA) that evaluates the overall potential of hemostasis. Our objective was to determine if TGA is a suitable method for assessing hypercoagulable tendency in dogs with naturally occurring HAC. As well as to correlate with other coagulation markers such as fibrinogen, antithrombin (AT), D-dimer, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), as well as routine laboratory tests for elucidating possible prothrombotic mechanisms. We hypothesized that Cushing patients would manifest a hypercoagulable tendency characterized higher thrombin generation when compared to healthy dogs.

The majority of dogs (80.6%) presented at least one alteration of the hemostatic profile and/or TGA parameters. TGA at high concentration of activator



showed significantly higher ETP ( $P= 0.0239$ ) and peak ( $P= 0.0281$ ) in Cushing patients. Fibrinogen ( $P= <0.0001$ ) and AT ( $P= 0.0444$ ) activity were significantly higher in the HAC group, while PT ( $P= 0.0046$ ) and aPTT ( $P= 0.0002$ ) were lower. Basal cortisol levels correlated positively with fibrinogen levels ( $r= 0.4503$ ;  $P= 0.0355$ ) and negatively with AT values ( $r= -0.4580$ ;  $P= 0.0280$ ). Fibrinogen and hematocrit values showed a negative correlation ( $r= -0.4853$ ;  $P= 0.0076$ ). Our study showed that dogs with HAC presented higher thrombin generation, however, TGA performed with lower concentrations of tissue factor were inadequate for assessing hypercoagulability. Degree of hypercortisolism influences AT and fibrinogen levels. Proteinuria does not appear to determine AT activity and dogs with HAC showed a significantly shortened PT and aPTT.

*Keywords:* Thrombosis; Hypercortisolism; Coagulation; Hypercoagulability; Cushing's syndrome.

## 1. Introduction

Hyperadrenocorticism (HAC) or Cushing's syndrome is a common endocrinopathy in dogs characterized by endogenous or exogenous chronic exposure to glucocorticoids. Its etiology is classified as ACTH-dependent and ACTH-independent, the first one related with pituitary (PDH) or ectopic overproduction of ACTH, and the second one with an excessive secretion of cortisol by an adrenal tumor (ADH) or hyperplasia (Ramsey and Ristic, 2007).

A life-threatening, but sub diagnosed complication of HAC is arterial or venous thrombosis secondary to a hypercoagulable state (Isidori et al., 2015; Miljic et al., 2012). The incidence of thromboembolic events is undefined, thus, information about its prevalence is based on anecdotal events, case reports and retrospective studies (Boswood et al., 2000; Teshima et al., 2007). In humans with HAC, it has been reported a 10-fold increased risk when compared to the general population; which seems to rise in postoperative patients (Stuijver et al., 2011).

Findings regarding hypercoagulability in canine HAC are conflicting; hence, the pathophysiological mechanisms remain unclear. Different studies suggest an increased procoagulant activity, impaired fibrinolytic capacity, or both (Pace et al., 2013). Additionally, conditions related with HAC, such as obesity, dyslipidemia, diabetes mellitus (DM), and hypertension have also been linked with a higher tendency of thrombosis (Aburto-Mejía et al., 2017; Gomibuchi et al., 2007; Hess et al., 2003).

The latest model of hemostasis elucidated thrombin as the main regulator of coagulation, its procoagulant and anticoagulant properties have turned it into a suitable marker for detecting hypo and hypercoagulability (Mann et al., 2003). The thrombin generation assay (TGA) is a novel method that estimates the overall potential of the hemostatic system by continuously measuring thrombin's proteolytic activity (Castoldi and Rosing, 2011; Hemker et al., 2003). Previous studies in dogs with HAC have unsuccessfully applied global assays of hemostasis and conventional tests for identifying hypercoagulability (Klose et al., 2011; Kol et al., 2013; Park et al., 2013; Rose et al., 2013). However, most of them presented methodological drawbacks, such as a lack of a well-defined control group, and poor correlation with other coagulation markers, routine laboratory tests, and degree of hypercortisolism (Klose et al., 2011; Park et al., 2013; Rose et al., 2013).

The aim of this study was to evaluate the ability of TGA for assessing hypercoagulable tendency in dogs with naturally occurring HAC. As well as to correlate with an hemostatic profile comprised of fibrinogen, antithrombin (AT), D-dimer, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), and routine laboratory tests (complete blood count [CBC] and biochemistry panel) for elucidating possible prothrombotic mechanisms. We hypothesized that dogs with newly diagnosed HAC would present abnormal TGA parameters suggestive of a hypercoagulable tendency when compared to the control group.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Patients and study design*

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of São Paulo State University (UNESP), Brazil (protocol number 0163/2018). Samples were collected at a Veterinary Specialty Center (Naya Veterinary Specialties, São Paulo, Brazil) with previous consent of all patient owners.

Dogs with confirmed ACTH-dependent or ACTH-independent HAC were included in the study. The diagnosis was based on history, clinical suspicion, CBC (Sysmex pocH-100V Diff), urine protein:creatinine ratio (UPCR), serum biochemical profile (Cobas Mira Plus, chemistry analyzer, Roche), urinalysis, abdominal ultrasound and low-dose dexamethasone suppression test (LDDST). Cortisol concentrations were assessed by radioimmunoassay (Coat-A-Count, RIA, Siemens), using the diagnostic threshold values of  $>1.20\mu\text{g/dl}$  for 8 hour post-dexamethasone (0.01mg/kg IV) cortisol. Endogenous adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and imaging findings (bilateral adrenal enlargement or unilateral adrenal mass) were assessed to identify the origin of HAC. Animals were excluded if they had been treated with corticosteroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, antithrombotics, or in presence of comorbidities that might predispose to thrombosis, such as DM, neoplasia and kidney failure.

For the control group, forty dogs between 1-10 years old were recruited to establish reference intervals and group comparison. Dogs were deemed healthy according to their physical examination, history, CBC and serum biochemistry

panel. None of the animals received treatment or presented any clinical condition in the preceding 3 months.

## *2.2 Sample collection*

Blood was drawn via atraumatic jugular or cephalic venipuncture using a 20 G needle and a 5ml syringe. From the whole sample, 0.5ml of blood was placed in an EDTA tube for CBC, 2ml in a sodium fluoride tube for glucose assessment and 3.5ml in a non-additive tube for serum biochemistry panel (alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], alkaline phosphatase [ALP], gamma-glutamyl transpeptidase [GGT], total protein, albumin, urea, creatinine, cholesterol and triglycerides). Urine sample was collected via cystocentesis or midstream sampling for urinalysis and UPCR. Once the diagnosis was confirmed, and prior to medical or surgical intervention, a 3.6ml blood sample was collected in a tube containing 3.2% sodium citrate for coagulation tests and TGA. Citrated whole blood was centrifuged for 15 minutes and the obtained plasma was aliquoted and frozen at -80°C until further analysis.

## *2.3 Hemostatic profile*

The coagulation tests PT and aPTT were performed in automated coagulation instrument CLOTimer (CLOT), using standardized coagulometric method and according to the guidelines of each commercial kit (Dade Actin FSL and Thromborel S; respectively). Fibrinogen, AT, and D-dimer values were assessed in automated coagulation analyzer Sysmex CA-600 (Siemens Healthcare Diagnostics) by clotting (Fibrinogen; Dade Thrombin), chromogenic

(AT; Berichrom Antithrombin III), and immuno-chemical (D-Dimer; INNOVANCE D-Dimer) methods.

#### *2.4 Thrombin generation test*

Thrombin generation (TG) was carried out in platelet poor plasma (PPP) using a 96-well plate fluorometer (Thrombinoscope BV; Diagnostica, STAGO). The assay was performed applying the fluorogenic substrate and recombinant tissue factor (TF) by means of the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) method (Hemker and Béguin, 1995), with slight modifications. Each assay required two sets of readings executed in two different wells, one designed for TG to occur (TG well) and the other one for thrombin calibrator measurement (CL well), hence each plasma was compared to its own calibrator. All of the wells were pipetted with 80  $\mu$ L the PPP sample to be tested, and additional 20 $\mu$ L of thrombin calibrator reagent (Diagnostica Stago, Asnières, France) were added to the CL wells. The filled plate was then incubated for 10 minutes at 37°C in the fluorimeter (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific), followed by the addition of 20 $\mu$ L of TF in low or high concentrations (PPP-Low and PPP-High, Diagnostica Stago) into the TG wells. Finally, 20 $\mu$ L of fluorescent substrate (Fluca-Kit, Diagnostica Stago) were automatically dispensed into each well. The reaction was read during 60 minutes and a Thrombinoscope software (Diagnostica Stago) was used to construct a TG curve, displayed as time (minutes) versus thrombin concentration (nM), and to calculate TGA parameters, i.e., lagtime, time to peak, peak and endogen thrombin potential (ETP).

## 2.5 Statistical analysis

Analyses were carried out using a commercial statistical software GraphPad Prism Version 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) and reference intervals (RI) were established with the Reference Value Advisor V 2.1 software (Office 2012-2013); when sample size was too small, RI were presented as 95% confidence intervals. Results were described as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median and percentiles (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>), according to their parametric and non-parametric nature. Normal distribution was recognized using the Shapiro-Wilk test and groups were compared by Student's *t* test (paired) or Mann-Whitney *U* test. Pearson test was employed for analysis of correlation. All statistical significance was set at *P-value*<0.05.

## 3. Results

Thirty-two patients with endogenous active HAC were enrolled in the study, five of them confirmed as ADH and 26 as PDH. The group comprised 19 females and 11 males with a mean age of 11.2 $\pm$ 2.6 years old, including four-mixed breed dogs, four Maltese, three Dachshunds, two Beagle, two French Bulldog and two Yorkshire Terrier. The remaining breeds were represented by a single dog of each (Fox Terrier, West Highland Terrier, Bichon Frise, Shih Tzu, Scottish Terrier, English Springer Spaniel and Toy French Poodle). To conform the control group, 40 healthy client-owned dogs, with a mean of age of 3.7  $\pm$ 2.3 years were evaluated. Predominantly medium and large-sized dogs were represented, such as Labrador Retriever, Belgian Malinois Pastor, Doberman, Pug, Bull Terrier and mixed-breed dogs.

### 3.1 Individual patients

TGA performed with PPP-Low revealed prolonged lag time in 3/21 (14.3%) dogs, increased ETP in 1/21 (4.8%) and prolonged TTpeak in 1/21 (5%) patients. At PPP-High, one dog presented prolonged lag time (1/9; 11.1%) and 6/9 dogs showed increased ETP (67%). In the hemostatic profile, 26% (8/31) of dogs exhibited AT activity above RI and 35.5% (11/31) presented increased levels of fibrinogen. PT and aPTT values were below RI in 29% of the dogs (9/31). From the 31 patients, 25 (80.6%) presented at least one alteration in the hemostatic profile and/or TGA. In CBC and biochemistry panel, 13.3% (3/30) of Cushing patients showed erythrocytosis, 45.2% (14/31) thrombocytosis, and 44.4% (12/27) hyperglycemia. The majority of dogs presented increased ALT, ALP, GGT, hyperlipidemia and proteinuria (71% (22/31); 87% (20/23); 91.3% (21/23); 84% (26/31); 63.2% (12/19), respectively).

### 3.2 Group comparison

Results of TGA parameters are described in table 1. When compared to healthy controls, HAC patients showed a prolonged lag time ( $P = 0.0003$ ) and TTpeak ( $P = 0.0027$ ) using PPP-Low. Contrarily, TGA performed at PPP-High revealed greater ETP ( $P = 0.239$ ) and peak ( $P = 0.0281$ ) values. For the rest of coagulation parameters (Table 2.), Cushing patients revealed significantly higher fibrinogen levels ( $P = <0.0001$ ), increased AT activity ( $P = 0.0444$ ), and shortened PT ( $P = 0.0046$ ) and aPTT ( $P = 0.0002$ ) values. As shown in table 1 and 2. sample size was unequal among the parameters, mainly due to limited sample volumes and analytical errors during TGA performance.



Table 3 summarizes selected hematological and biochemical variables. As expected, Cushing patients showed a highly significant increase in platelet count, ALT, ALP, GGT, triglycerides, glucose ( $P = <0.0001$  for all parameters), and cholesterol ( $P = 0.0009$ ), accompanied by lower albumin levels ( $P = 0.0150$ ) when compared to healthy dogs. No significant correlation was found between hemostatic profile and TGA parameters; though, basal cortisol levels correlated positively with fibrinogen ( $r = 0.4503$ ;  $P = 0.0355$ ; Fig.1) and negatively with AT activity ( $r = -0.4580$ ;  $P = 0.0280$ ; Fig. 3). Fibrinogen levels and hematocrit values showed a negative correlation ( $r = -0.4853$ ;  $P = 0.0076$ ; Fig. 2)

#### **4. Discussion**

TGA performed with PPP-High revealed greater values of ETP and peak in dogs with HAC, confirming our hypothesis that these patients manifest higher TG than healthy population. However, TGA showed discordant alterations when lower concentrations of TF were applied (1pM). Contrarily to the typical hypercoagulable profile (shortened lag time and TTpeak and increased peak and ETP), we observed a prolonged lag time and TTpeak in Cushing patients. Likewise, Dengate et al. (2016) recognized these alterations in dogs with proven thrombosis using lower concentrations of TF (0.15pM). The amount of activator and imbalances in endogenous procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors are known to affect lag time (Ollivier et al., 2010). Since we applied equal amounts of TF in both groups, we believe that technical issues and/or particularities related with Cushing syndrome might be interfering.

The presence of residual platelets and microparticles in plasma—promoted by low centrifugation, storage and thawing—can hamper TGA performance. As seen in our results, dogs with HAC tend to present thrombocytosis, so a greater interference is probable (Tripodi, 2016; Cuq et al., 2018). A study evaluating TGA concluded that variability can differ between healthy and ill dog population and that sample collection techniques constitute an important source of preanalytical variability (Cuq et al., 2018). Despite observing no correlation between AT and lag time or TT<sub>peak</sub>, we theorized that increased AT activity seen in hypercortisolic dogs, might be delaying these parameters due to its attenuating effects on TG. AT and tissue factor pathway inhibitor, are the main antithrombotic regulators of the initiation phase, which could explain why only the first two parameters of TG curve were unusual. The recommended concentrations of TF in humans, range from 1-5pM (Tripodi, 2016): at 5pM, TG relies upon factors VIII and IX, and around 1pM, TG critically depends on TF (Hemker et al., 2003). Even with a significant smaller sample size, we were able to identify increased TG in Cushing patients using PPP-High. Meaning that TF concentrations of 5pM could have exceeded the effect of increased AT in TG or any other interference that might be occurring.

Behavior of AT activity in HAC is controversial, while some studies report lower levels associated to secondary glomerulonephritis and proteinuria (Donahue et al., 2011; Jacoby et al., 2001), others report normal or increased activity attributed to a compensatory mechanism toward thrombosis (Koutroumpi et al., 2014; Pace et al., 2013). Cushing patients exhibited higher AT activity in presence of proteinuria (with no correlation), meaning that a compensating

production in response to renal loss might be occurring; yet, AT showed a tendency of diminishing as cortisol levels increase, characterized by a moderate negative correlation. We surmise that this compensating mechanism might be less effective in chronic disease, possibly related with detrimental liver capacity or a more severe nephropathy. The current study was performed in dogs with newly diagnosed HAC and prior to treatment, so different chronicity scenarios were involved. Previous studies have shown that proteinuria in HAC could be either from glomerular or tubular origin (Cavalcante et al., 2013; Caragelasco et al., 2017). AT is a low molecular weight protein that could be easily lost in urine; however, renal loss does not solely depend on molecular size and permeability. Protein charge and changing tubular secretion and reabsorption can also determine protein passage (Smets et al., 2012). Evaluations of dogs with protein loss nephropathies have shown increased protein C in presence of decreased AT; supporting the theory that a protective mechanism might be occurring (Donahue et al., 2011). A long-term evaluation including arterial pressure, protein S, protein C, AT and urine electrophoresis for determining origin of proteinuria could fill some gaps regarding AT behavior in HAC.

The mechanisms associated with hyperfibrinogenemia and thrombotic risk derive from studies showing a shortened time to vessel occlusion, faster fibrin formation and a stronger and more stable clot, resistant to *in vivo* thrombolysis. However, there is no evidence of hyperfibrinogenemia itself causing spontaneous thrombosis (Machlus et al., 2011; Walton et al., 2015). One of the most relevant alterations seen in this study was increased fibrinogen activity and a straight relationship with degree of hypercortisolism; supporting previous findings that

depicted regularization of fibrinogen levels after clinical resolution (Kol et al., 2013; Park et al., 2013). In a parallel experiment (not published yet) using thromboelastometry (TEM), we were able to prove the effects of hyperfibrinogenemia on clot viscoelastic properties, principally by correlating fibrinogen levels with the maximum amplitude (MA) parameter. However, a follow up evaluation of dogs with HAC, showed persistent alteration of MA despite normalization of fibrinogen levels, implying that more complex mechanisms may be influencing clot formation (Kol et al., 2013). Of note, human fibrinogen chain variations have been linked with both anticoagulant and prothrombotic effects, some of them related with protection of thrombin against AT inactivation and reduction of thrombin-antithrombin complexes (Walton et al., 2015). This said, we speculate that fibrinogen procoagulant effects may be due to a dysfibrinogenemia, rather than a hyperfibrinogenemia (Fish and Neerman-Arbez, 2012); explaining why parameters that evaluate clot formation remain altered even after stabilization of fibrinogen and cortisol levels. Because of its lack of specificity, it is rushed to affirm that hyperfibrinogenemia represents a causative mechanism or a marker for thrombotic risk. Thus, further research is required to comprehend fibrinogen species-specific properties and its implication on hypercoagulability.

Conditions related with HAC, such as hypertension, hyperlipidemia, glucose intolerance, and erythrocytosis are known to enhance hyperfibrinogenemia. We found no association of fibrinogen activity with triglycerides or cholesterol levels, but a negative correlation with hematocrit (HTC) values was assessed. Besides increasing RBC aggregation and blood

viscosity, fibrinogen-RBC binding interaction promotes the incorporation of RBC into venous thrombi (Walton et al., 2015), so it is interesting to assume that high fibrinogen levels may counteract erythrocytosis produced by hypercortisolism. This RBC incorporation can alter fibrin network of thrombi, making it resistant to fibrinolytic mechanisms (Cines et al., 2014). In addition, some authors have proposed higher levels of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) as a cause of hypofibrinolysis in hyperlipidemic dogs (Wong et al., 2017). Explaining why we noted normal levels of D-dimer, in spite of the presence of active coagulation.

In agreement with most of the studies, our data showed a shortened PT and aPTT in Cushing patients. Traditionally these tests have been used for assessing hypocoagulability; however, their utility for detecting hypercoagulability has been questioned for not reflecting real contribution of small quantities of active factors; as well as being easily affected by pre-analytical errors and interferences. (Lipets and Ataulakhanov, 2015). Some studies demonstrated an association between shortened aPTT and increased thrombin generation, characterized by higher prothrombin fragments, D-dimer and TAT complexes (Korte et al., 2000). In addition, shortened aPTT has probe efficacy as a risk marker of deep venous thrombosis (Tripodi et al., 2004), and as an indicator of abnormal activity of factors V, XI, XII and VWf (Lipets and Ataulakhanov, 2015). Despite not being a suitable method for evaluating overall hemostasis, these tests can be useful in hypercoagulable states that involve elevation of specific coagulation factors. In canine HAC, few studies have assessed coagulation factor components; yet, there are reports of increased II, V, VII, IX, X, XII and VIII in some animals (Feldman et al., 1986; Pace et al., 2013). Further research

evaluating individual coagulation factors, PT and aPTT are necessary to determine whether these conventional tests constitute an important prothrombotic marker in HAC.

There are limitations to our study. First, we did not minimize interference of TGA generated by venipuncture, nor the presence of microparticles in citrated plasma. Second, controls were mainly represented by younger and bigger animals than Cushing patients, which can create biological variation between groups. Third, our study omitted clinical manifestations, arterial pressure, and a long-term evaluation until clinical resolution. Fourth, we were unable to compare PDH with ADH HAC due to small sample size in the ADH group. However, we suspect that adrenal tumors might express higher thrombotic risk as they commonly develop vascular invasion. Finally, degree of hypercortisolism was assessed using basal cortisol levels. Although these values were capable of showing moderate correlations, we consider that severity of hypercortisolism would be better assessed using a 24h urine cortisol:creatinine ratio.

In conclusion, dogs with naturally occurring HAC presented higher TG when compared to controls. TGA performed with low concentrations of TF is unsuitable for achieving prothrombotic tendency in dogs with HAC. Degree of hypercortisolism plays an important role in the severity and behavior of certain coagulation markers. Increased AT activity and lack of correlation with proteinuria revealed that AT levels are unlikely determined by renal loss. PT, aPTT and fibrinogen concentration can provide relevant information about coagulation status in Cushing patients. Until convincing evidence states a reliable and more

accessible marker for thrombotic risk, it would be interesting to create an algorithm involving traditional coagulation tests, presence of secondary complications (such as hyperlipidemia, glucose intolerance, proteinuria and hypertension) and degree of hypercortisolism to improve selection of patients for enrollment in prophylactic treatments.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgment**

This study was financed in part by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

### **Supplementary material**

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:

### **References**

- Aburto-Mejía, E., Santiago-Germán, D., Martínez-Marino, M., Mariá Eugenia Galván-Plata, Almeida-Gutiérrez, E., López-Alarcón, M., Hernández-Juárez, J., Alvarado-Moreno, A., Leanõs-Miranda, A., Majluf-Cruz, A., Isordia-Salas, I., 2017. Hypofibrinolytic State in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus Aggravated by the Metabolic Syndrome before Clinical Manifestations of Atherothrombotic Disease. *Biomed Res. Int.* 2017, 6519704. <https://doi.org/10.1155/2017/6519704>
- Boswood, C.R, L., R.N, W., 2000. Aortic thromboembolism 6 dogs. *J. Small Anim. Pract.* 41, 109–114.
- Caragelasco, D.S., Kogika, M.M., Martorelli, C.R., Kanayama, K.K., Simões, D.M.N., 2017. Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostane. *Pesqui.*

Vet. Bras. 37, 734–740. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700014>

Castoldi, E., Rosing, J., 2011. Thrombin generation tests. *Thromb. Res.* 127, S21–S25. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(11\)70007-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(11)70007-X)

Cavalcante, C.Z., Kogika, M.M., Bacic, A., Santoro, M.L., Miyashiro, S.I., Sault, J.P., Oyafuso, M.K., Simões, D.M., 2013. Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica. *Pesqui. Veterinária Bras.* 33, 1357–1363. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2013001100012>

Cines, D.B., Lebedeva, T., Nagaswami, C., Hayes, V., Masefski, W., Litvinov, R.I., Rauova, L., Lowery, T.J., Weisel, J.W., 2014. Clot contraction: Compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* 123, 1596–1603. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-523860>

Cuq, B., Blois, S.L., Wood, R.D., Monteith, G., Abrams-Ogg, A.C., Bédard, C., Wood, G.A., 2018. Reproducibility, stability, and biological variability of thrombin generation using calibrated automated thrombography in healthy dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 47, 218–226. <https://doi.org/10.1111/vcp.12602>

Donahue, S.M., Brooks, M., Otto, C.M., 2011. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 21, 346–355. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2011.00656.x>

Duarte, R.C.F., Rios, D.R.A., Rezende, S.M., Jardim, L.L., Ferreira, C.N., Carvalho, M. das G., 2019. Standardization and evaluation of the performance of the thrombin generation test under hypo- and hypercoagulability conditions. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 41, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.08.007>

Fish, R.J., Neerman-Arbez, M., 2012. Fibrinogen gene regulation. *Thromb. Haemost.* 108, 419–426. <https://doi.org/10.1160/TH12-04-0273>

Gomibuchi, H., Okazaki, M., Iwai, S., Kumai, T., Kobayashi, S., Oguchi, K., 2007. Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: A potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia. *Exp. Anim.* 56, 1–10. <https://doi.org/10.1538/expanim.56.1>

Hemker, H.C., Giesen, P., Dieri, R.A., Regnault, V., De Smedt, E., Wagevoord, R., Lecomte, T., Béguin, S., 2003. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 4–15. <https://doi.org/10.1159/000071636>

Hemker, H.C., Béguin, S., 1995. Its Assessment in Plasma : Generation Thrombin Potential Thrombin Via the Endogenous. *Haemostasis* 74, 134–



- Hess, R.S., Kass, P.H., Van Winkle, T.J., 2003. Association between Diabetes Mellitus, Hypothyroidism or Hyperadrenocorticism, and Atherosclerosis in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 489–494. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0489:ABDMHO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0489:ABDMHO>2.3.CO;2)
- Isidori, A.M., Minnetti, M., Sbardella, E., Graziadio, C., Grossman, A.B., 2015. The spectrum of haemostatic abnormalities in glucocorticoid excess and defect. *Eur. J. Endocrinol.* 173, R101–R113. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0308>
- Jacoby, R.C., Owings, J.T., Ortega, T., Gosselin, R., Feldman, E.C., 2001. Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing syndrome. *Arch. Surg.* 136, 1003–1007. <https://doi.org/10.1001/archsurg.136.9.1003>
- Klose, T.C., Creevy, K.E., Brainard, B.M., 2011. Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 21, 625–632. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2011.00696.x>
- Kol, A., Nelson, R.W., Gosselin, R.C., Borjesson, D.L., 2013. Characterization of thrombelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. *Vet. J.* 197, 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.047>
- Korte, W., Clarke, S., Lefkowitz, J.B., 2000. Short activated partial thromboplastin times are related to increased thrombin generation and an increased risk for thromboembolism. *Am. J. Clin. Pathol.* 113, 123–127. <https://doi.org/10.1309/g98j-ana9-rmnc-xlyu>
- Koutroumpi, S., Spiezia, L., Albiger, N., Barbot, M., Bon, M., Maggiolo, S., Gavasso, S., Simioni, P., Frigo, A., Mantero, F., Scaroni, C., 2014. Thrombin generation in Cushing's Syndrome: Do the conventional clotting indices tell the whole truth? *Pituitary* 17, 68–75. <https://doi.org/10.1007/s11102-013-0467-3>
- Lipets, E.N., Ataulakhanov, F.I., 2015. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thromb. J.* 13. <https://doi.org/10.1186/s12959-015-0038-0>
- Machlus, K.R., Cardenas, J.C., Church, F.C., Wolberg, A.S., 2011. Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice. *Blood* 117, 4953–4963. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316885>
- Mann, K.G., Brummel, K., Butenas, S., 2003. What is all that thrombin for? *J. Thromb. Haemost.* <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00298.x>
- Miljic, P., Miljic, D., Cain, J.W., Korbonits, M., Popovic, V., 2012. Pathogenesis

of vascular complications in Cushing's syndrome. *Hormones*.  
<https://doi.org/10.1007/bf03401535>

- Ollivier, V., Wang, J., Manly, D., Machlus, K.R., Wolberg, A.S., Jandrot-Perrus, M., Mackman, N., 2010. Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay. *Thromb. Res.* 125, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.03.003>
- Pace, S.L., Creevy, K.E., Krimer, P.M., Brainard, B.M., 2013. Assessment of coagulation and potential biochemical markers for hypercoagulability in canine hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1113–1120. <https://doi.org/10.1111/jvim.12159>
- Park, F.M., Blois, S.L., Abrams-Ogg, A.C.G., Wood, R.D., Allen, D.G., Nykamp, S.G., Downie, A., 2013. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1136–1142. <https://doi.org/10.1111/jvim.12162>
- Ramsey, I., Ristic, J., 2007. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. In *Pract.* 29, 446–454. <https://doi.org/10.1136/inpract.29.8.446>
- Reitmeyer, M., Vance, M.L., Laws, E.R., 2002. The neurosurgical management of Cushing's disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 73–79. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00281-2)
- Rose, L., Dunn, M., Bédard, C., 2013. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on Coagulation Parameters. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 207–211.
- Smets, P.M.Y., Lefebvre, H.P., Meij, B.P., Croubels, S., Meyer, E., Van de Maele, I., Daminet, S., 2012. Long-Term Follow-Up of Renal Function in Dogs after Treatment for ACTH-Dependent Hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 565–574. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00915.x>
- Stuijver, D.J.F., Van Zaane, B., Feelders, R.A., Debeij, J., Cannegieter, S.C., Hermus, A.R., Van Den Berg, G., Pereira, A.M., De Herder, W.W., Wagenmakers, M.A.E.M., Kerstens, M.N., Zelissen, P.M.J., Fliers, E., Schaper, N., Drent, M.L., Dekkers, O.M., Gerdes, V.E.A., 2011. Incidence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: A multicenter cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3525–3532. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1661>
- Teshima, T., Hara, Y., Taoda, T., Koyama, H., Takahashi, K., 2007. Cushing's Disease Complicated with Thrombosis in a Dog. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 5–9.
- Tripodi, A., 2016. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 62, 699–707. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.248625>
- Tripodi, A., Chantarangkul, V., Martinelli, I., Bucciarelli, P., Mannucci, P.M.,

2004. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood* 104, 3631–3634.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1042>

Walton, B.L., Byrnes, J.R., Wolberg, A.S., 2015. Fibrinogen, red blood cells, and factor XIII in venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 13, S208–S215.  
<https://doi.org/10.1111/jth.12918>

Wong, C.J., Koch, M., Behling-Kelly, E.L., 2017. Development of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) assay and comparison of plasma PAI-1 activity in hyperlipidemic/dyslipidemic dogs with either hyperadrenocorticism or diabetes mellitus, and healthy dogs. *Res. Vet. Sci.* 111, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.11.004>

**Table 1**

Parameters of thrombin generation assay using low and high concentrations of tissue factor in dogs with hyperadrenocorticism and healthy controls.

Value	HAC	N	Control	N	RI	P
<b>TGA (PPP-Low)</b>						
Lag time (min)	3.05±0.69	21	2.39±0.58	39	0.8-3.4	0.0003
ETP (nM/min)*	392.7(313-542.9)	21	416.9(336.3-455.5)	40	195,1-686,4	0.9432
Peak (nM)	145.5±55.49	21	145.7±52.7	39	54.2-270.7	0.9887
TTpeak (min)	5.05±0.89	21	4.31±0.85	39	2.5-6.3	0.002
<b>TGA (PPP-High)</b>						
Lag time (min)*	1.67(1.5-1.67)	9	1.67(1.33-1.67)	25	1.4-1.6	0.2369
ETP (nM/min)*	562.7(450.1-585.4)	9	450.6(366.2-485.5)	23	395.9-479.7	0.0239
Peak (nM)*	203.2(186.3-221.8)	9	173.4(151.8-187.9)	24	147.3-263.6	0.0281
TTpeak (min)*	3.0(2.83-3.33)	9	3.0(2.67-3.33)	25	2.8-3.2	0.4503

\*Nonparametric data described as median and percentiles (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>). Abbreviations: HAC: hyperadrenocorticism, RI: reference interval, ETP: endogenous thrombin potential, TTpeak: time to peak.

**Table 2.**

Hemostatic profile in dogs with hyperadrenocorticism and healthy controls.

Value	HAC	N	Control	N	RI	P
<b>Hemostatic Profile</b>						
AT (%)	135±33.84	31	123.2±12.10	40	93.6-152.7	0.0444
Fibrinogen (mg/dL)	299.7±150.4	31	168.7±70.68	40	63.7-358.3	<0.0001
D-dimer (mg/L)*	0.58(0.29-1.3)	31	0.61(0.32-0.73)	40	0.2-4.4	0.9426
PT (seconds)	7.5(6.9-9.4)	25	8.6(7.61-10.79)	40	7.1-13.3	0.0046
aPTT (seconds)	11.8±2.89	28	14.73±3.05	40	10.4-21.2	0.0002

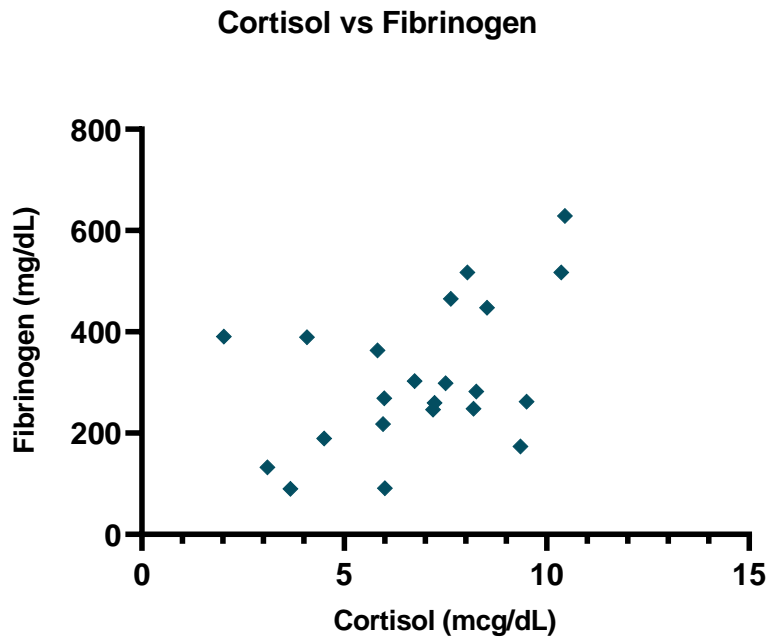
\*Nonparametric data described as median and percentiles (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>). Abbreviations; HAC: hyperadrenocorticism, RI: reference interval, AT: antithrombin, PT: prothrombin time, aPTT: activated partial thromboplastin time

**Table 3.**

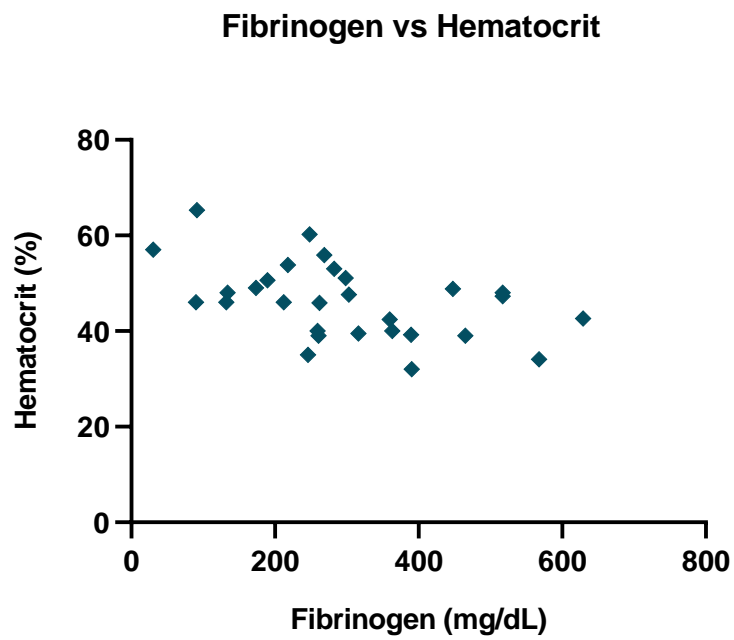
Selected hematological and biochemical parameters in dogs with hyperadrenocorticism and control group.

<b>Value</b>	<b>HAC</b>	<b>N</b>	<b>Control</b>	<b>N</b>	<b>RI</b>	<b>P</b>
Hematocrit (%)	46.21±7.71	30	49±5.04	40	37-55	0.0694
Platelet count (x10 <sup>3</sup> /μL)	454.8±185.1	31	250±62.62	40	160-430	<0.0001
ALT (U/L)*	110(83-240)	31	42(29.5-60.75)	40	21-102	<0.0001
ALP (U/L)*	564(169.3-1040)	29	40(26-66.75)	40	20-156	<0.0001
GGT (U/L)*	15(7-38)	23	4.05(3.3-5.4)	36	1.2-6.4	<0.0001
Cholesterol (mg/dL)	316.6±118.3	30	222.1±82.25	32	135-270	0.0005
Triglycerides (mg/dL)*	141(102-377)	31	69.5(44.25-103)	32	20-112	<0.0001
Glucose (mg/dL)*	102.2(92-123)	27	86(80-93)	39	70-110	<0.0001
Albumin (g/dL)	5.05±0.89	21	4.31±0.85	39	2.5-6.3	0.0027

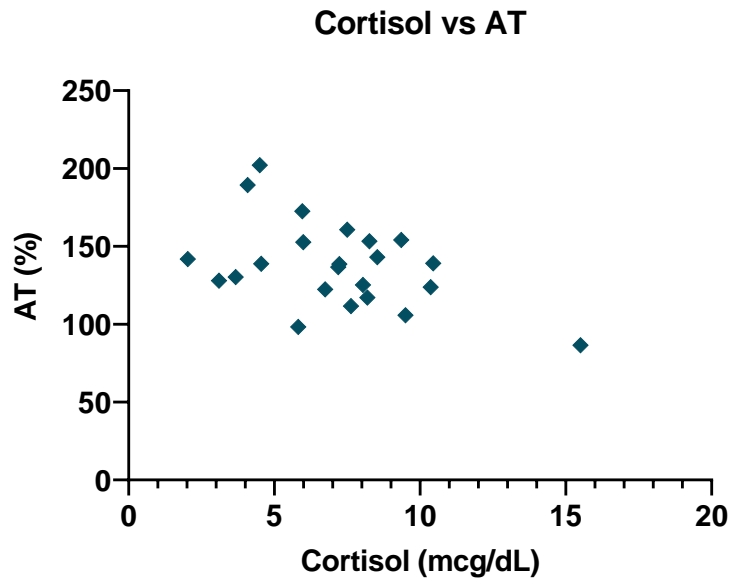
\*Nonparametric data described as median and percentiles (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>). Abbreviations: HAC: hyperadrenocorticism, RI: reference interval, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, GGT: gamma-glutamyl transferase



**Figure 1.** Correlation between cortisol levels and fibrinogen concentration in dogs with hyperadrenocorticism. A moderate positive correlation was detected ( $r = 0.4503$ ;  $P = 0.0355$ ).



**Figure 2.** Correlation between fibrinogen levels and hematocrit values. A moderate negative correlation was detected ( $r = -0.4853$ ;  $P = 0.0076$ ).



**Figure 3** Correlation between cortisol levels and antithrombin activity. A moderate negative correlation was detected ( $r = -0.4580$ ;  $P = 0.0280$ )



### 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem poucos estudos em cães que avaliem o estado de hipercoagulação mediante o teste de geração de trombina, sendo que a maioria deles tem mostrado resultados inespecíficos ou incompatíveis com trombose. Embora o teste tenha mostrado eficácia em humanos, a sua utilização em cães ainda precisa ser padronizada pois acredita-se que possa existir particularidades metodológicas ou interferências associadas ao processo de amostragem. Em cães, para minimizar a presença de interferências analíticas é recomendado descartar o primeiro tubo coletado e uma segunda centrifugação do plasma deve ser considerada quando a velocidade da centrifuga for insuficiente. Essas interferências podem ser potencializadas por particularidades próprias da doença primária, como foi observado nos cães com HAC do presente estudo. Para essas particularidades não interferirem nos resultados de TGT, adaptações na metodologia, principalmente na concentração de ativador, devem ser consideradas.

Além de ter detectado um aumento de geração de trombina em cães com HAC, alterações nos marcadores hemostáticos convencionais contribuíram na especulação de possíveis mecanismos pró trombóticos. A hiperfibrinogenemia tem sido até agora um dos achados mais consistentes no HAC. No entanto, é um marcador pouco específico que por si só, não demonstrado o desenvolvimento de trombose. Interpretado da forma correta e em correlação com outras alterações, pode constituir uma ferramenta importante na detecção de risco trombótico. O incremento de AT foi um dos achados mais relevantes e inesperados, pois contradiz postulações amplamente descritas na literatura. A sua ausência de correlação com a proteinúria e a correlação negativa observada com o grau de hipercortisolemia infere que mecanismos mais complexos possam estar envolvidos na determinação dos níveis de AT.

O delineamento de futuras pesquisas deve buscar a integração dos achados mais relevantes descritos até hoje. A compreensão e a detecção do estado de hipercoagulabilidade continua sendo um desafio e embora os testes de hemostasia global sejam promissórios, a sua aplicabilidade na rotina clínica

é limitada. Até encontrar uma opção viável e confiável para a detecção de risco trombótico, a formulação de um algoritmo que inclua testes de hemostasia tradicional, grau de hipercortisolemia e complicações secundárias tais como hiperlipidemia, hipertensão, proteinúria e resistência insulínica, poderiam ajudar a orientar a seleção de pacientes para tratamentos profiláticos.

### 3.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRIE, J., WATSON, T.D.G. Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and endocrine disease. **Journal of Small Animal Practice**. v. 34, n. 10, p. 507-512, 1993.

BERNTORP, E.; SALVAGNO, G.L. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 34, n. 7, p. 670-82, 2008.

BICK, R.L. **Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1, 2002.

BOSWOOD, A.; LAMB, C.R.; WHITE, R.N. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v. 41, n. 3, p. 109-114, 2000.

BRINKMAN, H.J.M. Global assays and the management of oral anticoagulation. **Thrombosis Journal**. v. 13, n. 9, p. 1-14, 2015.

BRUMMEL-ZIEDINS, K.E.; WOLBERG, A.S. Global Assays of Hemostasis. **Current Opinion in Hematology**. v. 21, n. 5, p. 395-403, 2015.

CARAGELASCO, D.S., KOGIKA, M.M., MARTORELLI, C.R., KANAYAMA, K.K., SIMÕES, D.M.N. Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostane. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, n.7, p. 734-740, 2017.

CASTOLDI, E., ROSING, J. Thrombin generation tests. **Thrombosis Research**. v. 127, n. 3, p. S21-S25, 2011.

COELHO, M.C.A. et al. Rotation thromboelastometry and the hypercoagulable state in Cushing's Syndrome. **Clinical Endocrinology**. v. 81, n. 5, p. 657-664, 2014.

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.

DAHLBACK, B. Blood Coagulation. **Haematology**. v. 355, n. 9215, p. 1627-1632, 2000.

DENGATE, A.L. et al. Differentiation between dogs with thrombosis and normal dogs using the overall hemostasis potential assay. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 26, n. 3, p. 446-452, 2016.

DRAKE, T.A.; MORRISEY J.H.; EDGINGTON, T.S. Selective Cellular Expression of Tissue Factor in Human Tissues: Implications for Disorders of Hemostasis and Thrombosis. **American Journal of Pathology**. v. 134, n. 5, p. 1087-1097, 1989.

DUARTE, R.C.F. FERREIRA C.N.; RIOS, D.R.A.; REIS, H.J.D.; CARVALHO, M.D.G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 9, n. 3, p. 259-265, 2017.

DUTT, T.; TOH, C.H. The Yin-Yang of thrombin and activated protein C. **British Journal of Haematology**. v. 140, n. 5, p. 505-515, 2008.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W.; REUSCH, C.E.; SCOTT-MONCRIEFF, C.R.; BEHRED, E.N. **Canine and Feline Endocrinology**. 4 ed. Missouri: Elsevier Saunders, p. 378, 2015.

FATTI, L.M. et al. Markers of activation of coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing's syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**. v. 23, n. 3, p. 145-150, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W.; REUSCH, C.E.; SCOTT-MONCRIEFF, C.R.; BEHRED, E.N. **Canine and Feline Endocrinology**. 4 ed. Missouri: Elsevier Saunders, p. 378, 2015

FELDMAN, B.F; RASEDEE, A; FELDMAN, E.C. Haemostatic abnormalities in canine Cushing's syndrome. **Research in Veterinary Science**. v. 41, n. 2, p. 228-230, 1986.

FELDMAN E.C. Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 183, n. 2 195-200, 1983.

GILOR, C; GRAVES, T.K. Interpretation of Laboratory Tests for Canine Cushing's syndrome. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 26, n. 2, p. 98-108, 2011.

GOMIBUCHI, H., OKAZAKI, M., IWAI, S., KUMAI, T., KOBAYASHI, S., OGUCHI, K. Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: A potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia. **Experimental Animals**. v. 56, n. 1, p. 1-10, 2007.

HARDIE, E.M.; VADEN, S.L.; SPAULDING, K.; MALARKEY, D.E. Splenic Infarction in 16 Dogs: A Retrospective Study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 3, n. 3, p. 141-148, 1995.

HIRSH, J.; HULL, R.D.; RASKOB, G.E. Epidemiology and Pathogenesis of Venous Thrombosis. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 8, n. 6, p. 104B-113B, 1986.

HEMKER, H.C.; BÉGUIN, S. Thrombin Generation in Plasma: Its Assessment Via the Endogenous Thrombin Potencial. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 74, n. 1, p. 132-138, 1995.

HEMKER, H.C., GIESEN, P.L.A., RAMJEE, M., WAGENVOORD, R., BÉGUIN, S. The Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 83, n. 4, p. 589-591. 2000.

HEMKER, H.C. et al. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**. v.33, n.1, p. 4–15, 2003.

HEMKER, H. C. et al. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. **Thrombosis Haemostasis**, v. 96, n. 5, p. 553-61, 2006.

HESS, R.S; KASS, P.H; VAN WINKLE, T.J. Association between Diabetes Mellitus, Hypothyroidism or Hyperadrenocorticism, and Atherosclerosis in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, n. 4, p. 489-494, 2003.

HOFFMAN, M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. v. 16, n. 12, p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombin and Haemostasis**. v. 85, n. 6, p. 958-65, 2001.

ISIDORI, A.M.; MINNETTI, M.; SBARDELLA, E.; GRAZIADIO, C.; GROSSMAN, A.B. Mechanisms in endocrinology: The spectrum of haemostatic abnormalities in glucocorticoid excess and defect. **European Journal of Endocrinology**. v. 173, n. 3, p. R101-R113, 2015.

JACOBY, R.C.; OWINGS, J.T.; ORTEGA, T.; GOSSELIN, R.; FELDMAN, E.C. Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. **Archives of Surgery**. v. 136, n. 9, p. 1003-1007, 2001.

JERICÓ, M.M.; DE CAMARGO CHIQUITO, F.; KAJIHARA, K.; et al. Chromatographic analysis of lipid fractions in healthy dogs and dogs with obesity or hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 21, n.2, p. 203-207, 2009.

KLOSE, T.C.; CREEVY, K.E.; BRAINARD, B.M. Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v. 21, n. 6, p. 625-632, 2011.

KOL, A.; NELSON, R.W.; GOSSELIN, R.C.; BORJESSON, D.L. Characterization of thrombelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. **The Veterinary Journal**. v. 197, n. 3, p. 675-681, 2013.

KOUTROUMPI, S. et al. Thrombin generation in Cushing's Syndrome: do the conventional clotting indices tell the whole truth? **Pituitary**. v. 17, n. 1, p. 68-75, 2014.

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. 1, p. 4, 2015.

MACFARLANE, R. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and it's Function as a Biochemical Amplifier. **Nature**. v. 202, n. 4931, p. 489-499, 1964.

MAZZIOTTI, G; GAZZARUSO, C; GIUSTINA, A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. v. 22, n. 12, p. 499-506, 2011.

MCMICHAEL, M. New Models of Hemostasis. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 27, n. 2, p. 40-45, 2012.

MICELI, D.D., PIGNATARO, O.P., CASTILLO, V.A. Concurrent hyperadrenocorticism and diabetes mellitus in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.115, p.425-431, 2017.

NICHOLS, R. Complications and Concurrent Disease Associates with Canine Hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 27, n. 2, p. 309-320, 1997.

NINIVAGGI, M. et al. Whole-Blood Thrombin Generation Monitored with a Calibrated Automated Thrombogram-Based Assay. **Clinical Chemistry**. v. 58, n. 8, p. 1252-1259, 2012.

PACE, S.L.; CREEVY, K.E.; KRIMER, P.M.; BRAINARD, B.M. Assessment of coagulation and potential biochemical markers for hypercoagulability in canine hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 27, n. 5, p. 1113-1120, 2013.

PARK, F.M. Hypercoagulability and ACTH-Dependent Hyperadrenocorticism in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 27, n. 55, p. 1136-1142, 2013.

PETERSON, J.L; COUTO C.G; WELLMAN M.L. Hemostatic Disorders in Cats: A Retrospective Study and Review of the Literature. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 9, n. 5, p. 298-303, 1995.

PETERSON, M.E; GILBERTSON, S.R; DRUCKER, W.D. Plasma Cortisol response to exogenous ACTH in 22 dogs with hyperadrenocorticism caused by adrenocortical neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 180, n. 5, p. 542-544, 1982.

RAMSEY, I; RISTIC, J. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. **In Practice**. v. 29, n. 8, p. 446-454, 2007.

REITMAYER, M.; VANCE, M.L.; LAWS, E.R. Jr. The neurosurgical management of Cushing's disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 197, n. 1, p. 73-79, 2002.

RESPESS, M. et al. Portal Vein Thrombosis in 33 Dogs: 1998-2011. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 26, n. 2, p. 230-237, 2012.

ROMÃO, F.G.; CAMPOS, E.F.; MATOSSO, C.R.S.; TAKAHIRA, R.K. Hemostatic profile and thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized controlled trial. **BMC Veterinary Research**. v. 9, p. 268, 2013.

ROSE, L.; DUNN M.E.; BÉDARD C. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on Coagulation Parameters. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 27, n. 1, p. 207-211, 2013.

SALVAGNO, GL., BERNTORP, E. Thrombin Generation Testing for Monitoring Hemophilia Treatment: A Clinical Perspective. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v.36, n. 7, p. 780-790, 2010.

SMETS, P.M.Y; et al. Long-Term Follow-Up of Renal Function in Dogs after Treatment for ACTH-Dependent Hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 26, n. 3, p. 565-574, 2012.

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

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2 ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 213, 2008.

STUIJVER, D.J.; *et al.* Incidence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: a multicenter cohort study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 19, n. 11, p. 3525-3532, 2011.

TEN CATE, H. Thrombin generation in clinical conditions. **Thrombosis Research**. v. 129, n. 3, p. 367-370, 2012.

TESKE, E; ROTHUIZEN, J; DE BRUIJNE, J.J; RIJNBERK, A. Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. **The Veterinary Record**. v. 125, n. 1, p.12-14, 1989.

TIROSH, A. et al. Coagulation Profile in Patients with Different Etiologies for Cushing Syndrome: A Prospective Observational Study. **Hormone and Metabolic Research**. v. 49, n. 5, p. 365-371, 2017.

TRIPODI, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. **Clinical Chemistry**. v. 62, n. 5, p. 699-707, 2016.

WOLBERG, A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**. v. 21, n. 3, p. 131-142, 2007.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, v. 21, n. 3, p. 131–142, 2007.

WONG, C.J.; KOCH, M.; BEHLING-KELLY, E.L. Development of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) assay and comparison of plasma PAI-1 activity in hyperlipidemic/dyslipidemic dogs with either hyperadrenocorticism or diabetes mellitus, and healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v.111, p.1-8, 2017.

ZAIDI, A.; GREEN, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v.17, n. 2, p. 79-82, 2016.

### 3.3 ANEXOS I

**Figura 1. Modelo celular de hemostasia.** a) Fase de iniciação; b) fase de amplificação. c) Fase de propagação

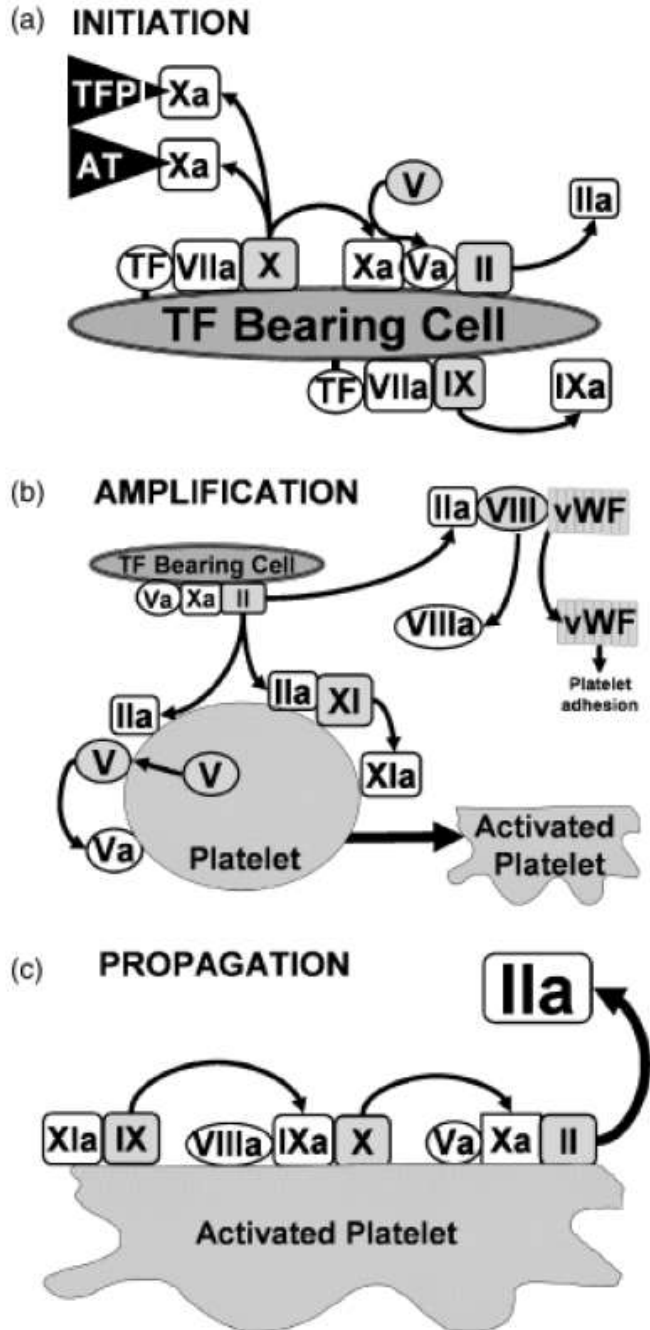


Imagem extraída de: SMITH, S.A. The cell-based model of coagulation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v. 19, n. 1, p. 7, 2009.



## 3.4 ANEXOS II

### 1- Parecer comitê de ética



## A T E S T A D O

**Atesto** que o subprojeto intitulado "Geração de trombina em cães diagnosticados com hipradrenocorticismo ACTH-dependente" faz parte do Projeto "Avaliação do bissulfato de clopidogrel como agente antiagregação plaquetária em cães com hiperadrenocorticismo", **Protocolo CEUA 0163/2018**, aprovado em 19 de julho de 2018, a ser conduzido por **Silvia Vargas Mora**, orientada pela Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira, para fins de pesquisa científica, 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, 19 de novembro de 2019.



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