

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMORRÁGICAS E
TROMBOEMBÓLICAS EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

DANIELE SILVANO GONÇALVES

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

BOTUCATU – SP

2016

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

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMORRÁGICAS E
TROMBOEMBÓLICAS EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

DANIELE SILVANO GONÇALVES

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

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

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

Gonçalves, Daniele Silvano.

Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas
em cães com doença renal crônica / Daniele Silvano
Gonçalves. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia
Orientador: Regina Kiomi Takahira
Capes: 50503030

1. Cães - Doenças. 2. Rins - Doenças. 3. Insuficiência
renal cronica. 4. Hemostasia. 5. Trombofilia.

Palavras-chave: DRC; Hemostasia; Hipercoagulabilidade;
Tromboelastometria.

Nome do Autor: Daniele Silvano Gonçalves

Título: Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica.

Comissão examinadora

Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof^a Dr^a. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Dr. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias - DCCV

UFMG – EV – Belo Horizonte/MG

Data da defesa: 19 de fevereiro de 2016.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original. "

Albert Einstein

A família Silvano Gonçalves, meu pai Claudi e minha mãe Juçara, pela maior prova de amor que poderia ser dada, a renúncia dos próprios sonhos pelos filhos. Meu irmão Fernando, pelo exemplo de garra e coragem em nossas jornadas.

A solidão não é a melhor companhia para a realização de um trabalho ou etapa profissional, ao contrário da solidariedade. Minha eterna gratidão ...

Primeiramente **A Deus**, por colocar em minha vida tantas oportunidades e anjos que me apoiaram e incentivam até mesmo nos gestos mais singelos ou nos momentos mais difíceis. Por me mostrar que a vida é muito mais do que profissão, títulos e dinheiro... "o que se leva dessa vida, é a vida que se leva...".

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, por possibilitarem a execução deste trabalho por meio da concessão da Bolsa de Estudo, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação.

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

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira**, por ter paciência com esse meu jeito peculiar de ser, por me entender sem mesmo eu falar, por apoiar minhas ideias sempre com confiança plena. Por tantos aprendizados, pela tranquilidade que soluciona todos os problemas baseados em enorme conhecimento profissional e de vida e pelo carinho inestimável.

À **Prof^a. Dr^a. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto**, do departamento de Clínica Veterinária desta Faculdade, pelas horas de conversa com palavras de carinho e apoio indispensáveis para a realização deste sonho.

Aos meus pais **Claudi Gonçalves** e **Juçara Maria Silvano Gonçalves**, por sempre confiarem e apoiarem minhas decisões pessoais e profissionais, viabilizando de todas as formas possíveis e impossíveis os meus planos de aprimoramento.

Ao meu irmão **Fernando Silvano Gonçalves**, pela simples existência, por não me deixar desistir mesmo em momentos mais adversos.

Ao meu amor e companheiro **Gustavo Sanches**, por todo amor e dedicação. Com você aprendi que posso voar e voar mais longe, sem ter medo da solidão, pois perto ou longe sempre estivemos juntos.

Aos queridos amigos **Silvano Salgueiro Geraldês e Paula Bilbau**, pelo companheirismo, pelo apoio constante na seleção dos animais, nas coletas e por tantos momentos felizes.

À querida amiga **Claudia Zeferino Garcia**, pelo apoio incondicional, carinho e amizade. Pelo incentivo a realização deste sonho desde o princípio. Pela amiga que terei por toda a vida ou quem sabe além dela.

À querida amiga **Thays Tretin**, pelo auxílio absolutamente necessário no laboratório de hemostasia, por dedicar-me seu tempo e todos os ensinamentos das técnicas para que este trabalho fosse realizado, sem você isso não seria possível.

À querida amiga **Karen Caffaro**, pelo seu carinho e apoio. Mesmo nos separando fisicamente no meio do percurso, você sempre esteve ao meu lado, em orações e mensagens de uma amizade linda e verdadeira.

Às queridas amigas **Sarah Paschoal Scarelli, Priscila Kobayashi e Claudenice Barros** pelos risos que me proporcionaram e pelo apoio durante esta jornada. Foram essenciais para manter a confiança e a força para prosseguir.

A querida e eterna amiga **Jucilene Souza**, que me acompanha desde a residência, me incentiva e me ensina muito além da técnica, mas principalmente a ser um ser humano melhor.

Ao **Professor Hélio Langoni e família**, pelos momentos de descontração, diálogos e todo o carinho e auxílio que me deram desde o início desta grande jornada.

Aos amigos **Ênio Fogassa e Marco Antônio Ferreira**, por tantos momentos felizes em Botucatu/SP, São Pedro/SP e Torrinha/SP ao lado de vocês, com risadas infinitas e conselhos para vida toda.

Aos amigos que fiz no curso de Oração e Vida e no Curato São José, anjos que jamais esquecerei, **Dona Lurdes, Ana, Rosário, Diva e a Elaine e sua família**. Grata pelo acolhimento e carinho de mãe.

Aos amigos que fiz na **Academia Axial**, pelos momentos vividos com vocês, que foram muito além da relação aluna e professor. O carinho e a atenção dedicados me fizeram mais forte durante todo o percurso.

Aos residentes e ex-residentes do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, **Bruno E. M. de C. Ceolin, Carolina Tostes Martins, Jussara Shimono, Cristiana M. Costa, Fernanda P. Rodrigues e Bruna dos**

Santos pela convivência durante o mestrado e todo o apoio que me foi dado.

Ao professor do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, **Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes** sempre pronto a colaborar.

Aos residentes e ex-residentes da Clínica de Pequenos Animais desta Faculdade, **Luísa Martelli Soares, Bianca Mariani Gonçalves, Beatriz Rodrigues Berbel, André Nanny Le Sueur Vieira, Mariana Cristina Ramos, José Francisco Antunes Ribeiro, Bárbara Keiko Kichise, Ana Caroline Foganholo Biazeto** pelas discussões dos casos, apresentação dos proprietários e paciência na hora da coleta das amostras.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório Clínico Veterinário desta Faculdade, **Marcio José Figueira, Adriana Lopes Figueira, Marcos Montanha Ramos e Rosana Aparecida Fogasa da Silva**, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos pós-graduandos do Laboratório Clínico Veterinário, **Victor Yunes, Brayan Lopes, Dani Dabus, Leizinara Lopes, Mauricio Wilmsen e Pedrita Assunção Carvalho**, pela convivência, aprendizados e experiências compartilhadas.

Ao **Prof. José Carlos de Figueiredo Pantoja**, por possibilitar o aprofundamento nos conhecimentos em estatística aplicada, permitindo o acompanhamento de suas consultorias, um exemplo de profissionalismo, paciência e dedicação.

Ao amigo **Fabio Possebon**, pela disponibilidade em sempre me ajudar nas dúvidas de estatística e dividir comigo seus conhecimentos e práticas.

Ao **Carlos Pazini Junior, Patrícia Biasotto Martins e Fernando Alberto Lecciollada** da Secretaria de Pós-Graduação desta Faculdade, por tantos pedidos atendidos com tanta prestatividade.

Aos queridas Professoras do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, **Mere Erika Saio e Suzane Lillian Beier**, por toda a amizade e incentivo para chegar até aqui.

A **Marlene Dias Camargo e Izabel Cristina Castro**, secretárias do departamento de Clínica Veterinária desta Faculdade, pelos inúmeros favores prontamente prestados, com a simpatia de sempre e pela amizade.

As funcionárias da FUNVET, **Maricilia Luzia Rossetto, Jaqueline Rosa Miranda, Rosana Vendrami Buganza e Danubia Pereira Santos** pelos

inúmeros favores prontamente prestados, com a simpatia de sempre e pela amizade.

Aos **funcionários da Biblioteca** da UNESP - Campus de Botucatu-SP, pelos serviços prestados com dedicação.

Aos queridos e inesquecíveis **amigos de Lages/SC (Mariana Ferreira, Vanda Baade e Fabrício Leocino) e Criciúma/SC (Cristina Peruchi e Keli Salvador e Carolina Resmini Melo)**, pela presença constante, apesar da distância física.

Aos **proprietários dos cães** que aceitaram participar deste projeto, pela cordialidade em aceitar e acreditar que esta pesquisa ajudaria não só os seus, mas futuros amigos de quatro patas que se encontrarão na mesma situação. Os quais tinham a esperança de uma vida melhor fortalecida em cada gesto de carinho e amor com os seus queridos.

Aos que eventualmente tenha esquecido, peço desculpas pela memória não privilegiada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros da hematimetria, plaquetas e leucócitos totais de cães nos grupos controle e DRC	27
Tabela 2 – Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros bioquímicos e urinários de cães nos grupos controle e DRC	27
Tabela 3 – Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), tempo de protrombina (TT), fibrinogênio e da amplitude de agregação plaquetária de cães nos grupos controle e DRC	28
Tabela 4 – Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros da tromboelastometria de cães nos grupos controle e DRC	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tempo de coagulação (CT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem [®] , extem [®] e fibtem [®] . Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05)	29
Figura 2 – Tempo de formação do coágulo (CFT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem [®] , extem [®] e fibtem [®] . Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05)	29
Figura 3 – Ângulo α (α) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem [®] , extem [®] e fibtem [®] . Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05)	29
Figura 4 – Firmeza máxima do coágulo (MCF) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem [®] , extem [®] e fibtem [®] . Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05)	29
Figura 5 – Lise máxima (ML) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem [®] , extem [®] e fibtem [®] . Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05)	29

LISTA DE ABREVIATÖESE E SIGLAS

% - por cento
µL – microlitros
°C – graus Celsius
ADP – difosfato adenosina
ATP – trifosfato adenosina
ALT – alanina amino transferase
AT – antitrombina
CFT – tempo de formação do coágulo
CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média
CT – tempo de coagulação
DRC – doença renal crônica
EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético
EXTEM® – Ativador de fator tecidual
et al – e colaboradores
FA – fosfatase alcalina
FIBTEM® – Fator tecidual ativado (extem®) + citocalasina
g/dL – gramas por decilitro
GGT – gama glutamil transferase
INTEM® – Ativador de contato
MCF – firmeza máxima do coágulo
mg/dL – miligramas por decilitro
ML – lise máxima
mL – mililitros
mm – milímetros
NaCl – cloreto de sódio
PDFs – produtos de degradação da fibrina
RPC – relação proteína/creatinina urinária
S – segundos
SRD – sem raça definida
TA₂ – tromboxano A₂
TEM – tromboelastometria
TP – tempo de protrombina
TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada
U/L – unidade internacional por litro
VCM – volume corpuscular médio

SUMÁRIO

RESUMO	xv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivos gerais	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Seleção dos animais	24
4.2. Colheita das amostras	24
4.3. Exames laboratoriais	25
4.3.1. Hemograma	25
4.3.2. Bioquímica sérica	25
4.3.3. Urinálise e relação proteína / creatinina urinária	25
4.3.4. Tromboelastometria	25
4.3.5. Agregação plaquetária	26
4.3.6. Tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio (mg/dL)	26
4.4. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	32
8. REFERÊNCIAS	33
9. TRABALHO CIENTÍFICO	38
ANEXOS	46
Anexo 1 – Diretrizes para preparação do artigo a ser submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	46
Anexo 2 – Atestado de aprovação do Comitê de ética no uso de animais	47
Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos proprietários dos animais participantes do projeto	48

GONÇALVES, DANIELE SILVANO. **Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica.** Botucatu, 2016. 48p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) acomete principalmente cães idosos e tem como característica principal a perda irreversível da função renal. A DRC em cães promove alterações metabólicas graves, caracterizadas frequentemente pela azotemia, hipoalbuminemia e anemia não regenerativa. Tanto a azotemia quanto a uremia predispõem a alterações hemostáticas que podem levar a quadros hemorrágicos. Além das disfunções plaquetárias, deficiência de anticoagulantes naturais e redução da fibrinólise são fatores que predispõem ao tromboembolismo. Este trabalho tem como objetivo avaliar as possíveis tendências hemorrágicas ou trombóticas em cães com DRC. Foram selecionados 20 cães saudáveis (grupo controle) com exames dentro da normalidade e 17 cães com DRC em estágios III ou IV classificados segundo a IRIS e a relação proteína/creatinina urinária maior que um (grupo DRC). As amostras de sangue para a realização da tromboelastometria (TEM), agregação plaquetária, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e concentração de fibrinogênio foram colhidas em momento único para ambos os grupos após os critérios de inclusão serem confirmados. A análise estatística foi realizada de acordo com a distribuição das variáveis, ao nível de 5% de significância. No presente estudo foi possível observar um estado de hipercoagulabilidade sanguínea nos cães com DRC. Na TEM com o ativador de via extrínseca, observou-se encurtamento no tempo de coagulação e do tempo de formação do coágulo, aumento do ângulo alfa, da firmeza máxima do coágulo e redução da lise máxima nos cães com DRC em relação aos animais controle. O tempo de protrombina também apresentou resultados menores no grupo DRC. Adicionalmente, a dosagem de fibrinogênio foi maior neste grupo. A agregação plaquetária não apresentou diferenças entre os grupos. A interpretação conjunta dos resultados obtidos nos leva a concluir que os cães com DRC possuem uma predisposição a trombose, porém as plaquetas parecem não desempenhar um importante papel neste processo.

Palavras-chave: DRC, hemostasia, tromboelastometria, hipercoagulabilidade

GONÇALVES, DANIELE SILVANO. **Evaluation of bleeding and thromboembolic disorders in dogs with chronic kidney disease.** Botucatu, 2016. 48p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) affects mostly older dogs and its main characteristic is the irreversible loss of kidney function. CKD in dogs promotes serious metabolic alterations, often characterized by azotemia, hypoalbuminemia and non-regenerative anemia. Azotemia and uremia predispose the hemostatic abnormalities that can lead to hemorrhagic cases. In addition to platelet dysfunction, deficiency of natural anticoagulants and reduced fibrinolysis are factors that predispose to thromboembolism. This work aims to evaluate the possible bleeding or thrombotic tendencies in dogs with CKD. 20 healthy dogs were selected (control group) with tests within normal limits and 17 dogs with CKD in stages III or IV classified according to IRIS and urine protein to creatinine ratio greater than one (CKD group). Blood samples for the realization of thromboelastometry (TEM), platelet aggregation, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinogen concentration were collected at one time for both groups after the inclusion criteria had been confirmed. Statistical analysis performed according to the distribution of the variable at the 5% level of significance. In the present study, we observed a state of hypercoagulable blood in dogs with CKD. In TEM with the extrinsic pathway activator, there was shortening of the clotting time and clot formation time, increasing the alpha angle and the maximum clot firmness, and reducing the maximum lysis in dogs with CKD compared to control animals. Prothrombin time also had lower results in the CKD group. In addition, the fibrinogen level was higher in this group. Platelet aggregation did not differ between groups. The joint interpretation of the results leads us to conclude that dogs with CKD have a thrombosis toward predisposition, but the platelets do not seem to play an important role in this process.

Keywords: CKD, hemostasis, thromboelastometry, hypercoagulable

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida pela presença de anormalidade estruturais e funcionais de um ou ambos os rins, que se estende por um longo período e de forma irreversível. O reconhecimento da doença requer a avaliação de vários parâmetros, como testes de função renal, eletrólitos, urinálise e exames de imagem (POLZIN, 2011). O envolvimento dos rins com a homeostase do organismo como um todo exerce papel importante quando suas funções estão comprometidas, causando um desequilíbrio metabólico extenso (BARTGES, 2012). Com a evolução da DRC podem ocorrer alterações digestivas, cardiovasculares, esqueléticas, neurológicas ou hematopoiéticas (POLZIN, 2004).

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

O risco de trombose em pacientes com DRC tem como referência a tríade de Virchow com os pilares que envolvem seu processo: a estase sanguínea, hipercoagulabilidade sanguínea e lesão endotelial (WATTANAKIT e CUSHMAN, 2009). O risco hemorrágico é multifatorial, mas a persistência do quadro urêmico e suas consequências hemostáticas tem sido investigadas (SOHAL et al., 2006).

A tromboelastometria se apresenta como uma ferramenta promissora para a avaliação das possíveis complicações hemostáticas causadas pela DRC, destacando-se pela sua capacidade de avaliação dos estados de hipo ou hipercoagulabilidade, e também no monitoramento de terapias anticoagulantes (HANEL et al., 2014). A aplicação desta técnica em associação aos demais testes de avaliação hemostática se tornou uma importante contribuição ao estudo de caracterização da doença renal crônica sobre a hemostasia de cães.

As alterações hemostáticas, tanto hemorrágicas quanto trombóticas, têm sido bem documentadas em seres humanos nefropatas (LAU et al., 1980; ADAMS et al., 2008; MANNUCCIO et al., 2012), porém ainda há poucos trabalhos avaliando sua importância em cães com doença renal (PRIHIRUNKIT et al., 2010; DONAHUE et al., 2013; FALCO et al., 2013).

Os estudos realizados em cães com azotemia e/ou proteinúria empregando a tromboelastometria ou tromboelastografia verificaram evidências de que a atividade

plaquetária possui um papel importante, juntamente com os anticoagulantes naturais, além da azotemia e do grau de proteinúria (DONAHUE et al., 2011; PRIHIRUNKIT et al., 2011; LENNON et al., 2013).

A avaliação conjunta da função plaquetária com a tromboelastometria e a correlação de seus resultados com os testes convencionais de hemostasia fornecerão informações para o estabelecimento do perfil hemostático de cães com DRC. Desta forma, poderemos avaliar as tendências hemorrágicas e/ou trombóticas desses animais nas três fases do processo de hemostasia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

Segundo a International Renal Interest Society (IRIS), a DRC é classificada em quatro estágios com base na função renal, e é subclassificada de acordo com a presença de proteinúria e hipertensão. A classificação da DRC é feita por meio da dosagem seriada da creatinina sérica em animais em jejum e bem hidratados. Para subclassificação da DRC em não proteinúrico, com proteinúria marginal ou proteinúrico, a magnitude da proteinúria é mensurada pela razão proteína/creatinina urinária (RPC), a partir de uma urina com sedimento pobre e estéril. A pressão arterial também é mensurada de forma seriada por algumas semanas para subclassificação da DRC (IRIS, 2013).

O processo de hemostasia ocorre em uma série de eventos dinâmicos e interligados. As interações ocorrem entre os vasos sanguíneos, plaquetas, vias da coagulação e o sistema fibrinolítico que culminam com a formação e a resolução do tampão plaquetário após uma lesão vascular. Essa lesão expõe o fator tecidual que ativa o fator VII que em cascata ativa os fatores X e IX resultando na conversão da protrombina em trombina e formação de um tampão hemostático ainda susceptível à fibrinólise. Concomitantemente, as plaquetas são ativadas, bem como os fatores V, VIII e XI, amplificando a geração de trombina e consequentemente a conversão do fibrinogênio em fibrina. Anticoagulantes endógenos (antitrombina, proteína C e proteína S e o inibidor do fator tecidual) agem simultaneamente para interromper a cascata de coagulação modulando a formação do coágulo. O processo de hemostasia segue com a remoção do coágulo formado pela ação da plasmina que é capaz de clivar a fibrina (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A persistência do quadro azotêmico e/ou urêmico juntamente com outras alterações como diminuição dos fatores de coagulação, trombocitopenia, anormalidades envolvendo a

antitrombina, proteína S e fibrinólise predisõem a uma série de alterações hemostáticas que podem causar hemorragias e/ou tromboembolismo (EBERST e BERKOWITZ, 1994), demonstrando um mecanismo multifatorial para as alterações hemostáticas de pacientes nefropatas.

O diagnóstico dos distúrbios hemostáticos, tanto hemorrágicos quanto trombóticos tem evoluído no decorrer dos tempos. A tromboelastometria (TEM) é uma técnica para diagnóstico *in vitro* sendo capaz de detectar tanto o estado de hipocoagulabilidade sanguínea com risco hemorrágico, quanto à hipercoagulabilidade com risco trombótico pois avalia de forma global a função hemostática do sangue, integrando os componentes celulares e as proteínas da cascata de coagulação, além de auxiliar no diagnóstico de distúrbios hemostáticos, como coagulação intravascular disseminada e detectar estados de hipo e/ou hipercoagulabilidade antes mesmo das manifestações clínicas. Consiste na mensuração e registro de todo processo de coagulação, desde o início da interação plaqueta-fibrina, da agregação plaquetária e do desenvolvimento do coágulo, até sua eventual lise (KOL e BORJESSON, 2010).

É um teste cinético que avalia as características viscoelásticas do sangue total que tem a grande vantagem de abordar o sistema de coagulação como um todo. O sangue total contém células que em suas superfícies carregam fosfolípidos necessários para reações enzimáticas. A participação das plaquetas com a liberação do conteúdo de seus grânulos proporcionando à amplificação e propagação da coagulação, como também sua interação com os fatores plasmáticos bem como com as hemácias durante a coagulação permite a avaliação da sua função de forma indireta (SMITH, 2010), permitindo esclarecer qual o seu papel na fisiopatologia de condições de hipo ou hipercoagulabilidade sanguínea.

Os parâmetros analisados pelo teste são: tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo α (alfa), firmeza máxima do coágulo (MCF) e a porcentagem de fibrinólise máxima (ML). O tempo de coagulação é o tempo para o início da formação da fibrina sendo um indicador da atividade dos fatores de coagulação plasmáticos. O tempo de formação do coágulo corresponde ao início da ativação das plaquetas e fibrinogênio, formando no gráfico uma angulação α que corresponde à cinética da formação do coágulo. A firmeza máxima do coágulo depende das plaquetas e da ativação do fibrinogênio e fator XIII (MCMICHAEL e SMITH, 2011). A técnica foi validada para monitoração hemostática em caninos (SMITH et al., 2010), equinos (KOL e BORJESSON, 2010) e felinos (MARSCHNER et al., 2010).

A avaliação da função plaquetária pode ser realizada de forma isolada pelo teste *in vitro* de agregação plaquetária, que avalia a capacidade das plaquetas de se agregarem. Nesse teste, um agonista (ADP, colágeno, ácido araquidônico) é adicionado a uma suspensão de

plaquetas ou sangue total, estimulando-as e promovendo sua agregação medida por impedância elétrica (HARRISON, 2005; COLLET e MONTALESCOT, 2009).

Alterações funcionais plaquetárias podem causar o prolongamento do tempo de sangramento observado em pacientes humanos com uremia, uma vez que os defeitos na agregação contribuem para o retardo na formação do tampão hemostático e na adesão plaquetária (MANNUCCIO e TRIPODI, 2012). Em geral, o envolvimento plaquetário no distúrbio hemorrágico em pacientes urêmicos é multifatorial, comprometendo as funções de agregação, adesão e secreção. Pesquisas anteriores já haviam identificado possíveis mecanismos envolvidos nesta hipofunção, como a deficiência nas proteínas do citoesqueleto (actina), prejudicando as funções de mobilidade e de secreção e diminuindo a contratilidade e a adesão plaquetária. (EBERST e BERKOWITZ, 1994, MALYSKO et al., 2005, KAW e MALHORRA, 2006)

Mischke e Schulze (2004) verificaram a diminuição da agregação plaquetária frente a diferentes agonistas e Sohal et al. (2006) constataram uma redução na capacidade de ligação dos receptores de membrana plaquetária ao fator de von Willebrand e ao fibrinogênio em condições urêmicas. O aumento do fibrinogênio diminui a agregação plaquetária devido à redução na disponibilidade dos receptores para ação do ADP (MEADE et al., 1985). A via da cicloxigenase também é inibida em pacientes urêmicos, pois Zeck e colaboradores (2013) verificaram menor liberação de ATP pelas plaquetas quando utilizado ácido araquidônico ao teste de agregação plaquetária em pacientes urêmicos, mas não quando utilizado o colágeno.

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

Os nefropatas podem apresentar trombocitopenia, porém raramente atingem níveis que representem risco hemorrágico, mas é um fator que pode contribuir para a tendência hemorrágica. Uma das hipóteses para a trombocitopenia inclui atividade trombopoietica reduzida (GAFTER et al., 1987). A destruição plaquetária também é outro fator observado em diversas doenças ou síndromes associadas a doenças renais. Estes processos podem ser localizados, regionais ou difusos. Normalmente a destruição plaquetária está relacionada a

doenças imunomediadas que geram um pior prognóstico ao quadro renal (LINDSAY e CLARK, 1982).

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

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

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

A função plaquetária já foi apresentada nos parágrafos anteriores como fator de risco hemorrágico, porém a hiperagregabilidade das plaquetas também pode ocorrer nos animais com DRC. A hipoalbuminemia pode contribuir neste ponto, pois aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico, normalmente ligado à albumina, o que leva a maior produção de tromboxano A₂ nas plaquetas, estimulando a agregação plaquetária (SINGHAL e BRIMBLE, 2006) e aumentando o risco trombótico nos animais com DRC. Essa condição ocorre pois o TA₂ é um agonista da agregação plaquetária, assim como a trombina produzida na superfície de plaquetas ativadas, o que amplifica a resposta de ativação plaquetária (COLLET e MONTALESCOT, 2009). Embora a TEM não seja a ferramenta mais adequada para avaliar a função plaquetária, Falco e colaboradores (2013) verificaram que as plaquetas podem apresentar um potencial de contribuição para a hipercoagulabilidade nos cães nefropatas.

Biomarcadores inflamatórios (proteína C reativa, interleucina-6) e pró-coagulantes (fator VII, VIII, dímeros-D, complexo plasmina-antiplasmina) foram encontrados em níveis elevados

em pacientes humanos com insuficiência renal (SHILIPAK et al 2003). O mecanismo pode ser o aumento na produção, a redução na excreção ou ambos (GORDGE et al., 1988). Keller et al. (2008) também observaram uma forte correlação entre a função renal diminuída e a elevação de biomarcadores inflamatórios e pró-coagulantes, como o fibrinogênio. Solomom e colaboradores (2011) encontraram alta correlação entre a concentração de fibrinogênio e a firmeza do coágulo na tromboelastometria de pacientes humanos antes de serem submetidos a cirurgias cardíacas. Cães com coagulação intravascular disseminada também apresentaram associação com o aumento do fibrinogênio e a hipercoagulabilidade sanguínea (WIINBERG et al., 2008). Lang e colaboradores (2009) verificaram que a variável que avalia a firmeza do coágulo (MCF), quando aplicados o extem® e fibtem®, aumenta de maneira dependente à concentração do fibrinogênio e independente da contagem de plaquetas.

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

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

Ao final do processo de coagulação sanguínea a fibrinólise tem o papel de desfazer o coágulo formado após exercer a função de cessar o sangramento. Porém, falhas neste processo também contribuem para o desenvolvimento de tromboembolismo (LISMAN et al., 2005). Os níveis de plasminogênio em pacientes nefróticos também é baixo devido à perda urinária desta substância (LAU et al., 1980). O plasminogênio é convertido em plasmina, uma protease capaz de clivar a fibrina polimerizada produzindo fragmentos denominados genericamente de produtos da degradação da fibrina e do fibrinogênio (PDFs), além dos dímeros-D, oriundos exclusivamente da degradação da fibrina estável (SMITH, 2010). A diminuição do plasminogênio em pacientes com DRC contribui para o quadro de hipercoagulabilidade sanguínea juntamente com os demais fatores anteriormente citados.

Pesquisas recentes verificaram um perfil de hipercoagulabilidade em cães com proteinúria associada à nefropatia por meio da TEM (FALCO et al., 2013; LENNON et al.,

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

Outras doenças como a parvovirose e a anemia hemolítica imunomediada, além da nefropatia com proteinúria têm sido associadas a um estado de hipercoagulabilidade em cães (DONAHUE e OTTO, 2005). Ainda, a patogênese da trombose é multifatorial, envolvendo vários elementos de risco para que ela ocorra. Pacientes apresentando desde doenças renais crônicas discretas até mesmo síndrome nefrótica podem apresentar episódios hemorrágicos, que vem sendo estudas na medicina humana para melhor caracterizar o perfil nesses pacientes. As alterações hemostáticas decorrentes da DRC são importantes sendo necessária sua identificação de maneira precoce para a prevenção e de um evento intervenção terapêutica adequada.

A falta de testes diagnósticos que possam identificar com segurança a hipo ou hipercoagulabilidade tem tornado difícil a detecção precoce dos riscos de hemorragia ou tromboembolismo no paciente com DRC e a decisão quanto à necessidade da indicação de um protocolo terapêutico antitrombótico. Desta maneira, novas pesquisas relacionadas à TEM em associação ao perfil hemostático de cães com DRC auxiliarão na compreensão dessa doença e suas complicações.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar as possíveis tendências hemorrágicas ou trombóticas em cães com DRC.

3.2 Objetivos específicos:

Avaliar as alterações de hemostasia primária por meio da contagem de plaquetas e prova de agregação plaquetária em cães com DRC.

Avaliar as alterações de hemostasia secundária ou da coagulação por meio dos testes hemostáticos TP, TTPa e fibrinogênio em cães com DRC.

Avaliar o perfil hemostático por meio da tromboelastometria em cães com DRC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

O estudo foi realizado em cães atendidos na rotina da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP após acompanhamento e triagem. O projeto foi submetido a avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 33/2014 – Anexo 2) e elaborado um termo de “Consentimento Livre e Esclarecido” fornecido aos proprietários para conhecimento dos procedimentos de coleta de sangue e urina a serem realizados (Anexo 3).

Foram selecionados 17 cães com doença renal crônica (DRC) em estágios III (8/17) e IV (9/17), classificados conforme IRIS (IRIS, 2013). O grupo controle foi composto por 20 cães saudáveis provenientes de proprietários voluntários.

A seleção dos animais saudáveis foi realizada por meio de hemograma com contagem de plaquetas, dosagem de proteína total, albumina, globulinas, enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), ureia, creatinina, urinálise e razão proteína / creatinina urinária, sendo incluídos aqueles com perfil hematológico, bioquímicos e urinário com resultados dentro dos limites de referência e ausência de doença pregressa nos últimos 30 dias.

Foram incluídos no grupo DRC, os cães com valores estabilizados de creatinina 2 - 5mg/dL (grau III) e >5mg/dL (grau IV), urinálise com sedimento pobre e razão proteína/creatinina urinária (RPC) >1,0 independente da causa de base. Todos os animais foram confirmados com DRC por meio de ultrassonografia. Foram excluídos deste grupo os animais que apresentavam neoplasia, doenças infecciosas concomitantes, animais em choque, com insuficiência cardíaca congestiva, hepatopatia, nefrolitíase ou outra doença que viesse a mascarar e/ou influenciar os resultados dos exames hemostáticos.

4.2 Colheita das amostras

As amostras de sangue para a tromboelastometria foram colhidas em momento único, após dosagens seriadas de ureia e creatinina e estabilização das mesmas, confirmando assim o estágio da DRC no paciente estável. Além disso, os critérios de inclusão foram confirmados e no grupo controle após confirmada a hígidez do animal.

A colheita de sangue foi realizada preferencialmente por venopunção jugular única e com fluxo sanguíneo contínuo em seringa de 10mL (BD®, New Jersey, Estados Unidos). Foram colhidos 0,5mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 (ácido etilenodiamino tetra acético) a 7,5% (Vacuette®, Greiner Bio-one, Kremsmuenster, Osterreich, Austria) para o hemograma e 2,0mL de sangue sem anticoagulante (BD®, New Jersey, Estados Unidos) para as dosagens bioquímicas. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 1710 X g por 15 minutos para obtenção do soro e realização dos testes.

Para a tromboelastometria e a prova de agregação plaquetária foram colhidos 4,5mL de sangue em citrato de sódio 3,2% (BD®, New Jersey, Estados Unidos). Após a colheita, as amostras foram imediatamente submetidas à análise.

As análises do tempo de protrombina, tromboplastina parcial ativada e fibrinogênio foram realizadas no plasma. Para isso foram colhidos 4,5mL de sangue em tubo com citrato de sódio 3,2% (BD®, New Jersey, Estados Unidos) que imediatamente após a colheita foi submetido a um banho de gelo, em seguida centrifugado a 1710 X g por 15 minutos e o plasma armazenados em microtubos e congelado em -80°C (Sanyo® Ultra 108 Low, Osaka, Japão) até o processamento.

4.3 Exames laboratoriais

4.3.1 Hemograma

Os hemogramas foram realizados em contador hematológico (Sysmex® - Poch - 100iV – Miami, Estados Unidos). O hematócrito foi mensurado pela técnica de microhematócrito (SCHALM et al., 1975). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em conjunto com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido (Laborclin®, Paraná, Brasil).

4.3.2 Bioquímica sérica

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

4.3.3 Urinálise e razão proteína / creatinina urinária

A urinálise compreendeu o exame físico, químico (*Combur-Test*® – Roche) e sedimentoscopia em microscópio óptico (40x). A amostra de urina foi coletada por cateterismo e/ou cistocentese. A dosagem de proteína e creatinina urinárias foram realizadas em equipamento de bioquímica automatizada (Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça) utilizando kits comerciais (Katal®, Belo Horizonte, Brasil).

4.3.4 Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM® (Delta, Pentapham, Munique, Alemanha) mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L (startem®) sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: intem® (20µL, fosfolipídios de

tromboplastina parcial, Pentapham, Munique, Alemanha), extem[®] (20µL, tromboplastina tecidual, Pentapham, Munique, Alemanha) e fibtem[®] (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina, Pentapham, Munique, Alemanha). Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML (lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo.

4.3.5 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada em duplicata mediante a adição de 2µL de Colágeno (reagent Chrono-log[®], Chicago, Estados Unidos) em 500µL de sangue citratado + 500µL de solução fisiológica (NaCl 0,9% Equiplex[®]). A resposta das plaquetas frente ao agonista foi mensurada por impedância elétrica em um agregômetro de plaquetas de sangue total (Chrono-log[®] 592, Chicago, Estados Unidos).

4.3.6 Tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio (mg/dL)

O TP e o TTPa foram realizados em coagulômetro (ClotTimer[®] Laser Sensor, Sorocaba, Brasil) em duplicata, utilizando os kits específicos (Clot[®], Sorocaba, Brasil) para cada teste. A dosagem do fibrinogênio foi realizada pelo método de Clauss, utilizando kit específico (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil).

4.4 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando dados de estudos semelhantes das variáveis mais relevantes, supondo poder estatístico de 80%, nível alfa de 5%, resultando no valor de 17 animais para cada grupo como ideal para o estudo (Statstodo Trading Pty Ltd). A distribuição das variáveis foi avaliada por meio da visualização de histograma e gráficos quantil-quantil. Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva, para as variáveis com distribuição paramétrica foram consideradas a média e desvios padrão, para as variáveis não paramétricas considerou-se a mediana, primeiro quartil e terceiro quartil de cada variável. Para comparação entre os grupos das variáveis paramétricas foi aplicado o teste t. Nas variáveis com distribuição não paramétricas a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas com software SAS 9.4 (2013) ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS

O grupo DRC foi composto por 10 fêmeas e 7 machos, com idade média de 8,6 anos (3 - 13 anos) e os cães estavam distribuídos dentre as raças Boxer (1/17), Dálmata (1/17), Pastor Alemão (1/17), Rottweiler (1/17), Weimaraner (1/17) e sem raça definida - SRD (12/17). No grupo controle obtivemos 11 fêmeas e 9 machos, com idade média de 5 anos (1,5 – 10 anos) distribuídos entre as raças: Border Collie (1/20), Dachshund (2/20), Terrier Brasileiro (1/20), Labrador (5/20), Lhasa Apso (1/20), Pitbull (4/20), Poodle (1/20), Australian Cattle Dog (1/20), Shitzu (1/20), Yorkshire (1/20) e SRD (2/20).

A avaliação hematológica, bioquímica e da urinálise foi realizada em ambos os grupos para fins de comparação estatística, e os resultados estão demonstrados nas tabelas 1 e 2.

A avaliação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), fibrinogênio, agregação plaquetária e tromboelastometria foi realizada em ambos os grupos para fins de comparação estatística, e os resultados estão demonstrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 1. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros da hematimetria, plaquetas e leucócitos totais de cães nos grupos controle e DRC.

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
Hemácias*	7,35	6,89	7,89	3,51	2,79	3,98
Hemoglobina*	17,7	16,4	18,4	8,1	6,6	9,3
Hematócrito*	52	47	54,5	25	22	28
VCM	68,99	65,27	70,41	71,21	68,10	72,97
CHCM*	34,86	33,58	35,38	32,61	32,19	33,13
Plaquetas	280.000	221.000	369.825	276.000	248.000	299.000
Leucócitos	8.100	6.900	11.150	10.800	9.200	15.600

Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); Plaquetas (μL); Leucócitos (μL);

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros bioquímicos e urinários de cães nos grupos controle e DRC.

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
Ureia*	33,0	29,0	46,4	236,0	161,0	293,0
Creatinina*	0,9	0,7	1,1	5,9	4,4	6,8
Proteína sérica*	6,2	5,9	6,5	5,7	4,9	6,1
Albumina*	3,5	3,5	3,6	2,5	2,0	2,6
Proteína urinária*	40,0	26,5	60,0	126,0	99,0	195,0
Creatinina urinária*	250,9	163,0	337,1	50,4	41,0	66,0
RPC*	0,14	0,10	0,22	2,5	1,80	3,0

Ureia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); Proteína sérica (g/dL); Albumina (g/dL); Proteína urinária (mg/dL); Creatinina urinária (mg/dL); RPC: razão proteína creatinina urinária.

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), tempo de protrombina (TT), fibrinogênio e da amplitude de agregação plaquetária de cães nos grupos controle e DRC.

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
TTPA	11,5	11,1	12,4	12,6	11,2	13,3
TP*	9,7	8,9	10,3	8,0	7,9	8,7
Fibrinogênio*	312,6	261,6	354,2	489,2	456,2	504,0
Amplitude	12,4	10,4	16,4	4,9	3,7	16,7

TTPA e TP: segundos; Fibrinogênio: mg/dL; Amplitude (ohms);

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 4. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros da tromboelastometria de cães nos grupos controle e DRC.

Parâmetro	EXTEM®		INTEM®		FIBTEM®	
	Controle	DRC	Controle	DRC	Controle	DRC
CT	58 (42;99)*	27 (25;36)*	141 (119;158)	134 (118;146)	63 (38;132)*	25 (23;31)*
CFT	99 (75;121)*	24 (16;48)*	91 (81;114)*	31 (25;35)*	-	-
Ângulo α	72 (68;76)*	86 (83;87)*	73 (69;75)*	84 (83;85)*	69 (67;81)*	87 (85;88)*
MCF	62 (58;64)*	79 (74;82)*	59 (56;62)*	78 (74;81)*	9 (7;14)*	41 (26;48)*
ML	19 (14;25)*	7 (4;8)*	19 (15;21)*	7 (5;12)*	27 (19;34)*	2 (0;8)*

INTEM® = Ativador de contato; EXTEM® = Ativador de fator tecidual; FIBTEM® = Fator tecidual ativado (EXTEM®) + citocalasina; CT (s) = Tempo de coagulação; CFT (s) = Tempo de formação do coágulo; α (°) = Ângulo α ; MCF (mm) = Firmeza máxima do coágulo; ML (%) = Lise máxima.

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

As figuras 1, 2, 3, 4 e 5 representam a variação nos parâmetros CT, CFT, ângulo α , MCF e ML da tromboelastometria com os reagentes intem®, extem® e fibtem®, para os grupos controle e DRC.

O tempo de coagulação - CT (Figura 1) apenas o reagente intem® não apresentou diferença significativa entre os grupos, com valores menores no grupo DRC.

O tempo de formação do coágulo - CFT (Figura 2) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, valores menores no grupo DRC. O fibtem® não produziu resultados de CFT para o grupo controle.

O ângulo α (Figura 3) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores maiores no grupo DRC.

A firmeza máxima do coágulo – MCF (Figura 4) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores maiores no grupo DRC.

A lise máxima - ML (Figura 5) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores menores no grupo DRC.

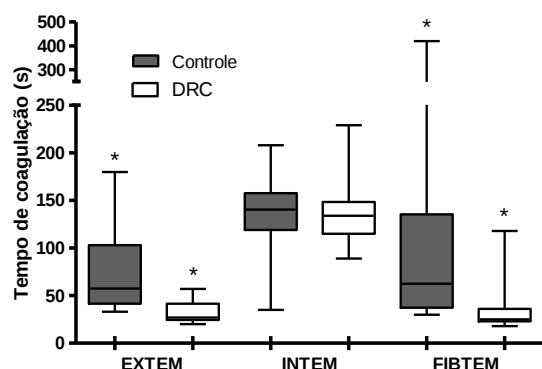


Figura 1. Tempo de coagulação (CT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

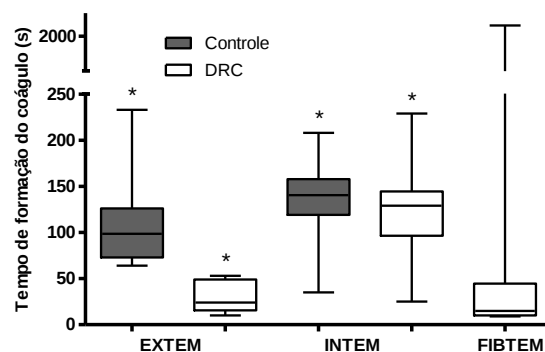


Figura 2. Tempo de formação do coágulo (CFT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

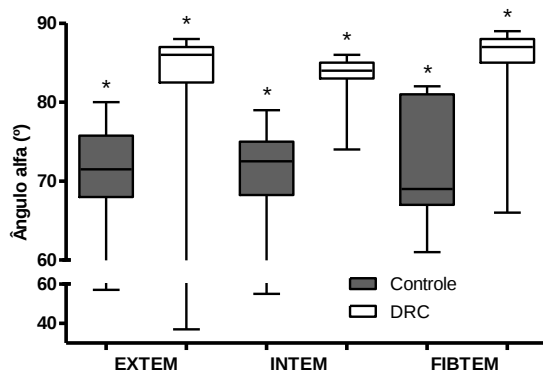


Figura 3. Ângulo alfa (α) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

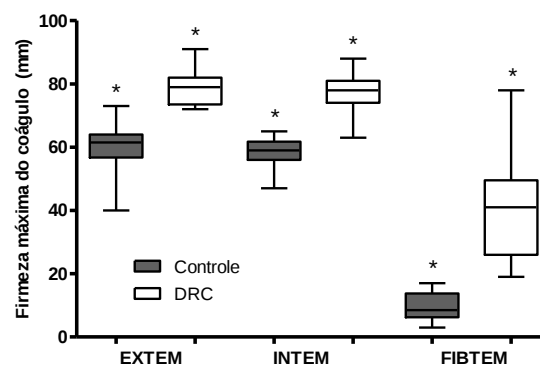


Figura 4. Firmeza máxima do coágulo (MCF) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

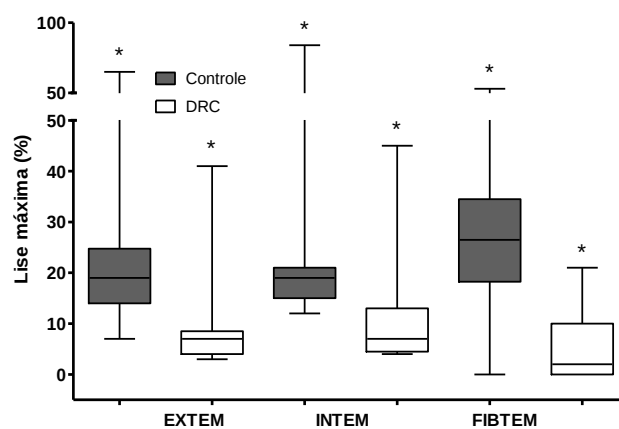


Figura 5. Lise máxima (ML) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Na tromboelastometria, a hipercoagulabilidade sanguínea é caracterizada pelo encurtamento do tempo de coagulação (CT) e do tempo de formação do coágulo (CFT), aumento do ângulo α e da firmeza máxima do coágulo (MCF) (GOGGS et al., 2014). O encurtamento do CT no presente estudo sugere que a formação da fibrina está ocorrendo de forma mais rápida. Este indicador pode ser influenciado pelo ativador utilizado, mas as demais variáveis são minimamente influenciadas (SMITH et al., 2010). A utilização dos reagentes intem® e extem® permitem avaliar a formação da trombina ocorrendo de forma exclusiva em cada via da coagulação, intrínseca e extrínseca respectivamente. O fibtem® permite avaliar a formação da fibrina a partir do fibrinogênio principalmente, sem a função das plaquetas no processo (MCMICHAEL e SMITH, 2011).

Os testes plasmáticos de coagulação apresentaram encurtamento do tempo de protrombina – TP (via extrínseca) mas não do tempo de tromboplastina parcial ativado. Adicionalmente o CT com extem® apresentou encurtamento, sendo equivalente ao TP. O CT com intem® não apresentou diferença entre os grupos, demonstrando sua equivalência ao TTPA. Nossos achados corroboram com Falco e colaboradores (2013), que também encontraram encurtamento do tempo de coagulação apenas com extem®, em cães azotêmicos e proteinúricos, enquanto que no intem® isso não ocorreu. Caracterizando um estado de hipercoagulabilidade.

Donahue e colaboradores (2011) também verificaram hipercoagulabilidade caracterizada pela rapidez na formação do coágulo (menor CFT e ângulo α aumentado) em cães com insuficiência renal e nos casos de nefropatia com proteinúria (RPC>2). Estes dados também foram encontrados neste estudo, em que selecionamos apenas cães com RPC>1, sugerindo ser um importante fator a se considerar quanto ao risco trombótico em cães com DRC.

A fase de estabilização do coágulo, representada pelo MCF foi significativamente diferente entre os grupos estudados. A utilização do ativador fibtem®, que inibe as plaquetas, permite avaliar a contribuição do fibrinogênio nesta fase. Fato confirmado pois encontramos alterações não só no MCF do extem®, mas também no fibtem®. Além disso a concentração de fibrinogênio foi significativamente maior no grupo DRC, comparado ao grupo controle. A firmeza máxima do coágulo aumenta em humanos (LANG et al., 2009) e em cães (WIINBERG et al., 2008) de maneira dependente à concentração do fibrinogênio. Prihirunkit e colaboradores (2011) verificaram um aumento significativo de fibrinogênio em cães com DRC, bem como a redução da AT nesses animais. A seleção de animais com RPC>1 e os resultados de hipercoagulabilidade e de aumento na concentração de fibrinogênio nos animais com DRC, levam-nos a sugerir que a razão proteína/creatinina urinária e a concentração de fibrinogênio

podem ser considerados fatores interferentes para a estabilidade do coágulo e aumento do risco trombótico. Porém, Lennon e colaboradores (2013) já concluíram que RPC e antitrombina não podem ser utilizados como fatores preditivos isoladamente.

O aumento da viscosidade sanguínea conjuntamente a hipertensão produz maior resistência ao fluxo sanguíneo, o que pode causar isquemias (LEE, 1997). Consequentemente causa dano endotelial verificado pelo aumento do fator de von Willebrand e de trombosmodulina (LI-SAW-HEE et al., 1997), também há ativação plaquetária, aumento do fibrinogênio e da fibrinólise (LEE, 1997).

Apesar de a TEM não ser a técnica mais acurada para a avaliação da função plaquetária, esta forneceu dados que sustentam a hipótese da contribuição da agregação plaquetária para a hipercoagulabilidade em cães com DRC, verificado pelo aumento das variáveis CFT, ângulo α e MCF, que são correlacionadas com a concentração de plaquetas em cães (SMITH et al., 2012). Um estudo semelhante realizado em cães (FALCO et al., 2013), sem a avaliação da agregação plaquetária já havia encontrado indícios da participação das plaquetas no processo de hipercoagulabilidade por meio da TEM. Porém, não observamos diferenças significativas na concentração das plaquetas entre os grupos, nem mesmo na avaliação da função plaquetária. O que chama atenção neste último teste, é que o grupo DRC apresentou valores menores de agregação plaquetária. As plaquetas podem apresentar hipofunção *in vivo*, mas quando avaliadas de forma isolada e sem a presença de fluxo, elas podem apresentar função normal (ZWAGINGA et al., 1991).

Neste ponto, um complexo mecanismo no processo de hemostasia fica estabelecido, pois apesar do quadro de hipercoagulabilidade sanguínea as plaquetas não seriam fatores de risco trombótico. A participação das plaquetas parece contribuir para o risco hemorrágico em cães com DRC, que pode ser devido a níveis elevados de fibrinogênio que reduzem a disponibilidade de receptores plaquetários ao ADP (MEADE et al., 1985). O grupo DRC apresentou maiores concentrações de fibrinogênio.

Os resultados da TEM podem ser afetados pelo valor do hematócrito. Valores baixos de hematócrito podem produzir traçados indicando hipercoagulabilidade sanguínea, enquanto hematócrito elevado pode dar indícios de hipocoagulabilidade (MCMICHAEL e SMITH, 2011). Smith e colaboradores (2012) verificaram a possibilidade da influência do citrato de sódio nos resultados da TEM quando avaliaram animais anêmicos, e não encontraram diferenças significativas nos resultados em condições nas quais se corrigia ou não a quantidade de citrato de acordo com o hematócrito. Em nosso estudo, encontramos diferenças significativas entre o grupo controle e DRC nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito, mas não foram observadas diferenças nos resultados de VCM e CHCM, o que caracteriza a anemia não regenerativa já esperada na DRC (MACDOUGALL, 2007).

O efeito do hematócrito nos resultados da TEM pode ser um potencial limitante quando a TEM é realizada em animais anêmicos. Porém os resultados dos testes convencionais como TP e a concentração do fibrinogênio, sustentam a condição de hipercoagulabilidade que encontramos na TEM. Além disso, Brooks e colaboradores (2014) em condições experimentais verificaram que a influência do hematócrito no traçado da TEM não é válida, mas sim as condições de viscoelasticidade do sangue de cães.

No presente estudo, verificamos uma menor taxa de fibrinólise nos animais com DRC, devido à redução da porcentagem de lise máxima (ML), como também encontramos uma hipoalbuminemia significativa nos mesmos animais. Também encontramos uma correlação moderada entre estas variáveis. A hipoalbuminemia e menor ML podem ser explicados pela perda urinária da albumina e do plasminogênio. Estes dois achados foram estudados por Gandrille e Aiach (1990) que verificaram que pode haver um papel importante da hipoalbuminemia na deposição de fibrina, gerando coágulos anormais e com capacidade reduzida de se ligar ao plasminogênio.

A tromboelastometria se mostrou uma ferramenta eficiente para detectar evidência de hipercoagulabilidade e avaliar o risco trombótico em pacientes com DRC ou outras nefropatias que causem azotemia e proteinúria.

Os exames que avaliam a hemostasia em pacientes nefropatas na rotina do atendimento clínico ainda são escassos e onerosos. A investigação mais acurada das alterações hemostáticas nesses pacientes, por meio de equipamentos precisos e com resultados rápidos como a TEM, se faz necessária haja vista o processo complexo que podem ser encontradas na DRC. São necessários estudos clínicos para comprovação de que os achados de hipercoagulabilidade sanguínea neste estudo impliquem na ocorrência de eventos trombóticos. Assim, com diagnóstico rápido e a intervenção terapêutica adequada, busca-se melhorar o prognóstico e sobrevida destes animais.

7. CONCLUSÕES

As vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação estão envolvidas no complexo processo que leva a tendências trombóticas em cães com DRC, porém as plaquetas parecem não contribuir para este estado.

Os resultados do presente estudo demonstraram que cães proteinúricos com DRC apresentam evidências de risco trombótico caracterizado pela hipercoagulabilidade sanguínea e hipofibrinólise verificadas na TEM.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.J.; IRISH, A.B.; WATTS, G.F.; OOSTRYCK, R.; DOGRA, G.K. Hypercoagulability in chronic kidney disease is associated with coagulation activation but not endothelial function. *Thrombosis Research*, v.123, n.2, p.374–380, 2008.
- BALLARD, H.S.; MARCUS, A.J. Primary and Secondary platelet aggregation in uraemia. *Scandinavian Journal of Haematology* v.9, p.198-203, 1972.
- BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America*. Small animal practice, v.42, n.4, p.669–92, 2012.
- BROOKS, A.C.; GUILLAUMIN, J.; COOPER, E.S.; COUTO, C.G. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. *Transfusion* v.54, n.3, p.727-734, 2014.
- COLLET, J.P.; MONTALESCOT, G. Platelet function testing and implications for clinical practice. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, v.14, n.3, p.157–69, 2009.
- DONAHUE, S. M.; BROOKS, M.; OTTO, C. M. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein losing nephropathy. *Veterinary Emergency and Critical Care Society*, v.21, n.4, p.346–355. 2011.
- DONAHUE, S.M.; OTTO, C.M. Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.15, n.1, p.9–16, 2005.
- EBERST, M. E.; BERKOWITZ, L. R. Hemostasis in Renal Disease: Pathophysiology. *The American Journal of Medicine*, v.96, p.168–179, 1994.
- FALCO, S.; ZANATTA, R.; BRUNO, B.; MAURELLA, C.; SCALONE, A.; TARDUCCI, A.; BORRELLI, A. Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with kidney diseases. *Acta Veterinaria Brno*, v.82, p.209-214, 2013.
- FORSYTHE, L.T.; JACKSON, M.L.; MERIC, S.M. Whole blood platelet aggregation in uremic dogs. *American Journal Veterinary Research* v. 50, n. 10, p. 1754-1757, 1989.
- GAFTER, U.; BESSLER, H.; MALACHI, T.; ZEVIN, D.; DJALDETTI, M.; LEVI, J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. *Nephron* v.45, p.207-210, 1987.
- GOGGS, R.; BRAINARD, B.; LAFORCADE, A.M.; FLATLAND, B.; HANEL, R.; MCMICHAEL, M.; WIINBERG, B. Partnership on Rotational Viscoelastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* v.24, n.1, p. 1-22, 2014.
- GORDGE, M.P.; FAINT, R.W.; RYLANCE, P.B.; NEILD, G.H. Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure. *Thrombosis and Haemostasis* v.60, n.1, p.83-87, 1988.

GRANDRILLE, S.; AIACH, M. Albumin Concentration Influences Fibrinolytic Activity in Plasma and Purified Systems. *Fibrinolysis* v.4, n.4, p.225-232, 1990.

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

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

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

HENIK, R.A.; DOLSON, M.K.; WENHOLZ, L.J. How to obtain a blood pressure measurement. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* v.20, p.144-150, 2005.

IRIS, Staging of Chronic Kidney Disease, modified 2013. Disponível em: < <http://www.iris-kidney.com/pdf/n378.008-iris-website-staging-of-ckd-pdf.pdf> > Acessado: 11/01/2016.

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

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

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

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

KUZI, S.; SEGEV, G.; HARUVI, E.; AROCH, I. Plasma Antithrombin Activity as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Dogs: A Retrospective Study of 149 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n.3, p. 587-596, 2010.

LANG, T.; JOHANNING, K.; METZLER, H.; PIEPENBROCK, S.; SOLOMON, C.; RAHE-MEYER, N.; TANAKA, K.A. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. *Anesthesia & Analgesia* v.108, n.3, p.751-758, 2009.

LAU, S. O.; TKACHUCK, J. Y.; HASEGAWA, D. K.; EDSON, J. R. Plasminogen and antithrombin III deficiencies in the childhood nephrotic syndrome associated with plasminogenuria and antithrombinuria. *The Journal of Pediatrics*, v.96, p.390–392, 1980.

LEE, A.J. The role of rheological and haemostatic factors in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, v.11, p.767-776, 1997.

LENNON, M.; HANEL, R.M.; WALKER, J.M.; VADEN, S.L. Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, n.3, p. 462-468, 2013.

LINDSAY, R.M.; CLARK, W.F. Platelet destruction in renal disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v.8, n.2, p.138-155, 1982.

LI-SAW-HEE, F.L.; BLANN, A.D.; LIP, G.Y.H. The detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *International Journal of Cardiology*, v. 61, p.171-174, 1997.

LISMAN, T.; DE GROOT, P. G.; MEIJERS, J. C. M.; ROSENDAAL, F. R. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood*, v.105, n.3, p.1102-1105, 2005.

MACDOUGALL, I.C. Anaemia of chronic kidney disease. *Medicine* v.35, n.8, p.457-460, 2007.

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

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

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

MARSCHNER, C. B.; BJORNVAD, C. R.; KRISTENSEN, A. T.; WIINBERG, B. Thromboelastography results on citrated whole blood from clinically healthy cats depend on modes of activation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.52, p.38, 2010.

MCMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, v.40, n.2, p.140–153, 2011.

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

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

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

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

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

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C.A.; JACOB, F.; ROSS, S. Insuficiência Renal Crônica In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, cap.169, p. 1721-1751.

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

SAS Institute Inc. 2013. SAS/AF® 9.4 Procedure Guide, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.

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

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

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

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

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

SMITH, S.A.; MCMICHAEL, M.A.; GALLIGAN, A.J.; GILOR, S.; HOH, C.M. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v.21, n.7, p.692-702, 2010.

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

SOLOMON, C.; CADAMURO, J.; ZIEGLER, B.; SCHÖCHL, H.; VARVENNE, M.; SORENSEN, B.; HOCHLEITNER, G.; MEYER, N.R. A comparison of fibrinogen measurement methods with fibrin clot elasticity assessed by thromboelastometry, before and after administration of fibrinogen concentrate in cardiac surgery patients. *Transfusion Practice*, v.51, n.8, p.1695-1706, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica

Daniele S. Gonçalves^{2*}, Silvano S. Geraldês², Pryscilla T. C. Guimarães-Okamoto², Regina K. Takahira²

ABSTRACT. – Gonçalves, D.S., Geraldês, S.S., Guimarães-Okamoto, P.T.C. & Takahira, R.K. 2016.

[Evaluation of bleeding and thromboembolic disorders in dogs with chronic kidney disease.] Alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica, Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Cx Postal 560, 18618-000 - Botucatu, SP. E-mail: danielesilvano@gmail.com

Chronic kidney disease (CKD) affects mostly older dogs and its main characteristic is the irreversible loss of kidney function. CKD in dogs promotes serious metabolic alterations, often characterized by azotemia, hypoalbuminemia and non-regenerative anemia. Azotemia and uremia predispose the hemostatic abnormalities that can lead to hemorrhagic cases. In addition to platelet dysfunction, deficiency of natural anticoagulants and reduced fibrinolysis are factors that predispose to thromboembolism. This work aims to evaluate the possible bleeding or thrombotic tendencies in dogs with CKD. 20 healthy dogs were selected (control group) with tests within normal limits and 17 dogs with CKD in stages III or IV classified according to IRIS and urine protein to creatinine ratio greater than one (CKD group). Blood samples for the realization of thromboelastometry (TEM), platelet aggregation, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinogen concentration were collected at one time for both groups after the inclusion criteria had been confirmed. Statistical analysis performed according to the distribution of the variable at the 5% level of significance. In the present study, we observed a state of hypercoagulable blood in dogs with CKD. In TEM with the extrinsic pathway activator, there was shortening of the clotting time and clot formation time, increasing the alpha angle and the maximum clot firmness, and reducing the maximum lysis in dogs with CKD compared to control animals. Prothrombin time also had lower results in the CKD group. In addition, the fibrinogen level was higher in this group. Platelet aggregation did not differ between groups. The joint interpretation of the results leads us to conclude that dogs with CKD have a thrombosis toward predisposition, but the platelets do not seem to play an important role in this process.

INDEX TERMS: CKD, hemostasis, thromboelastometry, hypercoagulable

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Cx Postal 560, 18618-000, Botucatu, SP. *Autor para correspondência: danielesilvano@gmail.com

RESUMO. - A doença renal crônica (DRC) acomete principalmente cães idosos e tem como característica principal a perda irreversível da função renal. A DRC em cães promove alterações metabólicas graves, caracterizadas frequentemente pela azotemia, hypoalbuminemia e anemia não regenerativa. Tanto a azotemia quanto a uremia predispoem a alterações hemostáticas que podem levar a quadros hemorrágicos. Além das disfunções plaquetárias, deficiência de anticoagulantes naturais e redução da fibrinólise são fatores que predispoem ao tromboembolismo. Este trabalho tem como objetivo avaliar as possíveis tendências hemorrágicas ou trombóticas em cães com DRC. Foram selecionados 20 cães saudáveis (grupo controle) com exames dentro da normalidade e 17 cães com DRC em estágios III ou IV classificados segundo a IRIS e a relação proteína/creatinina urinária maior que um (grupo DRC). As amostras de sangue para a realização da tromboelastometria (TEM), agregação plaquetária, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e concentração de fibrinogênio foram colhidas em momento único para ambos os grupos após os critérios de inclusão serem confirmados. A análise estatística foi realizada de acordo com a distribuição das variáveis, ao nível de 5% de significância. No presente estudo foi possível observar um estado de hipercoagulabilidade sanguínea nos cães com DRC. Na TEM com o ativador de via extrínseca, observou-se encurtamento no tempo de coagulação e do tempo de formação do coágulo, aumento do ângulo alfa, da firmeza máxima do coágulo e redução da lise máxima nos cães com DRC em relação aos animais controle. O tempo de protrombina também apresentou resultados menores no grupo DRC. Adicionalmente, a dosagem de fibrinogênio foi maior neste grupo. A agregação plaquetária não apresentou diferenças entre os grupos. A interpretação conjunta dos resultados obtidos nos leva a concluir que os cães com DRC possuem uma predisposição a trombose, porém as plaquetas parecem não desempenhar um importante papel neste processo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: DRC, hemostasia, tromboelastometria, hipercoagulabilidade.

INTRODUÇÃO

Distúrbios de hemostasia são complicações comuns na doença renal crônica que podem predispor tanto à trombose quanto à hemorragia. O processo complexo de coagulação pode refletir de maneiras diferentes nas manifestações clínicas (Eberst & Berkowitz 1994). Em humanos tem sido bastante estudada a DRC e suas complicações hemostáticas (Wattanakit & Cushman 2009, Pavord & Myers 2011). Porém, muitas informações ainda são conflitantes quanto a ocorrência de hiper ou hipocoagulabilidade sanguínea, e os trabalhos em cães com DRC ainda são escassos (Donahue et al. 2011, Prihirunkit et al. 2011, Falco et al. 2013), de forma que sua relevância clínica ainda não está bem esclarecida.

O risco de trombose em pacientes com DRC tem como referência a tríade de Virchow com os pilares que envolvem seu processo: a estase sanguínea, hipercoagulabilidade sanguínea e lesão endotelial (Wattanakit & Cushman 2009). O risco hemorrágico é multifatorial, mas a persistência do quadro urêmico e suas consequências hemostáticas tem sido investigada (Sohal et al. 2006).

A tromboelastometria se apresenta como uma ferramenta promissora para a avaliação das possíveis complicações hemostáticas causadas pela DRC, destacando-se pela sua capacidade de avaliação dos estados de hipo ou hipercoagulabilidade (Hanel et al. 2014). A aplicação desta técnica em associação aos demais testes de avaliação hemostática torna-se uma importante contribuição ao estudo de caracterização da doença renal crônica sobre a hemostasia de cães.

Os estudos realizados em cães com azotemia e/ou proteinúria empregando a tromboelastometria ou tromboelastografia verificaram evidências que a atividade plaquetária possui um papel importante, juntamente com os anticoagulantes naturais, além da azotemia e grau de proteinúria (Donahue et al. 2011, Prihirunkit et al. 2011, Lennon et al. 2013).

A avaliação conjunta da função plaquetária com a tromboelastometria e correlacionar seus resultados com testes convencionais de hemostasia, fornecerá informações para o estabelecimento do perfil hemostático e avaliar possíveis tendências hemorrágicas e/ou trombóticas em cães com DRC.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental. O estudo foi realizado em cães atendidos na rotina da Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP. Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo no 33/2014). Foram selecionados 17 cães com doença renal crônica (DRC) em estágios III (8/17) e IV (9/17), classificados conforme IRIS (IRIS, 2013). O grupo controle foi composto por 20 cães saudáveis provenientes de proprietários voluntários.

A seleção dos animais saudáveis foi realizada por meio de hemograma com contagem de plaquetas, dosagem de proteína total, albumina, globulinas, enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), ureia, creatinina, urinálise e razão proteína / creatinina urinária, sendo incluídos aqueles com perfil hematológico, bioquímicos e urinário com resultados dentro dos limites de referência e ausência de doença pregressa nos últimos 30 dias.

Foram incluídos no grupo DRC, os cães com valores estabilizados de creatinina 2 - 5mg/dL (grau III) e >5mg/dL (grau IV), urinálise com sedimento pobre e razão proteína/creatinina urinária (RPC) >1,0 independente da causa de base. Todos os animais foram confirmados com DRC por meio de ultrassonografia. Foram excluídos deste grupo os animais que apresentavam neoplasia, doenças infecciosas concomitantes, animais em choque, com insuficiência cardíaca congestiva, hepatopatia, nefrolitíase ou outra doença que viesse a mascarar e/ou influenciar os resultados dos exames hemostáticos.

Colheita das amostras. As amostras de sangue para a tromboelastometria foram colhidas em momento único, após dosagens seriadas de ureia e creatinina e estabilização das mesmas, confirmando assim o estágio da DRC no paciente estável. Além disso, os critérios de inclusão foram confirmados e no grupo controle após confirmada a higidez do animal.

A colheita de sangue foi realizada preferencialmente por venopunção jugular única e com fluxo sanguíneo contínuo em seringa de 10mL (BD®, New Jersey, Estados Unidos). Foram colhidos 0,5mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 (ácido etilenodiamino tetra acético) a 7,5% (Vacuette®, Greiner Bio-one, Kremsmuenster, Osterreich, Austria) para o hemograma e 2,0mL de sangue sem anticoagulante (BD®, New Jersey, Estados Unidos) para as dosagens bioquímicas. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 1710 X g por 15 minutos para obtenção do soro e realização dos testes.

Para a tromboelastometria e a prova de agregação plaquetária foram colhidos 4,5mL de sangue em citrato de sódio 3,2% (BD®, New Jersey, Estados Unidos). Após a colheita, as amostras foram imediatamente submetidas à análise.

As análises do tempo de protrombina, tromboplastina parcial ativada e fibrinogênio foram realizadas no plasma. Para isso foram colhidos 4,5mL de sangue em tubo com citrato de sódio 3,2% (BD®, New Jersey, Estados Unidos) que imediatamente após a colheita foi submetido a um banho de gelo, em seguida centrifugado a 1710 X g por 15 minutos e o plasma armazenados em microtubos e congelado em -80°C (Sanyo® Ultra 108 Low, Osaka, Japão) até o processamento.

Hemograma. Foram realizados em contador hematológico (Sysmex® - Poch - 100iV – Miami, Estados Unidos). O hematócrito foi mensurado pela técnica de microhematócrito (SCHALM et al., 1975). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em conjunto com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido (Laborclin®, Paraná, Brasil).

Bioquímica sérica. Os testes bioquímicos alanina amino-transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil-transferase (GGT), ureia, creatinina, proteína total sérica, albumina e globulinas foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada (Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça) utilizando kits comerciais (Katal®, Belo Horizonte, Brasil).

Urinálise e razão proteína / creatinina urinária. A urinálise compreendeu o exame físico, químico (Combur-Test® – Roche) e sedimentoscopia em microscópio óptico (40x). A amostra de urina foi coletada por cateterismo e/ou cistocentese. A dosagem de proteína e creatinina urinárias foram realizadas em equipamento de bioquímica automatizada (Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça) utilizando kits comerciais (Katal®, Belo Horizonte, Brasil).

Tromboelastometria. Foi realizada no aparelho ROTEM® (Delta, Pentapham, Munique, Alemanha) mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L (startem®) sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: intem® (20µL, fosfolipídios de tromboplastina parcial, Pentapham, Munique, Alemanha), extem® (20µL, tromboplastina tecidual, Pentapham, Munique, Alemanha) e fibtem® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina, Pentapham, Munique, Alemanha). Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML (lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo.

Agregação plaquetária. Foi realizada em duplicata mediante a adição de 2µL de Colágeno (reagent Chrono-log®, Chicago, Estados Unidos) em 500µL de sangue citratado + 500µL de solução fisiológica (NaCl 0,9% Equiplex®). A resposta das plaquetas frente ao agonista foi mensurada por impedância elétrica em um agregômetro de plaquetas de sangue total (Chrono-log® 592, Chicago, Estados Unidos).

Tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio (mg/dL). O TP e o TTPa foram realizados em coagulômetro (ClotTimer® Laser Sensor, Sorocaba, Brasil) em duplicata, utilizando os kits específicos (Clot®, Sorocaba, Brasil) para cada teste. A dosagem do fibrinogênio foi realizada pelo método de Clauss, utilizando kit específico (Labtest®, Minas Gerais, Brasil).

Análise estatística. O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando dados de estudos semelhantes das variáveis mais relevantes, supondo poder estatístico de 80%, nível alfa de 5%, resultando no valor de 17 animais para cada grupo como ideal para o estudo (Statstodo Trading Pty Ltd). A distribuição das variáveis foi avaliada por meio da visualização de histograma e gráficos quantil-quantil. Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva, para as variáveis com distribuição paramétrica foram consideradas a média e desvios padrão, para as variáveis não paramétricas considerou-se a mediana, primeiro quartil e terceiro quartil de cada variável. Para comparação entre os grupos das variáveis paramétricas foi aplicado o teste t. Nas variáveis com distribuição não paramétricas a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas com software SAS 9.4 (2013) ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

O grupo DRC foi composto por 10 fêmeas e 7 machos, com idade média de 8,6 anos (3 - 13 anos) e os cães estavam distribuídos dentre as raças Boxer (1/17), Dálmata (1/17), Pastor Alemão (1/17), Rottweiler (1/17), Weimaraner (1/17) e sem raça definida - SRD (12/17). No grupo controle obtivemos 11 fêmeas e 9 machos, com idade média de 5 anos (1,5 – 10 anos) distribuídos entre as raças: Border Collie (1/20), Dachshund (2/20), Terrier Brasileiro (1/20), Labrador (5/20), Lhasa Apso (1/20), Pitbull (4/20), Poodle (1/20), Australian Cattle Dog (1/20), Shitzu (1/20), Yorkshire (1/20) e SRD (2/20).

A avaliação hematológica, bioquímica e da urinálise foi realizada em ambos os grupos para fins de comparação estatística, e os resultados estão demonstrados nos quadros 1 e 2.

A avaliação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), fibrinogênio, agregação plaquetária foi realizada em ambos os grupos para fins de comparação estatística, e os resultados estão demonstrados nas quadro 3.

As figuras 1, 2, 3, 4 e 5 representam a variação nos parâmetros CT, CFT, ângulo α , MCF e ML da tromboelastometria com os reagentes intem®, extem® e fibtem®, para os grupos controle e DRC.

O tempo de coagulação - CT (Figura 1) apenas o reagente intem® não apresentou diferença significativa entre os grupos, com valores menores no grupo DRC.

O tempo de formação do coágulo - CFT (Figura 2) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, valores menores no grupo DRC. O fibtem® não produziu resultados de CFT para o grupo controle.

O ângulo α (Figura 3) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores maiores no grupo DRC.

A firmeza máxima do coágulo – MCF (Figura 4) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores maiores no grupo DRC.

A lise máxima - ML (Figura 5) apresentou diferença entre os grupos para todos os reagentes, com valores menores no grupo DRC.

DISCUSSÃO

Na tromboelastometria, a hipercoagulabilidade sanguínea é caracterizada pelo encurtamento do tempo de coagulação (CT) e do tempo de formação do coágulo (CFT), aumento do ângulo α e da firmeza máxima do coágulo (MCF) (Goggs et al. 2014). O encurtamento do CT no presente estudo sugere que a formação da fibrina está ocorrendo de forma mais rápida. Este indicador pode ser influenciado pelo ativador utilizado, mas as demais variáveis são minimamente influenciadas (Smith et al. 2010). A utilização dos reagentes intem® e extem® permitem avaliar a formação da trombina ocorrendo de forma exclusiva em cada via da coagulação, intrínseca e extrínseca respectivamente. O fibtem® permite avaliar a formação da fibrina a partir do fibrinogênio principalmente, sem a função das plaquetas no processo (Mcmichael & Smith 2011).

Os testes plasmáticos de coagulação apresentaram encurtamento do tempo de protrombina – TP (via extrínseca) mas não do tempo de tromboplastina parcial ativado. Adicionalmente o CT com extem® apresentou encurtamento, sendo equivalente ao TP. O CT com intem® não apresentou diferença entre os grupos, demonstrando sua equivalência ao TTPA. Nossos achados corroboram com Falco e colaboradores (2013), que também encontraram encurtamento do tempo de coagulação apenas com extem®, em cães azotêmicos e proteinúricos, enquanto que no intem® isso não ocorreu. Caracterizando um estado de hipercoagulabilidade.

Donahue e colaboradores (2011) também verificaram hipercoagulabilidade caracterizada pela rapidez na formação do coágulo (menor CFT e ângulo α aumentado) em cães com insuficiência renal e nos casos de nefropatia com proteinúria (RPC>2). Estes dados também foram encontrados neste estudo, em que selecionamos apenas cães com RPC>1, sugerindo ser um importante fator a se considerar quanto ao risco trombótico em cães com DRC.

A fase de estabilização do coágulo, representada pelo MCF foi significativamente diferente entre os grupos estudados. A utilização do ativador fibtem®, que inibe as plaquetas, permite avaliar a contribuição do fibrinogênio nesta fase. Fato confirmado pois encontramos alterações não só no MCF do extem®, mas também no fibtem®. Além disso a concentração de fibrinogênio foi significativamente maior no grupo DRC, comparado ao grupo controle. A firmeza máxima do coágulo aumenta em humanos (Lang et al. 2009) e em cães (Wiinberg et al. 2008) de maneira dependente à concentração do fibrinogênio. Prihirunkit e colaboradores (2011) verificaram um aumento significativo de fibrinogênio em cães com DRC, bem como a redução da AT nesses animais. A seleção de animais com RPC>1 e os resultados de hipercoagulabilidade e de aumento na concentração de fibrinogênio nos animais com DRC, levam-nos a sugerir que a razão proteína/creatinina urinária e a concentração de fibrinogênio podem ser considerados fatores interferentes para a estabilidade do coágulo e aumento do risco trombótico. Porém, Lennon e colaboradores (2013) já concluíram que RPC e antitrombina não podem ser utilizados como fatores preditivos isoladamente.

O aumento da viscosidade sanguínea conjuntamente a hipertensão produz maior resistência ao fluxo sanguíneo, o que pode causar isquemias (Lee 1997). Consequentemente causa dano endotelial verificado pelo aumento do fator de von Willebrand e de trombosmodulina (Li-Saw-Hee et al. 1997), também há ativação plaquetária, aumento do fibrinogênio e da fibrinólise (Lee 1997).

Apesar de a TEM não ser a técnica mais acurada para a avaliação da função plaquetária, esta forneceu dados que sustentam a hipótese da contribuição da agregação plaquetária para a hipercoagulabilidade em cães com DRC, verificado pelo aumento das variáveis CFT, ângulo α e MCF, que são correlacionadas com a concentração de plaquetas em cães (Smith et al. 2012). Um estudo semelhante realizado em cães (Falco et al. 2013), sem a avaliação da agregação plaquetária já havia encontrado indícios da participação das plaquetas no processo de hipercoagulabilidade por meio da TEM. Porém, não observamos diferenças significativas na concentração das plaquetas entre os grupos, nem mesmo na avaliação da função plaquetária. O que chama atenção neste último teste, é que o grupo DRC apresentou valores menores de agregação plaquetária. As plaquetas podem apresentar hipofunção in vivo, mas quando avaliadas de forma isolada e sem a presença de fluxo, elas podem apresentar função normal (Zwaginga et al. 1991).

Neste ponto, um complexo mecanismo no processo de hemostasia fica estabelecido, pois apesar do quadro de hipercoagulabilidade sanguínea as plaquetas não seriam fatores de risco trombótico. A participação das plaquetas parece contribuir para o risco hemorrágico em cães com DRC, que pode ser devido a níveis elevados de fibrinogênio que reduzem a disponibilidade de receptores plaquetários ao ADP (Meade et al. 1985). O grupo DRC apresentou maiores concentrações de fibrinogênio.

Os resultados da TEM podem ser afetados pelo valor do hematócrito. Valores baixos de hematócrito podem produzir traçados indicando hipercoagulabilidade sanguínea, enquanto hematócrito elevado pode dar indícios de hipocoagulabilidade (Mcmichael & Smith 2011). Smith e colaboradores (2012) verificaram a possibilidade da influência do citrato de sódio nos resultados da TEM quando avaliaram animais anêmicos, e não encontraram

diferenças significativas nos resultados em condições nas quais se corrigia ou não a quantidade de citrato de acordo com o hematócrito. Em nosso estudo, encontramos diferenças significativas entre o grupo controle e DRC nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito, mas não foram observadas diferenças nos resultados de VCM e CHCM, o que caracteriza a anemia não regenerativa já esperada na DRC (Macdougall 2007).

O efeito do hematócrito nos resultados da TEM pode ser um potencial limitante quando a TEM é realizada em animais anêmicos. Porém os resultados dos testes convencionais como TP e a concentração do fibrinogênio, sustentam a condição de hipercoagulabilidade que encontramos na TEM. Além disso, Brooks e colaboradores (2014) em condições experimentais verificaram que a influência do hematócrito no traçado da TEM não é válida, mas sim as condições de viscoelasticidade do sangue de cães.

No presente estudo, verificamos uma menor taxa de fibrinólise nos animais com DRC, devido à redução da porcentagem de lise máxima (ML), como também encontramos uma hipoalbuminemia significativa nos mesmos animais. Também encontramos uma correlação moderada entre estas variáveis. A hipoalbuminemia e menor ML podem ser explicados pela perda urinária da albumina e do plasminogênio. Estes dois achados foram estudados por Gandrille e Aiach (1990) que verificaram que pode haver um papel importante da hipoalbuminemia na deposição de fibrina, gerando coágulos anormais e com capacidade reduzida de se ligar ao plasminogênio.

A tromboelastometria se mostrou uma ferramenta eficiente para detectar evidência de hipercoagulabilidade e avaliar o risco trombótico em pacientes com DRC ou outras nefropatias que causem azotemia e proteinúria.

Os exames que avaliam a hemostasia em pacientes nefropatas na rotina do atendimento clínico ainda são escassos e onerosos. A investigação mais acurada das alterações hemostáticas nesses pacientes, por meio de equipamentos precisos e com resultados rápidos como a TEM, se faz necessária haja vista o processo complexo que podem ser encontradas na DRC. Assim, com diagnóstico rápido e a intervenção terapêutica adequada, busca-se melhorar o prognóstico e sobrevida destes animais.

CONCLUSÕES

As vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação estão envolvidas no complexo processo que leva a tendências trombóticas em cães com DRC, porém as plaquetas parecem não contribuir para este estado.

São necessários estudos clínicos para comprovação de que os achados de hipercoagulabilidade sanguínea nos cães com DRC neste estudo impliquem na ocorrência de eventos trombóticos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que cães proteinúricos com DRC apresentam evidências de risco trombótico caracterizado pela hipercoagulabilidade sanguínea e hipofibrinólise verificadas na TEM.

REFERÊNCIAS

- Brooks, A.C., Guillaumin, J., Cooper, E.S. & Couto, C.G. 2014. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. *Transfusio*(54 (3):727-734.
- Donahue, S. M., Brooks, M. & Otto, C. M. 2011. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein losing nephropathy. *Veterinary Emergency and Critical Care Society* 21(4):346-355.
- Eberst, M. E., Berkowitz, L. R. 1994. Hemostasis in Renal Disease: Pathophysiology. *The American Journal of Medicine* 96:168-179.
- Falco, S., Zanatta, R., Bruno, B., Maurella, C., Scalone, A., Tarducci, A. & Borrelli, A. 2013. Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with kidney diseases. *Acta Veterinaria Brno*, 82:209-214.
- Goggs, R., Brainard, B., Laforcade, A.M., Flatland, B., Hanel, R., McMichael, M. & Wiinberg, B. 2014. Partnership on Rotational Viscoelastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24(1):1-22.
- Grandrille, S., Aiach, M. 1990. Albumin Concentration Influences Fibrinolytic Activity in Plasma and Purified Systems. *Fibrinolysis* 4(4):225-232.
- Hanel, R.M., Chan, D.L., Conner, B., Gauthier, Holowaychuk, M., Istvan, S., Walker, J.M., Wood, D., Goggs, R. & Wiinberg, B. 2014. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24(1):47-56.
- Henik, R.A., Dolson, M.K. & Wenzholz, L.J. 2005. How to obtain a blood pressure measurement. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 20:144-150.
- IRIS, Staging of Chronic Kidney Disease, modified 2013. Disponível em: < <http://www.iris-kidney.com/pdf/n378.008-iris-website-staging-of-ckd-pdf.pdf> > Acesso em: 11/01/2016.
- Lang, T., Johanning, K., Metzler, H., Piepenbrock, S., Solomon, C., Rahe-Meyer, N. & Tanaka, K.A. 2009. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. *Anesthesia & Analgesia* 108(3):751-758.
- Lee, A.J. 1997. The role of rheological and haemostatic factors in hypertension. *Journal of Human Hypertension* 11:767-776.
- Lennon, M., Hanel, R.M., Walker, J.M. & Vaden, S.L. 2013. Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27(3):462-468.

- Li-Saw-Hee, F.L., Blann, A.D. & Lip, G.Y.H. 1997. The detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension(*International Journal of Cardiology* 61:171-174.
- Macdougall, I.C. 2007. Anemia of chronic kidney disease. *Medicine* 35(8):457-460.
- Mcmichael, M. A. & Smith, S. A. 2011. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Veterinary Clinical Pathology* 40(2):140-153.
- Meade, T.W., Vickers, M., Thompson, S.G. & Seghatchian, M.J. 1985. The effect of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation *Thrombosis Research* 38:527-534.
- Pavord, S. & Myers, B. 2011. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. *Blood Reviews* 25:271-278.
- Prihirunkit, K., Lekcharoensuk, C., Pooripanpipat, S. & Tipsawek, S. 2011. Alteration of some natural anticoagulants in dogs with chronic renal failure. *Comparative Clinical Pathology* 20(3):217-221.
- SAS Institute Inc. 2013. SAS/AF® 9.4 Procedure Guide, Second Edition Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schalm, O.W., Jain, N.C. & Nemi, C. 1975. Hematology Techniques In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 3ed. Philadelphia : Lea & Febiger 2:20-86.
- Smith S.A., Mcmichael, M.A., Gilor, S., Galligan, A. J. & Hoh, C.M. 2012. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *American Journal of Veterinary Research* 73(6):789-798.
- Smith, S.A., Mcmichael, M.A., Galligan, A.J., Gilor, S. & Hoh, C.M. 2010. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 21(7):692-702.
- Sohal, A.S., Gangji, A.S., Crowther, M.A. & Treleaven, D. 2006. Uremic bleeding: pathophysiology and clinical risk factors. *Thrombosis Research* 118:417-422.
- Wattanakit, K. & Cushman, M. 2009. Chronic kidney disease and venous thromboembolism: epidemiology and mechanisms. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 15(5):408-412.
- Wiinberg, B., Jensen, A.L., Johansson, I., Rozanski, E., Tranholm, M. & Kristensen, A.T. 2008. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22:357-365.
- Zwaginga, J.J., Jsseldijk, M.J.W.I., Grooten, G., Vos, J., Boskuil, R.L.J. & Sixma, J.J. 1991. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorder can be attributed to factors in plasma. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 11(3):733-744.

Títulos dos quadros

Quadro 1. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros da hematimetria, plaquetas e leucócitos totais de cães nos grupos controle e DRC.

Quadro 2. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) dos parâmetros bioquímicos e urinários de cães nos grupos controle e DRC.

Quadro 3. Mediana, primeiro quartil (1q) e terceiro quartil (3q) do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), tempo de protrombina (TT), fibrinogênio e da agregação plaquetária de cães nos grupos controle e DRC.

Legendas das figuras

Figura 1. Tempo de coagulação (CT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05).

Figura 2. Tempo de formação do coágulo (CFT) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05).

Figura 3. Ângulo alfa (α) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05).

Figura 4. Firmeza máxima do coágulo (MCF) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05).

Figura 5. Lise máxima (ML) dos grupos controle e DRC para os reagentes intem®, extem® e fibtem®. *: Variáveis que apresentaram diferenças significativas (*p<0,05).

Quadros

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
Hemácias*	7,35	6,89	7,89	3,51	2,79	3,98
Hemoglobina*	17,7	16,4	18,4	8,1	6,6	9,3
Hematócrito*	52	47	54,5	25	22	28
VCM	68,99	65,27	70,41	71,21	68,10	72,97
CHCM*	34,86	33,58	35,38	32,61	32,19	33,13
Plaquetas	280.000	221.000	369.825	276.000	248.000	299.000
Leucócitos	8.100	6.900	11.150	10.800	9.200	15.600

Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); Plaquetas ($/\mu\text{L}$); Leucócitos ($/\mu\text{L}$);

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
Ureia*	33,0	29,0	46,4	236,0	161,0	293,0
Creatinina*	0,9	0,7	1,1	5,9	4,4	6,8
Proteína sérica*	6,2	5,9	6,5	5,7	4,9	6,1
Albumina*	3,5	3,5	3,6	2,5	2,0	2,6
Proteína urinária*	40,0	26,5	60,0	126,0	99,0	195,0
Creatinina urinária*	250,9	163,0	337,1	50,4	41,0	66,0
RPC*	0,14	0,10	0,22	2,5	1,80	3,0

Ureia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); Proteína sérica (g/dL); Albumina (g/dL); Proteína urinária (mg/dL);

Creatinina urinária (mg/dL); RPC: razão proteína creatinina urinária.

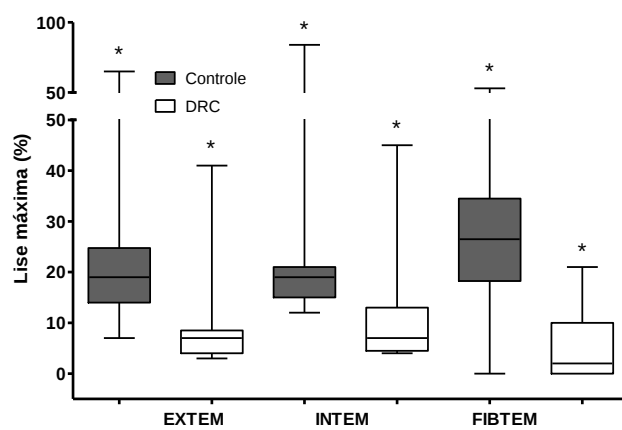
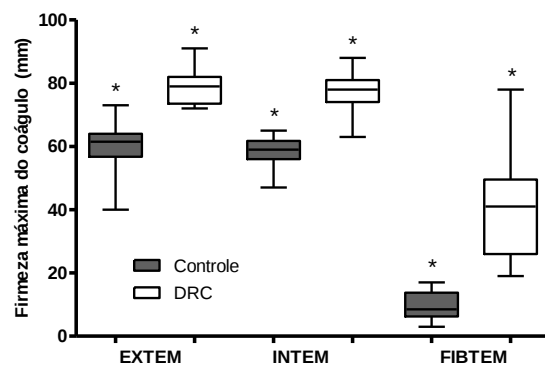
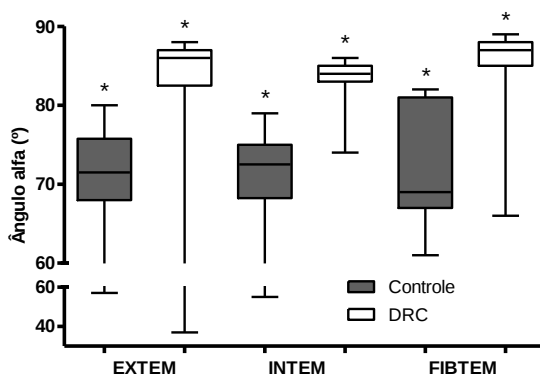
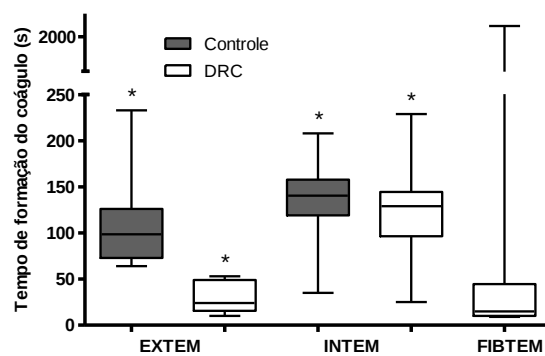
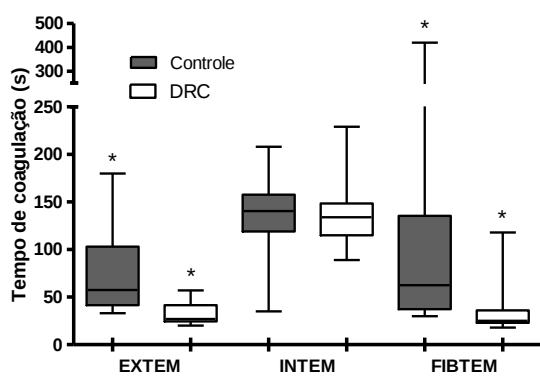
*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Parâmetro	Controle			DRC		
	Mediana	1q	3q	Mediana	1q	3q
TTPA	11,5	11,1	12,4	12,6	11,2	13,3
TP*	9,7	8,9	10,3	8,0	7,9	8,7
Fibrinogênio*	312,6	261,6	354,2	489,2	456,2	504,0
Amplitude	12,4	10,4	16,4	4,9	3,7	16,7

TTPA e TP: segundos; Fibrinogênio: mg/dL; Amplitude (ohms);

*: variáveis que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figuras



Anexo 1 – Diretrizes para preparação do artigo a ser submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico

ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. **Essa numeração será contínua por todo o artigo**; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. **ABSTRACT** e **RESUMO** serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, **será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em **itálico (grifo)**, e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).**

5. **Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos**. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Anexo 2 – Atestado de aprovação do Comitê de ética no uso de animais.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica**", Protocolo nº 33/2014-CEUA, da Professora Regina Kiomi Takahira, desta Faculdade, a ser conduzido por **Daniele Silvano Gonçalves** foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de abril de 2014.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos proprietários dos animais participantes do projeto.



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento “coleta de sangue e urina”, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado *Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica*, de responsabilidade de Daniele Silvano Gonçalves.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____