

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS
VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE
ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGUÍNEAS
DE CÃES HÍGIDOS**

Tauara dos Santos Dias

Médica veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS
VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE
ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGUÍNEAS
DE CÃES HÍGIDOS**

Discente: Tauara dos Santos Dias

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre no programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias na área de Patologia Animal.

D541d

Dias, Tauara dos Santos

Determinação dos intervalos de referência das variáveis tromboelastográficas sem o uso de ativadores em diferentes amostras sanguíneas de cães hígidos / Tauara dos Santos Dias. -- Jaboticabal, 2021

64 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira

1. Canina. 2. Coagulação. 3. Hemorragia. 4. Hemostasia. 5.

~~Trombo. I. Título.~~

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

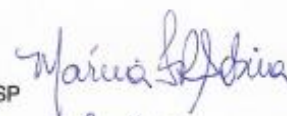
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGÜÍNEAS DE CÃES HÍGIDOS

AUTORA: TAUARA DOS SANTOS DIAS

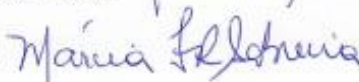
ORIENTADORA: MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA (Participação Virtual)
Núcleo Hospitalar Veterinário / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. MICHELLY FERNANDES DE MACEDO (Participação Virtual)
Universidade Federal do Semi-Árido-UFERSA / Mossoró/RN



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Jaboticabal, 23 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tauara dos Santos Dias, filha de Henrique Tadeu Marques Dias e Maria José dos Santos Dias, nasceu em 03 de agosto de 1992, na cidade de Ribeirão Preto/SP. Concluiu ensino Fundamental na Escola Municipal de Educação Básica (EMEB) João Nogueira, em Cravinhos/SP e ensino Médio na Escola Estadual “Cel. João de Souza Campos”, em Cravinhos/SP. Graduou-se Médica Veterinária pelo Centro Universitário Moura Lacerda, na cidade de Ribeirão Preto/SP, em dezembro de 2017, sob orientação da Professora Mestra Roberta Vanessa Pinho Casale, apresentou trabalho de conclusão de curso intitulado “Influência do ciclo estral no controle glicêmico de cadelas com *Diabetes mellitus* - relato de caso”. No ano de 2019, ingressou no curso de Mestrado na área de concentração em Patologia Animal junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal/SP, sob orientação da Professora Doutora Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, com a dissertação intitulada “Determinação dos intervalos de referência das variáveis tromboelastográficas sem o uso de ativadores em diferentes amostras sanguíneas de cães hípidos”.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tadeu e Maria, minha irmã
Tayná e meu namorado Marcelo, por
acreditarem em mim, além de toda força,
apoio e paciência durante mais esta fase da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, sou imensamente grata a Deus, por todas as coisas que faz para mim e por mim, por conduzir a minha vida sempre dando-me paciência, serenidade, coragem, sabedoria para as coisas e situações de cada dia.

Gratidão a minha orientadora Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, por acreditar em minha capacidade, ser sempre tão paciente, por todo carinho, amizade e por me orientar com excelência, possibilitando assim, mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela paciência, gentileza, solicitude e tanto me ajudar com a estatística do trabalho. Sem ele, nada disso seria possível.

Aos Representantes Thays Borgonove, Rafael Celayes e Alexandre Sette da CEI Comércio de Exportação e Importação de Materiais Médicos, São Paulo/SP, pelo empréstimo do tromboelastógrafo TEG e todo suporte necessário para que as avaliações tromboelastográficas dos animais utilizados no ensaio que deu origem a esta dissertação, fossem realizadas.

Ao Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto/SP e a todos que lá trabalham, por abrir as portas do Núcleo Hospitalar Veterinário para os animais utilizados no estudo e por autorizar a realização dos exames tromboelastográficos e exames clínicos laboratoriais no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária.

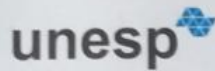
Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e a todos os que trabalham no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Unesp, por abrir as portas do Laboratório para que eu pudesse escrever a dissertação e aprender com os que lá trabalham e estudam.

Aos amigos que me acompanharam durante todo este período, com gestos de carinho, força, por toda e qualquer demonstração de afeto e luz.

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

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVEATURAS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de literatura.....	3
1.2.1 Fisiologia da hemostasia.....	3
1.2.2 Distúrbios da hemostasia	9
1.2.3 Avaliação Laboratorial do Sistema Hemostático	11
1.2.3.1 Tromboelastografia (TEG).....	13
1.2.3.2 Tromboelastometria (TEM)	15
1.2.3.3 Reometro de oscilação livre (FOR)	17
1.2.3.4 Tromboelastografia (TEG6s).....	19
1.2.3.5 Analisador Sonoclot	22
1.2.4 Aplicação dos testes viscoelásticos	25
1.2.5 Referências	25
CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE CÃES HÍGIDOS	23
2.1 INTRODUÇÃO.....	25
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.2.1 Análise estatística dos dados	32
2.3 RESULTADOS	33
2.4 DISCUSSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS.....	39
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICES.....	44



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização dos parâmetros tromboelastográficos de diferentes amostras sanguíneas de cães sadios**", protocolo nº 07349/19, sob a responsabilidade da Profª Drª Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de junho de 2019.

Vigência do Projeto	01/07/2019 a 01/11/2020
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	20
Peso / Idade	De qualquer peso, entre dois e cinco anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Núcleo Hospitalar Veterinário de Centro Universitário Moura Lacerda da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo

Jaboticabal, 13 de junho de 2019.

Fabiana Pilarski
Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fcav.unesp.br

DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE CÃES HÍGIDOS

RESUMO - O sistema hemostático compreende um conjunto de eventos fisiológicos e complexos do organismo. Este previne o escape de sangue a partir dos vasos sanguíneos e a formação de trombos que afetarão o fluxo sanguíneo. Para manter a fluidez do sangue nos vasos sanguíneos, é necessária a interação em homeostase de vários componentes, como a parede vascular, plaquetas, fatores de coagulação, substâncias anticoagulantes naturais e substâncias fibrinolíticas, entre outros. A avaliação de desordens hemostáticas é realizada por meio de exames laboratoriais geralmente subdivididos em testes convencionais e em testes viscoelásticos, como a tromboelastografia (TEG). O presente estudo teve como objetivo evidenciar as variáveis tromboelastográficas de cães hígidos utilizando diferentes amostras sanguíneas, como o sangue total fresco (STF), sangue total com citrato de sódio a 3,2% (STC), plasma fresco (PF) e plasma fresco congelado (PFC). A finalidade foi estabelecer intervalo de referência (IR) para tais variáveis em cães hígidos e verificar se o tipo de amostra e o método de conservação da amostra alteram o traçado tromboelastográfico. Para este projeto, foram selecionados 22 cães saudáveis oriundos do serviço de atendimento clínico do Núcleo de Atendimento Veterinário do Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto/SP, que buscaram o atendimento para avaliações rotineiras anuais de sanidade. As diferentes amostras sanguíneas foram coletadas por meio de venopunção jugular e submetidas à análise tromboelastográfica em diferentes circunstâncias. Para determinação dos IR, foi realizado teste t Student com intervalo de confiança (IC) de 95%, valor-p 0,05 e teste de Fisher para verificar homogeneidade. Além disso, foi realizado teste de Shapiro Wilk para verificação de normalidade e com auxílio de gráficos box plot para detecção e exclusão de valores extremos (*outliers*). Os dados foram processados no software estatístico livre RGui versão 4.0.0 (R Core Team (2020)). O conjunto de eventos do sistema hemostático, necessita de avaliação laboratorial robusta, como testes viscoelásticos, para melhor interpretação. Portanto, realizar tromboelastografia em diferentes amostras sanguíneas, bem como, determinar intervalo de referência para as variáveis TEG das diferentes amostras, mostra avanço para a realização do TEG em laboratórios clínicos veterinários. A obtenção de IR para diferentes tipos de amostras, possibilita o acesso ao exame tromboelastográfico em diferentes circunstâncias. O presente projeto mostrou ser possível e viável a realização da tromboelastografia em diferentes amostras sanguíneas e todas elas representam o paciente animal de maneira confiável.

Palavras-chave: canina, coagulação, hemorragia, hemostasia, trombo

DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS OF THROMBOELASTOGRAPHIC VARIABLES WITHOUT THE USE OF ACTIVATORS IN DIFFERENT BLOOD SAMPLES OF HEALTHY DOGS

ABSTRACT - The hemostatic system comprises a set of physiological and complex events in the body. This prevents the leakage of blood from the blood vessels and the formation of thrombi that will affect blood flow. To maintain the fluidity of blood in blood vessels, it is necessary to interact in homeostasis of various components, such as the vascular wall, platelets, coagulation factors, natural anticoagulant substances and fibrinolytic substances, among others. The evaluation of hemostatic disorders is performed through laboratory tests, usually subdivided into conventional tests and viscoelastic tests, such as thromboelastography (TEG). The present study aimed to evidence the thromboelastographic variables of healthy dogs using different blood samples, such as fresh whole blood (FTS), whole blood with 3.2% sodium citrate (STC), fresh plasma (FP) and fresh plasma frozen (PFC). The purpose was to establish a reference interval (RI) for such variables in healthy dogs and to verify whether the type of sample and the method of sample conservation alter the thromboelastographic tracing. For this project, 22 healthy dogs were selected from the clinical care service of the Center for Veterinary Care of the Moura Lacerda University Center, Ribeirão Preto/SP, which sought care for routine annual health assessments. Different blood samples were collected through jugular venipuncture and submitted to thromboelastographic analysis under different circumstances. To determine the RI, Student's t test was performed with a confidence interval (CI) of 95%, p-value 0.05 and Fisher's test to verify homogeneity. In addition, the Shapiro Wilk test was performed to verify normality and with the aid of box plot graphics for detection and exclusion of extreme values (outliers). Data were processed in the free statistical software RGui version 4.0.0 (R Core Team (2020)). The set of events of the hemostatic system requires robust laboratory evaluation, such as viscoelastic tests, for better interpretation. Therefore, perform thromboelastography in different samples blood tests, as well as determining the reference interval for the TEG variables of different samples, shows advances in the performance of TEG in clinical veterinary laboratories. This project showed that it is possible and viable to perform thromboelastography in different blood samples and all of them represent the animal patient reliably.

Keywords: canine, coagulation, hemorrhage, hemostasis, thrombus

LISTA DE ABREVEATURAS

% - Porcentagem
A – Amplitude máxima em tempo determinado
AA – Ácido aracdônico
ACT – Tempo de coagulação ativado
ActF – Ativador F
ADP – Difosfato de adenosina
APTEM – Teste aprotinina
AT - Antitrombina
CFF – Fibrinogênio funcional
CFR – Ângulo máximo
CFT – Tempo de coagulação
CID – Coagulação intravascular disseminada
CK – Kaolin
CKH – Kaolin com heparinase
CLOTSR – Lise em momento determinado
CLOTSRPAMIN – Lise em momento determinado
CLR – Tempo de lise máxima
COT1 – Período de mensuração
COT2 – Tempo de reação
CR – Taxa de coagulação
CRT – Kaolin com fator tecidual
CS – Sinal de coagulação
CT – Tempo de reação
DvW – Doença de von Willebrand
EPL – Porcentagem estimada de lise
EXTEM – Teste fator tecidual
FibScreen1 – Teste tromboplastina
FibScreen2 – Teste tromboplastina com abciximab
FIBTEM – Teste fibrinogênio
FOR – Reometro de oscilação livre
FT – Fator tecidual
FvW – Fator de von Willebrand
G – Elasticidade do coágulo
G'MAX – Máxima elasticidade
GPIIa/IIIb – Glicoproteína IIa/IIIb
HepScreen1 – Teste tromboplastina sensível a heparina
HepScreen2 – Teste tromboplastina com neutralizante de heparina
HepTEG – Teste heparina
HEPTTEM – Teste heparinase
HKH – Kaolin heparinizado com heparinase
Htc% - Hematócrito
INTEM – Teste Kaolin
K – Tempo de coagulação
KaoTEG – Teste Kaolin

LI – Lise em momento determinado
LY – Lise em momento determinado
MA – Amplitude máxima
MAXELAST- Amplitude máxima
MCE – Elasticidade do coágulo
MCF – Amplitude máxima
MCF-t – Tempo para a força máxima
ML – Lise máxima
NA – Não analisada
NATEM – Teste sem uso de ativador
PA - Plasminogênio
PAI1 – Inibidor do ativador de plasminogênio do tipo tecidual
PAI2 – Inibidor do ativador de plasminogênio do tipo tecidual
PAR -1 – Peptídeo de ativação do receptor de trombina
PDF – Produto de degradação da fibrina
PF – Função plaquetária
PF – Plasma fresco
PFC – Plasma fresco congelado
R – Tempo de reação
RapidTEG – Teste Kaolin com Fator tecidual
Reolyse – Teste de medição de fibrinólise
Reotrap – Teste de ativação plaquetária
RT – Período de mensuração
SI – Sistema internacional de unidades
SLOPEDE – ângulo alfa
SLOPEPAMIN – ângulo alfa
SRIS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
STC – Sangue total citratado
STF – Sangue total fresco
TCa – Tempo de coagulação ativado
TEG - Tromboelastografia
TEGPM – Teste de mapeamento plaquetário
TEM - Tromboelastometria
TFPI – Inibidor da via intrínseca
TIMETOMAX – Tempo para força máxima
TMA – Tempo para força máxima
TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa
TP – Tempo de protrombina
t-PA – Ativador de plasminogênio tipo tecidual
TSMO – Tempo de sangramento de mucosa oral
TT – Tempo de trombina
TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativado
TXA2 – tromboxano A2
u-PA – Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
 α - Alfa

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1: Representação esquemática do processo inicial de ativação do sistema hemostático, evidenciando lesão endotelial, exposição do colágeno e vasoconstrição reflexa. Fonte: Takahira (2015).	4
Figura 2: Representação esquemática do processo de adesão plaquetária mediada pelo fator de von Willebrand (FvW), ativação das plaquetas e liberação de substâncias vasoativas e pró-agregantes de seus grânulos e agregação plaquetária mediada pelo fibrinogênio. Fonte: Takahira (2015).	5
Figura 3: Esquema simplificado da ativação da cascata da coagulação por vias. As linhas tracejadas mostram a ação amplificadora da trombina os fatores V, VIII e XI. O fator IV é o cálcio ionizado. HMWK corresponde ao cininogênio de alto peso molecular. Fonte: Takahira (2015).	6
Figura 4: Equipamento tromboelastográfico a esquerda e mecanismo da tromboelastografia a direita ilustrando o funcionamento do equipamento desde a introdução da amostra sanguínea na cuba, sua leitura, transdução e formação de gráfico em monitor eletrônico representando o sistema hemostático. Fonte: López et al. (2016b).	14
Figura 5: Traçado tromboelastográfico mostrando as variáveis comumente avaliadas, como o tempo R, tempo K, ângulo alfa, MA, G, EPL, A e LY. Fonte: Dorsey et al. (2018).	15
Figura 6: Equipamento da tromboelastometria rotacional a esquerda e mecanismo da tromboelastometria rotacional a direita ilustrando o funcionamento do equipamento desde a introdução da amostra sanguínea na cubeta, sua leitura, detecção eletrônica por dispositivo óptico e formação de gráfico em monitor representando o sistema hemostático. Fonte: López et al. (2016b).	16
Figura 7: Traçado gráfico do mecanismo tromboelastometria rotacional mostrando suas variáveis: CT (tempo de coagulação), CFT (tempo de formação do coágulo) ângulo alfa, A10, MCF (firmeza máxima do coágulo) e ML (lise máxima). Fonte: Crochemore et al. (2017).	17
Figura 8: Equipamento Reômetro de oscilação livre (ReoRox G2) a esquerda, esquema do copo de amostra de oscilação livre ao centro e a direita, gráfico com suas respectivas curvas e variáveis (COT1, COT2, Max elasticity). Fonte: Winstedt et al. (2013).	18
Figura 9: Equipamento tromboelastográfico TEG6s a esquerda, esquema do seu cartucho contendo os quatro canais de ensaio ao centro e a direita, esquema da porta de entrada para a amostra sanguínea do cartucho. Fonte: Adaptado de Dias et al. (2017).	20
Figura 10: Resultado gráfico do TEG6s com as respectivas variáveis (ACT – tempo de coagulação ativado, R – tempo de reação, K – tempo de coagulação, ângulo, MA – amplitude máxima, LY30 – porcentagem de lise em 30 minutos, FLEV – nível de fibrinogênio) em relação aos ensaios (CK – sangue total citratado ativada com Kaolin, CRT – sangue total citratado ativado com RapidTEG, CKH – sangue total citratado	

ativado com Kaolin e heparinase, CFF – sangue total citratado ativado pelo teste de fibrinogênio funcional).Fonte: Dias et al. (2017).	21
Figura 11: Esquema de resultados do cartucho de mapeamento de plaquetas evidenciando as variáveis (R – tempo de reação, K – tempo de coagulação, ângulo, MA – amplitude máxima, LY30 – porcentagem de lise em 30 minutos) para as reações (HKH – Kaolin heparinizado com heparinase, ActF – ativador F, ADP – difosfato de adenosina, AA – ácido aracdônico), e ainda, porcentagem de inibição e agregação plaquetária. Fonte: Adaptado de Sivapalan et al. (2017).	22
Figura 12: Analisador Sonoclot a esquerda, ilustração do mecanismo de funcionamento do analisador (cubeta de depósito da amostra sanguínea, sonda plástica descartável e transdutor eletrônico) ao centro, Assinatura Sonoclot (gráfico). Fonte: Adaptado de Hett et al. (1995) e Babski et al. (2012).	23

CAPÍTULO 2

Figura 1: A. Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STF (sangue total fresco). B. Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STC (sangue total citratado). C. Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PF (plasma fresco). D. Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PFC (plasma fresco congelado)..**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Fatores da cascata de coagulação, nomes dos fatores, locais de síntese, meia vida plasmática e observações.....	7
Tabela 2: Variáveis dos diferentes equipamentos viscoelásticos e seus significados.	24

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Intervalo de referência das variáveis do equipamento tromboelastográfico (TEG) das diferentes amostras sanguíneas de cães saudáveis com intervalo de confiança de 95% para as médias dos tratamentos.	43
Tabela 2: Comparação entre as médias das variáveis tromboelastográficas das diferentes amostras sanguíneas de cães saudáveis.....	43

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

O sistema hemostático compreende um conjunto de eventos fisiológicos e complexo do organismo que para manter o sangue fluindo na luz vascular necessita da interação em homeostase de vários componentes, como parede vascular, plaquetas, fatores de coagulação, substâncias anticoagulantes naturais e substâncias fibrinolíticas, uma vez que previne hemorragia e trombose.

Muitas enfermidades podem alterar a hemostasia, pois este sistema caminha em paralelo com o sistema inflamatório, e já se tem conhecimento que as células do sistema inflamatório, quando secretam citocinas, aumentam a liberação plaquetária.

Por esta razão, eventos patológicos que são extremamente nocivos à saúde do paciente, como a sepse (principal causa de morte por presença de endotoxemia), coagulação intravascular disseminada (CID), síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), culminam com distúrbios hemostáticos. Sinais de hipercoagulabilidade, podem evoluir para quadros trombóticos e hipocoagulabilidade torna o paciente susceptível a hemorragias.

O sistema hemostático pode ser avaliado por testes convencionais (tempo de sangramento de mucosa oral (TSMO), plaquetograma, tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT), tempo de coagulação ativado (TCa), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), produtos de degradação da fibrina (PDF), concentração de fibrinogênio plasmático e concentração de dímeros D), porém esses testes avaliam somente risco hemorrágico e não trombótico, além de analisarem uma parte da hemostasia e serem realizados em amostras de plasma.

Sendo assim, os testes convencionais possuem limitações para investigar as alterações dos componentes hemostáticos, seja pela subjetividade do teste (TSMO), falta da disponibilidade de kits comerciais específicos para animais (PDF's), ou ainda, por restringirem o diagnóstico de falhas na hemostasia (TCa, TP, TT e TTPa), por exemplo.

Os testes viscoelásticos, como a tromboelastografia (TEG), são exames mais completos para analisar o perfil hemostático, pois eles mensuram, de maneira

dinâmica, componentes da hemostasia (avalia a fase de iniciação, formação, estabilização, até a lise do coágulo). Por esta razão, permitem identificar riscos de hemorragia ou trombose precocemente, pois detectam hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade.

A TEG tem sido tradicionalmente usada na medicina humana para monitorar a função hemostática durante procedimentos cirúrgicos (cardiovascular, transplante hepático), para transfundir o componente sanguíneo deficiente e no pós-cirúrgico. Além disso, tem sido utilizada para testar a eficácia de diferentes tipos de medicamentos *in vivo* e *in vitro* e o seu uso tem se expandido para o diagnóstico e orientação ao tratamento em estados de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade.

A TEG como ferramenta diagnóstica e guia transfusional, vem sendo potencialmente utilizada na medicina veterinária, já que é de fácil interpretação. Pela sua capacidade de detectar estados de hipercoagulabilidade e hipocoagulabilidade (parâmetros que indicam riscos trombóticos ou hemorrágicos), permite a terapia adequada e medidas preventivas, evitando terapia transfusional excessiva, otimizando o uso de hemocomponentes e prevenindo riscos de reações transfusionais.

A TEG é quase sempre executada em amostras de sangue total, por ele possuir todos os componentes celulares necessários para que o evento hemostático ocorra normalmente e semelhantemente a hemostasia *in vivo*. Todavia, o tipo de amostra sanguínea representa um obstáculo para analisar hemostasia pela TEG, já que a utilização de amostras de sangue total fresco sem adição de anticoagulante, necessitam do aparelho no mesmo local da venopunção. É possível verificar hemostasia em amostras plasmáticas, uma vez que contém fibrinogênio e fatores de coagulação (componentes indispensáveis para a coagulação sanguínea).

O presente projeto teve como escopo, evidenciar as variáveis tromboelastográficas de cães hípidos utilizando diferentes amostras sanguíneas (sangue total fresco, sem adição de anticoagulante (STF), sangue total com citrato de sódio a 3,2% (STC), plasma fresco (PF) e plasma fresco congelado (PFC)); determinar o intervalo de referência (IR) para as variáveis evidenciadas de cada uma das amostras sanguíneas utilizadas; verificar se o tipo de amostra e o método de conservação alteram o traçado tromboelastográfico.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Fisiologia da hemostasia

O sistema cardiovascular distribui sangue para todo o organismo e sempre está susceptível a lesões mecânicas, inflamatórias ou a outros tipos de lesão. O organismo em homeostase apresenta eventos que evitam a perda de sangue, mantém o fluxo sanguíneo e promove o reparo de vasos lesionados. O conjunto de eventos que contribui com à permanência do sangue na luz do vaso e mantém fluxo sanguíneo é denominado de sistema hemostático (Baker, 2015; Carmen et al., 2019).

A hemostasia é um fenômeno complexo e fisiológico, que para exercer sua função após uma lesão vascular, necessita da interação, em equilíbrio, de componentes: anticoagulantes naturais, fatores da coagulação (proteínas circulantes que geram fibrina), plaquetas (eventos de adesão, liberação e agregação), parede vascular (células endoteliais, musculatura lisa e fibroblasto) e a fibrinólise (Mitchell et al., 2017).

Vários conceitos foram propostos para explicar hemostasia, mas atualmente dois modelos são os mais aceitos. O primeiro, e utilizado por mais de 50 anos, foi descrito por Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964) definem a clássica cascata de coagulação sendo ativada por vias (vias intrínseca, extrínseca e comum). Já o segundo conceito descrito por Hoffman e Monroe (2001) apresenta a cascata de coagulação sendo ativada em quatro fases sobrepostas, baseada em superfícies celulares, tais como, iniciação, amplificação, propagação e finalização. (Silva e Melo, 2016; Sposito e Almeida, 2020).

De modo geral, a hemostasia ocorre da seguinte maneira: o endotélio vascular é inerte, mas a existência de lesão vascular com descontinuidade de endotélio expõe colágeno e o fator tecidual. Em um primeiro momento, para evitar perda de sangue, há vasoconstrição local por arco reflexo, porém o contato do sangue com o subendotélio vascular ativa componentes hemostáticos (Figura 1). As plaquetas aderem-se a substâncias teciduais, principalmente ao colágeno da membrana basal,

por meio de um receptor de superfície (glicoproteína Ib), que se liga ao fator de von Willebrand (FvW), que se liga ao colágeno (Takahira, 2015).

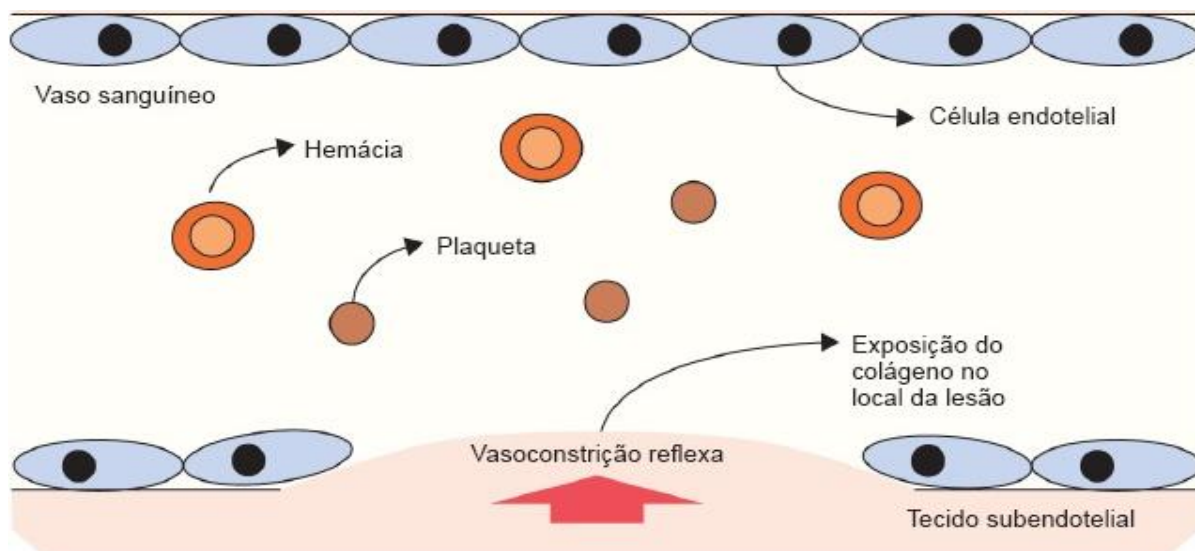


Figura 1: Representação esquemática do processo inicial de ativação do sistema hemostático, evidenciando lesão endotelial, exposição do colágeno e vasoconstrição reflexa. Fonte: Takahira (2015).

Após a adesão, as plaquetas mudam sua forma discoide com superfície lisa para uma superfície espiculada (tumefação, centralização de suas organelas e formação de pseudópodes), aumentando superfície de contato. A mudança na forma das plaquetas, modifica o seu receptor de superfície GPIIb/IIIa (glicoproteína IIb/IIIa), que por sua vez possui mais afinidade com o fibrinogênio e as tornam mais ativas. As plaquetas então liberam substâncias vasoativas e agregantes presentes nos seus grânulos (difosfato de adenosina (ADP), serotonina, cálcio, tromboxano A2 (TXA2)), no plasma. Essas substâncias, quando em conjunto com outros agentes, como o cálcio e o fibrinogênio plasmático, mantém vasoconstrição nos minutos seguintes e promovem recrutamento plaquetário e agregação (adesão de uma plaqueta sobre a outra). Durante a agregação, as plaquetas conectam-se umas às outras por meio da contração de filamentos semelhantes a actina e miosina presente no seu citoplasma (Figura 2). Após os fenômenos de adesão, liberação e agregação, é formado um tampão plaquetário inicial (fraco e instável) (Baker, 2015).

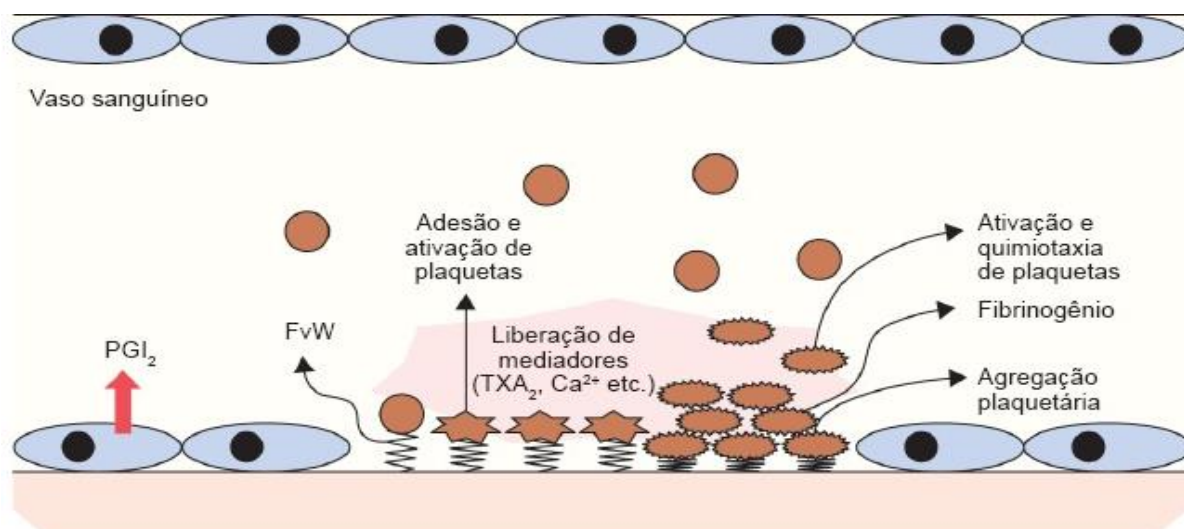


Figura 2: Representação esquemática do processo de adesão plaquetária mediada pelo fator de von Willebrand (FvW), ativação das plaquetas e liberação de substâncias vasoativas e pró-agregantes de seus grânulos e agregação plaquetária mediada pelo fibrinogênio. Fonte: Takahira (2015).

O sucesso da ativação inicial da hemostasia depende primordialmente do calibre do vaso sanguíneo lesionado, mostrando-se mais eficaz em vasos de calibre menores, como capilares e vênulas. A adesão plaquetária se restringe ao local da lesão, devido a liberação constante (pelo endotélio íntegro) de prostaciclina (derivado do ácido araquidônico, é vasodilatador e antagonista da agregação plaquetária) (Takahira, 2015).

Concomitantemente a esses eventos, há a ativação dos fatores de coagulação, que segundo Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964) são ativados por vias (via intrínseca, via extrínseca e via comum). A via intrínseca ou via de contato, é iniciada pelo contato do sangue com o colágeno (superfície carregada negativamente) exposto do subendotélio. Neste momento, o fator XII e as plaquetas são ativados e ativam subsequentemente o fator XI, que ativa o fator IX que com a presença de cininogênio de alto peso molecular, calicreína, pré-calicreína e cálcio ativa o fator VIII e fator X. A via extrínseca se inicia pela lesão vascular, ou seja, do contato do sangue com o subendotélio que contém uma proteína de membrana chamada fator tecidual (FT) ou fator III. Após uma lesão vascular, o sangue entra em contato com o FT, que ativa o fator VII, que por sua vez, ativa o fator X da via comum. A via extrínseca é responsável por dar início a produção de trombina, enquanto a ativação da via intrínseca ocorre por retroalimentação (pela trombina) dos fatores V, VIII e XI. A via comum se inicia

com a ativação dos fatores citados acima, a presença de fosfolípido plaquetário e cálcio. A ativação do fator X em conjunto com o fator V ativado faz a ativação da protrombina (fator II), que é convertida em trombina (fator II ativado), que converte o fibrinogênio em fibrina e ativa o fator XIII que confere estabilidade ao polímero de fibrina (fibrina sólida) através de ligações cruzadas por pontes dissulfeto entre as moléculas de fibrina, dando força e estabilidade ao tampão plaquetário inicial (Figura 3) (Takahira, 2015; Kattula et al., 2017; Sposito e Almeida, 2020).

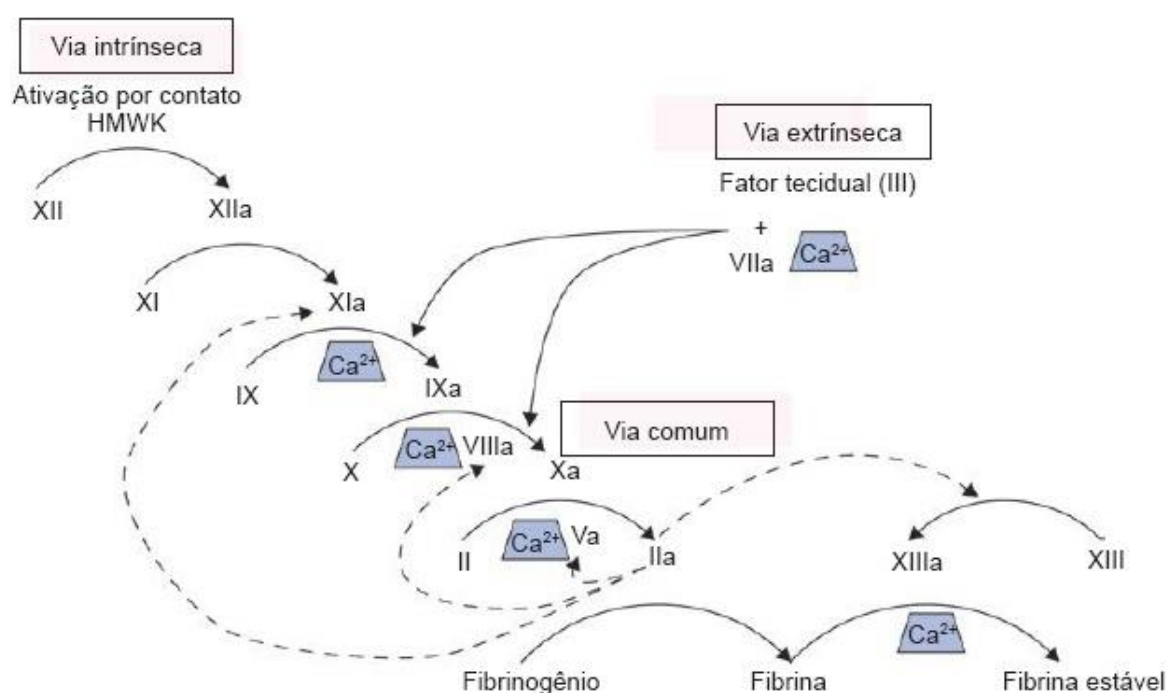


Figura 3: Esquema simplificado da ativação da cascata da coagulação por vias. As linhas tracejadas mostram a ação amplificada da trombina os fatores V, VIII e XI. O fator IV é o cálcio ionizado. HMWK corresponde ao cininogênio de alto peso molecular. Fonte: Takahina (2015).

Os fatores de coagulação, na sua grande maioria, são sintetizados pelos hepatócitos, e grande parte são proteínas. Alguns dos fatores são inerentes a vitamina K, denominados fatores dependentes de vitamina K. Ela promove carboxilação dos fatores II, VII, IX e X (distribuídos pelas vias da cascata) e de proteínas anticoagulantes, como a proteína C, proteína S. Durante a carboxilação dos fatores de coagulação, a vitamina K é oxidada e reduzida pela enzima epóxido-redutase a sua forma hidroquinona (Ferreira et al., 2010; Baker, 2015). Os nomes, local de

síntese, meia vida plasmática e algumas observações dos fatores de coagulação, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Fatores da cascata de coagulação, nomes dos fatores, locais de síntese, meia vida plasmática e observações.

Fator	Nome	Local de síntese	Meia vida plasmática	Observações
FVW	Fator de von Willebrand	Célula endotelial, megacariócito	-	Manter níveis plasmáticos de fator VIII
I	Fibrinogênio	Hepatócito	2 - 3 dias	-
II	Protrombina	Hepatócito, macrófago	2 – 4 dias	Dependente de vitamina K
III	Tromboplastina tecidual	Constituinte de fibroblastos e membranas de células musculares lisas	-	-
IV	Íons cálcio	-	-	-
V	Pró-acelerina	Hepatócito, megacariócito, Macrófago	15 – 24 horas	-
VII	Pró-convertina	Hepatócito, macrófago	1 - 6 horas	Dependente de vitamina K
VIII	Fator anti-hemofílico	Hepatócito	3 dias	-
IX	Fator de Christmas	Hepatócito	24 horas	Dependente de vitamina K
X	Fator de Stuard-Prower	Hepatócito, macrófago	32 – 48 horas	Dependente de vitamina K
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática	Hepatócito	30 horas	-
XII	Fator de Hageman	Hepatócito	18 – 52 horas	-
XIII	Fator estabilizador da fibrina	Hepatócito	4,5 – 7 dias	-
Pré-caliceína	Fator de Fletcher	Hepatócito	35 horas	-
Cininogênio de alto peso molecular	Fator de Fitzgerald	Hepatócito	6,5 dias	-

Fonte: Adaptado de Mitchell et al. (2017) e Takahira (2015).

Nota: O Fator VI não está presente no quadro, já que após a sua descoberta, verificou-se que correspondia ao Fator V ativado.

De acordo com Hoffman e Monroe (2001), o processo de ativação dos fatores de coagulação ocorre quando o FT, após lesão vascular é expresso e entra em contato com o sangue circulante. O FT está presente na membrana das células do músculo liso do vaso sanguíneo e fibroblastos. A ativação da cascata de coagulação, neste modelo, é dividida em quatro partes: iniciação, amplificação, propagação e finalização.

A fase de iniciação compreende o contato do FT com os componentes sanguíneos. Na amplificação, uma pequena quantidade de trombina é formada pelas células que expressam FT e possui várias funções, e uma dessas funções é fazer ativação plaquetária, expondo receptores e sítios de ligação para os fatores de coagulação. Na propagação, há o recrutamento de mais plaquetas para o local da lesão vascular e produção do complexo tenase e protrombinase na superfície das plaquetas que foram ativadas. E por fim, na fase de finalização o processo de coagulação é limitado ao local da lesão para que não haja obstrução do vaso por trombo. Ambas as cascatas, resultam na formação de fibrina, a qual concede força e estabilidade ao tampão plaquetário inicial, originando o coágulo de fibrina (Grover e Mackman, 2018; Sposito e Almeida, 2020).

Após a formação do coágulo de fibrina, o processo de coagulação se limita ao local da lesão, para que não haja oclusão trombótica do vaso. Dessa forma, fatores anticoagulantes e fibrinolíticos são ativados. Os anticoagulantes endógenos: inibidor da via do fator tecidual, a proteína C, proteína S, antitrombina (AT) e o inibidor da via intrínseca da coagulação (TFPI). O inibidor da via do fator tecidual é produzido pelo fígado e por monócitos, é responsável pela formação do complexo FT, fator VIIa e fator Xa, que resulta na limitação do coágulo. A proteína C, quando ativada faz proteólise dos fatores Va e VIIIa, impedindo a formação do complexo tenase e protrombinase. Durante a conversão de fibrinogênio em fibrina, a trombina se liga a trombomodulina (proteína transmembrana de células endoteliais intactas), formando um complexo de ativação de proteína C. Sua atividade é potencializada pela proteína S circulante no plasma (Wada et al., 2014).

A AT produzida pelo fígado e pelas células endoteliais é responsável por inibir as ligações da trombina e fator Xa, sendo potencializada pelo cofator heparina, que induz a ligação da AT com os fatores IXa, XIa, XIIa e a plasmina. Além da heparina (endógena ou exógena) secretada pelos mastócitos, o heparan sulfeto produzido pelas células do endotélio vascular, potencializa a AT da mesma maneira. O TFPI inibe o complexo fator III e V ativados, impedindo o desenvolvimento gradual da cascata, ativação e produção dos fatores IX e X pela via intrínseca (Takahira, 2015).

A fibrinólise é ativada junto com a coagulação, para manter o equilíbrio entre coagulação e fibrinólise. A fibrina é formada durante os processos de inflamação e

possui importante papel no tecido lesionado, porém precisa ser removida quando o tecido e a função do mesmo são restaurados. O processo de fibrinólise é ativado por dois ativadores de plasminogênio (PA), o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). A via mediada pelo t-PA está relacionada a homeostase da fibrina e a via mediada pela u-PA está relacionada a fenômenos de migração celular e remodelagem de tecidos. O plasminogênio ativado gera plasmina (enzima proteolítica) que atua no interior do coágulo promovendo degradação da fibrina, fibrinogênio, fator V, fator VIII, protrombina e o fator XII (Silva e Melo, 2016).

Quantidades pequenas de plasmina são sintetizadas de forma constante no sangue, e só não impedem que o processo de coagulação ocorra por causa do fator α_2 -antiplasmina (inibição da plasmina). Existem outros inibidores da plasmina como α_2 -macroglobulina, antiplasmina III, α_1 -antitripsina, proteína C e proteína S, além dos inibidores dos ativadores de plasminogênio tecidual (PAI1 e PAI2). Os PDF's e do fibrinogênio, formados pela ação da plasmina, são fagocitados por macrófagos. O término desses eventos, resultam em reparo vascular (Takahira, 2015).

1.2.2 Distúrbios da hemostasia

Desequilíbrio na hemodinâmica de alguma etapa da hemostasia, resulta em distúrbios hemostáticos que podem ser hemorrágicos, trombóticos ou trombo-hemorrágicos, podendo ser causados por defeitos vasculares, alterações plaquetárias (quantitativa ou qualitativa), coagulopatias (congenita ou adquirida) (Takahira, 2015). Eventos inflamatórios são condições que geram alterações significativas na hemodinâmica (Stokol, 2012).

As vasculopatias, na sua grande maioria, são causadas por injúria no tecido vascular de processos inflamatórios, infecciosos ou imunomediados. Esses processos fazem com que o vaso se torne frágil, levando a vasculite, dificultando a resposta do vaso quando diante de lesões (Takahira, 2003; Grandl e Wolfrum, 2018).

Desordens plaquetárias quantitativas são denominadas trombocitose (aumento de plaquetas circulantes) ou trombocitopenia (diminuição de plaquetas circulantes). Trombocitose é uma anormalidade inespecífica, na grande maioria das vezes não

gera sinais clínicos, mas é um fator que predispõe o paciente animal à trombose por eventos de hipercoagulabilidade. Está relacionada a anemias ferroprivas, doenças inflamatórias, liberação de epinefrina e algumas formas de doenças mieloproliferativas (Baker, 2015). Trombocitopenias são causadas por deficiência na produção pelo megacariócito, perda por hemorragias intensas, destruição (processos imunomediados), sequestro esplênico ou por consumo (ocorrem concomitantemente às vasculites) (Takahira, 2015). As desordens plaquetárias qualitativas são causadas por processos que comprometem sua função e morfologia, adquiridas em eventos imunomediados por medicamentos (antiinflamatórios não esteroidais, antibióticos) e agentes infecciosos (*Ehrlichia canis*). Alterações plaquetárias funcionais congênitas são mais raras (síndrome de Bernard-Soulier, trombastenia de Glanzmann) (Baker, 2015; Shropshire et al., 2018).

A Doença de Von Willebrand (DvW), é um distúrbio hereditário, resulta em deficiência ou não funcionalidade do FvW, responsável por permitir e intermediar a adesão plaquetária ao colágeno do subendotélio vascular (Pinheiro et al., 2017; Riskalla, 2020).

As coagulopatias ocorrem pela falha total ou parcial em síntese, ativação ou conservação dos fatores de coagulação e podem ser congênitas (hemofilia A ou B) ou adquiridas (Insuficiência hepática, antagonismo a vitamina K, CID) (Takahira, 2003; Riskalla, 2020).

Nos processos inflamatórios as células leucocitárias liberam citocinas (fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas 1, 6 e 8) prejudiciais ao endotélio vascular causando lesão de pequenos vasos, permitindo o contato direto dos componentes vasculares com os componentes sanguíneos, ativando o sistema hemostático. Durante a inflamação sistêmica, o nível sérico de inibidor da via do fator tecidual encontra-se diminuído, pois é degradado por proteases secretadas por neutrófilos ativados. Além disso, os processos inflamatórios fazem o número de células endoteliais intactas (não ativadas) caírem, com isso, a expressão de trombomodulina e receptores para proteína C diminuem favorecendo quadros trombóticos. A inflamação sistêmica reduz a concentração plasmática de antitrombina por consumo (já que há a produção exacerbada de trombina), degradação (proteases

secretadas de neutrófilos ativados) e por queda na síntese endotelial e no fígado (Grandl e Wolfrum, 2018).

Nem todo quadro hemorrágico ou trombótico deriva de um distúrbio hemostático. Pacientes saudáveis quando acometidos por traumas intensos, presença de corpo estranho que gere epistaxe ou submetidos a incisões profundas (procedimentos cirúrgicos, por exemplo) apresentam hemorragia intensa (Takahira, 2015).

O diagnóstico de desordem vascular só é confirmado quando alterações em função plaquetária e de fatores de coagulação são descartados. Não existe técnica laboratorial que meça funcionalidade de vaso sanguíneo diretamente, suspeita-se de distúrbio vascular quando há presença de hemorragia superficial com resultados de testes laboratoriais de avaliação hemostática normais (Fry et al., 2017).

As disfunções vasculares (como vasculite, flebite), alteração plaquetária quantitativamente (trombocitopenias ou trombocitoses) e/ou qualitativa (alterações morfológicas), disfunção dos fatores de coagulação, síntese defeituosa dos fatores, consumo ou perda excessiva de componentes da hemostasia, estímulos de coagulação em excesso, podem ocorrer por problemas congênitos (o que é raro, como a deficiência de colágeno) ou serem adquiridas, como em extensa lesão vascular pela ocorrência de traumas, tumores, doenças infecciosas, doenças autoimunes, agentes tóxicos e genéticos, e levam ao surgimento de sinais clínicos, que são dependentes do problema base, como o surgimento de equimoses, petéquias, púrpuras, hematomas, hemorragia e trombose (Mitchell et al., 2017).

Por isso, compreender a fisiologia da hemostasia é um pré-requisito de extrema importância para a abordagem clínica dos distúrbios hemostáticos (Takahira, 2015).

1.2.3 Avaliação Laboratorial do Sistema Hemostático

A realização de exames laboratoriais é um componente importante para avaliação da hemostasia. O sistema hemostático pode ser avaliado por meio de testes convencionais (TTPa, TP, TT, TSMO, TCa, PDF's, dímeros D, fibrinogênio, plaquetograma) (Moldal et al., 2012). No entanto, são testes que possuem limitações frente ao diagnóstico de distúrbios hemostáticos, por serem subjetivos (TSMO),

restritivos a uma fase do evento hemostático, não terem valores de referência para animais (TP), não possuírem kits comerciais específicos para animais (PDF's), avaliarem somente risco hemorrágico e não trombótico, além de serem realizados em amostras de plasma, portanto, não levam em consideração a interação dos fatores de coagulação com as plaquetas, os elementos celulares do sangue e o endotélio vascular. Por esse motivo, retratam tardiamente a hemostasia *in vivo* (Rubanick et al., 2017; Tyler et al., 2020).

Hayem (1889), sugeriu que mudanças na viscosidade do sangue poderiam ser a base para a formação de um teste que detectasse disfunção na coagulação. Koffmann (1910), desenvolveu um coaguloviscômetro capaz de detectar as mudanças na viscosidade sanguínea. Kugelmass (1923), criou um viscosímetro o qual formou a base para a tromboelastografia moderna.

Os testes viscoelásticos são exames mais completos na avaliação do sistema hemostático. Mensuram, de forma dinâmica, a fase de iniciação, formação, estabilização até a lise do coágulo. Por esta razão, permitem identificar riscos de hemorragia ou trombose precocemente, pois detectam estados de hipocoagulabilidade e/ou hipercoagulabilidade (Drumheller et al., 2019; Bugaev et al., 2020).

Existem diferentes analisadores viscoelásticos no mercado, como o tromboelastógrafo (TEG) norte americano (TEG® 5000 - Haemoscope Corporation), tromboelastógrafo (TEG6s) norte americano (TEG®6s - Haemonetics Corporation), trombolastômetro (TEM) alemão (ROTEM® – Pentapharm), o Reômetro de oscilação livre (FOR) suéco (Reorox G2® – MediRox) e o analisador Sonoclot (Sienco Inc., Morrison). Embora esses equipamentos avaliem os mesmos eventos do sistema hemostático, as variáveis expressas não podem ser comparadas numericamente entre si (McMichael et al., 2014; Solomon et al., 2015).

Tanto nos TEG's, TEM, FOR, como o Sonoclot emprega-se o uso de amostras de sangue total, já que ela possui todos os componentes necessários para que o evento hemostático *in vitro* ocorra normalmente e semelhantemente ao que ocorre *in vivo*, mostrando assim a interação entre as diferentes células do sangue e suas características bioquímicas, podendo ser realizada na temperatura do paciente. Todavia, o tipo de amostra sanguínea representa um obstáculo para a análise

viscoelástica, já que a utilização de amostras de sangue total fresco sem adição de anticoagulante, necessitam do aparelho no mesmo local da venopunção. É possível verificar hemostasia por meio de amostras de plasma, uma vez que contém fibrinogênio, fatores de coagulação (componentes indispensáveis para a coagulação sanguínea) (Donahue e Otto, 2005; De pietri et al., 2016; López et al., 2019a; Rout et al., 2020).

1.2.3.1 Tromboelastografia (TEG)

A tromboelastografia foi descrita pela primeira vez por Hartert (1948), na Alemanha. É um teste laboratorial que aponta as alterações hemostáticas por meio de uma representação gráfica durante o processo de formação do coágulo (López et al., 2016b).

O mecanismo da TEG é composto por um copo plástico e um pino que é suspenso por um fio de torção. A amostra de sangue total é colocada no copo, onde é mantida a 37°C ou a temperatura do paciente. O pino é baixado até o sangue. O copo oscila em um ângulo de 4°45' em um ciclo de 10 segundos. Quando a malha de fibrina se forma entre o pino e o copo, o pino começa a se mover com o copo e a rotação gerada por essa movimentação é transmitida pelo fio para um transdutor mecânico/elétrico que é convertido em dados digitais para exibição do gráfico em um computador (Figura 4). Embora o tempo de formação do coágulo seja variável, a maioria das amostras geram os parâmetros críticos em 30 minutos, excluindo o evento de fibrinólise (López et al., 2016b; Crochemore et al., 2017; Lee et al., 2017; Zamper et al., 2017; Júnior e Filippi, 2020; Tyler et al., 2020).

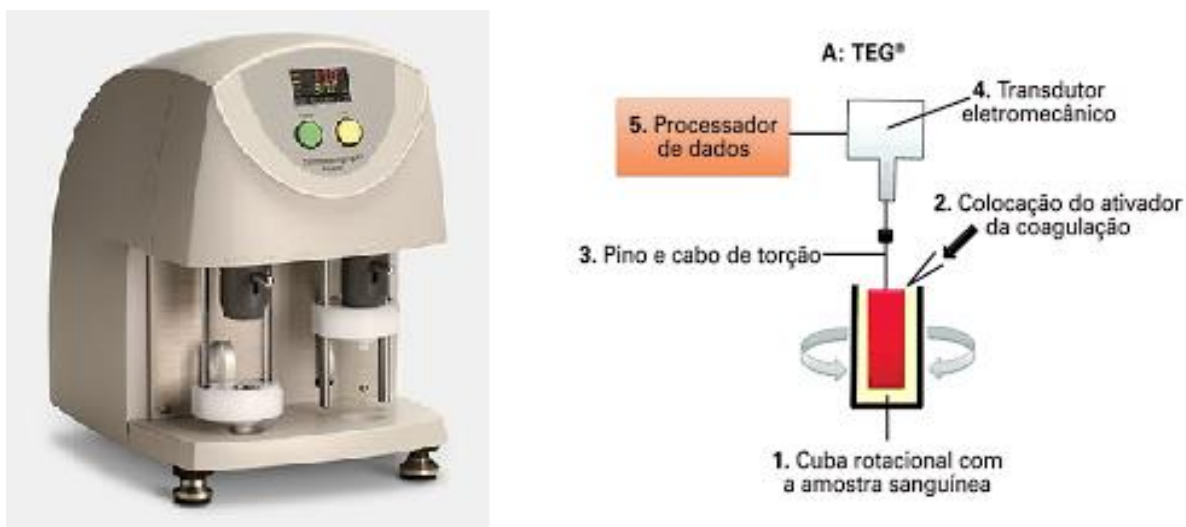


Figura 4: Equipamento tromboelastográfico a esquerda e mecanismo da tromboelastografia a direita ilustrando o funcionamento do equipamento desde a introdução da amostra sanguínea na cuba, sua leitura, transdução e formação de gráfico em monitor eletrônico representando o sistema hemostático. Fonte: López et al. (2016b).

O gráfico evidencia variáveis para a sua interpretação, como o R (tempo de reação), intervalo decorrido em minutos entre o início da coagulação até o gráfico atingir uma amplitude de 2 mm pelas primeiras bandas de fibrina, ou seja, basicamente mostra o início da captação da ativação do sistema hemostático na amostra pelo equipamento. Expressa a velocidade de formação de tromboplastina, função da via intrínseca, em especial a ativação dos fatores XII, XI e VIII. K (tempo de coagulação), corresponde ao tempo, em minutos, entre o R e o ponto em que o traçado gráfico atinge uma amplitude de 20 mm da linha de base, evidencia o início da polimerização da fibrina. O ângulo alfa é definido como o ângulo entre a linha de base e uma linha desenhada entre R e K, ou seja, formado pelo eixo R e inclinação K. Semelhante a K, o ângulo alfa indica o início da conversão de fibrinogênio em fibrina. MA (amplitude máxima), expressa em milímetros, representa o máximo de força e estabilização atingido pelo coágulo já formado, sofre influência, principalmente, da quantidade e função plaquetária, e em menor grau, da formação da fibrina. G (Grau de firmeza, elasticidade do coágulo, resistência global do coágulo) medido em dynas/cm², mostra a força, firmeza total do coágulo, é calculado pela fórmula: $G = 5000MA / (100 - MA)$. A (amplitude em função do tempo), expressa em milímetros,

permite avaliação da MA em tempos de 30 e 60 minutos após a MA ser atingida. EPL (porcentagem estimada de lise) e LY (lise em tempo determinado, lise do coágulo), determinam a porcentagem (%) de lise que o coágulo atinge em um tempo de 30 minutos após MA (Figura 5) (Crochemore et al., 2017; Lee et al., 2017).

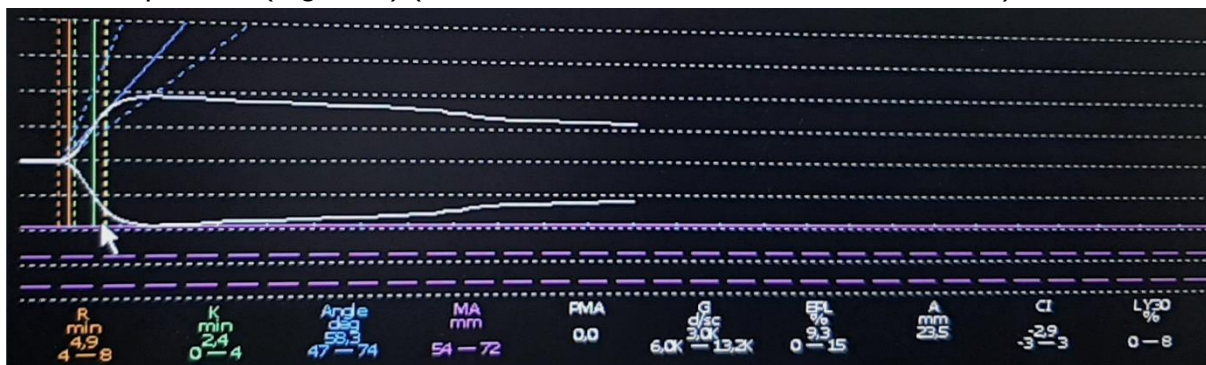


Figura 5: Traçado tromboelastográfico mostrando as variáveis comumente avaliadas, como o tempo R, tempo K, ângulo alfa, MA, G, EPL, A e LY. Fonte: Dorsey et al. (2018).

A tromboelastografia pode ser realizada sem o uso de reagentes ativadores, ou seja, em sangue total sem anticoagulantes, e com o uso de reagentes ativadores: KaoTEG (Kaolin – avalia via intrínseca), RapidTEG (Kaolin e Fator tecidual – avalia via intrínseca e extrínseca), HepTEG (monitora coagulabilidade sanguínea na presença de heparina), TEG-PM (mapeamento plaquetário – avalia a extensão da inibição plaquetária pelo uso de aspirina e clopidogrel), fibrinogênio funcional TEG (avalia a contribuição do fibrinogênio para a força do coágulo) (Drumheller et al., 2019).

1.2.3.2 Tromboelastometria (TEM)

A tromboelastometria rotacional surgiu em 1990 como sendo um aperfeiçoamento da tromboelastografia, por ser um sistema mais resistente às vibrações, o que permite o seu deslocamento até o paciente. O sistema ROTEM®, possui computador integrado para análise automatizada, pipeta eletrônica e quatro canais de aferição simultânea (Crochemore et al., 2017; Drumheller et al., 2019).

Na TEM, ao contrário da TEG, é o pino de aço que faz a rotação em um ângulo de 4°75' em relação ao copo. Por meio de uma leitura óptica. Esta movimentação exibe um gráfico para um software (Figura 6). A vantagem da TEM é que ele é capaz

de mostrar os resultados mais rapidamente, entre cinco e dez minutos, ou seja, identificando distúrbios da coagulação mais rápido, por meio de reagentes, aceleradores e inibidores do processo de formação do coágulo (López et al., 2016b; Meledeo et al., 2018).

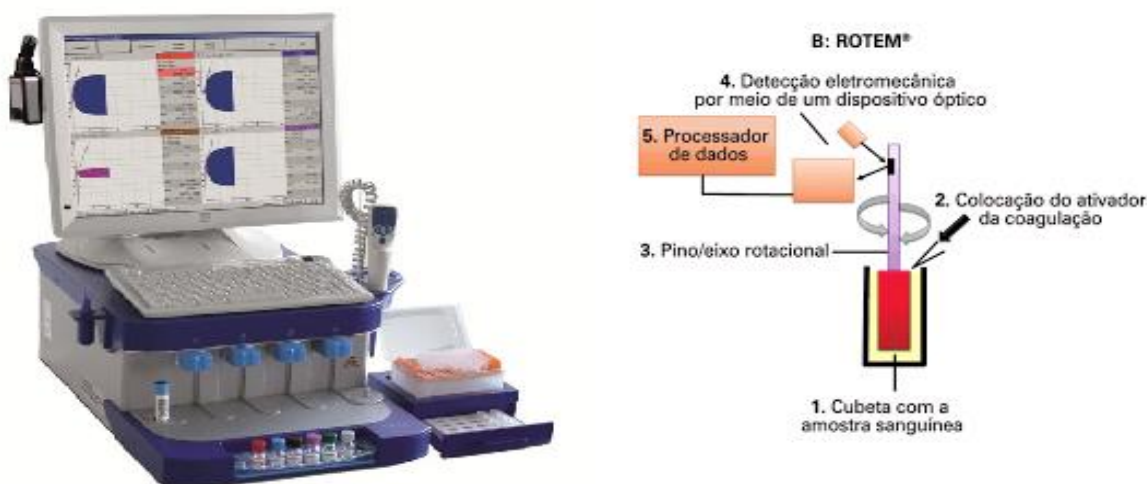


Figura 6: Equipamento da tromboelastometria rotacional a esquerda e mecanismo da tromboelastometria rotacional a direita ilustrando o funcionamento do equipamento desde a introdução da amostra sanguínea na cubeta, sua leitura, detecção eletrônica por dispositivo óptico e formação de gráfico em monitor representando o sistema hemostático. Fonte: López et al. (2016b).

As variáveis para interpretação do gráfico obtido pela TEM são o tempo de coagulação (CT) corresponde ao tempo de reação (R) da TEG. tempo de formação do coágulo (CFT) corresponde ao tempo de coagulação (K) da TEG. O ângulo alfa é comum aos dois métodos de exame. A firmeza máxima do coágulo (MCF) representa a MA da TEG. Já as variáveis A5 a A30 representam a firmeza do coágulo, pela amplitude entre os tempos de cinco e 30 minutos. Lise máxima (ML) é a redução da firmeza do coágulo após o MCF (Figura 7). O coágulo é estável se a ML for menor que 15% ou hiperfibrinolítico quando maior que 15% (López et al., 2016a; Fry et al., 2017).

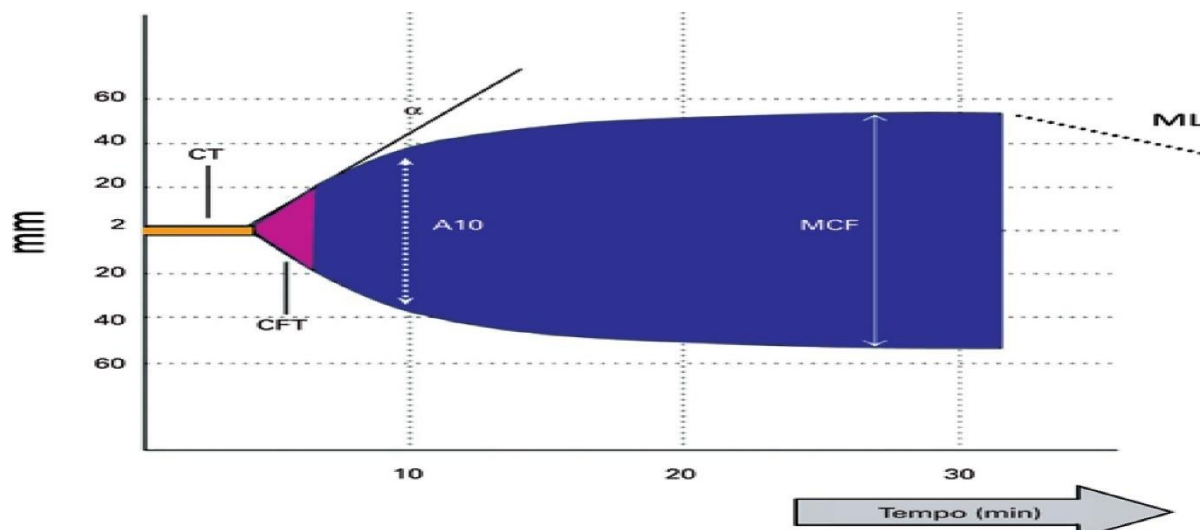


Figura 7: Traçado gráfico do mecanismo tromboelastometria rotacional mostrando suas variáveis: CT (tempo de coagulação), CFT (tempo de formação do coágulo) ângulo alfa, A10, MCF (firmeza máxima do coágulo) e ML (lise máxima). Fonte: Crochemore et al. (2017).

Assim como na TEG, a TEM também pode ser realizada sem o uso de ativadores (NATEM) e com o auxílio de ativadores: INTEM (Kaolin – avalia via intrínseca), EXTEM (Fator tecidual – avalia via extrínseca), FIBTEM (antiplaquetário – avalia a contribuição do fibrinogênio para a formação do coágulo), APTEM (aprotinina – avalia via fibrinolítica), HEPTTEM (heparinase – avalia existência da heparina). Os reagentes EXTEM, FIBTEM e APTEM possuem hexadimetrina, que neutraliza heparina (Drumheller et al., 2019).

1.2.3.3 Reometro de oscilação livre (FOR)

A reometria de oscilação livre mede as mudanças na viscosidade e elasticidade do sangue, assim como a dissolução do coágulo. Os resultados são obtidos em unidades SI (aceitas pelo sistema internacional de unidades). Este sistema é mais sensível para avaliar hemostasia, pois deixa a amostra mais estável, sendo assim, é capaz de avaliar coágulos fracos com maior precisão (Nilsson et al., 2018).

No FOR (Reorox G2 Assay®) o ímã roda o copo com a amostra em torno do fio de torção. Este movimento oscilatório é registrado por um detector óptico. A alteração do amortecimento gera uma curva de viscosidade (linha tracejada) e a alteração da frequência gera uma curva de elasticidade (linha completa). A linha

tracejada (viscosidade) aumenta à medida que a amostra coagula e para até que tudo seja coagulado e volta à linha de base. Na sequência, há um aumento da linha completa (elasticidade) representa a retração do coágulo por plaquetas. A altura da curva de elasticidade representa a resistência do coágulo. As variáveis detectadas são indicadas com setas: COT1 - tempo para o início da formação do coágulo, COT2 - tempo para completar a formação do coágulo e Max elasticidade (G'_{max}) - resistência máxima do coágulo (Figura 8) (Winstedt et al., 2013; Solomon et al., 2015).

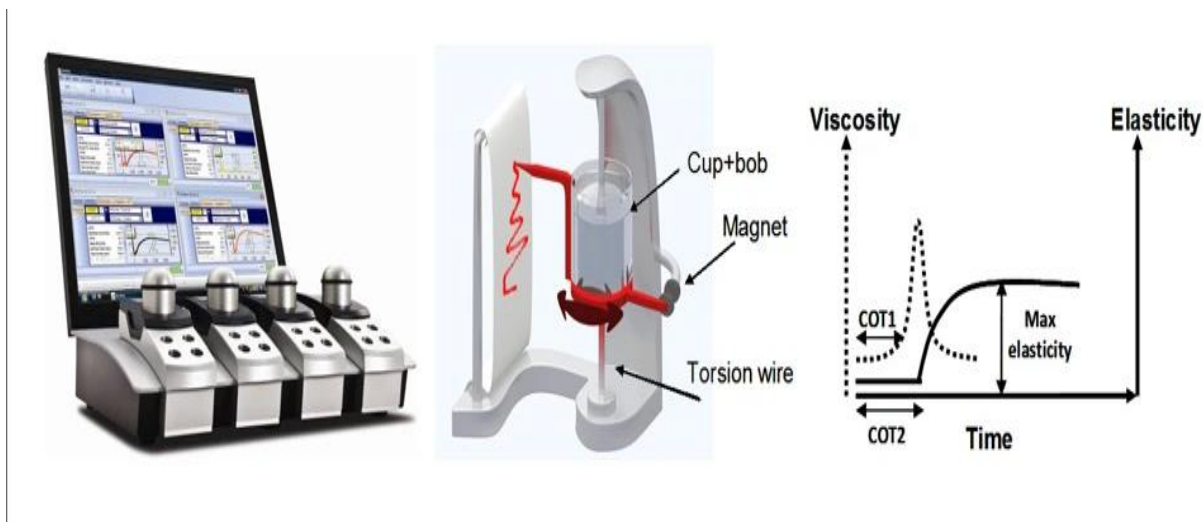


Figura 8: Equipamento Reômetro de oscilação livre (ReoRox G2) a esquerda, esquema do copo de amostra de oscilação livre ao centro e a direita, gráfico com suas respectivas curvas e variáveis (COT1, COT2, Max elasticity). Fonte: Winstedt et al. (2013).

Os ensaios¹ do FOR são realizados utilizando kits previamente configurados como HepScreen1 (tromboplastina – ativa via extrínseca da coagulação) sensível a heparina, então distingue os efeitos da heparina sobre a coagulação de outros distúrbios, HepScreen2 (tromboplastina + neutralizador de heparina – ativa via extrínseca da coagulação), FibScreen1 (tromboplastina – ativa via extrínseca da coagulação), FibScreen2 (tromboplastina + Abciximab – ativa via extrínseca e inibe função plaquetária por meio do bloqueio do receptor GpIIb/IIIa) a inibição da função plaquetária permite a medição dos níveis de fibrinogênio funcional, ReoTrap (ativação plaquetária via PAR-1 - peptídeo de ativação do receptor de trombina), teste ReoLyse

¹O ReoRox é um sistema aberto para reagentes. Além das aplicações de reagentes MediRox pré-configuradas para avaliação de hemostasia, quase todos os reagentes para análise de teste de coágulo podem ser utilizados no sistema.

(medição de fibrinólise), Hct% (permite a medição do hematócrito no sangue total em segundos), TP e TTPA que podem ser avaliados em sangue total (Nilsson et al., 2018).

1.2.3.4 Tromboelastografia (TEG6s)

O sistema TEG6s é um instrumento de diagnóstico de quatro canais totalmente automatizado. É o equipamento para teste viscoelástico mais atual, até o presente momento. A Haemonetics Corporation criou o TEG6s com o intuito de melhorar o TEG5000. No TEG6s, o volume de sangue total usado é bem menor que no TEG5000 e não é necessário o uso de computador separado. Faz o uso de cartucho microfluídico único que contém quatro canais com reagentes de ensaio. A utilização de cartuchos únicos reduz erros do operador (Meledeo et al., 2018; Neal et al., 2020).

O sangue é depositado em uma pequena porta no cartucho por pipeta de transferência ou seringa. Depois que a amostra é adicionada ao cartucho e o teste se inicia, o operador não tem mais acesso a ela. Os cartuchos contêm todos os reagentes necessários para a realização de um ensaio. Além dos ativadores e reagentes, os canais dos cartuchos contêm cálcio. Os reagentes presentes dentro de cada canal são reconstituídos pelo controle de movimentação da válvula microfluídica e do fole (Figura 9). Após a reconstituição, a amostra é entregue aos canais de teste individuais e o processo de coagulação é monitorado. O excesso de amostra é direcionado a uma câmara de resíduos (Meledeo et al., 2018).

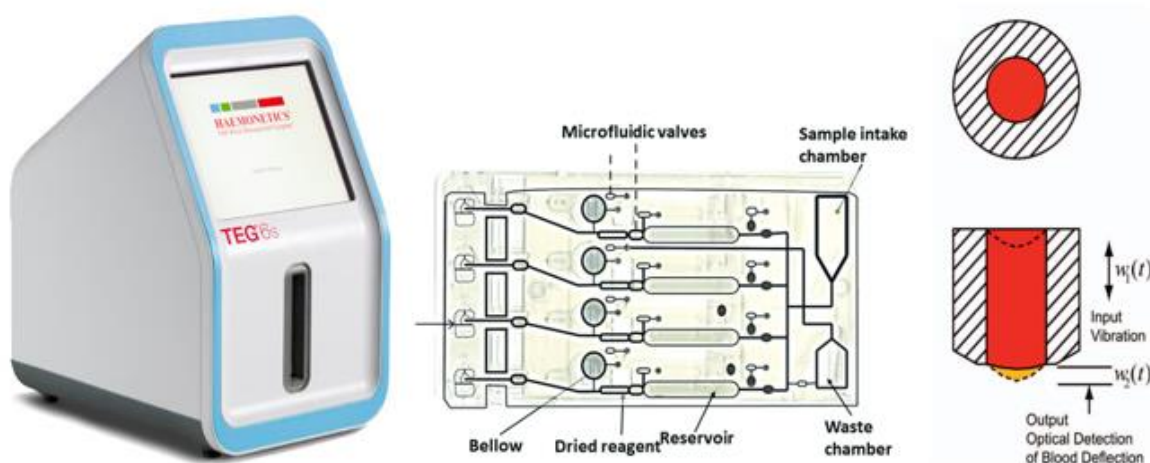


Figura 9: Equipamento tromboelastográfico TEG6s a esquerda, esquema do seu cartucho contendo os quatro canais de ensaio ao centro e a direita, esquema da porta de entrada para a amostra sanguínea do cartucho. Fonte: Adaptado de Dias et al. (2017).

O analisador monitora a gota de sangue que é introduzida no cartucho. À medida que a amostra muda o seu estado líquido para um estado gelatinoso durante o processo de coagulação, a elasticidade e a frequência de ressonância aumentam. O analisador mede essas variações durante a coagulação e a lise e exibe os resultados gráficos em uma tela sensível ao toque (Dias et al., 2017).

São utilizados dois tipos de cartuchos, ambos com quatro canais. O cartucho citratado para hemostasia global, possui os seguintes reagentes para realização dos ensaios: Kaolin (CK), RapidTEG (CRT), Kaolin com heparinase (CKH) e fibrinogênio funcional (CFF). O cartucho de mapeamento de plaquetas também possui quatro canais e realiza os seguintes ensaios: kaolin heparinizado com heparinase (HKH), Ativador F (ActF), difosfato de adenosina (ADP) e ácido aracdônico (AA) (Dias et al., 2017; Meledeo et al., 2018).

As variáveis registradas no gráfico do TEG6s são semelhantes as evidenciadas pela TEG5000 e estão diretamente ligadas as reações. O teste CK gera o tempo de reação (R), medido em minutos, representa o tempo decorrido desde o início do teste até o início da coagulação onde o gráfico atinge uma amplitude de 2mm. O tempo de coagulação (K), medido em minutos, corresponde ao tempo decorrido entre R até o ponto em que a reticulação de fibrina fornece resistência ao coágulo atingindo uma amplitude de 20 mm. O ângulo é formado pela inclinação da linha tangente, vai desde o início da coagulação até K. O tempo K e o ângulo alfa indicam a conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina disponível, mostrando assim o começo do fortalecimento do coágulo. A amplitude máxima (MA) denota o máximo de força que o coágulo atinge, medida em milímetros, reflete a interação entre plaqueta e fibrina, por meio dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa. LY30 equivale a porcentagem de lise do coágulo em 30 minutos após a finalização da MA. O teste CRT contém Fator tecidual e Kaolin. Gera as variáveis mencionadas acima e a variável tempo de coagulação ativado (ACT), medido em segundos, vai desde o início do teste até a detecção da formação do coágulo. O teste CKH contém Kaolin heparinizado com heparinase que elimina o efeito da heparina na amostra. No teste CFF, contém fator

de tecidual que ativa via extrínseca da coagulação e abciximab, responsável por inibir função plaquetária por bloqueio de receptor GPIIb/IIIa, fazendo com que seja possível visualizar a contribuição do fibrinogênio funcional para a resistência do coágulo (Figura 10) (Dias et al., 2017).

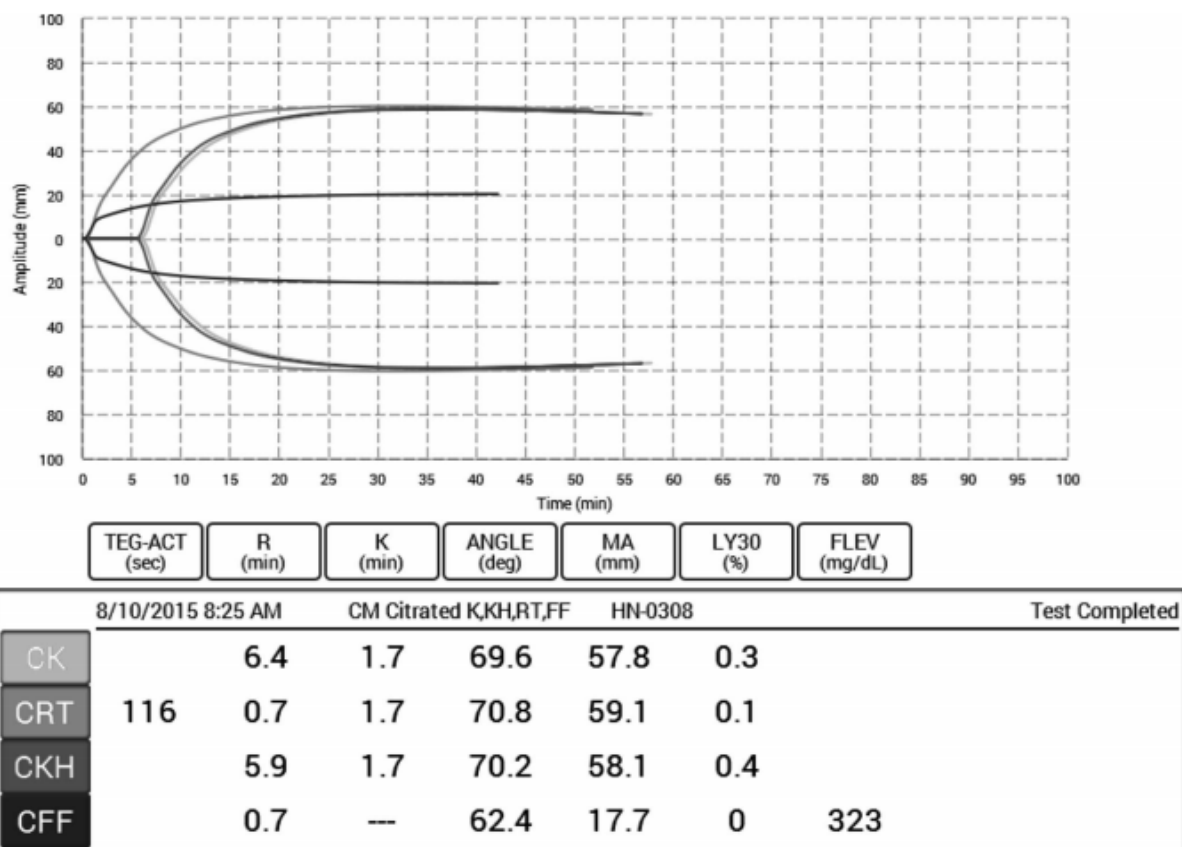


Figura 10: Resultado gráfico do TEG6s com as respectivas variáveis (ACT – tempo de coagulação ativado, R – tempo de reação, K – tempo de coagulação, ângulo, MA – amplitude máxima, LY30 – porcentagem de lise em 30 minutos, FLEV – nível de fibrinogênio) em relação aos ensaios (CK – sangue total citratado ativado com Kaolin, CRT – sangue total citratado ativado com RapidTEG, CKH – sangue total citratado ativado com Kaolin e heparinase, CFF – sangue total citratado ativado pelo teste de fibrinogênio funcional). Fonte: Dias et al. (2017).

A representação gráfica gerada pelo cartucho de mapeamento de plaquetas é semelhante a evidenciada pelo cartucho de reação global, pois mostram as mesmas variáveis, porém estão diretamente relacionadas a outras reações (Figura 11). Este cartucho, de modo geral, detecta a porcentagem de plaquetas que são inibidas por medicamentos antiplaquetários em amostras de sangue total heparinizada. Há presença de heparina inibi a trombina e o ActF (compreende a formação de fibrina e

fator XIIIa) faz o papel da trombina e fornece força ao coágulo de fibrina/plaquetas. Os ensaios de ADP e AA são realizados com ActF, medem a força de coágulo. O ensaio do canal HKH determina a variabilidade e o tempo de execução de uma amostra de sangue total fresco. Há presença de heparinase neste teste neutraliza o efeito da heparina na amostra, fazendo com que ocorra a ativação da trombina, o que possibilita a aferição da MA (Gurbel et al., 2016; Sivapalan et al., 2017).

PM Platelet Mapping						baseline	
1/16/2014 11:21	R (min)	K (min)	Angle (deg)	MA (mm)	LY30 (%)	Inhibition (%)	
HKH	6.6 4.2-9.8	1.7 1-2.96	68.2 57-75	61.8 54-70	— 0-2.4	ADP	4.1
						AA	0
ActF				7.6 2-19		Aggregation (%)	
ADP				59.6 44-69		ADP	95.9
AA				61.9 37-71		AA	100

Figura 11: Esquema de resultados do cartucho de mapeamento de plaquetas evidenciando as variáveis (R – tempo de reação, K – tempo de coagulação, ângulo, MA – amplitude máxima, LY30 – porcentagem de lise em 30 minutos) para as reações (HKH – Kaolin heparinizado com heparinase, ActF – ativador F, ADP – difosfato de adenosina, AA – ácido aracdônico), e ainda, porcentagem de inibição e agregação plaquetária. Fonte: Adaptado de Sivapalan et al. (2017).

1.2.3.5 Analisador Sonoclot

Descrito por von Kaulla et al. (1975), o analisador Sonoclot (Figura 12) avalia a mudança na viscosidade sanguínea gerada pela formação do coágulo, pois mede a impedância por uma sonda tubular vibratória que oscila em movimento vertical (para cima e para baixo). Ao movimento, o circuito eletrônico do equipamento detecta a resistência da amostra e o primeiro sinal da formação do coágulo gera um parâmetro denominado sinal de coagulação (CS). A ativação do sistema hemostático é exibida em um gráfico de CS em relação ao tempo e descrito em três variáveis quantitativas: tempo de coagulação ativado - ACT, taxa de coagulação - CR e função plaquetária - PF (Babski et al., 2012; Bischof et al., 2015; Frum, 2020).

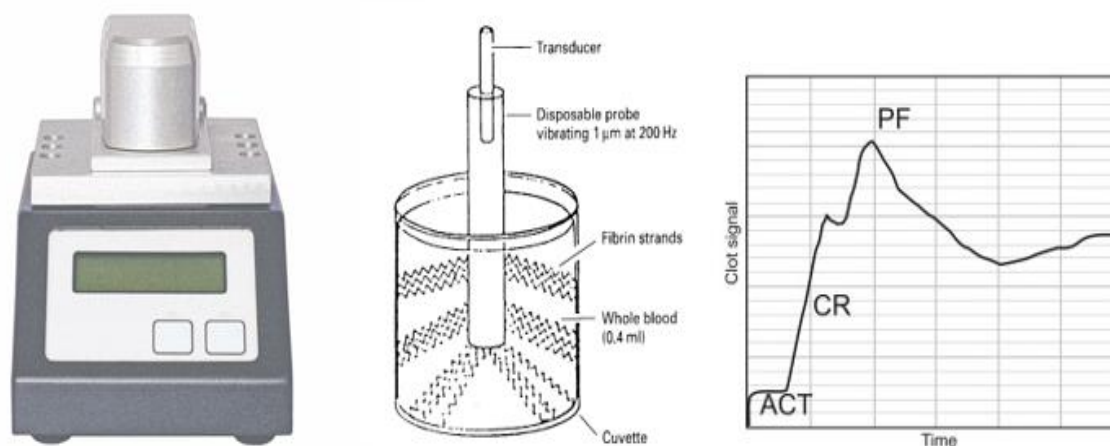


Figura 12: Analisador Sonoclot a esquerda, ilustração do mecanismo de funcionamento do analisador (cubeta de depósito da amostra sanguínea, sonda plástica descartável e transdutor eletrônico) ao centro, Assinatura Sonoclot (gráfico). Fonte: Adaptado de Hett et al. (1995) e Babski et al. (2012).

ACT representa o tempo desde a detecção dos primeiros sinais de ativação do sistema hemostático até o início de formação da fibrina. CR relata a inclinação máxima da Assinatura Sonoclot durante o início da polimerização da fibrina e desenvolvimento do coágulo. PF evidencia a qualidade de retração do coágulo em relação ao tempo após a formação da fibrina. No entanto, desde a década de 70 o seu uso tem sido relativamente limitado em comparação com TEG e TEM (Babski et al., 2012; Frum, 2020).

A Tabela 2 faz um resumo do significado das variáveis dos diferentes tipos de analisadores viscoelásticos.

Tabela 2: Variáveis dos diferentes equipamentos viscoelásticos e seus significados.

EQUIPAMENTO	TEG	TEG6s	TEM	FOR	Sonoclot
Período de mensuração	-	ACT	RT	COT1	-
Tempo de reação (período de 0-2mm de amplitude)	R	R	CT	COT2	ACT
Tempo de coagulação (período de 2-20mm de amplitude)	K	K	CFT	-	CR
Ângulo alfa (velocidade de formação do coágulo)	α (inclinação entre r e k)	ANGLE	A (ângulo da tangente quando a amplitude é de 2mm)	SLOPEDE SLOPEPAMIN	-
Ângulo máximo	-	-	CFR	-	-
Amplitude máxima	MA	MA	MCF	MAXELAST	PF
Tempo para a força máxima	TMA	-	MCF-t	TIMETOMAX	-
Amplitude máxima (em momento determinado)	A (A30, A60)	-	(A5, A10...)	-	-
Elasticidade do coágulo	G	-	MCE	-	-
Lise máxima	-	-	ML	-	-
Lise em momento determinado	LY30, LY60	LY30	LI30, LI45, LI60	CLOTSR30 CLOTSRPAMIN	-
Tempo para lise	TTL (redução de 2mm da MA)	-	CLT (redução de 10% da MCF)	-	-
Tempo de lise máxima	-	-	CLR (tangente máxima pós MCF)	-	-
Nível de fibrinogênio funcional	-	FLEV	-	-	-

Fonte: Adaptado de López et al. (2016a).

Nota: COT1 e RT (tempo de coagulação – tempo transcorrido do início/detecção da formação do tampão plaquetário); R (tempo de reação), CT e COT2 (tempo de coagulação) – tempo transcorrido até a formação total do tampão plaquetário (marca o início de geração da trombina, ou seja, início da formação do coágulo); K (tempo de coagulação) e CFT (tempo de formação do coágulo) – tempo transcorrido entre o início da formação do coágulo até amplitude de 20 mm; Ângulo alfa, SLOPEDE (declive em graus) e SLOPEPAMIN (declive em Pa/min) – velocidade de formação do coágulo e de polimerização da fibrina; MA, MCF e MAXELAST (amplitude máxima – estabilização do coágulo pelas plaquetas e fator XIII em sua força máxima); LY30 e 60, LI30, 45 e 60 e CLOTSR30/CLOTSRPAMIN (lise em momento determinado – medidas do grau de fibrinólise depois de certo período de tempo). Há variação do ponto de partida – TEG é do início do processo e FOR (RoeRox) é a partir da elasticidade máxima.

1.2.4 Aplicação dos testes viscoelásticos

Os analisadores viscoelásticos tem sido tradicionalmente usados na medicina humana para auxiliar o monitoramento da função hemostática durante procedimentos cirúrgicos (cardiovascular, transplante hepático), guia transfusional (otimizar o uso de hemocomponente durante procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgico, evitar transfusão excessiva, prevenir reações transfusionais), além de ser uma ferramenta para o diagnóstico e orientação ao tratamento de estados de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade (Kol e Borjesson, 2010; Zamper et al., 2017; Shenoy e Intagliata, 2020; Tyler et al., 2020).

Recentemente os testes viscoelásticos vêm sendo utilizados como potencial ferramenta diagnóstica e guia transfusional na medicina veterinária, já que é de fácil interpretação e pela sua capacidade de detectar estados de hipercoagulabilidade e hipocoagulabilidade (parâmetros que indicam riscos trombóticos ou hemorrágicos), permite orientação terapêutica adequada e medidas preventivas, evitando terapia transfusional excessiva, otimizando o uso de hemocomponentes e prevenindo riscos de reações transfusionais assim como na medicina humana (Kol e Borjesson, 2010; Langhorn et al., 2019).

1.2.5 Referências

Babski DM, Brainard BM, Krimer PM, Ralph AG, Pittman JR, Koenig A (2012) Sonoclot evaluation of whole blood coagulation in healthy adult dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 22:646-652.

Baker DC (2015) Diagnóstico das anormalidades da hemostasia. In: Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell T (Eds) Hematologia e bioquímica clínica veterinária São Paulo: Editora Roca Ltda, p. 399.

Bischof DB, Ganter MT, Lesserson LS, Hartnack S, Klaghofer R, Graves K, Genoni M, Hofer CK (2015) Sonoclot's Viscoelastic Blood Coagulation Measurement Predicts Postoperative Bleeding in Cardiac Surgery after Heparin Reversal. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia** 29:715-722.

Bugaev N et al. (2020) Thromboelastography and rotational thromboelastometry in bleeding patients with coagulopathy: Practice management guideline from the Eastern Association for the Surgery of Trauma. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery** 89:999-1017.

Carmen RDS, Sandra GS, Guadalupe BRS, Benjamín RJ, Hernán NZA (2019) Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. **Revista Mexicana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio** 66:227-233.

Crochemore T, Piza FMT, Rodrigues RR, Guerra JCC, Ferraz LJR, Corrêa TD (2017) A nova era da tromboelastometria. **Hospital Israelita Albert Einstein São Paulo, SP, Brasil** 15:380-385.

Davie EW, Ratnoff OD (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** 145:1310-1312.

De Pietri L et al. (2016) Thromboelastography-guided blood product use before invasive procedures in cirrhosis with severe coagulopathy. A randomized controlled trial. **Hepatology** 63:566–573.

Dias JD, Haney EI, Mathew BA, Lopez-Espina CG, Orr AW, Popovsky MA (2017) New-Generation Thromboelastography: Comprehensive Evaluation of Citrated and Heparinized Blood Sample Storage Effect on Clot-Forming Variables. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 141:569-577.

Donahue SM, Otto CM (2005) Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 15:9-16.

Dorsey TI, Rozanski EA, Sharp CR, Babyak JM, Laforcade AM (2018) Evaluation of thromboelastography in bitches with pyometra. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 30:165-168.

Drumheller BC, Stein DM, Moore LJ, Rizoli SB, Cohen MJ (2019) Thromboelastography and rotational thromboelastometry for the surgical intensivist: A narrative review. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery** 86:710-721.

Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG (2010) O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 32:416-421.

Frum J (2020) **Anticoagulant profile of subcutaneous enoxaparin in healthy dogs.** 54 f. Thesis (Degree of Master of Science in Veterinary Medical Research) - Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi.

Fry W, Lester C, Etedali NM, Shaw S, DeLaforcade A, Webster CRL (2017) Thromboelastography in Dogs with Chronic Hepatopathies. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 31:419-426.

Grandl G, Wolfrum C (2018) Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. **Seminars in Immunopathology** 40:215–224.

Grover SP, Mackman N (2018) Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 38:709-725.

Gurbel PA et al. (2016) First report of the point-of-care TEG: A technical validation study of the TEG-6S system. **Platelets, Early Online** 27:1-8.

Hartert H (1948) Blutgerinnungsstudien mit der thrombelastographie, Einem neuen untersuchungsverfahren. **Klinische Wochenschrift** 37:577-583.

Hayem G (Eds) (1889) **Du sang et de ses altérations anatomiques.** Paris: MASSON, 1023p.

Hett DA, Walter D, Pilkington SN, Smith DC (1995) Sonoclot analysis. **British Journal of Anaesthesia** 75:771-776.

Hoffman M, Monroe DM (2001) A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis** 85:958-65.

Júnior HCR, Filippi ACZ (2020) Aspectos Técnicos e Aplicações Clínicas de Testes Viscoelásticos no Monitoramento da Hemostasia Perioperatória. **Revista de Saúde** 11:29-35.

Kattula, S, Byrnes JR, Wolberg AS (2017) Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 37:113-121.

Koffmann K (1910) Der Koaguloviskosimeter mit spezieller Beruecksichtigung seiner klinischen verwendbarkeit fuer gerinnungsestimungen des Blutes. **Zeitschrift Klinische Medizin** 59:415–421.

Kol A, Borjesson DL (2010) Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology** 39:405-416.

Kugelmass IN (1923) Contribution physico-clinique au mecanisme de la coagulation du sang. **Archives Internationales de Physiologie** 21:139-190.

Langhorn R, Bochsén L, Willesen JL, Sørensen TM, Kristensen AT (2019) Thromboelastography-guided transfusion in dogs with hypocoagulable disorders: a case series. **Acta Veterinaria Scandinavica** 61:1-8.

Lee A, Boysen SR, Sanderson J, Wagg CR, Chalhoub S (2017) Effects of Yunnan Baiyao on blood coagulation parameters in beagles measured using kaolin activated thromboelastography and more traditional methods. **International Journal of Veterinary Science and Medicine** 5:53-56.

López MS, Martinuzzo M, Taie AF, Barrera LH, D'Adamo MA, Otaso JC, Oyhamburu J (2016) Thromboelastometry ROTEM® delta vs. Thromboelastography and classical hemostasis test. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana** 50:309-318(a).

López MS, Martinuzzo M, Taie AF, Barrera LH, D'Adamo MA, Otaso JC, Oyhamburu J (2016) Thromboelastography and Thromboelastometry. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana** 50:319-328(b).

López NP, Días MQ, Egea-Guerreiro JJ (2019) Plasma fresco congelado precoz en el shock hemorrágico, estamos seguros? **Medes Medicina en Español: Emergencias** 31:353-354.

Macfarlane RG (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature** 202:498-499.

McMichael M, Goggs R, Smith S, Wagg C, Warman S, Wiinberg B (2014) Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 1: System comparability. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 24:23-29.

Meledeo MA, Peltier GC, McIntosh CS, Voelker CR, Bynum JA, Cap AP (2018) Functional Stability of the TEG 6s Hemostasis Analyzer under Stress. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery** 84:83-88.

Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2017) Distúrbios hemodinâmicos, doença tromboembólica e choque. In: Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Eds) **Robbins & Cotran Fundamentos da Patologia**. 9ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p. 118.

Neal MD et al. (2020) A Comparison Between the TEG® 6s and TEG® 5000 Analyzers to Assess Coagulation in Trauma Patients. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery** 88:279-285.

Nilsson CU, Strandberg K, Reinstrup P (2018) Warfarin monitoring with viscoelastic haemostatic assays, thrombin generation, coagulation factors and correlations to Owren and Quick prothrombin time. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** 78:358-364.

Pinheiro YT, Silva ECL, Maciel MA, Sousa ET (2017) Hemofilias e Doença de von Willebrand: uma revisão de literatura. **Archives of Health Investigation** 6:218-221.

Rizkalla JAB (2020) Distúrbios da coagulação. **Guia Prático de Hematologia** 1:126-140.

Rout G, Shalimar, Gunjan D, Mahapatra SJ, Kedia S, Garg PK, Nayak B (2020) Thromboelastography-guided Blood Product Transfusion in Cirrhosis Patients with Variceal Bleeding: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Clinical Gastroenterology** 54:255-262.

Rubanick JV, Pashmakova MB, Bishop MA, Barr JW (2017) Correlation between thromboelastography and traditional coagulation test parameters in hospitalized dogs. **Veterinary Medicine: Research and Reports** 8:21-26.

Shenoy A, Intagliata NM (2020) Thromboelastography and Utility in Hepatology Practice. **CLD Clinical Liver Disease** 16:149–152.

Shropshire S, Olver C, Lappin M (2018) Characteristics of hemostasis during experimental *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 32:1334–1342.

Silva RDR, Melo EM (2016) A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Saúde & Ciência em Ação: Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde** 2:79-92.

Sivapalan P, Bäck AC, Ostrowski RS, Ravn HB, Johansson PI (2017) Transfusion requirements in elective cardiopulmonary bypass surgery patients: predictive value of Multiplate and Thromboelastography (TEG) Platelet Mapping Assay. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** 77:345-351.

Solomon C, Schöchl H, Ranucci M, Schött U, Schlimp CJ (2015) Comparison of fibrin-based clot elasticity parameters measured by free oscillation rheometry (ReoRox®) versus thromboelastometry (ROTEM®). **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation** 75:239-246.

Sposito TC, Almeida PV (2020) O novo modelo celular da coagulação. **Semana de Pesquisa do Centro Universitário Tiradentes - SEMPESq – Alagoas** 8:1-3.

Stokol T (2012) Laboratory diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs and cats: the past, the present and the future. *The Veterinary Clinics of North American*. **Small Animal Practice** 42:189-202.

Takahira RK (2003) Distúrbios da hemostasia em veterinária: patologia e avaliação clínico-laboratorial. In: González FHD, Campos R. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: UFRGS, p. 46-64.

Takahira RK (2015) Distúrbios da hemostasia. In: Jericó MM, Neto JPA, Kogika MM (Eds) *Tratado de medicina interna de cães e gatos* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda e Editora Roca Ltda, p. 5612.

Tyler PD, Yang LM, Snider SB, Lerner AB, Aird WC, Shapiro NI (2020) New Uses for Thromboelastography and Other Forms of Viscoelastic Monitoring in the Emergency Department: A Narrative Review. **Annals of Emergency Medicine** 77:357-366.

von Kaulla KN, Ostendorf P, von Kaulla E (1975) The impedance machine: a new bedside coagulation recording device. **Journal of Medicine** 6:73-87.

Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y (2014) Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. **Journal of Intensive Care** 2:1-8.

Winstedt D, Tynngård N, Olanders K, Schött U (2013) Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. **Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine** 21:1-9.

Zamper RPC, Amorim TC, Costa LGV, Takaoka F, Neto AS (2017) The role of thromboelastometry in the assessment and treatment of coagulopathy in liver transplant patients. **Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil** 15:243-246.

**CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA DAS
VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE
ATIVADORES EM DIFERENTES AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE
CÃES HÍGIDOS**

Intervalo de referência para diferentes amostras

TAUARA S. DIAS¹, MÁRCIA F. R. SOBREIRA^{1,2*}, EDMILSON R. DANEZE³, GENER T.
PEREIRA¹

¹Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal-SP, Brasil (FCAV/UNESP)

²Centro Universitário Moura Lacerda, Campus Ribeirão Preto-SP, Brasil (CUMML)

³Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus São Miguel do Oeste-SC, Brasil
(UNOESC)

***Autor correspondente**

Email: marciafrsobreira2@gmail.com

Número de telefone: +55 (16)997923186

Endereço postal: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Hospital Veterinário
Governador Laudo Natel, Via de Acesso Prof Paulo Donato Castellane, s / n, CEP 14884-900,
Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: O sistema hemostático compreende um conjunto de eventos fisiológicos e
complexos do organismo, cuja função é a prevenção do escape de sangue e formação de

^aEste capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Veterinary Clinical Pathology e encontra-se em avaliação para publicação.

trombos no vaso sanguíneo. A avaliação de desordens hemostáticas é realizada por meio de exames laboratoriais, geralmente subdivididos em testes convencionais e testes viscoelásticos.

Objetivos: Evidenciar as variáveis tromboelastográficas utilizando amostras de sangue total fresco (STF), sangue total com citrato de sódio a 3,2% (STC), plasma fresco (PF) e plasma fresco congelado (PFC); com a finalidade de se estabelecer intervalo de referência para tais variáveis em cães hígidos e verificar se o tipo de amostra e o método de conservação alteram o traçado tromboelastográfico.

Material e Métodos: Foram selecionados 22 cães saudáveis dos quais foram coletadas diferentes amostras sanguíneas que foram submetidas à análise viscoelástica pelo equipamento TEG5000®. Para as variáveis TEG das diferentes amostras sanguíneas, foi estabelecido intervalo de referência. Além disso, foi realizado o congelamento de amostras.

Resultados: O intervalo de referência das amostras de STF e STC, para todas as variáveis, não diferiram estatisticamente entre si. Já nas amostras de PF e PFC, as variáveis R (tempo de reação) e K (tempo de coagulação) diferiram estatisticamente entre si. TEG. Para metade das amostras plasmáticas a variável K não foi detectada e para todas as amostras de PF a variável de lise (LY/EPL) teve análise igual a zero. Para as amostras plasmáticas que foram congeladas a -15°C, após descongelamento, obtiveram leitura gráfica pelo equipamento TEG5000®.

Conclusões: Mostramos ser possível estabelecer intervalo de referência para as variáveis tromboelastográficas das diferentes amostras sanguíneas, sem o uso de ativadores de coágulo e com número reduzido de animais. As amostras de STF e STC representam o paciente de maneira eficaz, já que o sangue total possui todos os componentes necessários para que a hemostasia *in vitro* ocorra semelhantemente ao que acontece *in vivo*. É possível avaliar hemostasia pela TEG em amostras plasmáticas e essas são tão representativas quanto as

amostras de STF e STC. O método de conservação da amostra não impediu a leitura e formação gráfica pelo equipamento TEG.

Palavras-Chave

Canina, coagulação, hemorragia, hemostasia, trombo

2.1 INTRODUÇÃO

O sistema hemostático é um conjunto de eventos fisiológicos e complexos do organismo, que permite ao sangue fluir normalmente dentro dos vasos sanguíneos, e por meio de componentes como plaquetas, fatores de coagulação, parede vascular, anticoagulantes naturais e fibrinólise, previne hemorragia e trombose quando há lesão no endotélio vascular, contribuindo com a homeostase. Esse sistema é mantido pelo equilíbrio entre coagulação e fibrinólise³⁰.

Existem vários conceitos para se explicar a hemostasia, mas atualmente dois modelos são os mais aceitos. O primeiro, e utilizado por mais de 50 anos, descrito por Macfarlane (1964)²⁸ Davie e Ratnoff (1964)⁸, definem a clássica cascata de coagulação ativada por vias (vias intrínseca, extrínseca e comum). O segundo conceito, descrito por Hoffman e Monroe (2001)¹⁸, apresentam a cascata de coagulação baseada em superfícies celulares, ou seja, a ativação da cascata ocorrendo em quatro fases sobrepostas (iniciação, amplificação, propagação e finalização)³⁹.

O desequilíbrio na hemodinâmica de alguma das etapas da hemostasia resulta em distúrbios hemostáticos que podem ser hemorrágicos, trombóticos ou trombo-hemorrágicos, geralmente causados por defeitos vasculares, alterações plaquetárias (quantitativa ou qualitativa), ou coagulopatias (congenita ou adquirida)⁴¹. Eventos inflamatórios são condições que geram alterações significativas na hemodinâmica, uma vez que o sistema hemostático caminha em

71 paralelo com o sistema inflamatório (células do sistema inflamatório, quando secretam
72 citocinas, aumentam liberação plaquetária, por exemplo)⁴⁰.

73 O sistema hemostático pode ser avaliado por testes convencionais, como tempo de sangramento
74 de mucosa oral (TSMO), plaquetograma, tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT),
75 tempo de coagulação ativado (TCa), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), produtos
76 de degradação da fibrina (PDF), concentração de fibrinogênio plasmático e concentração de
77 dímeros D. Contudo, esses testes avaliam somente risco hemorrágico e não trombótico, pois,
78 por serem realizados em amostras de plasma, analisam uma parte da hemostasia. Sendo assim,
79 os testes convencionais possuem limitações para investigar as alterações dos componentes
80 hemostáticos, seja pela subjetividade do teste (TSMO), falta da disponibilidade de kits
81 comerciais específicos para animais (PDF), ou ainda, por restringirem o diagnóstico de falhas
82 na hemostasia (TCa, TP, TT e TTPa)^{35,42}. E por testes viscoelásticos, como a tromboelastografia
83 (TEG), são exames hemostáticos mais completos. Eles mensuram, de forma dinâmica, a fase
84 de iniciação, formação, estabilização até a lise do coágulo. Por esta razão, permitem identificar
85 riscos de hemorragia ou trombose precocemente, pois detectam estados de hipocoagulabilidade
86 e/ou hipercoagulabilidade^{5,12}.

87 A tromboelastografia foi descrita pela primeira vez por Hartert (1948), na Alemanha. O registro
88 da ativação do sistema hemostático na amostra analisada é captado e processado pelo software
89 do equipamento TEG desenvolvido para esquematizar os resultados, por meio de uma curva
90 gráfica. Este gráfico evidencia variáveis para a sua interpretação, como o R (tempo de reação),
91 intervalo decorrido em minutos entre o início da coagulação até o gráfico atingir uma amplitude
92 de 2 mm pelas primeiras bandas de fibrina, ou seja, o início da captação da ativação do sistema
93 hemostático na amostra pelo equipamento. Expressa a velocidade de formação de
94 tromboplastina, função da via intrínseca, em especial a ativação dos fatores XII, XI e VIII. K

(tempo de coagulação), corresponde ao tempo, em minutos, entre o R e o ponto em que o traçado gráfico atinge uma amplitude de 20 mm da linha de base, evidencia o início da polimerização da fibrina. O ângulo α (alfa) é definido como o ângulo entre a linha de base e uma linha desenhada entre R e K, ou seja, formado pelo eixo R e inclinação K. Semelhante a K, o ângulo α indica o início da conversão de fibrinogênio em fibrina. MA (amplitude máxima), expressa em milímetros, representa o máximo de força e estabilização do coágulo já formado, sofre influência principalmente da quantidade e função plaquetária e em menor grau, da formação da fibrina. G (Grau de firmeza, elasticidade do coágulo, resistência global do coágulo) medido em dynas/cm², mostra a força/firmeza total do coágulo, é calculado pela fórmula: $G = 5000MA / (100 - MA)$. A (amplitude em função do tempo), expressa em milímetros, permite avaliação da MA em tempos de 30 e 60 minutos após a MA ser atingida. EPL (porcentagem estimada de lise) e LY (lise em tempo determinado, lise do coágulo), determinam a porcentagem (%) de lise que o coágulo atinge em um tempo de 30 minutos após MA^{6,19,24,42}.

A TEG tem sido tradicionalmente usada na medicina humana para monitorar a função hemostática durante procedimentos cirúrgicos (cardiovascular, transplante hepático), para transfundir o componente sanguíneo deficiente e no pós-cirúrgico. Além disso, tem sido utilizada para testar a eficácia de diferentes tipos de medicamentos *in vivo* e *in vitro* e o seu uso tem se expandido para o diagnóstico e orientação ao tratamento em estados de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade^{16,38,42,43}. A TEG como ferramenta diagnóstica e guia transfusional, vem sendo potencialmente utilizada na medicina veterinária, já que é de fácil interpretação. Pela sua capacidade de detectar estados de hipercoagulabilidade e hipocoagulabilidade (parâmetros que indicam riscos trombóticos ou hemorrágicos), permite a terapia adequada e medidas preventivas, evitando terapia transfusional excessiva, otimizando o uso de hemocomponentes e prevenindo riscos de reações transfusionais^{22,23}.

Na TEG normalmente emprega-se o uso de amostras de sangue total fresco (sem anticoagulante ou ativador de coágulo), já que ela possui todos os componentes necessários para que o evento hemostático *in vitro* ocorra normalmente e semelhantemente ao que ocorre *in vivo*, mostrando assim a interação entre as diferentes células do sangue e suas características bioquímicas, podendo ser realizada na temperatura do paciente³⁴. Todavia, o tipo de amostra sanguínea representa um obstáculo para a análise tromboelastográfica, já que a utilização de amostras de sangue total fresco sem anticoagulantes, necessitam do aparelho no mesmo local da venopunção. É possível verificar hemostasia por meio de amostras de plasma, uma vez que contém fibrinogênio, fatores de coagulação (componentes indispensáveis para a coagulação sanguínea)^{10,27}.

Há uma escassez de artigos que determinam intervalos de referência para as variáveis tromboelastográficas em diferentes amostras sanguíneas de cães hígidos. E até o presente momento, não há trabalhos mostrando intervalo de referência para as variáveis tromboelastográficas em diferentes amostras sanguíneas de cães hígidos, sem o uso de ativadores. O não uso de ativadores de coágulo para avaliação hemostática pela tromboelastografia, além de mimetizar mais fidedignamente hemostasia *in vivo*, reduz custos, já que com a obtenção de apenas dois gráficos, sendo esses, um gráfico TEG plasmático e um gráfico TEG oriundo de amostra de sangue total, é possível avaliar a contribuição do fibrinogênio para a amostra, sem o uso do reagente FIBTEG. Tornando o uso de testes viscoelásticos, cada vez mais acessíveis na rotina clínica veterinária.

Neste contexto, objetivou-se, evidenciar as variáveis tromboelastográficas de cães hígidos utilizando diferentes tipos de amostras sanguíneas (sangue total fresco - sem adição de anticoagulante (STF), sangue total com citrato de sódio a 3,2% (STC), plasma fresco (PF) e plasma fresco congelado (PFC)); determinar intervalo de referência para as variáveis

tromboelastográficas evidenciadas de cada uma das amostras sanguíneas analisadas; comparar os intervalos de referência entre si para cada variável determinada de cada amostra sanguínea analisada; verificar se o tipo de amostra e o método de conservação alteram o traçado tromboelastográfico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/FCAV, da cidade de Jaboticabal do estado de São Paulo, sob número de protocolo 07349/19.

Este experimento partiu de uma população de 27 animais, cujos animais eram todos da espécie canina, com idade entre dois e cinco anos, de diferentes raças, sendo 16 fêmeas e 11 machos.

Desses 27 animais, 22 foram selecionados, pois amostras de cinco cães foram descartadas devido a alterações em exames laboratoriais. Dos 22 animais, foram realizados testes em quatro circunstâncias diferentes, para obtenção das amostras de STF, STC, PF e PFC.

Os intervalos de referência seguiram as orientações recomendadas por Friedrichs et al. (2012); Hanel et al. (2014)^{15,17}, onde afirmam que dados coletados entre 20 e 40 animais podem ser utilizados para geração de IR, mas para isso eles devem ser testados quanto a normalidade e em seguida devem ser utilizados métodos robustos ou paramétricos adequados para calcular IR.

As coletas das amostras foram realizadas entre janeiro e fevereiro de 2020, no Núcleo Hospitalar Veterinário do Centro Universitário Moura Lacerda, situado na cidade de Ribeirão Preto/SP, após a autorização e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos tutores. Para a composição do grupo experimental, foram utilizados 22 animais da espécie canina, sendo oito machos e 14 fêmeas, todos sadios, independente do peso e raça, com idade

166 entre dois e cinco anos, que buscaram o atendimento para avaliações rotineiras anuais de
167 sanidade.

168 O estado de higidez foi confirmado por exames clínicos, tais como, exame físico e exames
169 laboratoriais (hemograma, determinação das concentrações séricas de albumina, creatinina,
170 fibrinogênio, proteínas totais, ureia e da atividade enzimática da alanina aminotransferase,
171 fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase).

172 Para que os animais selecionados fossem classificados como hígidos, ao exame físico e ao
173 exame laboratorial, todos deveriam estar dentro dos valores de referência da espécie de Scham's
174 Veterinary Hematology³⁷.

175 As análises tromboelastográficas e os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de
176 Patologia Clínica do Núcleo Hospitalar Veterinário do Centro Universitário Moura Lacerda da
177 cidade de Ribeirão Preto/SP. Tanto para a obtenção do traçado tromboelastográfico, como para
178 obtenção dos valores dos exames laboratoriais, os animais estavam previamente em jejum
179 alimentar de oito horas e as amostras de sangue foram obtidas por meio de venopunção jugular
180 ininterrupta em seringas de 3mL e 5mL com agulha calibre 25x8 (21-G) e depositadas em
181 sistema a vácuo (Injex Vácuo Indústrias Cirúrgicas LTDA, Ourinhos/SP, Brasil, Labor Import,
182 Osasco/SP, Brasil), microtubo para microcoleta de sangue capilar (BD Microtainer, Juiz de
183 fora/MG, Brasil) Criotubo (Tubo Criogênico de Rosca Corning, São Paulo/SP, Brasil) e
184 microtubo de centrifugação 0,5mL transparente, como recomendado por Flatland et al.
185 (2014)¹⁴.

186 Antes da coleta das amostras sanguíneas para análise tromboelastográfica, o equipamento TEG
187 era previamente calibrado conforme recomendações de fábrica, ou seja, baixado as duas
188 plataformas de encaixe das cubetas até a base, os copos posicionados nas plataformas e a
189 temperatura do equipamento ajustada conforme a temperatura retal aferida de cada paciente.

190 Foram coletados um total de 8mL de sangue em duas seringas, sendo 3mL de sangue
191 transferidos para tubo seco sem ativador de coágulo, submetido a centrifugação (Centrífuga
192 Excelsa 4, modelo 280-R. Fanem. São Paulo, SP, Brasil) a 2202g (3600 rpm) durante cinco
193 minutos, para obtenção do soro e realização das análises bioquímicas (Analisador Bioquímico
194 Semiautomático LabQuest). E os 5mL de sangue restantes transferidos para os demais tubos na
195 seguinte ordem e proporção: 0,5mL transferidos para um microtubo para análise
196 tromboelastográfica (TEG 5000 Thrombelastograph Hemostasis Analyzer System.
197 Haemonetics Corporation. Braintree, MA, EUA) logo após a coleta (analisado em até quatro
198 minutos)²⁹, onde pipetava-se 360µL da amostra e direcionava-a para o copo do
199 tromboelastógrafo.

200 Os 4mL foram transferidos para tubo contendo anticoagulante citrato de sódio a 3,2%,
201 respeitando a proporção de 1:9 (citrato:amostra), e submetida a análise tromboelastográfica
202 logo após a coleta. Para tanto homogeneizava-se a amostra (inversão cinco a oito vezes),
203 pipetava-se 340µL da amostra e 20µL de cloreto de cálcio para recalcificação (reagente
204 comercial cloreto de cálcio 0,2mol. Haemonetics Corporation. Braintree, MA, EUA), sendo
205 20µL de cloreto de cálcio colocados na cubeta do tromboelastógrafo, antes dos 340µL da
206 amostra de sangue total citratado.

207 Após a análise tromboelastográfica das amostras dos tubos com anticoagulante citrato de sódio
208 a 3,2%, as mesmas eram submetidas a centrifugação a 2202g (3600 rpm) durante cinco minutos,
209 para obtenção do plasma. 340µL deste plasma era recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio
210 e submetido a análise tromboelastográfica do mesmo modo que a amostra de sangue total
211 citratado. O restante do plasma era aliquotado, transferido para criotubo e congelado a -15°C
212 por um período máximo de 15 dias. O descongelamento e análise tromboelastográfica das
213 amostras congeladas eram feitos em dias aleatórios. Retirava-se o plasma do congelador e o

214 deixava em bancada em temperatura ambiente por 20 minutos para processo de
215 descongelamento, após, homogeneizava-se a amostra, pipetava-se 20µL de cloreto de cálcio
216 seguidos de 340µL do plasma fresco descongelado, que era analisado da mesma maneira que o
217 sangue total citratado.

218 Os 0,5mL restantes transferidos para microtubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra
219 acético (EDTA), destinado a análise automatizada para obtenção do hemograma e realização
220 do esfregaço sanguíneo para contagem diferencial e avaliação morfológica de células, além
221 disso, esta mesma amostra, após a realização do hemograma, era submetida a centrifugação a
222 2202g (3600 rpm) durante cinco minutos, avaliado proteína total plasmática por meio de
223 refratometria e fibrinogênio pelo método de precipitação por calor do plasma desta amostra.

224 A amostra do microtubo foi identificada como sangue total fresco (STF), a amostra do tubo
225 com anticoagulante citrato de sódio a 3,2% foi denominada sangue total citratado (STC), o
226 plasma oriundo da centrifugação da amostra sanguínea citratada foi denominado de duas
227 formas, o que era submetido a análise após centrifugação, plasma fresco (PF) e o que era
228 congelado, plasma fresco congelado (PFC). A distribuição para os respectivos tubos, respeitou
229 a ordem determinada por Flatland et al. (2014)¹⁴.

230 2.2.1 Análise estatística dos dados

231 Para os resultados obtidos a partir dos dados oriundos de uma distribuição normal (Gaussiana),
232 foi realizado média da população das diferentes amostras sanguíneas para determinação de
233 intervalo de confiança de 95% pelo teste t Student (teste paramétrico de hipóteses), ou seja,
234 com ponto de corte para p-valor adotado de 5%. Para comparar as variâncias das amostras pelo
235 teste t Student, antes era realizado o teste de Fisher para avaliação de homogeneidade dos dados,
236 já que este teste fornece o valor exato de p-valor (com o intuito de ter uma variância correta na
237 razão)¹³. Para que os dados fossem analisados com precisão e confiança pelo teste t Student e
238 teste de Fisher, foi realizado teste de Shapiro Wilk (teste de normalidade) para exclusão de

outliers que pudessem interferir nos resultados dos dados analisados. As análises estatísticas dos dados seguiram as recomendações sugeridas por Friedrichs et al. (2012); Hanel et al. (2014)^{15,17}, para dados coletados entre 20 e 40 animais. Os dados foram processados no software estatístico livre RGui versão 4.0.0 (R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.3 RESULTADOS

Para cada tipo de amostra foi determinado média e intervalo de referência (IR) para cada variável TEG. Todas as amostras de PF do presente projeto, mostraram leitura zerada pelo equipamento TEG para as variáveis EPL/LY. As amostras de PFC evidenciaram valores, sendo possível estabelecer um intervalo (Tabela 1).

Os valores da variável K tanto para as amostras de PF como para as amostras de PFC do projeto em questão, na maioria das vezes não era analisada (NA).

As variáveis MA e G nas amostras plasmáticas desse projeto, apresentaram valores menores quando comparadas aos valores das mesmas variáveis nas amostras de sangue total.

As amostras de PFC do presente projeto, que foram congeladas a -15°C, quando descongeladas em temperatura ambiente e submetidas a análise tromboelastográfica, apresentaram leitura gráfica pelo equipamento.

Ao comparar as médias das variáveis, as amostras de STF e STC, estatisticamente, não diferiram de todas as variáveis TEG. Foi observado nas amostras de PF e PFC, as variáveis R e K, foram estatisticamente diferentes (Tabela 2).

A figura a seguir, mostra os gráficos TEG de cada uma das diferentes amostras sanguíneas (Figura 1).

2.4 DISCUSSÃO

A definição de IR é muito bem elucidada na literatura, e de acordo com a American Society for Veterinary Clinical Pathology, é necessário que dentro do IR tenha 95% dos resultados obtidos dos exames dos animais considerados saudáveis. Essa população de animais saudáveis deve ter sido selecionada de acordo com sua história clínica, ou seja, ausência de enfermidades duas semanas antes e depois da data da coleta das amostras, exame físico e exames laboratoriais de rotina¹⁵, assim como foi realizado neste estudo.

Este mesmo guia diz ainda, que são necessários 120 indivíduos para se usar métodos estatísticos para cálculo de IR não paramétrico com intervalo de confiança (IC) de 90% e percentis 2,5th e 97,5th. Porém, admite que determinar IR a partir de tamanho de amostras menores são comuns e frequentemente inevitáveis na medicina veterinária, e que é possível estabelecer IR em amostras coletadas entre 20 e 40 animais, utilizando métodos estatísticos robustos ou paramétricos¹⁵, assim como no presente estudo.

Na medicina humana há relatos de estudos para determinação de IR com uma população menor que 120 indivíduos, como no estudo de Polak et al. (2011)³³, avaliaram o traçado tromboelastográfico no TEG, comparando os traçados de 60 mulheres grávidas e 43 mulheres saudáveis, não gestantes e férteis utilizando percentis 2,5th e 97,5th.

Na medicina veterinária, existe muito mais estudos avaliando resultados tromboelastográficos, onde o grupo controle não apresenta a quantidade mínima de indivíduos recomendada pela International Federation of Clinical Chemistry. Por exemplo, Otto et al. (2000)³² compararam os resultados do TEG em nove animais com parvovirose canina e nove animais hígidos e concluiu que a enterite provocada pelo parvovírus fez com que os cães acometidos entrassem em estado de hipercoagulabilidade. Dorsey et al. (2018)¹¹ avaliaram a evolução tromboelastográfica de 18 cadelas com piometra utilizando grupo controle composto por oito

286 cadelas castradas e saudáveis. Saavedra et al. (2011)³⁶ compararam os resultados TEG de 32
287 cães com carcinoma e 19 cães hígidos, para a investigação de coagulopatias. Bentley et al.
288 (2013)³ avaliaram o traçado tromboelastográfico pelo TEG de 27 cães que apresentavam
289 peritonite séptica. Kelley et al. (2013)²⁰ avaliaram hemostasia de 21 cães com anastomose
290 portossistêmica e utilizaram valor referência de estudos prévios. Lennon et al. (2013)²⁵
291 avaliaram coagulação de 28 cães com nefropatia proteinúrica usando grupo controle de oito
292 indivíduos.

293 Porém, nenhum desses estudos determinaram IR para as variáveis do traçado
294 tromboelastográfico em amostras de plasma fresco, plasma fresco congelado e sangue total sem
295 anticoagulante, utilizando no equipamento TEG, somente amostras de sangue total citratado.
296 Friedrichs et al. (2012)¹⁵ relataram que o IR deve ser reavaliado a cada três a cinco anos ou
297 sempre que houver mudanças na população de pacientes animais, técnicas pré-analíticas ou
298 qualidade analítica.

299 Kol; Borjesson (2010)²² afirmaram que a utilização de sangue total fresco ou sangue total
300 citratado sem o uso de ativador, utilizando somente recalcificação, são métodos impraticáveis
301 na medicina veterinária, porém ao longo dos anos, sabe-se que o uso de sangue total fresco sem
302 anticoagulante e sangue total citratado somente recalcificados, além do uso de plasma para
303 resultados TEG, já vem sendo usados na medicina veterinária. Daneze (2019)⁷ avaliou status
304 hemostáticos pela tromboelastografia de cavalos com abdome agudo em amostras de plasma
305 fresco congelado recalcificadas e concluiu que as amostras foram eficazes na caracterização
306 individual do status hemostático de equinos com obstrução intestinal revelando alterações
307 relevantes na hemostasia. Koch et al. (2019)²¹ avaliaram TEG de cinco cães com acidente
308 vascular cerebral isquêmico em amostras de plasma fresco congelado e sangue total citratado.
309 Moldal et al. (2012)³¹ avaliaram a resposta hemostática frente a duas técnicas cirúrgicas de

esterilização de cadelas em plasma fresco, deixando claro que até o momento não havia trabalhos comparando tromboelastografia plasmática com a tromboelastografia sanguínea. Bauer; Eralp; Moritz (2009)² em um estudo para determinar IR utilizando reagente Kaolin em amostras sanguíneas citratadas, não evidenciam valores para EPL/LY. Kol; Borjesson (2010)²² relataram que há associação entre o aumento da concentração sérica de dímeros-D e PDF's, com o aumento das variáveis fibrinolíticas TEG e TEM (LY30 ou CLI30) na medicina humana, já essa correlação na medicina veterinária mostrou pouco sucesso. Hanel et al. (2014)¹⁷ diz que para se relatar hiperfibrinólise ou hipofibrinólise, valores da variável LY no TEG devem ser relatados.

Até o presente momento, somente o trabalho realizado por Daneze (2019)⁷ utilizou amostras de plasma fresco congelado recalcificadas para análise tromboelastográfica, onde não foram evidenciados valores para as variáveis EPL/LY. Bauer; Eralp; Moritz (2009)² não relatam os motivos pelos quais essas variáveis não são evidenciadas. Dorsey et al. (2018)¹¹ determinaram IR para a variável LY30/60 com número de oito indivíduos utilizando amostras de sangue total com citrado de sódio a 3,2% sendo ativadas por Kaolin ou heparina de sódio, utilizando análise estatística dos dados com distribuição normal, semelhante ao que foi realizada no presente trabalho (teste t Student, teste de Fisher, teste de Shapiro Wilk), porém o único gráfico box plot que não foi ilustrado, foi o da variável LY e os das variáveis R, K, Alfa, MA e G ilustrados, apresentam *outliers*, porém esses *outliers* não interferem as respectivas variáveis. As variáveis EPL/LY de todas as amostras do presente projeto apresentaram sérios problemas com *outliers*, ou seja, a presença de valores que fugiam da normalidade influenciou diretamente a formação gráfica dessas variáveis, fazendo com que a determinação dos IR, mesmo que possíveis de serem estabelecidos, não fossem confiáveis, pois para todas as amostras os valores de p-valor foram <0,05 (significativo), para as variáveis EPL/LY. O não uso de ativadores fortes, poderia

334 explicar a interferência de *outliers* nessa variável, já que ativadores fortes estabilizam a reação.
335 Outro fato curioso que poderia justificar a influência de *outliers* nessas variáveis, seria o IR
336 humano adotado pelo equipamento (EPL: 0 a 15% e LY: 0 a 8%) que possui valores bem
337 extremos, e os valores dos IR do presente estudo apresentaram essa oscilação nos valores, indo
338 de 0 a 29,9%.

339 O tempo K representa o tempo de coagulação, ou seja, momento inicial da estabilização do
340 tampão plaquetário pela malha de fibrina (tempo K – fase inicial de polimerização da fibrina),
341 por esse motivo sofre influência direta de plaquetas, fibrinogênio e fatores de coagulação^{1,22,42}.
342 Como o plasma não possui plaquetas, esse fato, pode ter sido um dos motivos para que a
343 variável K não tenha sido analisada (NA) pela TEG em algumas amostras plasmáticas desse
344 projeto.

345 Cogitou-se também a possibilidade da variável K não ter sido analisada, devido há não leitura
346 pelo equipamento de valores para K abaixo de um minuto, uma vez que o equipamento
347 tromboelastográfico fora inicialmente projetado para uso humano e o intervalo de referência
348 (IR) para essa variável na medicina humana vai de 1 a 4 minutos, porém, o IR do equipamento
349 TEG utilizado no presente projeto era de 0 a 4 minutos, o que exclui essa hipótese da não análise
350 pelo IR humano. Ainda assim, mesmo com a NA em algumas amostras plasmáticas para a
351 variável K, foi possível estabelecer IR com exclusão de *outliers* para esta variável no presente
352 projeto, sendo este IR confiável.

353 As variáveis MA e G sofrem influência de plaquetas e fibrinogênio. MA e G representam a
354 força máxima do coágulo, mostrando a interação de fatores de coagulação, plaquetas e fibrina,
355 no entanto, a fibrina contribui com apenas 20% da abertura gráfica de MA e G, enquanto as
356 plaquetas 80%^{4,22,42}. Por esta razão, é que as variáveis MA e G possuem valores menores, já

que o plasma não possui plaquetas e nas amostras de PF e PFC do projeto as variáveis MA e G são formadas principalmente de fibrina.

O uso de ativadores fortes de coágulo (reagentes com Kaolin e/ou fator tecidual por exemplo), minimizam ou até eliminam erros pré-analíticos, estabilizam amostras, além de acelerar o processo de formação do coágulo e geração mais rápida do gráfico⁹. O presente estudo não fez o uso de ativadores fortes de coágulo, apenas recalcificação das amostras, com o intuito de mimetizar, mais fidedignamente, a ativação do sistema hemostático que ocorre *in vivo*.

Amostras plasmáticas congeladas a temperaturas menores que -18°C por até um ano, não perdem os fatores termolábeis da coagulação (fatores V e VIII), sendo assim, possui a mesma composição do plasma antes de ser submetido ao congelamento. Após um ano de congelamento, as amostras perdem os fatores termolábeis da coagulação e passam a ser denominadas de plasma congelado com validade de quatro anos a temperaturas menores que -18°C^{1,27}. As amostras de PFC do presente trabalho, após o processo de descongelamento em temperatura ambiente, quando submetidas análise tromboelastográfica, obtiveram leitura gráfica pelo equipamento, mostrando assim que o método de conservação da amostra não interfere a análise tromboelastográfica, porém, não podemos excluir a possibilidade do tipo de amostra interferir a leitura gráfica na TEG em algumas variáveis, uma vez que a maioria das amostras plasmáticas não evidenciaram valores para a variável K.

Kol; Borjesson (2010)²² relataram ainda que em vários estudos, há um coeficiente de variação intra ensaio, no qual é clinicamente aceitável para as variáveis TEG de análise de amostras de cães que varia entre 3% e 18% dependendo da variável.

O conjunto de eventos do sistema hemostático, necessita de avaliação laboratorial robusta, como testes viscoelásticos, para melhor interpretação. Realizar tromboelastografia (TEG) em diferentes amostras sanguíneas, bem como, determinar intervalo de referência para as variáveis

TEG das diferentes amostras, mostra avanço para a realização do TEG em laboratórios clínicos veterinários.

A obtenção de IR para diferentes tipos de amostras, possibilita o acesso ao exame tromboelastográfico em diferentes circunstâncias. O presente projeto mostrou ser possível e viável a realização da tromboelastografia em diferentes amostras sanguíneas e todas elas representam o paciente animal de maneira confiável.

AGRADECIMENTOS

Aos Representantes Thays Borgonove, Rafael Celayes e Alexandre Sette da CEI Comércio de Exportação e Importação de Materiais Médicos, São Paulo/SP, pelo empréstimo do tromboelastógrafo TEG e todo suporte necessário para que as avaliações tromboelastográficas dos animais utilizados no ensaio que deu origem a esta dissertação, fossem realizadas.

ORCID

Tauara S Dias <https://orcid.org/0000-0001-5474-3860>

Márcia F R Sobreira <https://orcid.org/0000-0003-3990-5483>

Edmilson R Daneze <https://orcid.org/0000-0001-6383-9717>

Gener T Pereira <https://orcid.org/0000-0002-3057-411>

REFERÊNCIAS

1. Baker DC. Diagnóstico das Anormalidades da Hemostasia [Diagnosis of Hemostasis Abnormalities]. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, eds. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária [Hematology and Biochemistry Veterinary Clinic]*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Editora Roca Ltda, 2015: 399-430.
2. Bauer N, Eralp O, Moritz A. Establishment of reference intervals of Kaolin- activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use. *J Vet Diagn Invest*. 2009; 21: 641-648.
3. Bentley AM, Mayhew PD, Culp WTN, Otto CM. Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2013; 23: 14-22.
4. Brainard BM, Goggs R, Mendez-Angulo JL, Mudge MC, Ralph AG, Wiinberg B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 5: Nonstandard assays. *J Vet Emerg Crit Care*. 2014; 24: 57-62.
5. Bugaev N, Como JJ, Golani G, et al. Thromboelastography and rotational thromboelastometry in bleeding patients with coagulopathy: Practice management guideline from the Eastern Association for the Surgery of Trauma. *J Trauma Acute Care Surg*. 2020; 89: 999-1017.
6. Crochemore T, Piza1 FMT, Rodrigues RR, Guerra JCC, Ferraz LJR, Corrê TD. A nova era da tromboelastometria [The new era of thromboelastometry]. *Einstein*. 2017; 15: 380-385.
7. Daneze ER. *Descrição do status hemostático de equinos com abdome agudo por técnicas convencionais e tromboelastográficas [Description of the hemostatic status of horses with acute abdomen by conventional and thromboelastographic techniques]*. 2019. 53 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária: Área de concentração em Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, São Paulo, 2019.
8. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964; 145: 1310-1312.
9. DeLaforcade A, Goggs R, Wiinberg B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 3: Assay activation and test protocol. *J Vet Emerg Crit Care*. 2014; 24: 37-46.
10. Donahue SM, Otto CM. Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *J Vet Emerg Crit Care*. 2005; 15: 9-16.

11. Dorsey TI, Rozanski EA, Sharp CR, Babyak JM, Laforcade AM. Evaluation of thromboelastography in bitches with pyometra. *J Vet Diag Invest.* 2018; 30: 165-168.
12. Drumheller BC, Stein DM, Moore LJ, Rizoli SB, Cohen MJ. Thromboelastography and rotational thromboelastometry for the surgical intensivist: A narrative review. *J Trauma Acute Care Surg.* 2019; 86: 710-721.
13. Ferreira JC, Patino CM. O que realmente significa o valor-p? [What does the p-value really mean?] *Educação Continuada: Metodologia Científica.* 2015; 41: 485-485.
14. Flatland B, Koenigshof AM, Rozanski EA, Goggs R, Wiinberg B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 2: Sample acquisition and handling. *J Vet Emerg Crit Care.* 2014; 24: 30-36.
15. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012; 41: 441-453.
16. Fry W, Lester C, Etedali NM, Shaw S, DeLaforcade A, Webster CRL. Thromboelastography in Dogs with Chronic Hepatopathies. *J Vet Intern Med.* 2017; 31: 419-426.
17. Hanel RM, Chan DL, Conner B, et al. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. *J Vet Emerg Crit Care.* 2014; 24: 47-56.
18. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 958-965.
19. Júnior HCR, Filippi ACZ. Aspectos Técnicos e Aplicações Clínicas de Testes Viscoelásticos no Monitoramento da Hemostasia Perioperatória [Technical Aspects and Clinical Applications of Viscoelastic Tests in the Monitoring of Perioperative Hemostasis]. *Revista de Saúde.* 2020; 11: 29-35.
20. Kelley D, Lester C, DeLaforcade A, Webster CRL. Thromboelastographic evolution of dogs with congenital portosystemic shunts. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 1262-1267.
21. Koch BC, Motta L, Wiinberg B, et al. D-Dimer Concentrations and Thromboelastography in Five Dogs with Ischemic Stroke. *Front Vet Sci.* 2019; 6: 1-7.
22. Kol A, Borjesson DL. Application of thromboelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39: 405-416.

23. Langhorn R, Bochsén L, Willesen JL, Sørensen TM, Kristensen AT. Thromboelastography-guided transfusion in dogs with hypocoagulable disorders: a case series. *Acta Vet Scand.* 2019; 61: 1-8.
24. Lee A, Boysen SR, Sanderson J, Wagg CR, Chalhoub S. Effects of Yunnan Baiyao on blood coagulation parameters in beagles measured using kaolin activated thromboelastography and more traditional methods. *Intern J Vet Sci Med.* 2017; 5: 53-56.
25. Lennon EM, Hanel RM, Walker JM, Vaden SL. Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 462-468.
26. López MS, Martinuzzo M, Taie AF, et al. Thromboelastography and Thromboelastometry. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2016; 50: 319-328.
27. López NP, Días MQ, Guerreiro, JJE. ¿Plasma fresco congelado precoz en el shock hemorrágico? the plasmashow must go on [Early fresh frozen plasma in hemorrhagic shock? the plasmashow must go on]. *Revista Científica de la Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias.* 2019; 31: 353-354.
28. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature.* 1964; 202: 498-499.
29. McMichael M, Goggs R, Smith S, Wagg C, Warman S, Wiinberg B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 1: System comparability. *J Vet Emerg Crit Care.* 2014; 24: 23-29.
30. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Distúrbios hemodinâmicos, doença tromboembólica e choque [Hemodynamic disorders, thromboembolic disease and shock]. In: Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. *Robbins & Cotran Fundamentos da Patologia [Robbins & Cotran Fundamentals of Pathology]*. 9ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda, 2017: 118-129.
31. Moldal, ER, Kristensen AT, Peeters ME, Nødtvedt A, Kirpensteijn J. Hemostatic response to surgical neutering via ovariectomy and ovariohysterectomy in dogs. *Am J Vet Res.* 2012; 73: 1467-1476.
32. Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217: 1500-1504.
33. Polak F, Kolnikova I, Lips M, Parizek A, Blaha J, Stritesky M. New recommendations for thromboelastography reference ranges for pregnant women. *Thrombosis Research.* 2011; 128: 14-17.

34. Rout G, Shalimar, Gunjan D, et al. Thromboelastography-guided Blood Product Transfusion in Cirrhosis Patients with Variceal Bleeding: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Gastroenterol*. 2020; 54: 255-262.
35. Rubanick JV, Pashmakova MB, Bishop MA, W Barr JW. Correlation between thromboelastography and traditional coagulation test parameters in hospitalized dogs. *Vet Med: Research and Reports*. 2017; 8: 21-26.
36. Saavedra PV, García AL, López SZ, Couto G. Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: A thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *The Veterinary Journal*. 2011; 190: 78-83.
37. Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal Hematology of the Dog. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Scham's Veterinary Hematology*. 6^a ed. USA, Blackwell Publishing Ltd, 2010: 799-810.
38. Shenoy A, Intagliata NM. Thromboelastography and Utility in Hepatology Practice. *Clin Liver Dis*. 2020; 16: 149–152.
39. Silva RDR, Melo EM. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares [The current theory of coagulation based on cell surfaces]. *Saúde & Ciência em Ação: Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde*. 2016; 2: 79-92.
40. Stokol T. Laboratory diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs and cats: the past, the present and the future. *Vet Clin Small Anim*. 2012; 42: 189-202.
41. Takahira RK. Distúrbios da hemostasia [Hemostasis disorders]. In: Jericó MM, Neto JPA, Kogika MM, eds. *Tratado de medicina interna de cães e gatos [Internal Medicine Treaty for Dogs and Cats]*. 1^aed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan Ltda e Editora Roca Ltda, 2015: 5612-5626.
42. Tyler PD, Yang LM, Snider SB, Lerner AB, Aird WC, Shapiro NI. New Uses for Thromboelastography and Other Forms of Viscoelastic Monitoring in the Emergency Department: A Narrative Review. *Annals of Emergency Medicine*. 2020; 77: 357-366.
43. Zamper RPC, Amorim TC, Costa LGV, Takaoka F, Neto AS. The role of thromboelastometry in the assessment and treatment of coagulopathy in liver transplant patients. *Einstein*. 2017; 15: 243-246

Tabela 1. Intervalo de referência das variáveis do equipamento tromboelastográfico (TEG) das diferentes amostras sanguíneas de cães sadios com intervalo de confiança de 95% para as médias dos tratamentos.

	R	K	ALFA	MA	G	A	EPL/LY
STF	5.12 - 7.77	3.37 - 4.91	41.45 -	47.55 -	4656.105 -	38.85 -	-0.24 - 5.60
			51.29	56.23	6172.466	51.82	
STC	5.28 - 7.65	2.92 - 3.97	47.07 -	45.43 -	4481.015 -	40.70 -	0.37 - 6.76
			55.59	55.02	6437.167	50.76	
PF	5.96 - 7.85	3.40 - 7.77	35.21 -	18.16 -	1191.402 -	21.92 -	0
			52.05	27.72	2046.693	29.76	
PFC	4.49 - 6.21	1.51 - 2.61	47.17 -	17.28 -	1072.900 -	18.55 -	-0.04 - 0.12
			60.40	23.78	1608.918	25.19	

Nota: Intervalo de confiança realizado pelo teste t-Student a 5%.

*STF: sangue total fresco, STC: sangue total citratado, PF: plasma fresco, PFC: plasma fresco congelado.

**R: tempo de reação, K tempo de coagulação, ALFA: ângulo alfa, MA, amplitude máxima, G: força global, A, amplitude, EPL/LY: porcentagem de lise.

Tabela 2. Comparação entre as médias das variáveis tromboelastográficas das diferentes amostras sanguíneas de cães sadios.

TRATAMENTO	VARIÁVEIS						
	R	K	ALFA	MA	G	A	EPL/LY
STF	6.45 a	4.14 a	46.37 a	51.89 a	5414.286 a	45.34 a	2.68 a
STC	6.47 a	3.45 a	51.32 a	50.23 a	5459.091 a	45.73 a	3.56 a
PF	6.91 a	5.58 a	43.63 a	22.94 b	1619.048 b	25.84 b	0 b
PFC	5.40 b	2.06 b	53.79 a	20.53 b	1340.909 b	21.87 b	0.04 b

Nota: médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5%.

*STF: sangue total fresco, STC: sangue total citratado, PF: plasma fresco, PFC: plasma fresco congelado.

**R: tempo de reação, K tempo de coagulação, ALFA: ângulo alfa, MA, amplitude máxima, G: força global, A, amplitude, EPL/LY: porcentagem de lise.

Figura 1. A. Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STF (sangue total fresco). **B.** Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STC (sangue total citratado). **C.** Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PF (plasma fresco). **D.** Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PFC (plasma fresco congelado).

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Tauara dos Santos Dias, sou aluna do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal/SP e estou desenvolvendo o Projeto de Pesquisa intitulado “DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE REFÊNCIA DAS VARIÁVEIS TROMBOELASTOGRÁFICAS SEM O USO DE ATIVADORES EM DIFERENTES AMOTRAS SANGUÍNEAS DE CÃES HÍGIDOS”, com o objetivo geral de evidenciar as variáveis tromboelastográficas de cães hígidos utilizando diferentes amostras sanguíneas (sangue total fresco sem adição de anticoagulante, sangue total com citrato de sódio a 3,2%, plasma fresco e plasma fresco congelado).

Este estudo está sendo desenvolvido sob orientação da pesquisadora Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira.

Esclareço que:

- Sua participação e a inclusão do seu animal no projeto é voluntária e há liberdade para retirar seu consentimento em qualquer momento de sua realização, sem sofrer qualquer prejuízo.
 - Os dados desse trabalho serão utilizados somente para essa pesquisa, ficarão sob a guarda dos pesquisadores e mantidos em segredo. Assim, na divulgação dos resultados desse trabalho, em eventos e revistas científicas, não haverá a identificação dos nomes dos participantes.
 - Nada além do que está sendo explicado será feito e não há riscos ao seu animal ou outras despesas por você participar dessa pesquisa.
 - Ao final da pesquisa, se for de seu interesse, você terá livre acesso aos resultados, podendo discuti-los junto aos pesquisadores.
- Ao aceitar incluir seu animal para participar dessa pesquisa, você receberá uma cópia desse termo de consentimento assinado por mim e, depois, por você.

Agradeço a sua colaboração e me coloco à sua disposição para qualquer informação que julgar necessária.

Atenciosamente

Márcia Ferreira da Rosa Sobreira
Orientadora

Tauara dos Santos Dias
Pós-graduanda

Eu _____ portador
do RG _____ e responsável pelo animal
_____ aceito inclui-lo voluntariamente nessa
pesquisa, após ser esclarecido sobre o seu objetivo e como será feita a coleta de
dados. Estou ciente dos meus direitos.

Assinatura do responsável pelo animal

Ribeirão Preto, ____ / ____ / ____

APÊNDICE B

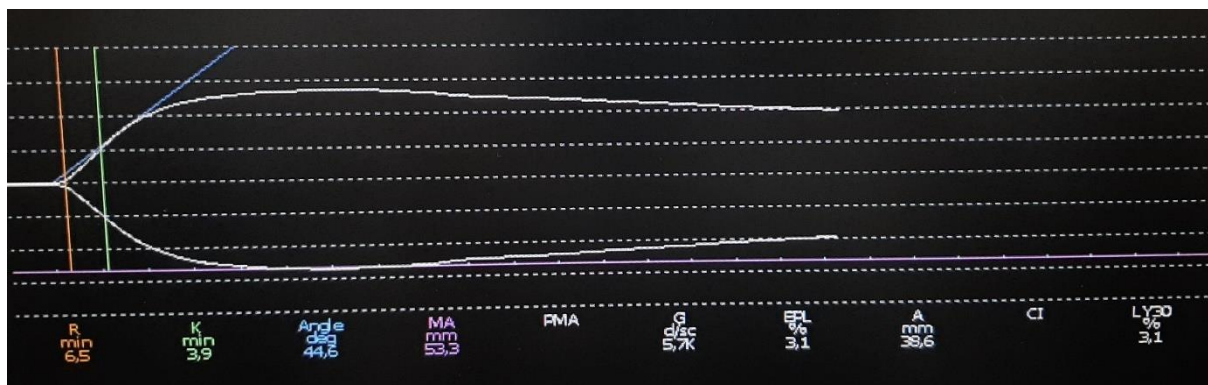


Figura 1B: Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STF (sangue total fresco).

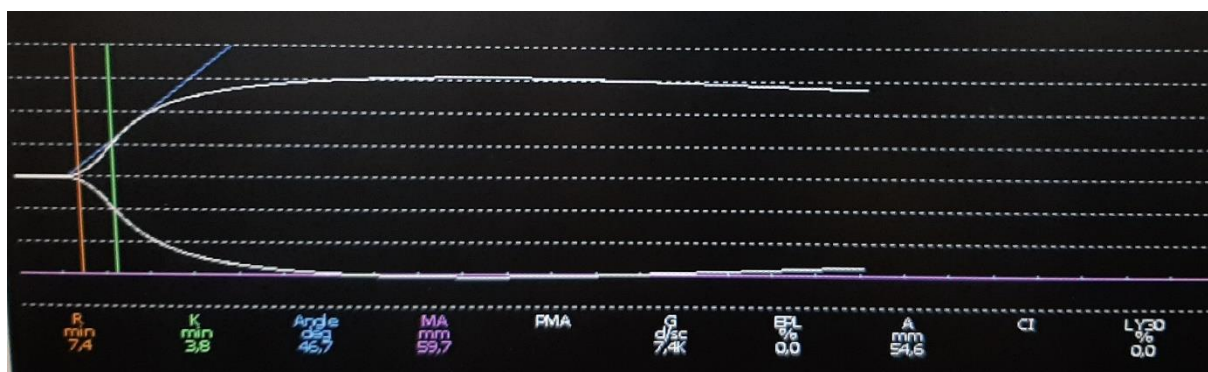


Figura 2B: Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de STC (sangue total citratado).

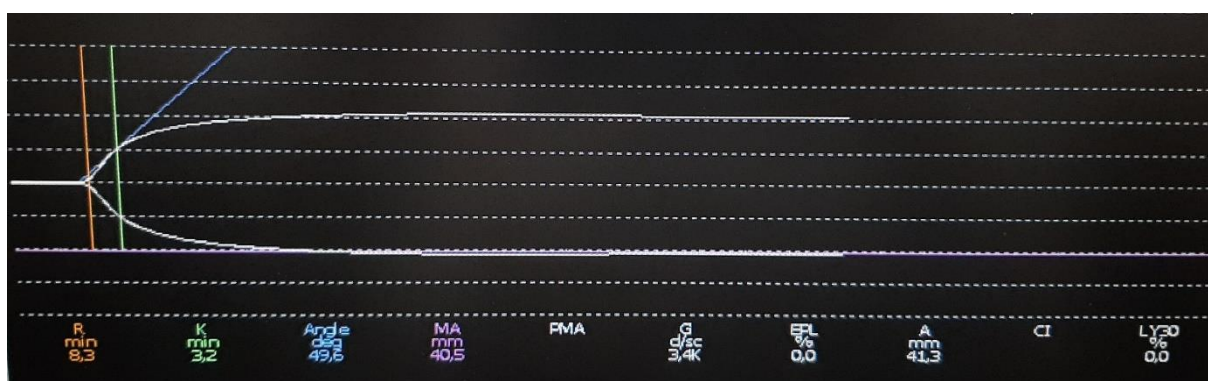


Figura 3B: Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PF (plasma fresco).

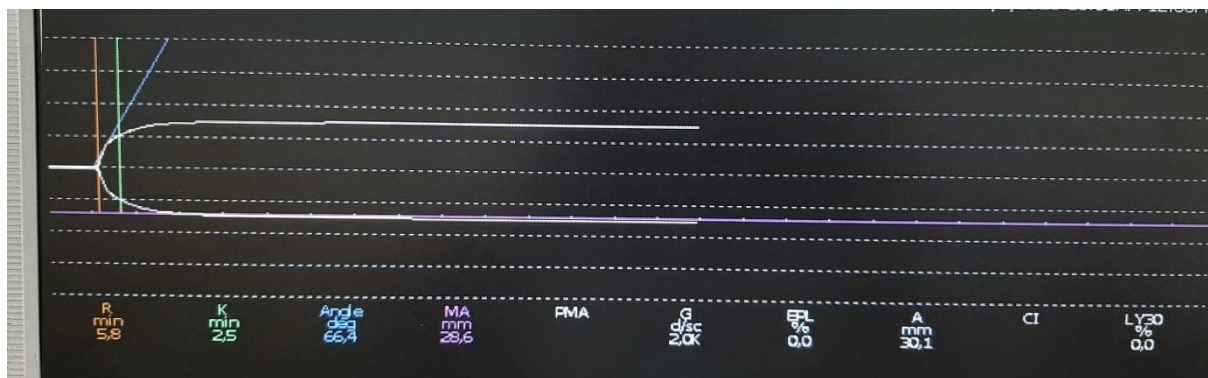
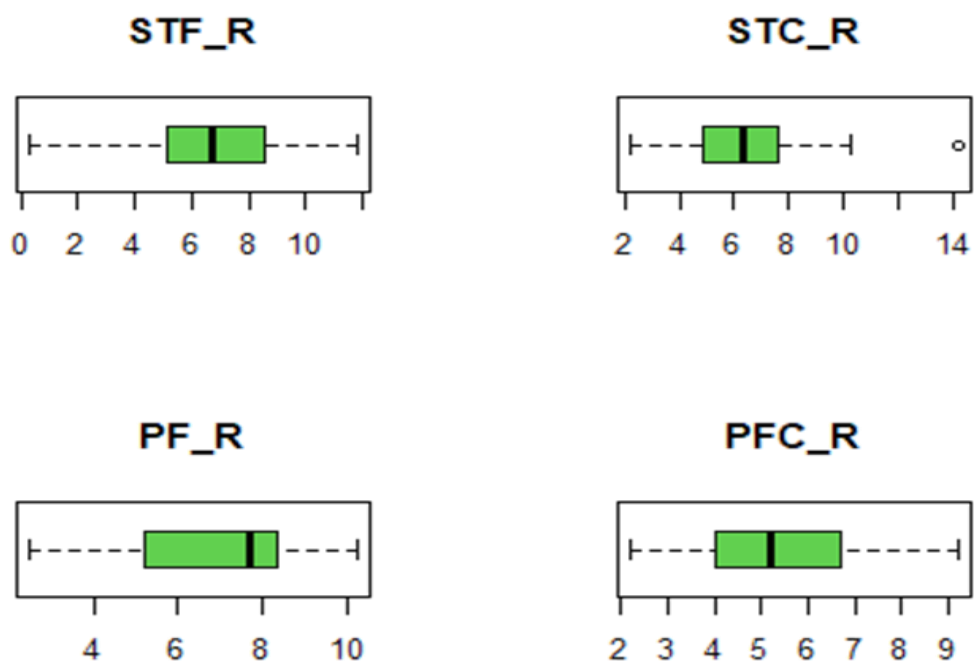


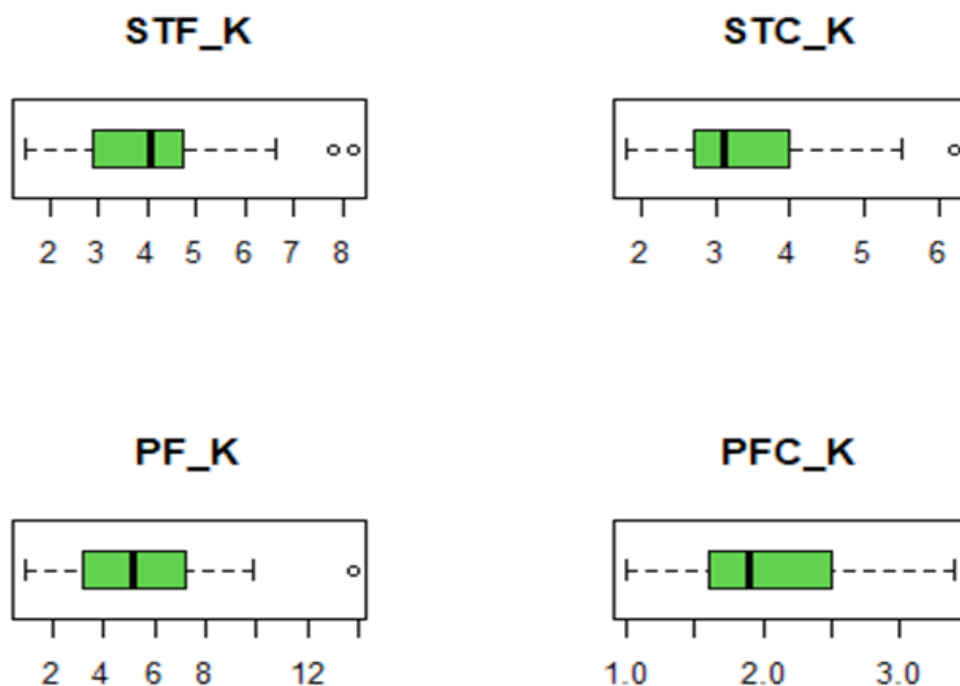
Figura 4B: Resultado gráfico do equipamento TEG para a amostra de PFC (plasma fresco congelado)

APÊNDICE C



Nota: O *outlier* presente no gráfico, não afetou a normalidade dos dados da amostra de STC para a variável R, sendo todos os resultados válidos. Os *outliers* que afetavam a normalidade os dados das amostras para as variáveis, foram excluídos. Os gráficos foram gerados pelo software estatístico Rgui.

Figura 1C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável R.



Nota: Os *outliers* presentes no gráfico, não afetaram a normalidade dos dados das amostras de STF (STF), STC e PF para a variável K, sendo todos os resultados válidos. Os *outliers* que afetavam a normalidade os dados das amostras para as variáveis, foram excluídos. Os gráficos foram gerados pelo software estatístico Rgui.

Figura 2C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável K.

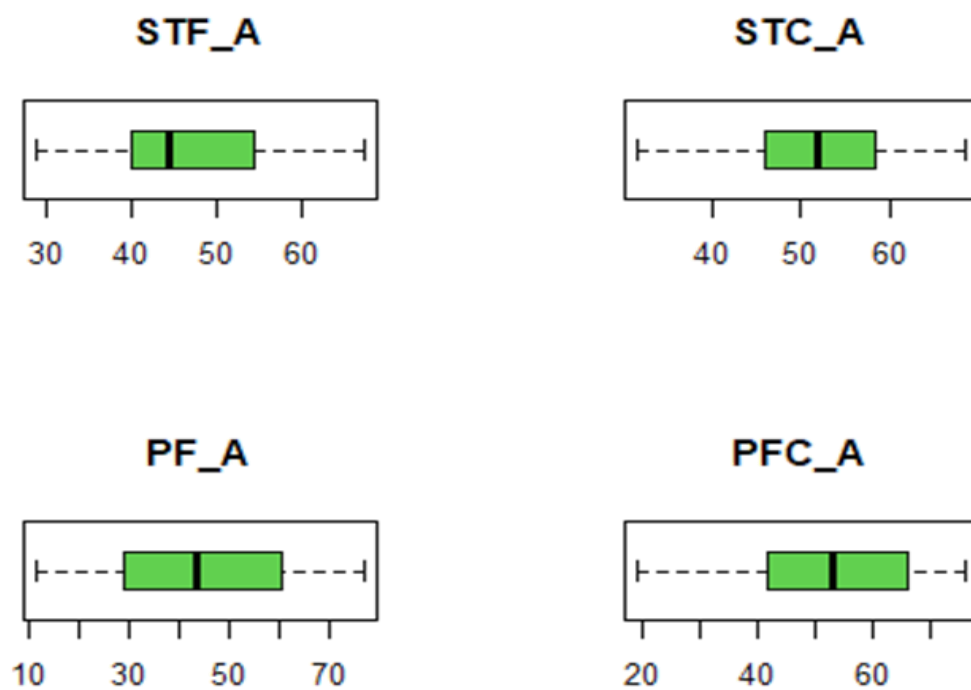
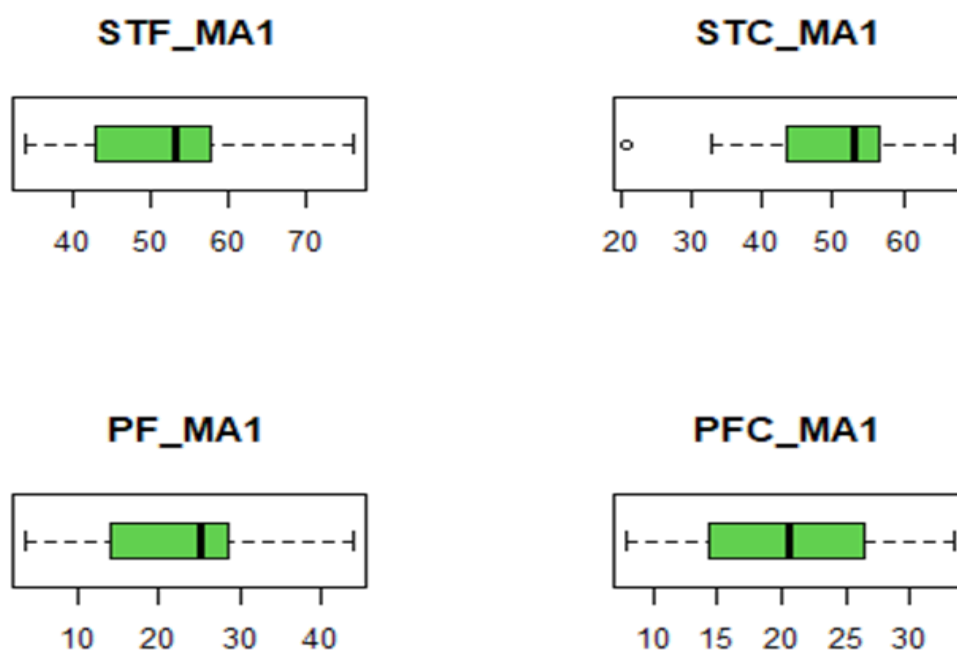
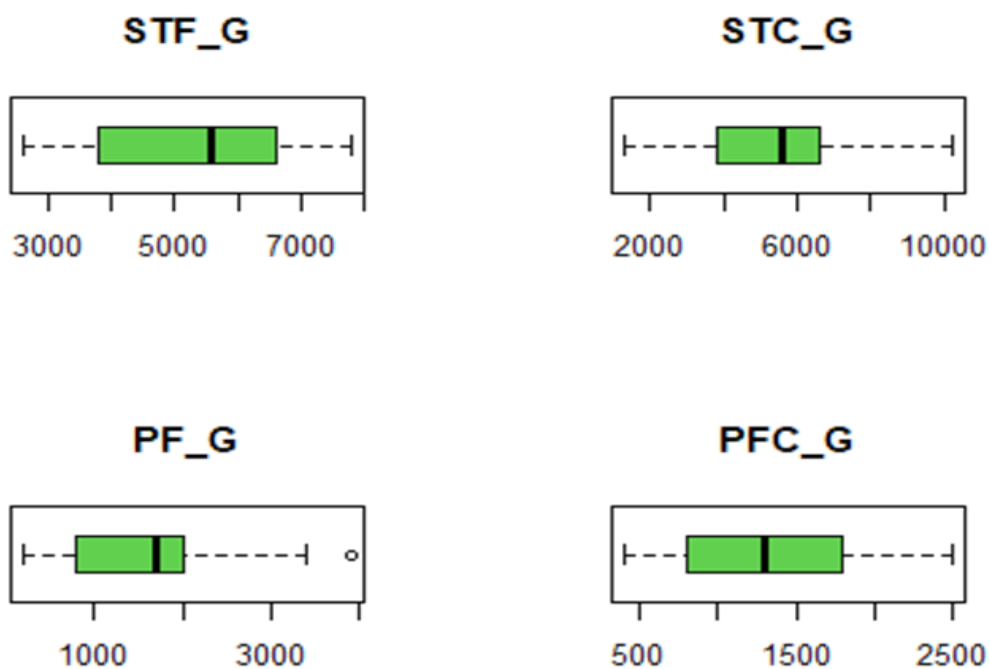


Figura 3C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável ALFA (A).



Nota: O *outlier* presente no gráfico, não afetou a normalidade dos dados da amostra de STC para a variável MA, sendo todos os resultados válidos. Os *outliers* que afetavam a normalidade os dados das amostras para as variáveis, foram excluídos. Os gráficos foram gerados pelo software estatístico Rgui. Figura 4C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável MA.



Nota: O *outlier* presente no gráfico, não afetou a normalidade dos dados da amostra de PF para a variável G, sendo todos os resultados válidos. Os *outliers* que afetavam a normalidade os dados das amostras para as variáveis, foram excluídos. Os gráficos foram gerados pelo software estatístico Rgui.

Figura 5C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável G.

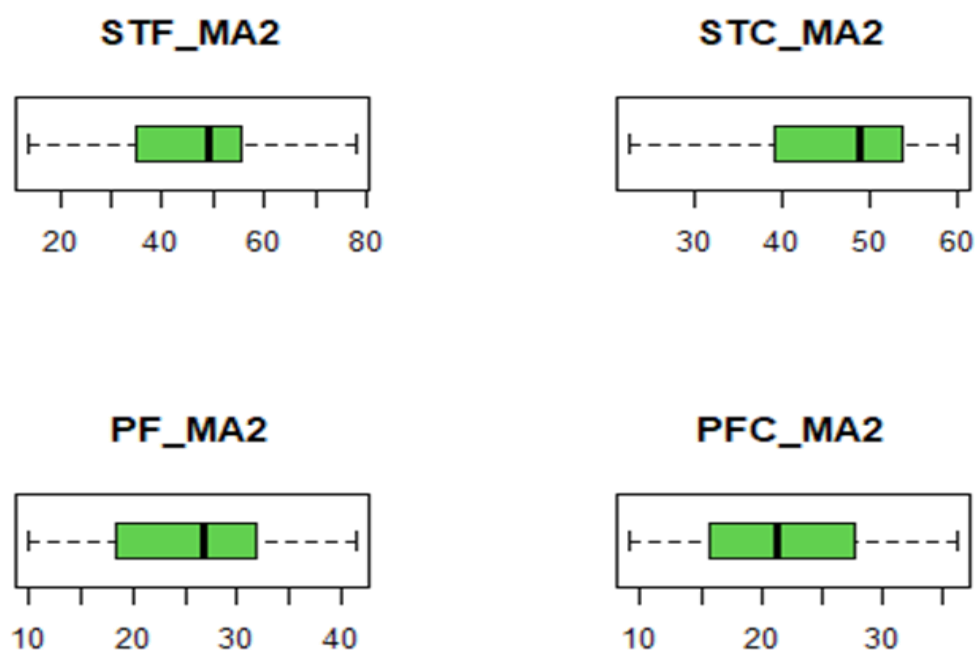
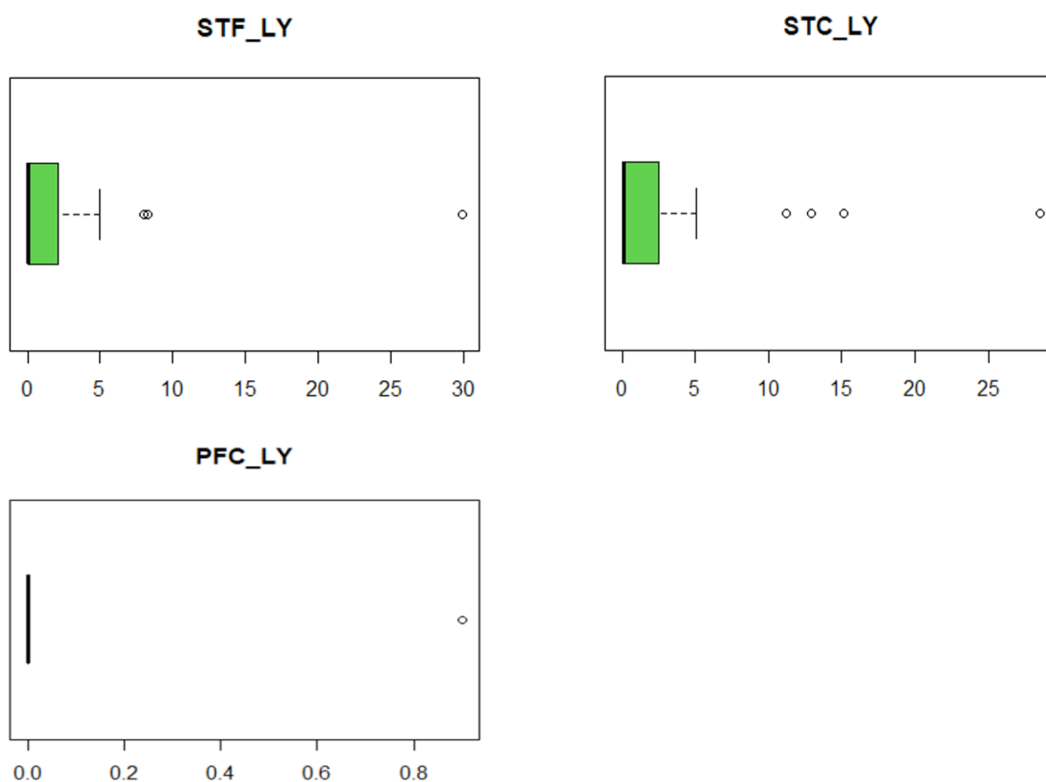


Figura 6C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável A (MA2).



Nota: Esta variável apresentou sérios problemas com *outliers*. Não foi possível gerar gráfico da amostra de PF para a variável LY uma vez que todos os resultados da referida variável para a respectiva amostra foram todos zerados. Os gráficos foram gerados pelo software estatístico Rgui.

Figura 7C: Gráficos Box plot das amostras de STF, STC, PF e PFC para a variável LY.