

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

**TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM) EM GATOS DA RAÇA MAINE COON
PORTADORES E NÃO PORTADORES DA MUTAÇÃO (A31P) NO GENE
MYBPC3 PARA MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA**

PEDRITA CARVALHO FERREIRA ASSUNÇÃO

Botucatu – São Paulo
2019

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

**TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM) EM GATOS DA RAÇA MAINE COON
PORTADORES E NÃO PORTADORES DA MUTAÇÃO (A31P) NO GENE
MYBPC3 PARA MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA**

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

Orientadora:
Prof.^a Associada Regina Kiomi Takahira.

Botucatu – São Paulo
2019

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

Assunção, Pedrita Carvalho Ferreira.

Tromboelastometria (ROTEM) em gatos da raça Maine Coon portadores e não portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica / Pedrita Carvalho Ferreira Assunção. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Regina Kiomi Takahira
Capes: 50503030

1. Hemostasia. 2. Trombofilia. 3. Ecocardiografia. 4. Tromboembolismo. 5. Pressão sanguínea.

Palavras-chave: diastólica; ecocardiograma; hemostasia; hipercoagulabilidade; tromboembolismo.

Nome do Autor: Pedrita Carvalho Ferreira Assunção

Título: TROMBOELASTOMETRIA (ROTEM) EM GATOS DA RAÇA MAINE COON PORTADORES E NÃO PORTADORES DA MUTAÇÃO (A31P) NO GENE MYBPC3 PARA MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Associada Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – Universidade Estadual Paulista – Unesp- Botucatu

Prof. Dr. Raimundo de Souza Lopes
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – Universidade Estadual Paulista –Unesp Botucatu

Profª. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – Universidade Estadual Paulista – Unesp- Botucatu

Prof. Dra. Rosângela de Oliveira Alves Carvalho
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
EVZ- Universidade Federal de Goiás- Goiânia – Goiás

PhD. MSc. M.V. Arine Pellegrino
Clínica Especializada em Medicina Felina- GATTOS
São Paulo- SP

Data da Defesa: 28 de janeiro de 2019

*“Me levanto sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso o que é que eu faço para tornar esta montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além”*

Rupi Kaur

*Dedico este trabalho às mulheres...mães.... filhas.... amigas
aos corações que foram ressignificados
aos abraços e apoio mútuos
a coragem da lágrima gestante, prematura
ao tempo,
as dificuldades, enfrentamentos e superações
aos olhos brilhantes...a paz do silêncio dentro dos quilômetros
a felicidade de viver todos dias uma nova vida*

Agradecimentos

Conquistar essa importante etapa em minha carreira envolveu pessoas e instituições, e a estes expresso meu respeito e gratidão.

À **Capes** pela bolsa concedida durante o período do Doutorado.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-Unesp), Campus Botucatu**, por disponibilizar toda a infraestrutura e qualidade para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da FMVZ-Unesp, Campus Botucatu**, e a todos os seus funcionários, pelo auxílio, fortalecendo a excelência desta formação acadêmica.

À minha estimada orientadora **Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira**, por todo carinho que dedica aos que a rodeiam. Pela ajuda nos momentos mais difíceis durante essa etapa, à empatia no olhar, no abraço, ao acalento e calma. Por ser uma inspiração, na docência, na bancada do laboratório, na maratona e estradas da vida, sempre atenta as palavras, com respeito, sabendo e escolhendo cada gesto de carinho, entendendo que tudo já é tão complicado, e na simplicidade dos seus atos se fazer um porto seguro de paciência e tranquilidade. Contar com suas palavras foi imprescindível para que tudo não se perdesse no meio do caminho. Serei eternamente grata ao sentimento que permeia essa conquista, a oportunidade e memórias destes quatro anos.

À querida **Prof Dra Aguemí Kohayagawa**, por ser um grande exemplo dentro das histórias que guardo por toda vida.

À **Prof. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt**, pelo incentivo e auxílio nas falhas, nas dificuldades, pelas retomadas e novas etapas. Meu mais singelo, afeto, respeito, gratidão e carinho.

Aos queridos **Dr. Alexandre Daniel e Dra. Arine Pellegrino**, pela paciência e ensinamentos. Espero que a vida e o mundo concedam em retorno toda a generosidade e apreço que vocês dedicaram a este trabalho, ao me auxiliarem nesta empreitada. Sem a colaboração da **Gattos- Clínica Veterinária Especializada em Medicina Felina**, este feito não teria sido realizado, estendo este agradecimento a “família Gattos”, por todos os momentos compartilhados e

principalmente a pequena Alice, que com seu sorriso e ternura, amenizava a saudade da minha família. Tenham absoluta certeza que compartilho as minhas orações mais profundas e bondosas ao coração tão precioso de cada um, e guardo na caixinha da minha memória cada momento. Que as pessoas possam amar os gatos, ao próximo e a vida da maneira que vocês amam. O obrigado é ínfimo perto do que vocês me ensinaram.

A equipe de cardiologia da FMVZ- Unesp, Campus Botucatu, em nome da **Prof. Maria Lúcia Gomes Lourenço** por todo auxílio e contribuição durante o desenvolvimento do projeto com idéias e oferecendo sempre suporte e conhecimento.

Aos docentes da **Universidade Federal de Goiás** que contribuem e contribuíram para a minha formação deste o princípio, na graduação como Médica Veterinária.

A **Associação de Criadores de Maine Coon (AMACOON- Brasil)**, em nome de **Eduardo Makita**, que prontamente se disponibilizou para o desenvolvimento deste projeto. A todos os criadores que colaboraram, pela paciência e atenção.

A minha filha **Maitê Assunção**, agradeço pela parte que você transforma em minha vida, com toda a sua doçura e amor, pela maturidade e compreensão. Pelo cotidiano quando foi possível, pela paciência em compartilhar nossos momentos com o irmão e com o tempo, que às vezes parecia não terminar. Você é meu raio de sol, minha pequena infante.

Ao meu filho **Benjamin Carvalho de Mello Assunção**, pelo nascimento, pelo nascimento novamente, por ser o hiato necessário e perfeito desta conquista, pela vida que dividimos de coração para coração no Box 2, e o auxílio mesmo que inconsciente na busca de coragem para finalizar esta etapa.

Ao **Bruno Martins de Mello**, ao pai, marido, pelas palavras, incentivo, cuidado e amor! Pela sua vida, lutas, por tudo de tudo que você representa, como meu exemplo de ser humano, por ser a personificação de escolher e permanecer, minha pessoa favorita.

Aos meus pais **Ediná Carvalho Ferreira Assunção e Anézio Ferreira da Assunção**, pelas orações e noites mal dormidas, pensando na minha solidão e saudade. Pelo auxílio no cuidado com a minha família.

À minha irmã **Mariana Carvalho Ferreira Assunção e família**, pelo apoio e torcida constante, compreensão nos momentos de ausência, pela companhia no fatídico dia do retorno mais importante da minha vida. Pela coragem e bravura quando me ensina tanto sobre tudo.

Aos meus sobrinhos, **Bento, Leone, Fernando, Bruna, Guilherme e Mateus**, pelo amor sempre repleto de risadas, lágrimas, simples e puro que compartilharam comigo, criando memórias e construindo sonhos.

Aos colegas médicos veterinários, professores, amigos, **Gabriel Pfrimer, Cíntia Neves, Tânia Alkmin, Mariana Andraschko, Lu Forlin, Sandro de Melo Braga**, por serem mais que especiais em nosso “*sense and beauty*” sobre a vida. Pelo apoio emocional, psicológico, a amizade tão impregnada dentro do meu coração, aos exemplos no cotidiano e convivência, fossem eles profissionais ou pessoais. Que a vida traga a vocês todos os sorrisos que me proporcionaram nesta etapa, e que os laços fraternos unidos nesta vida, permaneçam por toda a eternidade.

À **família LCV**, que tanto me acolheu e ensinou, aos técnicos e residentes que amenizavam a saudade e a tristeza com sorrisos e muito carinho. Em especial a **Grazielly Marques, Gisele Krammer, Roberta Martins Basso e Adriana Lopes**, pelo presente de ter a companhia de vocês. Nasceu nesta “temporada” um amor sem medida, sinto-me abençoada por receber o presente da convivência, por todos os momentos que congratulamos durante esse período, estar lado a lado é inspirador. Sonhem sempre e contem comigo em todos os momentos.

Aos colegas e amigos de pós graduação **Tatiana G. Gorenstein** pelo olhar tão carinhoso, atenção, receber sua amizade foi um presente; **Felipe G. Romão**, meu mais singelo agradecimento pela empatia e preocupação, com você tenho uma dívida de gratidão, conte comigo a qualquer momento e em qualquer hora; **Bruna dos Santos**, pela solicitude e auxílio, paciência e ensinamentos, que a vida lhe proporcione sempre muitas alegrias, saúde e felicidade; **Victor Yunes**, pelos anos compartilhando a convivência e aprendizado, pela receptividade na sua casinha, e ter sido o tio “*Bitol*”; **Daniele Silvano** pelo cuidado, atenção e carinho, **Maurício O. Wilmsen**, ao aprendizado pessoal. Tenho um apreço sem fim, pelos momentos divididos com todos vocês.

A todos não citados, mas que dividiram comigo, em algum momento, boas vibrações e auxiliaram de alguma forma esta conquista.

À **fé** que se manifestou nos momentos julgados intransponíveis e juntamente com ela a lucidez, saúde e sabedoria nas horas de deslize e fraqueza.

Aos **Maine Coons**, que na companhia da Amora se tornaram os gatos mais especiais da minha vida, os verdadeiros responsáveis por essa etapa concluída, agradeço parafraseando Carlos Drummond de Andrade “mais do que a coruja, o gato é símbolo e guardião da vida intelectual”.

Minha mais singela e eterna gratidão.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM- EXTEM), no G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3)..... **44**
- Tabela 2.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM- INTEM), no G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3)..... **45**
- Tabela 3.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM- FIBTEM), no G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3)..... **45**
- Tabela 4.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros hematológicos nos grupos G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3)..... **46**
- Tabela 5.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros bioquímicos nos grupos G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) **46**
- Tabela 6.** Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros do exame de imagem (Ecocardiograma), G1 (gatos não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) e G2 (gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3) **47**
- Tabela 7.** Perfil tromboelastométrico de gatos do grupo G1(n=15), não portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para MCH **103**
- Tabela 8.** Perfil tromboelastométrico de gatos do grupo G1(n=15), portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para MCH **104**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica das variáveis avaliadas na tromboelastometria (ROTEM®)	42
Figura 2	Representação gráfica, das variáveis ROTEM®, para as análises EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, de um gato da raça Maine Coon, não portador da mutação A31P-MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica (G1).....	45
Figura 3	Representação gráfica, das variáveis ROTEM®, para as análises EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, de um gato da raça Maine Coon, não portador da mutação A31P-MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica (G1)	46
Figura 4	Boxplot das variáveis EXTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3	50
Figura 5	Boxplot das variáveis INTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3	51
Figura 6	Boxplot das variáveis FIBTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3.....	52
Figura 7	Boxplot para a variável ALB: albumina, quando comparados os grupos de gatos da raça Maine Coon não portador (G1) e portador (G2) da mutação A31P no gene MYBPC3.....	53
Figura 8	Boxplot para as variáveis DVEs: diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e DVEd: diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole, quando comparados os grupos de gatos da raça Maine Coon: não portador (G1) e portador (G2) da mutação A31P no gene MYBPC3	53

- Figura 9** Boxplot das variáveis no EXTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores da mutação A31P no gene MYBCP3 sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++)
- Figura 10** Boxplot das variáveis no INTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores da mutação A31P no gene MYBCP3 sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++)
- Figura 11** Boxplot das variáveis no FIBTEM® pela tromboelastometria (ROTEM®). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores da mutação A31P no gene MYBCP3 sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++)

54

55

56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato
ATP – adenosina trifosfato
ALT – alanina amino transferase
AST- aspartato amino transferase
AT – Antitrombina
CAVD- miocardiopatia arritmogênica ventricular direita
CFT – tempo de formação do coágulo
CK- creatina quinase
CT – Tempo de coagulação
DVE_d - diâmetro diastólico final da cavidade do ventrículo esquerdo
DVE_s- diâmetro sistólico final da cavidade do ventrículo esquerdo
EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético
EXTEM® – Ativador de fator tecidual
FA – Fosfatase alcalin
FC- frequência cardíaca.
FIBTEM® – Fator tecidual ativado (EXTEM®) + citocalasina
FvW- fator de von Willebrand
FT- fator tecidual
g/dL – Gramas por decilitro
GGT – gama glutamil transferase
ICC- insuficiência cardíaca congestiva
INTEM® – Ativador de contato
MAS- movimento anterior sistólico
MCD- miocardiopatia dilatada
MCF – firmeza máxima do coágulo
MCH- Miocardiopatia hipertrófica
mg/dL – miligramas por decilitro
MCR- miocardiopatia restritiva
MYBPC3- gene da proteína C miosina ligante
LM – lise máxima
PK- pré kaliceína
PVE_d- espessura da parede livre do ventrículo esquerdo no final da diástole
SIV_d- espessura do septo interventricular no final da diástole
SIV_d/PVE_d, relação septo-parede na diástole
sPECAM-1- Molécula 1 de aderência de células endoteliais solúveis em plaqueta
TAX2- tromboxano A₂
TAT- complexo trombina antitrombina
TDE- tempo de desaceleração da onda E
TEA – tromboembolismo arterial
TEM – tromboelastometria
TP – Tempo de protrombina
TRIV- tempo de relaxamento isovolumétrico
TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada
U/L – Unidade internacional por litro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	18
1.INTRODUÇÃO	19
2.REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Miocardiopatias em felinos	21
2.1.1 Miocardiopatia hipertrófica.....	22
2.1.2 Diagnóstico e tratamento.....	25
2.2 Hemostasia.....	27
2.2.1 Hemostasia e Tromboembolismo relacionados a MCH.....	31
2.2.2 Tromboelastometria.....	34
2.2.3 Interpretação dos parâmetros ROTEM em felinos	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivos gerais	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Seleção dos animais	39
4.2. Colheita de Amostras	40
4.3. Exames Laboratoriais	41
4.3.1 Tromboelastometria.....	41
4.3.2 Hemograma.....	42
4.3.3 Bioquímica sérica	42
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSSÃO	57
8 CONCLUSÃO	63
9.REFERÊNCIAS	64
CAPITULO II	71
CAPITULO III	85
ANEXOS	97
Anexo 1 Atestado de Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais	98
Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	99

Anexo 3. Modelo do exame genético da mutação A31P-MYBPC3 para MCH.....	100
Anexo 4. Intervalos de Referência para os parâmetros do ROTEM® em gatos.....	101
Anexo 5. Intervalos de Referência Bioquímicos e Hematológicos de gatos.....	102
Anexo 6. Perfil Tromboelastométrico dos animais avaliados G1 (n15)	103
Anexo 7. Perfil Tromboelastométrico dos animais avaliados G2 (n=15)	104
Anexo 8. Normas para submissão de artigos Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	105
Anexo 9. Normas para submissão de artigos para Pesquisa Veterinária Brasileira.....	111

ASSUNÇÃO, P.C.F. **Tromboelastometria (ROTEM) em gatos da raça Maine Coon portadores e não portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica**. Botucatu, 2019. 111p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

A miocardiopatia hipertrófica é a doença cardíaca mais observada em gatos da raça Maine Coon e está diretamente relacionada à presença de uma mutação (A31P) que ocorre no gene da proteína C miosina ligante (MYBPC3). A doença pode provocar em determinados pacientes quadros secundários graves como o tromboembolismo arterial (TEA). O objetivo do presente trabalho foi avaliar gatos da raça Maine Coon não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3 (G1) e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3 (G2), por meio do perfil tromboelastométrico. Foram selecionados no estudo 15 gatos pertencentes ao grupo G1 e 15 gatos G2, previamente avaliados para A31P-MYBPC3, tendo como critério de inclusão a presença ou não da mutação e hígidez clínica e laboratorial para hemograma e provas de bioquímicas séricas. A coleta das amostras ocorreu em momento único após avaliação ecocardiográfica. A análise estatística foi realizada por meio de análise descritiva dos dados seguida da comparação dos grupos ao nível de 5 % de significância. No presente estudo o perfil pela tromboelastometria (TEM) não identificou diferenças quando comparados os grupos G1 e G2, portanto os animais não demonstraram variações de coagulabilidade. A concentração sérica de albumina foi significativamente menor no G2, mas se manteve dentro dos intervalos de referência para a espécie. No ecocardiograma foi observada alteração no volume diastólico final no G2, indicando a presença de possível disfunção diastólica. O G2 também apresentou diminuição de tempo de coagulação (CT) e aumento de lise máxima (LM), no INTEM em relação aos intervalos de referência para a espécie, porém, o perfil tromboelastométrico não evidenciou alterações de coagulabilidade quando comparados os grupos. Os resultados revelam a importância da associação das alterações do ecocardiograma com exames laboratoriais específicos como a tromboelastometria, especialmente em animais geneticamente predispostos.

Palavras chave: hemostasia, hipercoagulabilidade, ecocardiograma, tromboembolismo, diastólica.

ASSUNÇÃO, P.C.F. **Tromboelastometry (ROTEM) in Maine Coon breed cats carriers and no carriers of A31P mutation in the MYBPC3 gene for hipertrophic myocardiopathy.** Botucatu, 2019, 111p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Hypertrophic cardiomyopathy is the most observed heart disease in Maine Coon cats and is directly related to the presence of a mutation (A31P) occurring in the myosin binding protein C (MYBPC3) gene. The disease can cause serious side effects such as arterial thromboembolism (ATE) in certain patients. The objective of the present study was to evaluate the thromboelastometric profile in cats Maine Coon breed without mutation A31P on MYBPC3 gene (G1) and mutation carrier (G2). Thirty cats previously evaluated for A31P-MYBPC3 were divided into G1 and G2 groups (n=15). The inclusion criteria were the presence or absence of mutation and clinical data, blood counts and serum biochemistry within reference intervals. The samples were taken at a single moment after an echocardiographic evaluation. Statistical analysis was performed through descriptive data analysis followed by comparison of groups at the 5% level of significance. In the present study, the profile by thromboelastometry (TEM) did not identify differences when comparing groups G1 and G2, and the animals showed no coagulability variations. Serum albumin concentration was significantly lower in the mutation carrier group (G2), but it remained within the reference intervals for the species. On the echocardiogram, a change in final diastolic volume was observed in the carrier group, indicating that the carrier animals should be evaluated to previous identification of possible diastolic dysfunction. The carrier group also presented a decrease of CT and an increase of ML in INTEM in relation to the reference values for the species, but the thromboelastometric profile did not identify coagulability changes when comparing both groups. The results demonstrated the importance of the association of the echocardiogram profile with specific laboratory tests such as thromboelastometry, mainly in genetically predisposed cats.

Key words: hemostasis, hipercoagulability, echocardiogram, tromboembolism, diastolic.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As miocardiopatias em felinos constituem as maiores causas de morbidade e mortalidade em felinos cardiopatas, e a miocardiopatia hipertrófica (MCH) é a mais prevalente das desordens cardíacas, sugerindo um caráter hereditário principalmente em felinos com raças de pelo curto (FOX E SCHOBER, 2015).

A apresentação desta doença em felinos se assemelha, em aspectos clínicos e patológicos, com quadros clínicos observados em seres humanos e, portanto, representa uma oportunidade de estudo como modelo experimental. Acredita-se que nenhuma outra espécie desenvolva a MCH espontaneamente como observado no ser humano e no felino. (MARON E FOX, 2015).

A doença quando manifestada em felinos é comumente associada a morte súbita, falência cardíaca progressiva, e tem como principal complicação o tromboembolismo. Assim como em seres humanos, a fisiopatogenia da MCH está associada à obstrução ventricular esquerda e/ou a disfunção diastólica progressiva (FOX et al., 2014).

Os felinos domésticos da raça Maine Coon, apresentam a mutação do gene sarcomérico da proteína C miosina ligante, uma herança genética autossômica que pode alterar mecanismos fisiológicos causando hipertrofia ou disfunção diastólica no coração (GODIKSEN, 2011). A avaliação da presença desta mutação tem favorecido o controle dos animais portadores e a realização do controle reprodutivo dos mesmos e assim evitar a disseminação do gene de origem familiar (PELLEGRINO, 2014).

Doenças do miocárdio são doenças complexas e heterogêneas, e os mecanismos de resposta e progressão foram pouco estudados (HAGGSTROM, 2015). Em seres humanos, a ativação plaquetária e o aumento da expressão de P-selectina expressão estão associadas à inflamação do miocárdio, infarto do miocárdio e cardiomiopatia (WEIKERT et al., 2002; SCHMALBACH et al., 2015, LI et al., 2016). A presença de reatividade plaquetária, pode indicar eventos tromboembólicos e gatos com MCH é observada alteração da função plaquetária, e gatos da raça Maine Coon que possuem a mutação (A31P) na proteína C miosina ligante (MYBPC3) apresentaram aumento da expressão de P-selectina, indicando que as plaquetas podem desempenhar um papel importante nos estados de hipercoagulabilidade na MCH para esta espécie (TABLIN et al., 2014; LI et al., 2016).

A avaliação pré-clínica de animais portadores assintomáticos pode refletir em uma maior sobrevivência dos animais, como já observado em seres humanos (FOX et al., 2018). A avaliação do perfil hemostático destes animais, por meio da tromboelastometria (TEM) não foi descrita ou relatada, portanto a avaliação de possíveis quadros de hipercoagulabilidade relacionados a miocardiopatia hipertrófica em animais portadores não foi elucidada.

Levando-se em consideração as dúvidas a respeito da avaliação das cardiomiopatias hipertróficas felinas, prognóstico e diagnóstico da doença e suas complicações relacionadas ao estado de hipercoagulabilidade, o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil tromboelastométrico de gatos portadores da mutação MYBPC3 que predispõe o possível desenvolvimento da MCH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Miocardiopatias em felinos

As miocardiopatias são doenças amplamente estudadas na medicina por mais de quatro décadas, e foram identificadas principalmente em gatos apesar de acometerem diversas outras espécies, incluindo cães. O quadro clínico destas doenças se assemelha quando comparados felinos e seres humanos, e representa uma oportunidade de estudo como modelo experimental. Acredita-se que nenhuma outra espécie desenvolva a miocardiopatia hipertrófica (MCH) espontaneamente como observado no homem e no felino (BATY, 2004; ABBOT, 2010; CÔTÉ et al., 2011).

Existem diferentes classificações para as miocardiopatias, mas atualmente a utilizada amplamente é a categorização quanto a etiologia: em primárias ou idiopáticas (afecções inerentes ao miocárdio); ou secundárias (outras doenças cardíacas, metabólicas ou vasculares). E quanto à função cardíaca em: as que causam disfunção sistólica, disfunção diastólica ou ambas (CÔTÉ et al., 2011; PELLEGRINO, 2014, CÔTÉ, 2017).

A miocardiopatia hipertrófica (MCH) se inclui no grupo de miocardiopatias mais prevalentes e a principal causa de morbidade e mortalidade em gatos (FOX e SCHOBBER, 2015), acompanhadas da miocardiopatia dilatada (MCD), miocardiopatia restritiva (MCR) e miocardiopatia arritmogênica ventricular direita (CAVD) As alterações provocadas por estas doenças, se referem a característica principal: o disfunção estrutural e funcional dos músculos cardíacos (BRIZARD et al., 2009; WARE et al., 2007).

A MCH é uma doença considerada primária relacionada ao miocárdio e com amplo aspecto morfológico e clínico. Embora a maioria dos animais permaneçam assintomáticos, podem ocorrer complicações como insuficiência cardíaca congestiva e tromboembolismo arterial (TEA). A etiologia destas doenças não está amplamente esclarecida, mas sabe-se que felinos das raças Maine Coon, Ragdoll, Persa, têm predisposição genética para desenvolvê-las (FOX et al., 2018).

Em um estudo retrospectivo, foi observado que avaliação pré-clínica de animais assintomáticos para miocardiopatias, pode refletir em uma maior sobrevivência dos animais, como já é observado em seres humanos (FOX et al., 2018). Ainda existem muitas dúvidas relacionadas a miocardiopatia hipertrófica e a coagulabilidade destes pacientes.

2.1.1. Miocardiopatia hipertrófica (MCH)

A miocardiopatia hipertrófica (MCH) foi reconhecida há mais de cinquenta anos, com a primeira descrição da doença em seres humanos publicada em 1958, seguida do primeiro relato clínico no início da década de 1960 (TEARE, 1958). Desde então, estudos clínicos, bioquímicos, patológicos e genéticos fizeram um enorme progresso para entender melhor essa doença (UEDA e STERN, 2017). Em gatos, a prevalência da doença descrita na literatura varia de 8,5% (HAGGSTROM et al., 2015) a 41,5% (PAIGE et al., 2009), com diferenças de acordo com o estudo e com o padrão racial avaliado.

A MCH em felinos quando está ligada a característica hereditária familiar está relacionada ao miocárdio e é caracterizada por espessamento assimétrico das paredes do ventrículo esquerdo, que não pode ser relacionada com doença cardíaca prévia ou doença sistêmica, como hipertireoidismo, acromegalia e hipertensão arterial secundária (SCHOBER et al., 2016). A doença é geralmente associada a mutações na codificação do sarcômero com variáveis fenotípicas diferentes devido a sua característica de penetrância variável, por exemplo, em alguns animais portadores da mutação a ocorrência de alteração no espessamento da parede ventricular nem sempre é observada (HAGGSTROM, 2015; FREEMAN et al., 2017).

Os gatos machos, jovens ou idosos são os principais acometidos por esta doença, mas a idade média para o diagnóstico da doença pode variar de quatro meses, cinco anos e meio, até os 17 anos de idade principalmente com relação à predisposição racial, por exemplo: gatos da raça Ragdoll e Maine Coon, têm apresentação precoce da doença, enquanto nos Persas o diagnóstico é evidenciado em animais idosos (WARE et al., 2007; FERASIN 2012; PAYNE et al., 2015). Uma particularidade da raça Maine Coon é que animais jovens (um ano e meio até três anos de idade) que apresentam a manifestação clínica da doença têm sinais de insuficiência cardíaca congestiva e vêm a óbito; já em pacientes da raça Ragdoll, estas alterações podem ocorrer antes do primeiro ano de vida (TREHIYOU-SECHI et al., 2012; BORGÉAT et al., 2014; KIMURA, 2016). Os felinos da raça Maine Coon, merecem destaque, pois os aspectos hereditários, fenotípicos e características fisiológicas da MCH são similares às observadas na MCH em seres humanos de origem familiar (KITTELSON et al., 1999; MEURS et al., 2005; ABBOTT et al., 2010; CÔTÉ et al., 2011).

Uma mutação para a miocardiopatia hipertrófica foi identificada no gene

sarcomérico da proteína C miosina ligante (MYBPC3) em gatos Maine Coon. Essa identificação é importante, pois atribui a MCH o padrão de doença genética de origem autossômica dominante (MEURS et al., 2005; MCDONALD et al., 2007; GODIKSEN et al., 2011). Acredita-se que em outras raças possam existir mutações que levem ao desenvolvimento das miocardiopatias, similares a MYBPC3 ou que alterem mecanismos fisiológicos, como por exemplo, o transporte de cálcio no miocárdio e aumento da sensibilidade do miocárdio às catecolaminas, resposta anormal de hipertrofia frente à isquemia, à fibrose ou a fatores tróficos, anormalidade colágena primária, influência relacionada à taxa de crescimento e fatores nutricionais (BATE, 2004; BONAGURA, 2010; BORGEAT et al., 2014). Em seres humanos, mesmo com o grande número de genes descritos, ainda não foram bem elucidados os mecanismos que desencadeiam a manifestação fenotípica da MCH (MARSIGLIA et al., 2014; MARSIGLIA e PEREIRA, 2014).

Uma das teorias a respeito da fisiopatologia da MCH relacionada às mutações MYBPC3 é que quando presente ela promove uma redução da contração e função dos sarcômeros, e que o miocárdio supostamente sofreria remodelamento, compensando essa alteração, com consequente substituição dos sarcômeros alterados por outros adicionais, causando assim hipertrofia e rearranjo de miócitos e miofibrilas (KITTLESON et al., 1999; MEURS et al., 2005; MCDONALD et al., 2007; GODIKSEN et al., 2011).

A disfunção diastólica é a principal alteração observada na MCH, relacionada ao relaxamento cardíaco, pelo espessamento miocárdico, o qual leva ao aumento da rigidez ventricular e, desta forma, à alteração no enchimento ventricular esquerdo e aumento das pressões diastólicas tanto no átrio quanto no ventrículo (CONNOLLY et al., 2003; HÄGGSTRÖM, 2015; SCHOBER et al., 2016; FOX et al., 2018).

O relaxamento ventricular inicial (processo ativo) fica mais lento ou incompleto, aumentando o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), o que diminui o preenchimento ventricular inicial e aumenta a importância da contração atrial para o preenchimento do ventrículo (FERASIN, 2009). A presença de fibrose e alterações no miocárdio podem contribuir com o desenvolvimento de rigidez anormal do ventrículo esquerdo, pois colaboram com pressões de enchimento progressivas e maiores. O átrio aumenta de tamanho, às vezes de forma acentuada, mas o volume ventricular esquerdo permanece normal ou diminuído (CONNOLLY et al., 2003; MCDONALD et al., 2007; WARE, 2007).

Existem descritos na literatura padrões de hipertrofia para MCH: a hipertrofia simétrica difusa que compromete o septo ventricular e a parede do ventrículo esquerdo; a hipertrofia assimétrica difusa, que atinge principalmente o septo interventricular; a hipertrofia segmentada restrita, ou restritiva à parede ventricular; a segmentada, que atinge fragmentos não adjacentes do septo interventricular e do ventrículo esquerdo, e, por último, existem as relacionadas apenas aos músculos papilares (FERASIN, 2009; PELLEGRINO et al., 2014).

O movimento anterior sistólico da valva mitral (MAS) e seu contato com o septo ventricular são causados pela hipertrofia ventricular e obstrução da via de saída do ventrículo esquerdo (VE) em animais com MCH. A característica principal do MAS é um movimento abrupto do folheto anterior (septal) da valva mitral em direção ao septo interventricular (SIV). Os movimentos anormais da valva mitral promovem um estreitamento da região e obstrução da via de saída do volume sanguíneo, uma vez que a via de saída do VE tem comunicação com o folheto dessa valva e com a parte proximal do SIV; portanto, a inadequada abertura da valva mitral e a regurgitação de sangue para o átrio esquerdo (AE) resultam em estase e predisposição à formação de trombos (CHETBOUL et al., 2007; DANDEL et al., 2009; FERASIN, 2009; SCHOBER et al., 2016).

Nas miocardiopatias, pode-se observar regurgitação pela valva mitral devido à presença de mudanças estruturais do ventrículo esquerdo e dos músculos papilares, ou à movimentação sistólica anormal, as quais podem impedir o fechamento normal da mitral. O volume regurgitado por sua vez promoverá aumento de volume e pressão atrial esquerda, levando a quadros de congestão e edema pulmonar (MCDONALD et al., 2007). A função sistólica nos animais acometidos em sua maioria encontra-se normal, mas alguns gatos apresentam taquicardia e disfunção diastólica regional secundária à presença de infarto ou isquemia miocárdica (BONAGURA, 2010). Acredita-se que cerca de um quarto a um terço dos gatos com MCH apresentem hipertrofia septal assimétrica e grau de regurgitação na tricúspide (WARE, 2007; FERASIN, 2009).

A avaliação do diâmetro, volume, e função do átrio esquerdo têm valor indicativo de cronicidade e gravidade da disfunção diastólica observada na MCH, e quando associada à insuficiência cardíaca pode apresentar sinal de função contrátil atrial reduzida. Em alguns gatos com MCH, além de congestão e edema pulmonar, pode-se observar o desenvolvimento de efusão pleural, geralmente transudato modificado, em

consequência à insuficiência cardíaca, pelo aumento da pressão venosa pulmonar e aumento da pressão hidrostática (CÔTÉ et al., 2011; LINNEY et al., 2014).

Em quadros clínicos relacionados à MCH, são observados sinais discretos ou acentuados que podem levar a quadros de dispneia, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, acidente vascular cerebral e, em algumas situações, apresentação grave e morte súbita (MARSIGLIA et al., 2014).

A triagem dos animais por raça e faixa etária auxilia no exame físico do paciente felino com suspeita de miocardiopatia, pois o prognóstico está relacionado ao aumento do átrio esquerdo, idade e raça dos animais acometidos. A identificação de sopros e arritmias durante a auscultação nem sempre é possível em gatos portadores da doença, e não podem ser considerados sinais característicos ou específicos para o diagnóstico da MCH (PAIGE et al., 2009; PAYNE et al., 2013; PELLEGRINO et al., 2014).

O número de animais diagnosticados com a doença tem crescido durante os anos com ao avanço da tecnologia e ferramentas diagnósticas como o ecocardiograma além da preocupação e conscientização dos tutores na busca pelo tratamento clínico (PELLEGRINO et al., 2014).

2.1.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico de MCH é feito a partir dos sinais clínicos apresentados, da anamnese e do exame físico com auxílio de exames complementares, como ecocardiografia, radiografias e eletrocardiograma. Dentre estes exames a ecocardiografia é o método complementar de eleição para o diagnóstico das cardiomiopatias felinas (DANDEL et al., 2009). O método permite uma avaliação não invasiva da estrutura e função cardíaca bem como define os diferentes tipos de miocardiopatias (FERASIN, 2009). Os gatos com MCH discreta podem permanecer assintomáticos por anos, muitas vezes atendidos apenas quando apresentam manifestações respiratórias ou sinais de TEA agudo (FOX et al., 2015).

Na ecocardiografia para diagnóstico da miocardiopatia, pode-se destacar como características da MCH os seguintes achados: espessura da parede diastólica ≥ 6 mm, músculos papilares aumentados, obliteração da via de saída do ventrículo esquerdo e aumento da fração de encurtamento, aumento do átrio esquerdo, hipertrofia ventricular direita, TRIV prolongado, dilatação de átrio direito (CHETBOUL, 2012 ; FUENTES E WILKIE, 2015).

Idealmente, o tratamento das miocardiopatias em felinos deve ser direcionado na resolução de todos os mecanismos patogênicos da doença, como a disfunção diastólica e sistólica, obstrução do fluxo de saída, isquemia, arritmias, ativação neuro-hormonal ativação e estado de hipercoagulabilidade (FERASIN, 2009). Deve-se também levar em consideração as terapias que melhoram a atividade e função do miocárdio e que podem levar à relaxamento ventricular esquerdo e diminuir a pressão e dilatação atrial esquerda, reduzindo assim o risco de formação de trombos (HOGAN et al., 2017).

Um estudo de marcadores de coagulação (complexo trombina-antitrombina, D-dímeros e produtos de degradação da fibrina) mostrou que 45% dos gatos com MCH apresentavam estado de hipercoagulabilidade. Contudo, os resultados dos testes de coagulação não foram correlacionado com o tamanho do AE e uma associação entre hipercoagulabilidade e o risco trombótico ainda tem que ser documentado em gatos com MCH (BEDARD et al., 2007).

Os testes diagnósticos de rotina, como tempo de coagulação, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), não são os testes mais indicados para detecção de condições de hipocoagulabilidade e ou hipercoagulabilidade. Como a trombose pode ocorrer devido a qualquer combinação de aumento de atividade de fatores pró-coagulantes, diminuição da atividade endógena anticoagulante, decréscimo da fibrinólise, estase sanguínea ou dano vascular endotelial, esses testes provavelmente não preverão o risco geral de trombose (DENGATE et al., 2014). Portanto, a avaliação da cascata de coagulação e de quadros de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade têm sido validadas por outras técnicas como a tromboelastometria.

Atualmente, testes relacionados a tromboelastometria têm sido estudados para avaliação ampla e diferenciação dos estados de hipo e ou hipercoagulabilidade e podem ser utilizados em distúrbios relacionados a hemostasia e a cardiopatias em animais (DOEDERLIN E MISCHKE, 2015).

Uma grande limitação de estudos retrospectivos que visam estabelecer fatores prognósticos é a inerente variabilidade dos mesmos, como por exemplo, o acompanhamento dos pacientes após o diagnóstico (escolha de diferentes fármacos e doses). Além disso, os critérios para classificação da alteração da doença miocárdica ao longo do tempo podem ser influenciados por avaliações subjetivas (SMITH et al., 2003; FERASIN, 2009).

Gatos com formas assintomáticas de miocardiopatias, mas com evidência ecocardiográfica de trombos intracavitários, contraste de eco espontâneo ou dilatação grave do AE, podem se beneficiar da profilaxia antitrombótica para reduzir o risco de tromboembolismo (SMITH et al.,2003; HOGAN et al.,2004; LI et al., 2016).

2.2. Hemostasia

A hemostasia é um mecanismo de defesa do organismo para controle da hemorragia dos vasos sanguíneos lesados, objetivando a reparação tecidual e vascular. É um processo complexo e dinâmico que ocorre em duas fases distintas e sobrepostas (DODERLIN E MISCHKE, 2015).

A hemostasia primária envolve a adesão de plaquetas ao endotélio vascular lesado promovendo a formação de um tampão plaquetário. A hemostasia secundária envolve a conversão enzimática dos fatores de coagulação a fim de estabilizar o tampão plaquetário e formar o coágulo de fibrina. Esta fase tradicionalmente é descrita como um modelo em cascata com ativação de fatores de coagulação dentro de vias intrínsecas e extrínsecas para formar e depositar fibrina para estabilização do tampão plaquetário primário. Em indivíduos saudáveis, a fibrinólise equilibra a via de coagulação e degrada o coágulo (SONG, DROBATZ e SILVERSTEIN, 2016). Os fatores que promovem a coagulação, que inibem a coagulação e promovem a fibrinólise normalmente interagem em harmonia com a finalidade de prevenir perdas sanguíneas. O endotélio intacto produz fatores com efeitos antiplaquetários, anticoagulantes e fibrinolíticos. A hemostasia eficaz deve ser rápida e localizada (BROOKS, 2004; WARE, 2010).

O desenvolvimento de modalidades diagnósticas promoveu o crescimento de pesquisas relacionadas a hemostasia, pois aumentaram a capacidade de estudar detalhadamente as interações biológicas relacionadas ao processo hemostático. O novo modelo de hemostasia foi introduzido em 1996, “modelo celular”, onde a interação entre o tônus vascular, fluxo sanguíneo, células endoteliais, plaquetas, fatores de coagulação, fatores fibrinolíticos e seus cofatores e inibidores, resultariam no processo hemostático. Este é um modelo dinâmico, que envolve regulação celular em três fases - iniciação, amplificação e propagação. Estes estudos confirmaram o papel do fator tecidual e da atividade plaquetária (CAMERER et al., 1996; HOFFMAN et al.,1996).

Foi estabelecida uma ligação entre a inflamação, o sistema imune e o sistema hemostático. Em estados inflamatórios ou patológicos, monócitos, endotélio e

plaquetas expressam fator tecidual (FT). As sequências de FT do FVIIa e do FXa iniciam as vias de transdução do sinal intracelular, que induzem a produção de fatores de transcrição necessários para a síntese de proteínas adiçãoicas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. Esta ativação da coagulação na inflamação leva à produção de trombina, um potente ativador de plaquetas. Uma das consequências dos estudos realizados com hemostasia foi a compreensão do papel chave que as plaquetas têm na etiologia dos estados de hipercoagulabilidade, incluindo a doença tromboembólica (WINNBERG et al., 2012).

A disfunção plaquetária têm causas extrínsecas e intrínsecas. A causa mais comum de distúrbios extrínsecos é a doença de von Willebrand. Diminuição nas concentrações de fibrinogênio, seja hipofibrinogenemia ou disfibrinogenemia, também podem causar alterações, porque o fibrinogênio é necessário para a agregação plaquetária. Formas adquiridas de alteração de fibrinogênio são mais frequentes que as formas genéticas. Os distúrbios intrínsecos afetam a função de plaquetas e essas alterações podem surgir de anormalidades em receptores de membrana, grânulos de armazenamento ou transdução de sinal (CARR E PANCIERA, 2009; BOUDREAUX, 2012; BARR E MCMICHAEL, 2012).

O fator von Willebrand (FvW) é necessário para esta adesão, desencadeando ativação plaquetária e produção de adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A₂ (TXA₂). A liberação local de ADP e TXA₂ ativa as plaquetas adicionais, levando a recrutamento adicional das mesmas (FUENTES, 2012). O tampão de plaquetas inclui um número crescente de plaquetas ligadas em ponte pelo fibrinogênio, ligando os locais dos receptores de integrina das plaquetas. O endotélio normalmente produz fatores que ajudam a manter a "tromboresistência". Estes fatores antitrombóticos incluem antitrombina, trombomodulina, ativador de plasminogênio tipo tecido (tPA), prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico. Velocidades altas de fluxo sanguíneo estão associadas com a produção de óxido nítrico mediada pelo esforço de cisalhamento, enquanto que a estase sanguínea pode reduzir esse efeito antitrombótico (FUENTES, 2003).

A formação patológica de trombos ocorre quando doenças ou fármacos subvertem os mecanismos destinados a impedir a ativação plaquetária, na resposta hemostática à lesão e as plaquetas são então ativadas por colágeno ou trombina. Em condições determinadas, as plaquetas podem se ligar diretamente ao colágeno

exposto. Nas artérias, o fluxo sanguíneo intenso limita a formação de fibrina ao diluir rapidamente os fatores de coagulação solúveis. As plaquetas são ativadas mais rapidamente nas artérias, onde formam uma barreira física contra a perda de sangue e, ao mesmo tempo, fornecem uma superfície para a geração de trombina (WINNBERG et al., 2012).

Lesões teciduais presentes nas artérias também ajudam a expor o domínio A1 em múltiplos do FvW, que se liga às fibras colágenas expostas, resultando em uma alteração estrutural mediada por uma molécula que permite a glicoproteína plaquetária-Ib (GP-Ib) a ligar-se ao domínio fVW1, aderindo assim as plaquetas, o que retarda o progresso por tempo suficiente para facilitar o contato entre os receptores plaquetários e seus agonistas (THIJS et al., 2010; WINNBERG et al., 2012).

Os eritrócitos auxiliam no processo de marginalização das plaquetas nos vasos, deslocando as plaquetas para mais perto da parede do vaso e também em parte fornecendo uma fonte de adenosina difosfato (ADP) após a lesão. Patologicamente, fluxos intensos e empilhamento celular podem ativar as plaquetas diretamente, mas, em geral, vários agonistas presentes no tecido subcutâneo lesionado do endotélio cujos receptores são expressos na superfície das plaquetas, ativam as plaquetas. Os agonistas e seus respectivos receptores envolvidos na ativação plaquetária incluem colágeno (GP VI e $\alpha 2\beta 1$), trombina (PAR1 e PAR4), ADP (ADP; P2Y1 e P2Y12) e tromboxano A2 (TxA2; TP) (SANTOS et al., 1991; WINNENBERG et al., 2012).

Deficiências dos fatores de fatores de coagulação, são menos comuns do que as relacionadas à causas genéticas, mas podem ocorrer e resultam em TTPa prolongado, sem evidências de perda de sangue ao exame clínico. A deficiência do fator XII é bem reconhecida, particularmente gatos. (BROOKS, 1999; BROOKS, 2010). Devido à sua alta prevalência em gatos, a deficiência de fator XII deve ser considerada em gatos com TTPa prolongado, TP normal e sem evidência de sinais clínicos relacionados a perda de sangue. A confirmação da deficiência deste fator é realizada em um ensaio funcional simples de FXII, para avaliação do fator, e é importante, pois pacientes portadores desta deficiência não necessitam de terapia específica (BROOKS, 2010; BARR E MCMICHAEL, 2012).

Em seres humanos, cães, gatos e camundongos, uma mutação do gene FXII ou pré-kallicreína (PK), não causam alterações hemostáticas (MULLER E RENNÉ, 2008). O papel do FXII na hemostasia fisiológica ainda é investigado, mas o papel

para FXII e FXI na formação de trombo já foi demonstrado (RENNÉ, 2005; MCMICHAEL, 2012). As mutações genéticas do FXII e FXI parecem conferir alguma proteção contra a formação de trombose patológica em seres humanos, sugerindo que a via intrínseca pode desempenhar um papel na formação patológica de trombose *in vivo*. Portanto, existe suporte para uma teoria que FXII e FXI são importantes para a trombose, mas não para hemostasia e que, talvez, estas sejam entidades distintas (RENNÉ 2005; GAILANE E RENNE 2007; MCMICHAEL, 2012).

O modelo da cascata foi fundamental para a compreensão da coagulação *in vitro* e possibilitou a criação dos testes usados comumente na rotina clínica que são essenciais para a identificação de deficiências nas vias extrínseca, intrínseca e comum de coagulação. O modelo também foi essencial na elucidação do papel de vários dos inibidores da coagulação e é atualmente usado para demonstrar coagulação como em um ambiente estático, desprovido de interações endoteliais. Em contrapartida ao modelo *in vitro*, surgiu-se o modelo celular *in vivo*, que indica que nem sempre os fatores de contato são necessários para desencadear a coagulação e existem múltiplas interações entre as vias intrínseca e extrínseca (MCMICHAEL, 2012).

Os mesmos estímulos responsáveis pela ativação da fase de contato da coagulação também ativam as vias fibrinolíticas. A fibrinólise ou trombólise é um mecanismo de proteção do organismo muito importante, já que previne a excessiva formação de coágulo ou trombo. A fibrinólise deficiente provavelmente atua na trombose (KOL e BORJESSON, 2015).

Quadros de hipercoagulabilidade resultam de um desequilíbrio sistêmico dos fatores de coagulação e seus inibidores, que favorecem a formação de trombos. Este desequilíbrio pode ser causado pelo excesso dos fatores de coagulação (por exemplo, fibrinogênio e Fator VIII) e deficiência de inibidores (por exemplo, antitrombina- AT) e é caracterizada pelo aumento nas concentrações de produtos formados durante a geração de trombina (por exemplo, fragmento de protrombina) ou como consequência da atividade da trombina (por exemplo, fibrinopeptídeo A, complexo trombina-antitrombina (TAT) e Dímeros D).

Um estado de hipercoagulabilidade sistêmica pode ser identificado em muitas miocardiopatias em seres humanos, e estudos sugerem que nas miocardiopatias em felinos, mesmo que subclínicas, estados hipercoaguláveis têm sido identificados com

base no aumento das concentrações de TAT e dímeros D (BEDARD et al., 2007; BRAZZELL E BORJESSON, 2007; STOKOL et al., 2008).

2.2.1. Hemostasia e tromboembolismo relacionados a MCH

Doenças que causam danos endoteliais graves ou disseminados promovem perda das funções endoteliais antiplaquetárias, anticoagulantes e fibrinolíticas normais. A trombose patológica é favorecida pelo aumento da coagulabilidade e da ativação plaquetária. O endotélio lesado libera fator tecidual e fatores antifibrinolíticos e o tecido subendotelial exposto causa trombose por agir como substrato à formação de coágulos e estimular a adesão e a agregação plaquetárias. Em todas as formas de miocardiopatia felina há lesão miocárdica. Estas lesões podem desencadear um processo trombótico por indução da adesão e agregação das plaquetas aos substratos expostos pelo tecido lesionado com subsequente ativação da cascata de coagulação. A trombose é capaz de causar sequelas clínicas, podendo ser diagnosticadas apenas na necropsia ou ainda, nunca ser descoberta. A localização e o tamanho dos coágulos são fatores que irão definir o grau de comprometimento funcional da área atingida (PAYNE et al., 2015).

Os três processos que podem promover a trombose são denominados Tríade de Virchow, sendo: alterações na superfície endotelial: anomalia da estrutura ou função endotelial causando lesão ou ruptura, o que gera a ativação da coagulação intravascular; alterações na circulação sanguínea: diminuição da velocidade ou estase do fluxo sanguíneo; alterações na composição do sangue: estado de hipercoagulação, causado pelo aumento de substâncias pró-coagulantes ou redução na atividade de fatores anticoagulantes e/ou diminuição ou comprometimento dos fatores fibrinolíticos (SMITH E TOBIAS, 2004; FOX, 2004; COUTO, 2010; WARE, 2010).

O conceito de estase sanguínea, mais apropriadamente referido como “deficiência de circulação”, é considerado como um fator de risco para o tromboembolismo. A circulação prejudicada é determinante para o desenvolvimento de trombose, seja pela redução da velocidade de circulação do sangue ou na redução de retorno venoso (congestão). As valvas cardíacas desempenham um papel importante na promoção da circulação e o fluxo diminuído nessa região tem sido associado com hipóxia criando um microambiente suscetível ao desenvolvimento e formação da trombose (De LAFORCADE, 2012).

A contribuição do endotélio em estados trombóticos é tradicionalmente fundamentada na citocinética e expressão do fator tecidual que desencadeia a hemostasia secundária e a produção de fibrina. A lesão tecidual resultante de eventos hipóxicos ocasiona o aumento de plaquetas e o recrutamento de leucócitos e na concentração de fatores de coagulação. Através de estudos retrospectivos relacionados à espécie canina e a presença de hipóxia, as doenças subjacentes mais comuns que predis põem a formação de trombos, incluem doenças imunomediadas, nefropatia com perda de proteínas e enteropatia, várias formas de neoplasia, sepse e doença cardíaca. Além de processos relacionados a doenças, a presença de cateter venoso central e uso de terapia com corticoide também tem sido relatada. Dentre os locais de eleição para presença dos trombos, pode-se destacar, veia esplênica, aorta distal, veia porta, veia cava cranial e vasos pulmonares (De LAFORCADE, 2012).

A ativação plaquetária associada à MCH pode ocorrer devido a uma correlação entre a ativação plaquetária espontânea e a hipertrofia do VE, bem como o aumento da expressão de P-selectina. A associação de doença cardíaca, presença de AE aumentado, lesão endotelial e presença de regurgitação mitral promovem maior ativação de plaquetas e liberação dos componentes de grânulos plaquetários (BEDARD et al., 2007).

Possíveis indicadores de ativação plaquetária são o aumento da reatividade plaquetária e a sensibilidade à agonistas, tais como ADP, a liberação do conteúdo de grânulos das plaquetas e aumentos de moléculas de adesão de células endoteliais solúveis em plaquetas circulantes. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de um estado hipercoagulabilidade e o desenvolvimento de TEA (LI et al., 2016).

Felinos domésticos com doença miocárdica são susceptíveis a formação de trombos intracardíacos e, subsequentemente, a embolização arterial e o desenvolvimento do chamado risco trombótico, devido a estase e o aumento do volume sistólico, associados a miocardiopatia, pois promovem o desenvolvimento de turbulência sanguínea e ativação da coagulação (FOX E SCHOBER, 2015; PAYNE et al, 2015).

Tablin et al. (2014) observaram que as plaquetas não estimuladas (em repouso) de gatos com MCH grave, tiveram aumento significativo da expressão superficial da P-selectina. A P-selectina plaquetária, segundo os autores, é localizada nas membranas de grânulos alfa plaquetários e expressa na superfície plaquetária, e

desempenha um papel fundamental na estabilização de agregados plaquetários, que são formados inicialmente pela interação de fibrinogênio e integrina $\alpha 2b\beta 3a$. Adicionalmente, foi observado um aumento no número de microvesículas CD41-positivas, indicando a presença de ativação. Neste estudo também correlacionaram a presença de sopro cardíaco com o aumento da expressão de P-selectina e concluíram que existe uma associação entre biomarcadores de ativação plaquetária (P-selectina e sPECAM-1- [Molécula 1 de aderência de células endoteliais solúveis em plaqueta]) e miocardiopatia hipertrófica. Devido a tais fatores, as plaquetas de gatos com MCH são pró coagulantes e podem levar a um maior risco de desenvolver TEA.

Stokol et al. (2008) realizaram um estudo utilizando 30 gatos com MCH, demonstram evidências de hipercoagulabilidade mas não relacionados a tromboelastometria em aproximadamente metade dos gatos com formas mais graves de miocardiopatia hipertrófica (por exemplo, naqueles com fluxo sanguíneo reduzido, com imagem de “*smoke*” no átrio esquerdo ao exame ecocardiográfico ou com TEA. Porém, o estudo não definiu quais os fatores que causam o TEA. Já Sakurai et al. (2013), relataram que em pacientes humanos com fluxo sanguíneo reduzido na aorta e no átrio esquerdo, o risco de incidência de TEA é maior e atribuíram tal fator à hipercoagulabilidade.

O infarto miocárdico é um achado incomum na MCH felina, podendo ser causado por TEA, diminuição do fluxo coronariano em função de aterosclerose, vasoespasmos ou aumento substancial da massa ventricular sem que ocorra aumento concomitante no aporte sanguíneo (DA SILVA et al., 2009). Já Schober e Marz (2003), relataram que a estase relacionada a velocidade máxima do fluxo auricular no átrio esquerdo pode contribuir na formação do trombo arterial esquerdo.

As apresentações clínicas mais comuns de miocardiopatia felina são dispneia, cansaço fácil, taquipneia, paresia de membros pélvicos devido ao TEA, cianose em caso de edema pulmonar grave, letargia, anorexia e, algumas vezes, as arritmias são capazes de causar síncope ou morte súbita (BONAGURA e LEHMKUHL, 2006; WARE, 2010). Normalmente ao exame clínico detectam-se sopros cardíacos, ritmo de galope, arritmias, e pelo exame ecocardiográfico podem ser identificados, trombos aderidos ao endocárdio do átrio esquerdo e mais raramente no interior do VE ou aderido à parede ventricular, que podem se desprender e acarretar obstrução da artéria aorta abdominal, na região da trifurcação ilíaca, resultando em neuromiopia

isquêmica dos membros pélvicos. Os pulsos femorais geralmente são fortes, com exceção de casos de TEA aórtico distal (WARE, 2010; PAYNE et al., 2015).

Em casos de disfunção diastólica pode ser observado o relaxamento ventricular alterado, e pressões de preenchimento ventriculares elevadas com menor volume ejetado. Isto gera a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), contribuindo para a congestão venosa pulmonar e para o edema pulmonar, além de efusão pleural e ascite. Além disso, o aumento das pressões de enchimento do VE leva a consequente aumento nas pressões venosa pulmonar e do átrio esquerdo, havendo dilatação progressiva do átrio esquerdo (DA SILVA et al, 2009; WARE, 2010).

A maior parte dos gatos que apresenta TEA por miocardiopatia tem algum grau de dilatação atrial esquerda. A propensão de formação de trombo no átrio esquerdo pode estar relacionada à gravidade da dilatação atrial, uma dimensão atrial esquerda na sístole (DAE) maior que dois centímetros representa um risco significativo para a formação de trombo em gatos com doença cardíaca. Entretanto, os dados disponíveis relacionados ao risco relativo de TEA em função do tamanho atrial esquerdo ainda não foram bem esclarecidos. Sendo assim, um gato com doença cardíaca de gravidade suficiente para resultar em qualquer aumento atrial esquerdo representa um fator de risco para TEA. O aumento do risco pode ser causado por alterações da superfície endotelial, da circulação sanguínea, ou, mais provável, de ambos (SMITH et al., 2003).

Nos exames laboratoriais o hemograma e os exames bioquímicos não demonstram alterações na maioria dos casos de MCH, normalmente essas alterações estão relacionadas a presença de TEA ou uma doença concomitante. Há aumento marcante das enzimas CK, AST e ALT derivadas do músculo esquelético em gatos com TEA nos membros (BONAGURA e LEHMKUHL, 2006; BORGÉAT et al., 2015).

Os sinais clínicos da doença TEA em felinos normalmente são agudos, secundários à isquemia tecidual. Na maior parte dos casos há embolização aórtica distal (trombo em sela) ou artérias braquiais, mas o local da oclusão também depende, além do tamanho do êmbolo, da anatomia das ramificações vasculares (WARE, 2010).

2.2.2. Tromboelastometria (ROTEM)

Testes que avaliam da função hemostática são frequentemente usados como triagem para determinar se o animal tem uma coagulopatia. Testes analíticos

específicos quantitativos e estruturais são usados para determinar a natureza exata da doença (BARR E MCMICHAEL, 2012). Os testes funcionais são as ferramentas de diagnóstico mais utilizadas pela maioria dos médicos veterinários e funcionam como guias de orientação para a escolha de outras avaliações hemostáticas quando necessário. Exemplos de testes funcionais são: o tempo de sangramento (TS), tempo de coagulação, TTPa, PT, tromboelastografia (TEG; Haemoscope Corporation, Niles, IL, EUA), tromboelastometria (ROTEM; Pentapharm GmbH, Munique, Alemanha), Sonoclot (Sienco Inc., Arvada, CO, EUA) e análise da função plaquetária (PFA 100; Siemens HealthCare Diagnostics, Deerfield, IL, EUA) (BARR E MICHAEL, 2012).

A tromboelastometria (TEM) se caracteriza como um formato analítico capaz de integrar a ação de componentes do processo hemostático e uma avaliação ampla de todo processo, o que auxilia a compreensão destes processos e suas disfunções, visto que a modelagem clássica utilizando o tempo de protrombina (TP), tempo de trombolastina parcial ativada (TTPA), não avalia a função plaquetária, por não utilizar nestes parâmetros o plasma rico em plaquetas. A TEM auxilia na identificação de estados de hipo e ou hipercoagulabilidade, coagulopatias sendo um método de avaliação específico da função hemostática para cada amostra avaliada. As avaliações realizadas pela TEM baseiam-se nas alterações relacionadas ao processo de coagulação, pelo monitoramento através do pino submerso em sangue total citratado (DODERLEIN e MISCHKE, 2015).

Pode-se inferir que a TEM, se caracteriza como um teste cinético que avalia as características viscoelásticas do sangue total. O sangue total contém células que em suas superfícies carregam fosfolipídios necessários para reações enzimáticas. A participação das plaquetas com a liberação do conteúdo de seus grânulos proporcionando à amplificação e propagação da coagulação, como também sua interação com os fatores plasmáticos durante a coagulação permite a avaliação da sua função de forma indireta e permite esclarecer qual o seu papel na fisiopatologia de condições de hipo ou hipercoagulabilidade sanguínea (SMITH, 2010).

As alterações são demonstradas através de gráficos resultando nos seguintes parâmetros: tempo de coagulação, viscoelasticidade do sangue, tempo de formação do coágulo, ângulo alfa (α), força máxima do coágulo e tempo de fibrinólise (KOL E BORJESSON, 2010; MCMICHAEL E SMITH, 2011).

2.2.3. Interpretação dos parâmetros ROTEM em felinos

Os parâmetros analisados pelo teste são: tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo α (alfa), amplitude a 10 minutos (A10), amplitude a 20 minutos (A20), firmeza máxima do coágulo (MCF) e a porcentagem de fibrinólise máxima (ML). O tempo de coagulação é o tempo para o início da formação da fibrina sendo um indicador da atividade dos fatores de coagulação plasmáticos. O tempo de formação do coágulo corresponde ao início da ativação das plaquetas e fibrinogênio, formando no gráfico uma angulação α que corresponde à cinética da formação do coágulo. A firmeza máxima do coágulo depende das plaquetas e da ativação do fibrinogênio e fator XIII. As variáveis podem ser mensuradas pela ativação pelo fator tecidual (EXTEM®), ativador de contato (INTEM®) e pela adição de citocalesina D, retirando assim a influência das plaquetas na análise (FIBTEM®) (MCMICHAEL e SMITH, 2011). A técnica foi validada para monitoração hemostática em caninos (SMITH et al., 2010), equinos (KOL e BORJESSON, 2010) e felinos (MARSCHNER et al., 2010).

Segundo Marly- Vocher et al. (2017), em um estudo com valores de referência para gatos clinicamente saudáveis, cada teste ROTEM® registrou CT, CFT, ângulo alfa, A10, A20 MCF e ML. Os intervalos de referência foram calculados através da média, desvio padrão e intervalos entre quartis de 2,5 a 97,5. Os resultados do ROTEM® foram comparados com aqueles obtidos usando testes de coagulação padrão. Os intervalos obtidos nos testes INTEM E EXTEM, foram similares aos observados em outras espécies, como cães e cavalos. Foram realizadas correlações entre CT medida pelos ensaios EXTEM e INTEM e TP e TTPa, respectivamente, e entre os dois MCF medido no ensaio FIBTEM e LM medido no ensaio APTM, com concentração plasmática de fibrinogênio.

O MCF dos ensaios EXTEM e INTEM pelo método tromboelastométrico depende da contagem de plaquetas e concentração plasmática de fibrinogênio (MARLY- TOUCHER et al., 2017). Em um estudo com seres humano o MCF foi dependente da concentração de fibrinogênio, correlacionado com a contagem de plaquetas, e o resultado da diferença entre o MCF nos ensaios EXTEM e FIBTEM usado como um indicador de contribuição plaquetária a formação do coágulo (LANG et al., 2009). Os intervalos de referência em MCF para gatos na avaliação pelo EXTEM foram semelhantes aos observados em seres humanos e menores quando

considerado o ensaio FIBTEM. A diferença entre MCF no EXTEM e FIBTEM foi maior em gatos do que em seres humanos, sugerindo que a coagulação em gatos pode ser mais dependente da função plaquetária e menos da concentração de fibrinogênio. (MARLY-TOUCHER et al., 2017).

Em seres humanos, existe uma forte correlação entre a concentração de fibrinogênio e a amplitude do teste FIBTEM (HAAS et al., 2012). Em gatos, os valores de MCF no ensaio FIBTEM podem ser usados para aproximar a concentração e função do fibrinogênio como descrito em seres humanos (LANG et al., 2009). Tratando-se de medicina humana, relata-se que essa correlação pode ser útil na avaliação de condições específicas, e que o FIBTEM pode ser uma ferramenta valiosa na avaliação da função do fibrinogênio e o seu desempenho nas terapias de reposição, com um tempo de resposta mais rápido quando comparado com a avaliação da concentração de fibrinogênio plasmático (GORLINGER, et al 2013).

Marly Toucher et al (2017), em seu estudo com valores de referência para tromboelastometria em gatos, descreveram que a força relativa da retração do coágulo em felinos também poderia ser maior do que em outras espécies e que mais trabalhos devem ser realizados para diferenciar retração do coágulo e a lise do coágulo verdadeira.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Avaliar o perfil tromboelastométrico de felinos domésticos portadores e não portadores da mutação no gene da proteína C miosina (MYBPC3) para miocardiopatia hipertrófica (MCH).

3.2. Objetivos específicos:

Comparar os resultados obtidos no ROTEM para animais portadores com os animais não portadores da mutação MYBPC3.

Comparar o estado de coagulabilidade através do uso do ROTEM entre os animais portadores da mutação com e sem alterações no ecocardiograma.

Avaliar o perfil hematológico, bioquímico sérico e ecocardiográfico dos animais portadores e dos animais não portadores da mutação MYBPC3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos Animais

O estudo foi realizado em parceria com a Clínica Especializada em Medicina Felina- Gattos, situada na região Metropolitana de São Paulo, e com a Associação da Raça Maine Coon no Brasil (AMACOON). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP.

O projeto foi submetido à avaliação do Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo n 0164/2018– **Anexo 1**) e elaborado um termo de “Consentimento Livre e Esclarecido” fornecido aos proprietários (criadores) para conhecimento dos procedimentos de coleta de sangue e dos testes realizados (**Anexo 2**).

Foram selecionados 30 gatos da raça Maine Coon, sem predileção por sexo, com idade variada entre dois e 12 anos, com peso médio de 5 kg ($\pm 4,5$). Os animais foram divididos em dois grupos: 15 gatos não portadores da mutação MYBPC3 para MCH (MYBPC3 - Grupo 1) e 15 gatos portadores heterozigotos da mutação MYBPC3 para MCH (MYBPC3 + Grupo 2), classificados de acordo exame prévio de *screening* genético por PCR realizados por laboratórios particulares a critério de escolha do tutor responsável. O sequenciamento do DNA revela troca no par de bases (G por C) no códon 31 (exon 3) em gatos afetados, este teste é padrão para os animais raça Maine Coon, que são usados como reprodutores em gatis (**Anexo 3- Modelo**).

Como critérios de inclusão foram usadas as variáveis do perfil hematológico, dosagem de proteína total sérica, albumina, enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), ureia, creatinina, glicose, frutossamina, creatinaquinase (CK). Foram mantidos no experimento aqueles com resultados dentro dos intervalos de referência para a espécie. Além destes critérios foram excluídos do projeto animais que fizessem uso contínuo de medicação ou apresentassem alguma comorbidade.

A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada por método não invasivo, com um dispositivo de Doppler vascular (modelo DV610, MedMega®). Foram realizadas cinco determinações, considerando-se a média dos valores obtidos. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e a aferição realizada em membro torácico direito, utilizando manguito 3, no terço médio da região radio-ulna. O transdutor foi posicionado entre os coxins do carpo e metacarpo, sob a região da

artéria medial, iniciando-se a insuflação do manguito até a interrupção do pulso. A pressão arterial sistólica foi caracterizada no momento do retorno da percepção do pulso (ao desinflar o manguito), e considerados normais os valores de pressão arterial sistólica até 150 mmHg (PELLEGRINO, 2014).

O exame ecocardiográfico foi realizado no ecocardiógrafo portátil modelo *Vivid-I* (General Electric Co- GE ®), livres de sedação e/ou tranquilização. Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo com o transdutor (setorial de 3 a 8 MHz) sobre o tórax, para a obtenção das imagens através da janela paraesternal direita e paraesternal, conforme recomendações da *Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology – American College of Veterinary Internal Medicine* (THOMAS et al., 1993) e *American Society of Echocardiography* (ASE) (BOON, 2011; OYAMA, 2004; CHETBOUL et al., 2012; PELLEGRINO, 2014).

No ecodopplercardiograma foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC); valvas atrioventriculares; valvas semilunares; função; fração de ejeção; aorta (AO) (cm); átrio esquerdo (cm); relação AE/AO; espessura do septo interventricular no final da diástole (SIVd); espessura da parede livre do ventrículo esquerdo no final da diástole (PVEd); diâmetro diastólico final da cavidade do ventrículo esquerdo (DVEd); diâmetro sistólico final da cavidade do ventrículo esquerdo (DVEs); relação septo-parede na diástole (SIVd/PVEd), parede livre do ventrículo direito; diâmetro diastólico final da cavidade do ventrículo direito (DVDd); fluxo máx artéria aorta (FL. AO máx), fluxo máximo da artéria pulmonar (FL.AP máx), fluxo mitral relação onda E/A, tempo de desaceleração da onda E (TDE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), região septal/basal e músculos papilares.

4.2. Colheita de Amostras

As amostras de sangue para a tromboelastometria, hemograma e avaliações bioquímicas, foram colhidas em momento único para ambos os grupos após os critérios de inclusão serem confirmados.

A colheita de sangue foi realizada preferencialmente na veia jugular, apenas em cinco animais do grupo não portador (G1) foram coletadas amostras pelo acesso da veia femoral. Foram colhidos 0,5 mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 7,5% (BD- Vacutainer® São Paulo, Brasil) para o hemograma, e 2,0 mL de sangue sem anticoagulante (BD Vacutainer® SST® II Advance® São Paulo, Brasil) para a realização das dosagens bioquímicas séricas. As amostras sem anticoagulante foram

centrifugadas em até 30 minutos após a colheita em microcentrífuga (Eppendorf®) a 3000 rpm, durante cinco minutos, para obtenção do soro, após a centrifugação as amostras sorológicas foram separadas em alíquotas e acondicionadas em criotubos (Corning®, São Paulo, Brasil), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para avaliação no dia posterior a coleta.

Para a tromboelastometria foi colhido um tubo de 1,8 mL de sangue em tubo com citrato de sódio 3,2% (BD Vacutainer®, São Paulo, Brasil). Após a colheita, as amostras foram submetidas à análise em até 20 minutos.

4.3. Exames laboratoriais

4.3.1. Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM® (Delta, Pentapham, Munique, Alemanha) mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L). A ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: INTEM® (20µL, fosfolipídios de 26 tromboplastina parcial, Pentapham, Munique, Alemanha), EXTEM® (20µL, tromboplastina tecidual, Pentapham, Munique, Alemanha) e FIBTEM® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina, Pentapham, Munique, Alemanha). Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); A10 a A20: é a firmeza do coágulo, pela amplitude entre os tempos 10 e 20 minutos; MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML (lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo (**Figura 1**). A análise das amostras ocorreu no período de 60 minutos, para cada canal do aparelho com os reagentes citados.

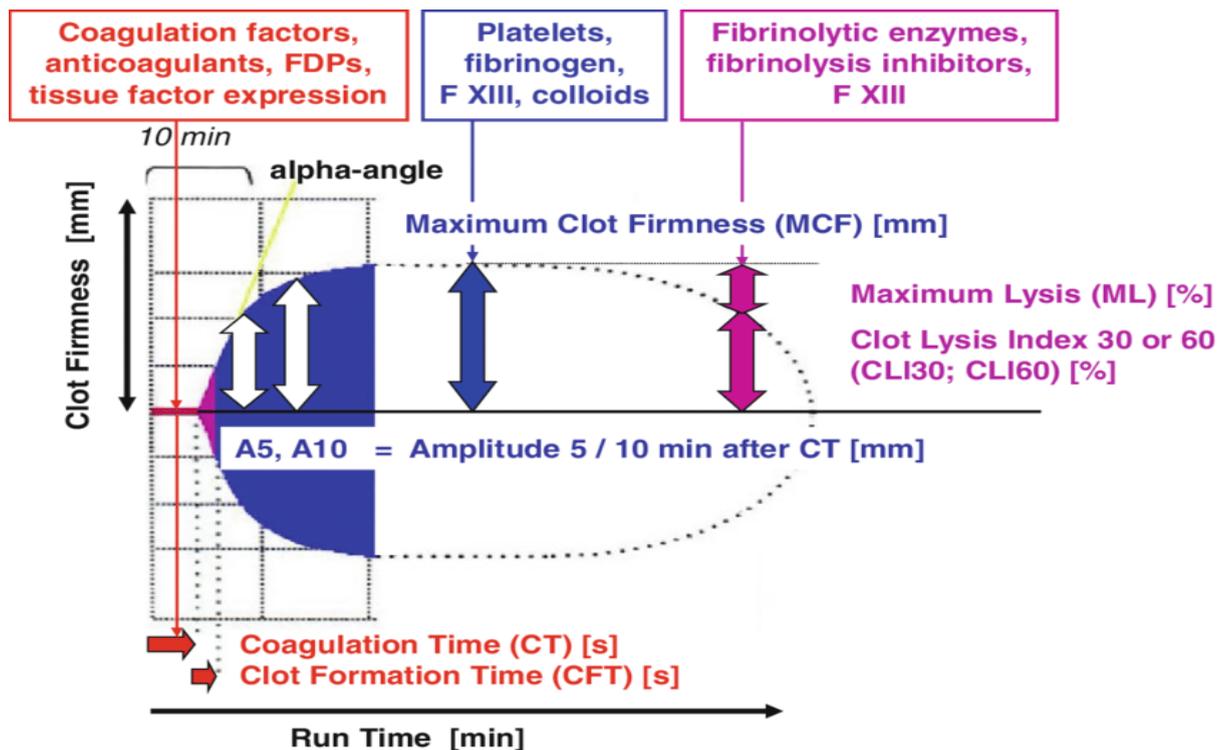


Figura 1- Representação gráfica das variáveis avaliadas na tromboelastometria (ROTEM®) (GORLINGER, 2016).

4.3.2. Hemograma

O hemograma foi realizado no Laboratório Clínico Veterinário (FMVZ- UNESP- Campus- Botucatu), em contador hematológico Procyte (IDEXX®), e o hematócrito confirmado através da técnica do microhematócrito. A contagem de plaquetas foi realizada manualmente em câmara de Neubauer, em até 1 hora da realização da coleta. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células conjuntamente com a avaliação da morfologia celular em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido (Laborclin®).

4.3.3. Bioquímica sérica

Os testes bioquímicos séricos: alanina amino-transferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil-transferase (GGT), uréia e creatinina, proteínas totais séricas (PTs), albumina, glicose, frutossamina, cálcio foram realizados em equipamento automatizado (Mindray® - BS200 E) utilizando kits comerciais (Bioclin® e Labtest®).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise dos dados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. O teste de normalidade utilizado foi o teste de Shapiro Wilk e como o teste substituto de t de Student, para variáveis não paramétricas utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) e Kruskal Wallis para pressupostos confiáveis, pois os pressupostos para aplicabilidade do teste t Student são mais exigentes, ou seja, as populações de onde as amostras provêm têm distribuição normal. Entretanto, para o teste de WMW as duas amostras são aleatórias e as observações, independentes.

Foram usadas as medianas acompanhadas dos intervalos interquartis (25%-75%), para os testes EXTEM, INTEM, FIBTEM na tromboelastometria (ROTEM), apresentados nas **Tabelas 1, 2 e 3** respectivamente, bem como para os resultados observados no hemograma (**Tabela 4**), bioquímica sérica (**Tabela 5**) para o ecocardiograma (**Tabela 6**), acompanhados dos respectivos intervalos de referência para a espécie (**Anexo 4 e Anexo 5**).

Todas as análises foram consideradas significativas com 5% de significância ($p < 0,05$).

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Graphpad®- versão 6.

6. RESULTADOS

Os animais amostrados nos diferentes grupos corresponderam a 15 fêmeas (60% G1 e 40% G2) e 15 machos (40% G1 e 60% G2), a média da idade dos animais em ambos os grupos foi de $\pm 6,7$ sendo G1 ($\pm 7,9$) e G2 ($\pm 5,6$). A média de idade das fêmeas do G1 foi de $\pm 9,5$ anos do G2 $\pm 5,5$. Para os machos a média de idade do G1 $\pm 5,5$ e para o G2 $\pm 5,6$.

Representações gráficas de dois animais sendo um do grupo G1 e um do grupo G2 estão demonstradas nas **Figuras 2 e 3** respectivamente.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$), para os parâmetros do ROTEM, para as variáveis das avaliações pelo EXTEM (Tabela 1 e Figura 3), INTEM quando comparados os grupos G1 e G2 para as variáveis da avaliação pelo EXTEM (**Tabela 1 e Figura 4**), INTEM (**Tabela 2 e Figura 5**) e FIBTEM (**Tabela 3 e Figura 6**).

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$), para os parâmetros hematológicos, quando comparados os grupos G1 (positivos para a mutação) e G2 (negativos para a mutação), apresentados nas tabelas **Tabela 4**.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$), para os parâmetros Bioquímicos (Uréia, Creatinina, ALT, AST, FAL, GGT, Frutosamina, PTs, Globulinas, Glicose e CK). Foi observada diminuição significativa para albumina quando comparados os grupos G1 e G2, apresentados nas tabelas **Tabela 5 e Figura 7**.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$), para os parâmetros ecocardiográficos (Ventrículo Esquerdo: SIVd, PVEd, função, fração de ejeção; Ventrículo Direito: parede livre, DVDs, fluxo de aorta, fluxo de artéria pulmonar, fluxo de mitral: relação onda E/A, tempo de desaceleração da onda E, tempo de relaxamento isovolumétrico, SIV) e observadas diminuições significativa para o diâmetro do ventrículo, apresentados nas tabelas **Tabela 6 e Figura 8**.

Os animais com espessuras de região septal basal com 0,5 cm foram considerados sadios; e os gatos com valores de espessuras diastólicas entre 0,5 e 0,6 cm foram considerados normais, porém suspeitos para a MCH. A maioria dos animais avaliados, independente da presença da mutação apresentaram na ecocardiografia, alterações discretas relacionadas a insuficiência da valva mitral, com presença ou ausência de movimento anterior sistólico. Os animais com alterações em região septal basal do grupo G2 também apresentaram alterações em músculos papilares.

Quando comparados os animais pertencentes ao grupo G2 sem alteração no ecocardiograma (G2/1) e os portadores com alterações no ecocardiograma (G2/2), para as análises EXTEM® (**Figura 9**), INTEM® (**Figura 10**) e FIBTEM® (**Figura 11**), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Os resultados do perfil tromboelastométrico de todos os animais avaliados nos grupos: não portador G1 (n=15) e portador G2 (n=15), estão apresentados nos **Anexos 6 e 7**, respectivamente.



Figura 2. Representação gráfica, das variáveis ROTEM®, para as análises EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, de um gato da raça Maine Coon, não portador da mutação A31P-MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica

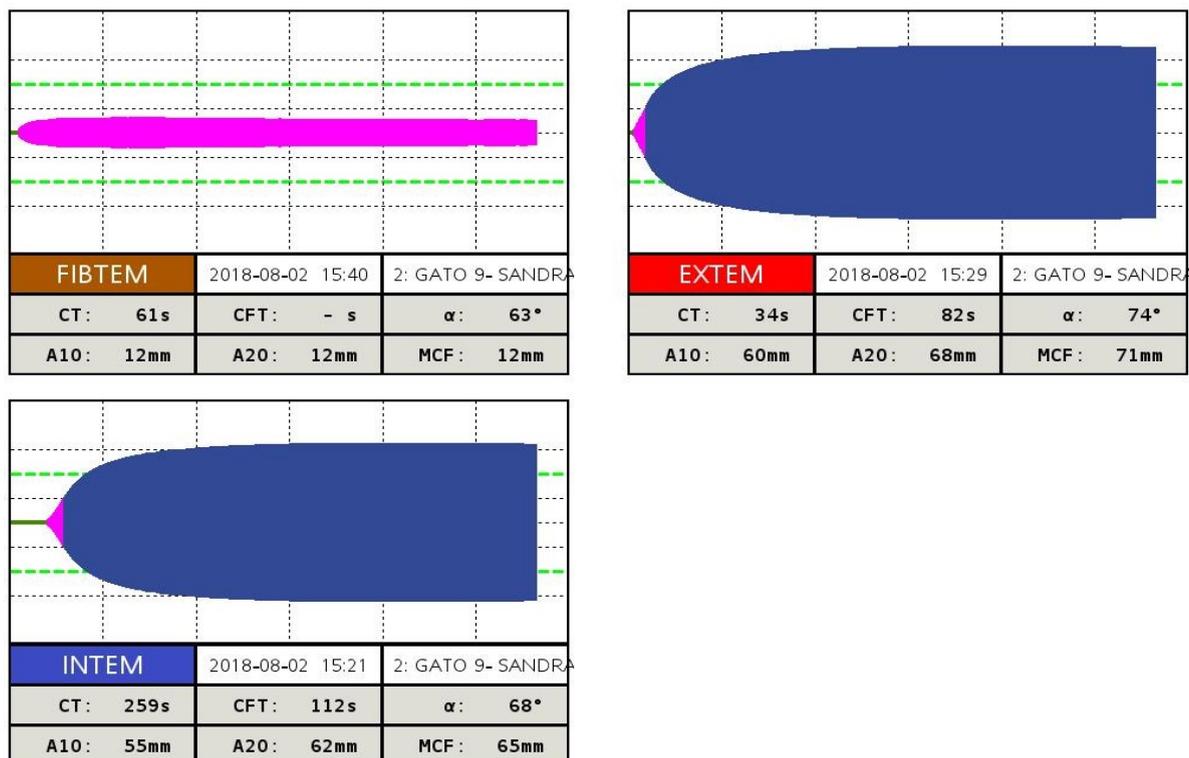


Figura 3. Representação gráfica, das variáveis ROTEM®, para as análises EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, de um gato da raça Maine Coon, portador heterozigoto da mutação A31P-MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica (G2).

Tabela 1. Mediana e intervalos interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®- EXTEM®), nos grupos G1 e G2 de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT	28	21	40	19	74	29	15	34	9	52	0,22
CFT	57	50	70	40	696	81	66	99	46	340	0,05
A° alpha	78	70	80	31	82	76	74	80	54	81	0,86
A10	57	44	62	19	70	52	44	56	25	64	0,21
A20	62	49	66	24	72	56	48	65	29	69	0,36
MCF	63	56	67	31	73	57	50	67	36	73	0,47
LM	5	1	7	0	33	14	1,5	26,7	0	55	0,22

CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)-milímetros; LM – lise máxima (%) porcentagem; Min: mínimo; Máx: máximo; p: probabilidade de significância.

Tabela 2. Mediana e intervalos interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®- INTEM®), nos grupos G1 e G2 de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT	160	152	180	67	237	117	98	198	31	259	0,56
CFT	94	61	183	52	423	94	79	151	68	909	0,47
A° alpha	72	59	77	26	80	72	68	75	28	78	0,86
A10	53	40	58	21	64	45	35	52	16	63	0,22
A20	55	51	63	28	68	51	27	60	22	67	0,08
MCF	57	53	63	33	70	46	35	63	5	67	0,06
LM	6	3	18	0	54	17	6,7	61,7	0	100	0,09

CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)-milímetros; LM – lise máxima (%) porcentagem; Min: mínimo; Máx: máximo; p: probabilidade de significância.

Tabela 3. Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®- FIBTEM®), nos grupos G1 e G2, de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT	60	53	66	15	117	41	32	59	22	112	0,07
A° alpha	54	68	76	46	79	67	59	72	7	77	0,58
A10	10	7	14	5	18	10	6	12	3	15	0,38
A20	10	7	15	5	20	10	7	12	2	15	0,28
MCF	10	7	16	5	20	11	7	12	2	15	0,21
LM	13	9	22	0	35	18	5,5	25	0	77	0,83

CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)-milímetros; LM – lise máxima (%) porcentagem; Min: mínimo; Máx: máximo; p: probabilidade de significância.

Tabela 4. Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros da hematológicos nos grupos G1 e G2, de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1			G2			Valor de p
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
Hemácias	9,62	8,5	10,4	9,96	9,0	10,8	0,50
Hemoglobina	14,2	13,1	15,7	13,7	12,1	14,9	0,57
Hematócrito	40	38	44	42	38	44	0,78
VCM	43,8	39,5	46,1	40,1	37,9	43,5	0,11
CHCM	34,4	33,8	34,7	34	31,8	36,2	0,39
Plaquetas	280.275	237.350	299.475	303.000	203.550	343.775	0,74
Leuc. Totais	10040	7460	12760	9900	8500	12900	0,96
Ppt	8,0	7,4	8,2	8,4	8,0	8,6	0,13

Hemácias ($\times 10^6$ / μ L); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); Plaquetas (/ μ L); Leucócitos (/ μ L); Ppt: Proteína Plasmática total (g/dL).

Tabela 5. Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros bioquímicos nos grupos G1e G2, de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1			G2			Valor de p
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
Uréia	52	47	63	52	46	63	0,82
Creatinina	1,4	1,3	1,4	1,4	1,2	1,7	0,92
ALT	67	53	72	57	45	71	0,21
AST	53	41	82	45	31	54	0,12
FA	32	17	43	26	22	32	0,46
GGT	1,0	0,9	1,1	1,0	0,8	1,5	0,83
Frutosamina	145	140	164	141	133	156	0,23
P.T. Sérica	8,2	7,4	8,6	7,7	7,3	8,2	0,47
Albumina	2,8 ^a	2,6	2,9	2,6 ^b	2,4	2,7	0,02
Globulina	5,4	4,5	5,9	4,9	4,7	6,3	0,60
Glicose	118	94	148	102	97	151	0,76
CK	136	78	236	117	104	142	0,97

Uréia (mg/dL); Creatinina (mg/dL); ALT (UI/L); AST (UI/L); Fosfatase alcalina (UI/L); GGT (UI/L); Glicose (mg/dL); Proteína Total (g/dL); Albumina (g/dL); Globulina (g/dL); CK (UI/L) Frutosamina (umol/L). Letras minúsculas em negrito na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 6. Mediana e intervalo interquartis dos parâmetros do exame de imagem (ecocardiograma), nos grupos G1 e G2, de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1			G2			Valor de p
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
SIVd	0,48	0,45	0,50	0,49	0,44	0,51	0,91
PVEd	0,46	0,45	0,50	0,48	0,45	0,50	0,73
DVEs	0,78 ^a	0,71	0,91	0,64 ^b	0,56	0,75	0,009
DVEd	1,71 ^a	1,53	1,89	1,52 ^b	1,40	1,62	0,006
Função	56,08	50,86	60,16	56,3	53,5	61,7	0,84
Fr. Ejeção	0,88	0,84	0,91	0,89	0,87	0,92	0,43
Aorta	1,01	0,93	1,14	1,03	0,98	1,09	0,75
AE	1,38	1,15	1,47	1,41	1,31	1,49	0,27
AE/AO	1,27	1,23	1,32	1,32	1,28	1,48	0,18
VD- Par L	0,26	0,26	0,32	0,26	0,23	0,29	0,28
DVDd	0,81	0,67	0,93	0,59	0,54	0,84	0,28
Fl. máx AO	0,97	0,91	1,03	1,16	0,99	1,20	0,08
Fl. máx AP	0,93	0,87	1,03	0,95	0,84	1,0	0,84
Fl. M. E/A	1,12	0,89	1,28	1,11	0,90	1,23	0,61
TDE	76,54	55,26	86,56	63,9	43,6	69,8	0,07
TRIV	46,59	43,26	59,93	46,5	39,9	56,5	0,38
SIVd/PVEd	0,48	0,47	0,54	0,48	0,49	0,57	0,34

VE: ventrículo esquerdo; SIVd Espessura septo diástole; PVEd espessura parede diástole; SIST: sístole; DIAST: diástole; Fr. Ejeção- fração de ejeção; AE- átrio esquerdo; AO- aorta VD par livre-ventrículo direito de parede livre; DVDd- ventrículo direito diâmetro diastólico; Fl. máx AO: fluxo máximo de aorta; Fl. máx AP: fluxo máximo de artéria pulmonar; FL.M. E/A: fluxo mitral, relação onda E/A; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV- tempo de relaxamento isovolumétrico; cm- centímetros; ms- metro por segundo, relação SIVd/PVEd- região septal basal. Letras diferentes minúsculas em negrito entre as colunas indica diferença significativa ($p < 0,05$).

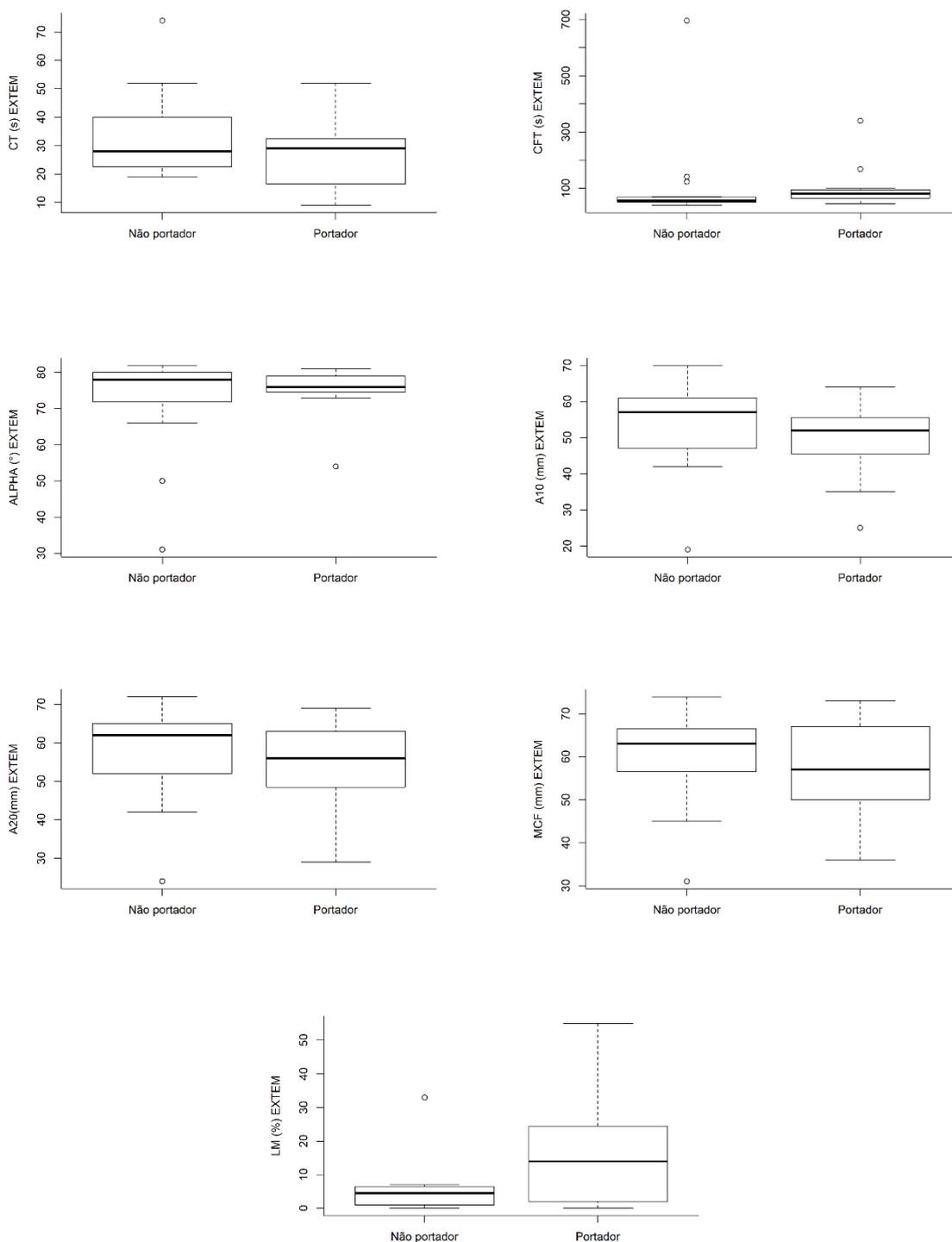


Figura 4: Boxplot das variáveis EXTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3.

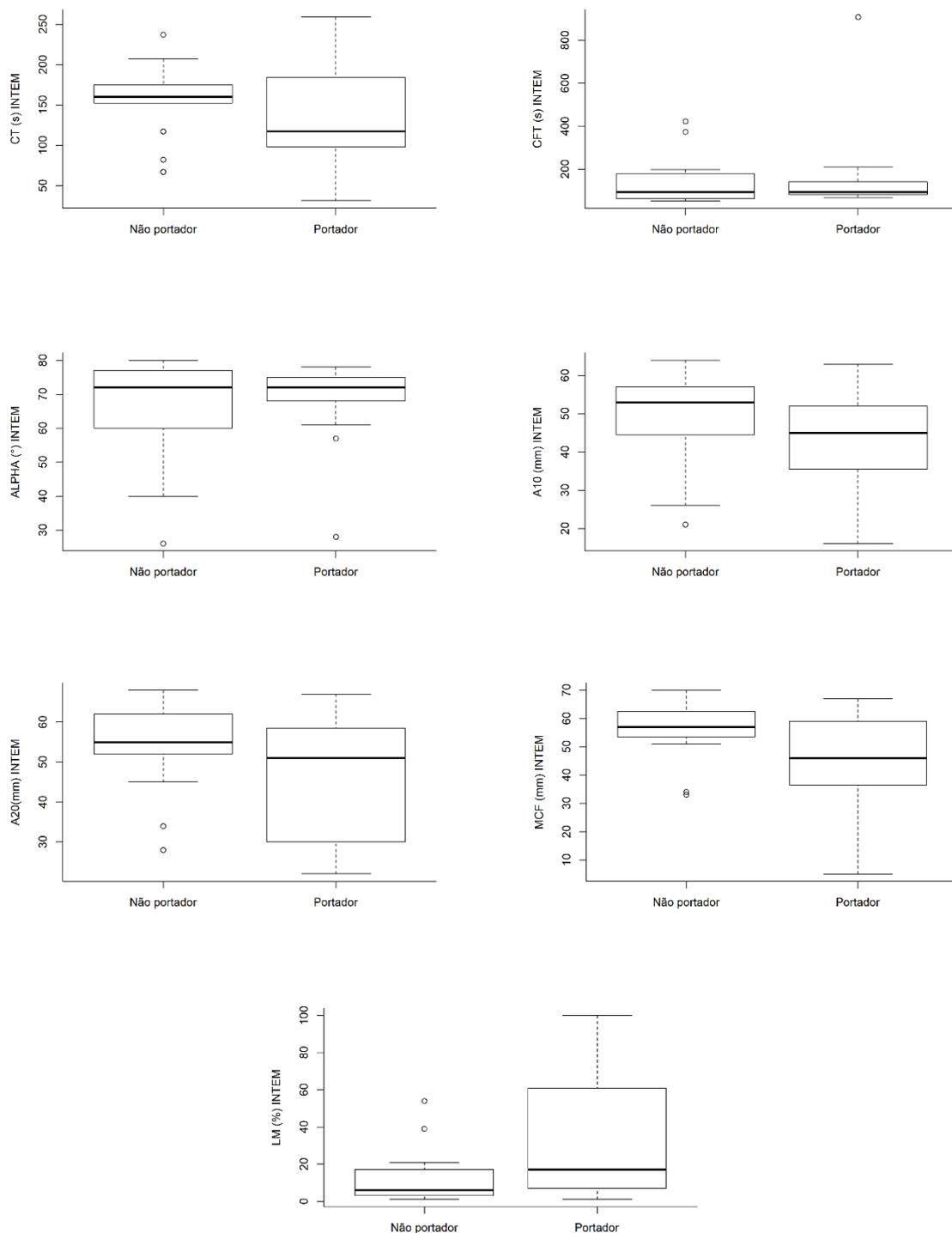


Figura 5: Boxplot das variáveis INTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3.

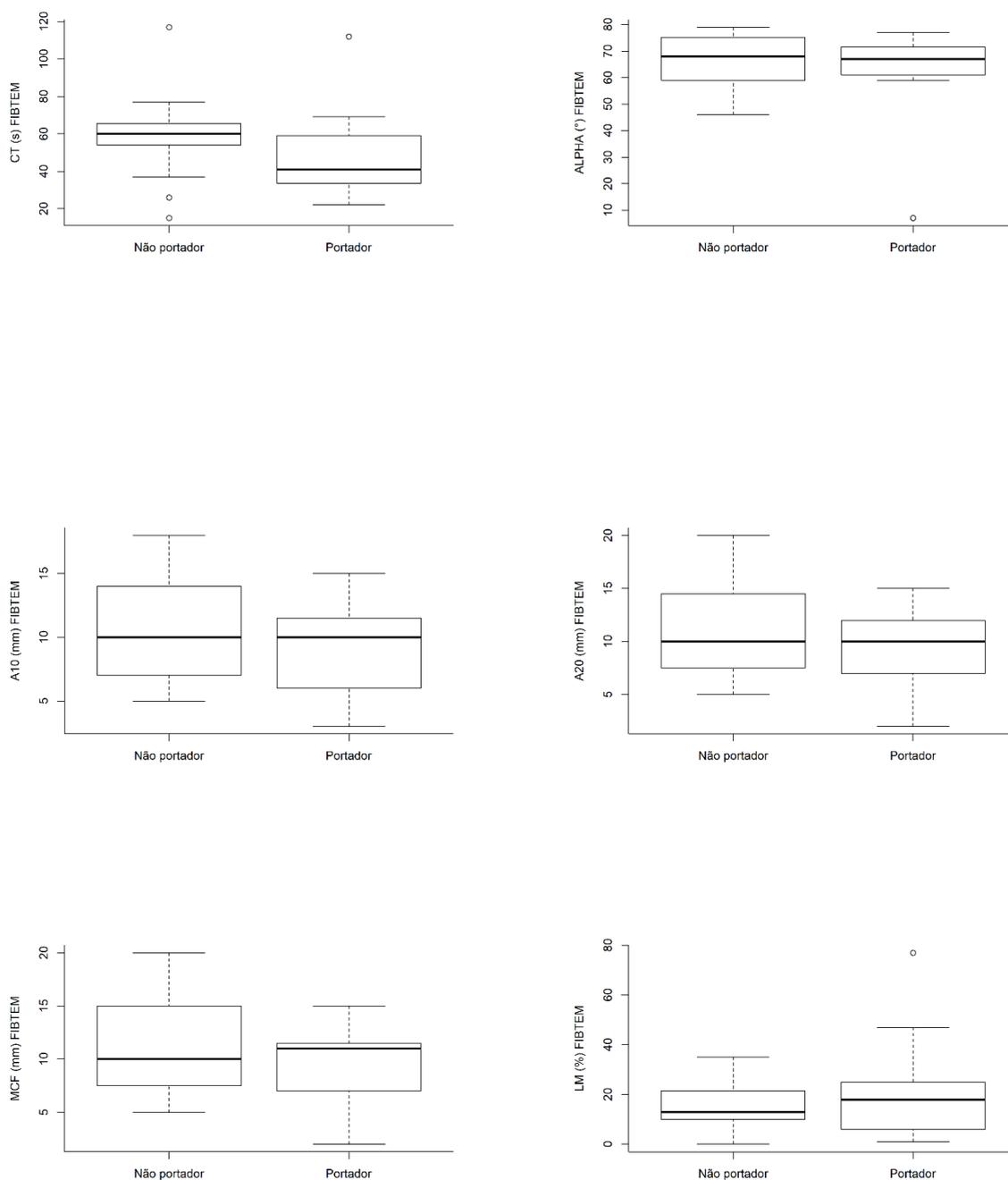


Figura 6: Boxplot das variáveis FIBTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, em gatos da raça Maine Coon não portadores e portadores da mutação A31P no gene MYBPC3.

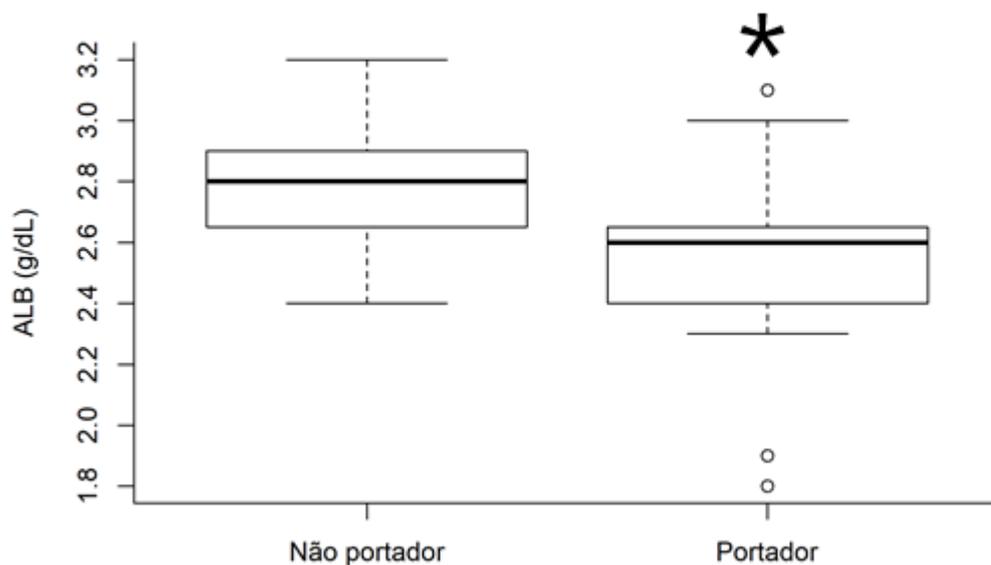


Figura 7: Boxplot para a variável ALB: albumina, quando comparados os grupos de gatos da raça Maine Coon não portador (G1) e portador (G2) da mutação A31P no gene MYBPC3.

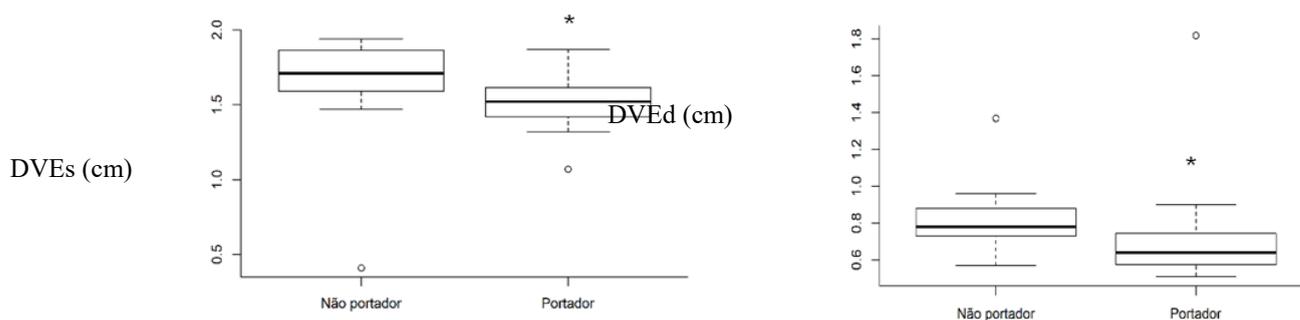


Figura 8: Boxplot para as variáveis DVEs: diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e DVEd: diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole, quando comparados os grupos de gatos da raça Maine Coon: não portador (G1) e portador (G2) da mutação A31P no gene MYBPC3.

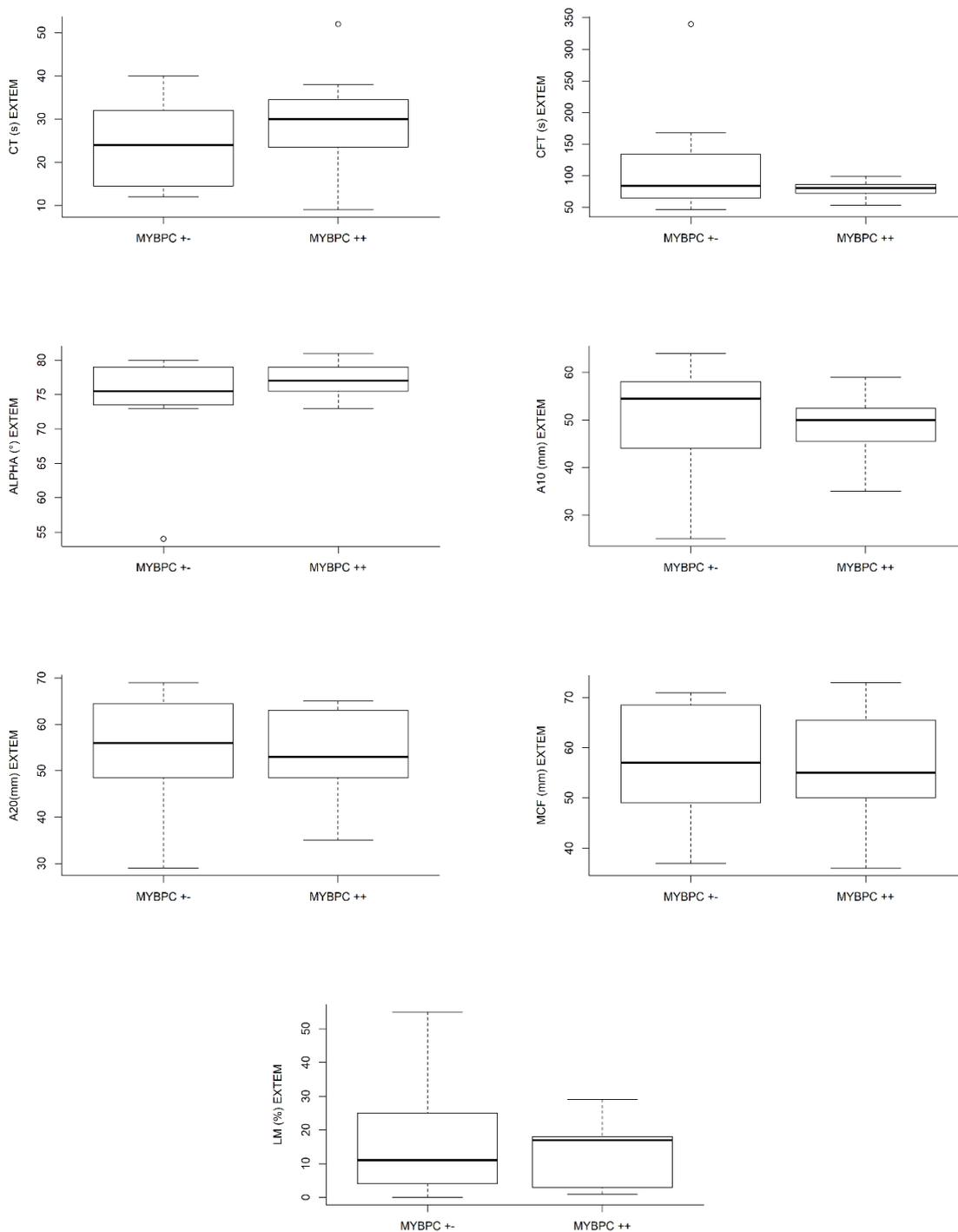


Figura 9: Boxplot das variáveis EXTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores e sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e portadores e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++).

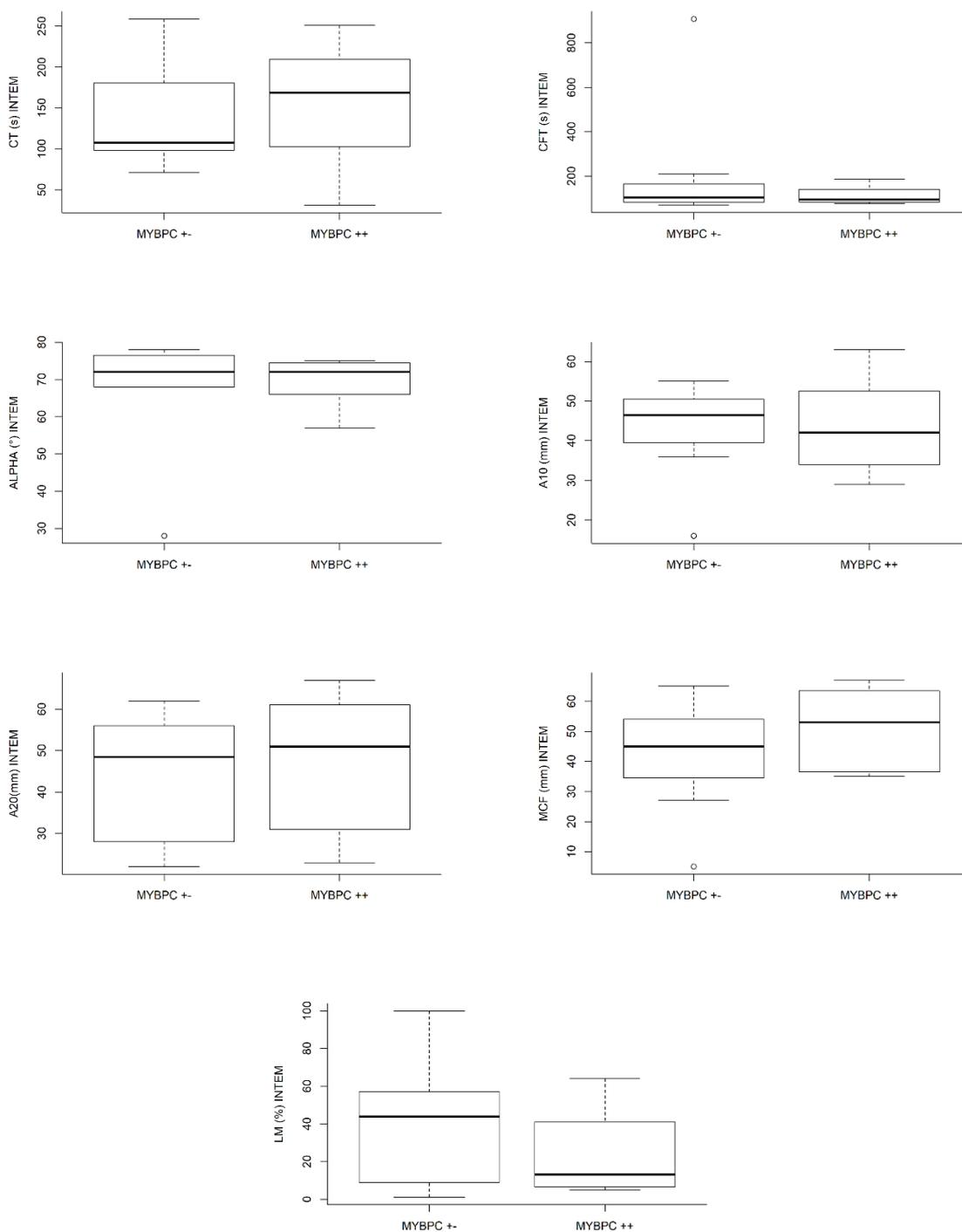


Figura 10: Boxplot das variáveis INTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores e sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e portadores e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++).

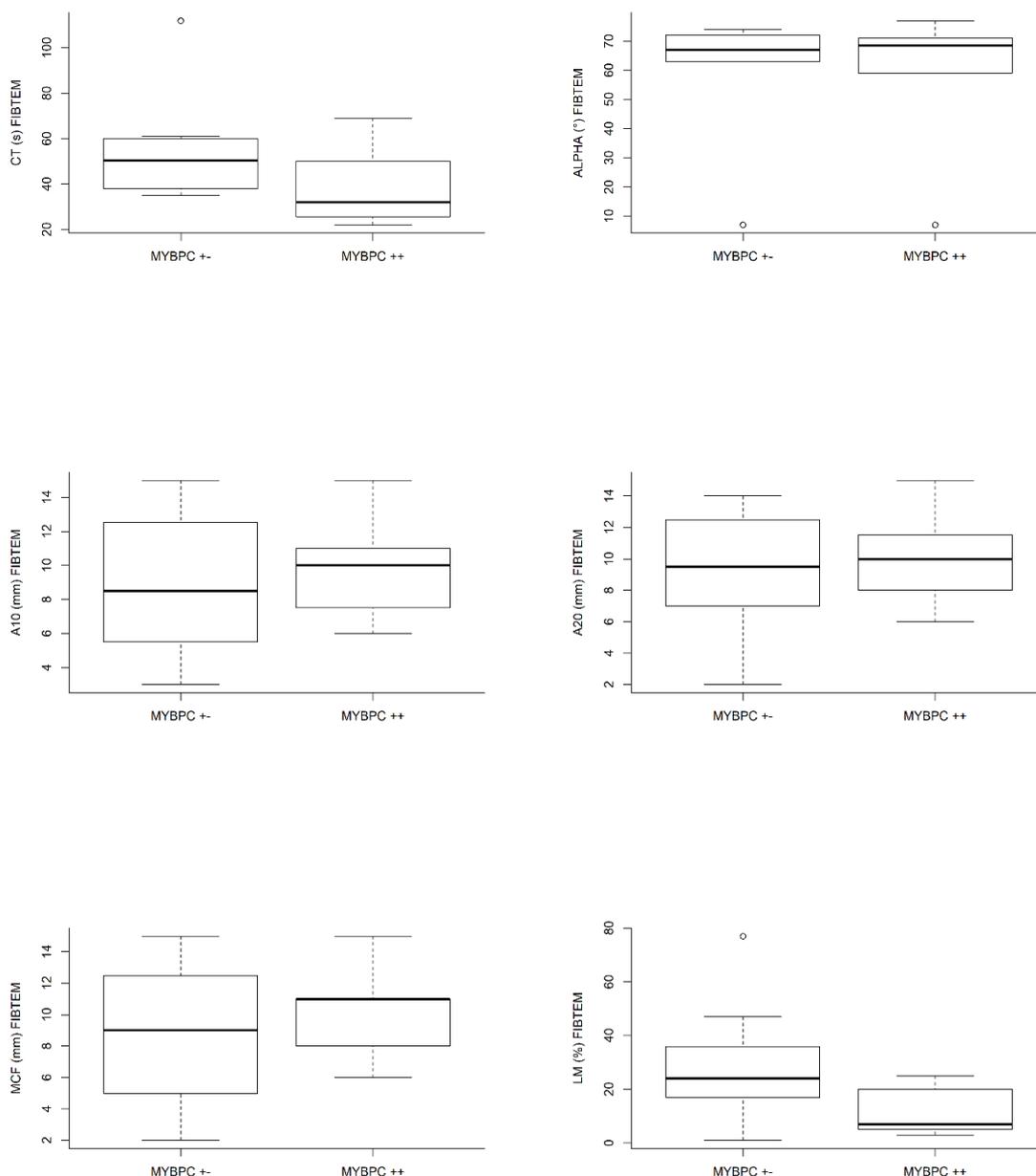


Figura 11: Boxplot das variáveis no FIBTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos de gatos da raça Maine Coon portadores e sem alterações no ecocardiograma (G2/1 MYBPC3+/-) e portadores e com alterações no ecocardiograma (G2/2 MYBPC3 ++).

7. DISCUSSÃO

Existem vários tipos de mutações relacionadas a MCH em diferentes raças de gatos, a prevalência da mutação A31P em gatos da raça Maine Coon é de aproximadamente 34% em todo o mundo. A penetrância da mutação não é de 100% e alguns animais desta raça com a mutação podem ou não desenvolver hipertrofia relacionada ao ventrículo esquerdo. O prognóstico clínico quanto as alterações secundárias relacionadas a coagulação sanguínea, como o TEA é melhor em animais portadores heterozigotos quando comparado aos animais homozigotos. O presente estudo foi relacionado apenas a uma raça e a uma mutação (A31P). Devem ser realizados mais estudos relacionados a presença da mutação, alterações cardiovasculares e o perfil hemostático de gatos, bem como as avaliações de outras mutações relacionadas a MCH.

O pequeno número amostral foi um fator limitante, porém foi notável a dificuldade em encontrar animais portadores heterozigotos e não foi detectado nenhum portador homozigoto. Tal afirmação é importante pois indica que para a raça Maine Coon, os animais reprodutores devem ser negativos para a mutação, ou seja, não portadores e assim monitorados constantemente para MCH, na tentativa de evitar a disseminação da doença pelo seu caráter genético de origem familiar.

Mesmo com a escolha aleatória dos animais apenas pela presença ou não da mutação, a população estudada foi homogênea quanto ao sexo, tendo em vista a distribuição de metade dos animais avaliados machos e a outra metade fêmeas. Porém, a maioria dos animais do grupo portadores da mutação eram fêmeas com média de idade de 10 anos já os autores Chetboul et al. (2006a); Fuentes et al. (2006); Granstrom et al. (2011) e Pellegrino et al. (2014), afirmaram que a ocorrência de MCH ocorre em machos de meia idade, mas que pode ocorrer em fêmeas jovens e senis. As divergências apontadas para este trabalho podem ter ocorrido já que os animais avaliados não possuíam MCH e sim a presença da mutação para o gene MYBPC3, o menor número amostral de animais deste estudo também difere dos autores supracitados e a utilização de apenas uma raça de gatos, os Maine Coons.

Para ambos os grupos não foram observadas alterações significativas para os parâmetros do ROTEM quando analisados os testes EXTEM, INTEM, FIBTEM. Marly-Toucher et al. (2017), no seu estudo com valores de referência indicaram que as

análises podem ser comparadas com o de tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e fibrinogênio.

Segundo estes mesmos autores, o MCF dos ensaios EXTEM e INTEM depende do grau de contagem de plaquetas e concentração plasmática de fibrinogênio e que a diferença entre o MCF nos ensaios EXTEM e FIBTEM também pode ser usado como um indicador de contribuição plaquetária ao coágulo. Eles afirmaram que nesta espécie a coagulação é mais dependente da função plaquetária do que pela ação do fibrinogênio, o que não pode ser evidenciado já estas análises não foram realizadas, tendo sido este um fator limitante do estudo realizado.

Quando comparados os resultados descritivos dos parâmetros do ROTEM, em relação aos valores de referência (Marly-Toucher et al., 2017), notou-se a diminuição das medianas para as variáveis CT e A10 nos grupos G1 e G2, no EXTEM. A diminuição do tempo de coagulação é um fator importante para estados de hipercoagulabilidade, já que estas variáveis não podem ser avaliadas isoladamente. A diminuição da amplitude do coágulo (MCF) em ambos os grupos em relação aos valores de referência não apresenta significado clínico, pois apenas a sua elevação apresenta relação com a qualidade da formação do coágulo como explica Crochemore et al., 2017.

Quando observadas as variações descritivas não significativas dos parâmetros do ROTEM, em relação aos valores de referência (Marly-Toucher et al., 2017), notou-se a diminuição das medianas para a variável CT e aumento na variável LM no grupo G1 no INTEM. Porém não foi possível relacioná-los a estados de hipercoagulabilidade, e hiperfibrinólise, pois apesar dessas alterações, o estudo em questão não fornece evidências possíveis de quadros de hipercoagulabilidade em gatos portadores e não portadores da mutação quando avaliados através da tromboelastometria. Segundo Stokol et al. (2008), quadros de hipercoagulabilidade foram observados em gatos com TEA, secundário a MCH, que foram caracterizados pela alteração de dois dentre quatro parâmetros hemostáticos sendo eles: fibrinogênio, FVIII, proteína C, dímeros D, complexo trombina antitrombina (TAT), afirmando que a hipercoagulabilidade não poder ser caracterizada utilizando-se apenas um teste. Definiram, portanto, que o aumento nas concentrações de substâncias pró coagulantes e marcadores de geração de trombina fornecem evidências mais fortes de desequilíbrio hemostático.

Desta forma, destaca-se a importância de se aliar as análises obtidas pela TEM com outros biomarcadores para avaliação da hemostasia.

As variáveis no FIBTEM de ambos os grupos estiveram dentro do intervalo de referência descritos por Marly-Toucher et al. (2017). Para Sigrist et al. (2018), em um estudo realizado com tromboelastometria em cães e gatos, a hiperfibrinólise (HFL) foi associada ao aumento comum de CT no EXTEM, diminuição do MCF do FIBTEM e em alguns cães também uma diminuição do MCF no EXTEM, indicando que a HFL prejudica a formação do coágulo estável levando a quadros de hipercoagulabilidade. Tais observações não foram evidenciadas nos animais do presente estudo quando comparados os grupos G1 e G2, portanto mais pesquisas investigando os mecanismos de HFL primária e secundária em gatos e cães, bem como indicadores específicos para a previsão de HFL são necessários.

A falta de valores de referência completos e disponíveis na literatura para a espécie com o reagente FIBTEM® comprometeram a análise, portanto mesmo sem alteração significativa entre os grupos, de forma descritiva, não é possível prever se os valores estão de acordo com a referência para a espécie (24), com o reagente FIBTEM®, levando em consideração as variáveis CT, MCF e LM..

Uma limitação do estudo se deve ao fato de que não foi possível realizar a mensuração de T4 total (hormônio tireoidiano), pois o hipertireoidismo é uma das principais causas de miocardiopatias secundárias (SAMPEDRANO et al., 2006). Foram realizadas apenas avaliações bioquímicas para o perfil renal, hepático e outros marcadores como critério de exclusão e inclusão para doenças de base, apesar dos animais apresentarem alterações clínicas para esta doença e previamente não terem alterações de pressão arterial sistólica, como mencionado e corroborando com os critérios da doença citados por Da Cunha et al. (2008).

Foi observada alteração significativa para as concentrações séricas de albumina, porém dentro do intervalo de referência para a espécie. Esta alteração pode estar relacionada a baixa ingestão proteica, diminuição da síntese proteica, perda de proteínas, hepatopatias, estado catabólico ou como uma alteração inespecífica de um processo inflamatório (ECKERSALL, 2008; CÉRON et al., 2005; MURATA et al., 2009). Para o presente estudo não se pode afirmar que os animais tenham alterações relacionadas a estas condições citadas, já que nenhum dos animais apresentou evidência clínica que pudessem ser relacionadas a tais processos. Outras avaliações

específicas devem ser feitas para avaliar esta afirmação, mas ressalva-se que a observação desta proteína é de suma importância para auxiliar na pesquisa clínica como um perfil de monitoramento dos animais e como biomarcador precoce, mesmo que inespecífico, desde de que esteja associada a avaliação de outras proteínas de fase.

A comparação do perfil tromboelastométrico de animais com e sem alterações ecocardiográficas no G2 (portadores) também não revelou diferenças estatísticas.

O ecocardiograma é o método diagnóstico, mas indicado para identificar a hipertrofia miocárdica, sendo este não invasivo e importante para diferenciar as alterações cardiovasculares, principalmente as miocardiopatias (CHETBOUL et al., 2006; HAGGSTROM et al., 2008), por isso o método foi escolhido para o acompanhamento e triagem dos animais no presente estudo.

De acordo com Trechiou Sechi et al. (2012) e Pellegrino et al. (2014), em gatos persas portadores de mutação, a hipertrofia miocárdica observada está relacionada com o aumento da região septal-basal (0,5- 0,6 cm suspeitos e superior a 0,6 positivos) e que a mesma foi considerada a alteração mais prevalente. O aumento dessa região mesmo sem diferença significativa, também foi observado no presente estudo: 46% (7/15) dos animais do grupo G2 apresentaram valores entre 0,52- 0,69 cm para a região septal basal, enquanto que no G1 26% (4/15) entre 0,54-0,65 cm. Mesmo com as alterações apresentadas, nenhum animal, apresentou alterações de pressão arterial sistólica e outras alterações clínicas.

Chetboul (2012), relatou que o aumento na região septal basal pode justificar a presença de aumento na velocidade do fluxo aórtico e na passagem do sangue na via de saída do ventrículo esquerdo. O que não foi observado no presente estudo. Para os animais que apresentaram aumento da região septal basal citados anteriormente, foram observadas alterações como insuficiência discreta a moderada da valva mitral, movimento anterior sistólico (MAS) e alterações em músculos papilares, tanto para o G1 quanto para o G2. A avaliação dos músculos papilares é considerada uma avaliação subjetiva e não pode ser avaliada unicamente para determinação do risco para cada animal avaliado (GRAZIANO, 2007). A progressão do MAS pode acarretar na obstrução da via de saída do VE, e a presença da mesma causar uma isquemia miocárdica futura (HAGGSTROM, 2008). Portanto, para os animais avaliados, principalmente os portadores (G2), com alterações nas regiões septal basal existe a

necessidade de um acompanhamento seriado com o ecocardiograma como paliativo para progressão da doença, identificando precocemente a presença de disfunções diastólicas importantes e hipertrofia atrial que levam ao desenvolvimento de quadros secundários graves, como o tromboembolismo arterial.

Segundo Haggstrom et al. (2008), Côte et al. (2011) e Pellegrino et al. (2014), considera-se alteração hipertrófica quando a espessura da parede ventricular esquerda e ou septo interventricular ultrapassar 0,6 cm. Para o presente estudo não foram observadas alterações significativas quando levadas em consideração as regiões supracitadas (acima de 0,6 cm), mas para estas mensurações, cinco animais do G1 e cinco animais do G2, apresentaram valores limítrofes ($> 0,5$ cm), para SIVd e PVd, sendo que três animais dos cinco para o G2 e quatro animais dos cinco para o G1, também apresentaram alterações hemodinâmicas e da região septal basal citada anteriormente, reiterando que mesmo sem diferença significativa existe uma relevância clínica para as variáveis e o proposto sobre o acompanhamento clínico e ecocardiográfico destes.

A avaliação da pressão arterial sistólica e alterações relacionadas a mesma não foram observadas em ambos os grupos avaliados. Esta análise é importante para diferenciar a hipertrofia miocárdica de outras doenças que causem alterações cardiovasculares e falso aumento pelo estresse (BROWN et al., 2007), por tal fato foi utilizada como critério de inclusão e exclusão do estudo em questão. Para os animais amostrados as pressões arteriais sistólicas não ultrapassaram 150mmHg e os animais não apresentaram alterações clínicas que justificassem a presença de outras doenças sistêmicas.

O diâmetro ventricular, tanto na sístole quanto na diástole, apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$), para o G1. Normalmente, em animais afetados pela doença ocorre a diminuição da cavidade do VE (SCHWARTZ, 2007), mas mesmo que a afirmação corrobore com o observado no presente estudo e a relevância clínica da mesma seja importante, não foi possível afirmar que os animais portadores da mutação grupo G2, possuem MCH em sua forma clínica, pois outros achados podem ser compatíveis e ou incompatíveis com esta doença e normalmente o principal parâmetro levado em consideração para o diagnóstico são as medidas ecocardiográficas do septo interventricular e da parede livre do VE $> 0,55-0,6$ cm,

durante a diástole (RUSH, 2002; COTE et al., 2011; HAGGSTROM, 2008; FREEMAN 2017), dado que não se alterou significativamente no estudo em questão.

Investigações que avaliam a hemostasia em pacientes que possuem miocardiopatia na rotina do atendimento clínico veterinário ainda são escassas. A avaliação mais acurada das alterações hemostáticas nesses pacientes, por meio de equipamentos como o ROTEM, se faz necessária, haja vista o processo complexo que pode ser encontrado em distúrbios hemostáticos provenientes de alterações hemodinâmicas.

8. CONCLUSÃO

Com base neste estudo e levando em consideração a metodologia utilizada, pode-se afirmar que não foram observadas diferenças significativas entre os animais portadores e não portadores da mutação A31P no gene MYBPC3 para MCH na tromboelastometria pela ativação da via extrínseca (EXTEM®), intrínseca (INTEM®), e pela adição de citocalasina D que inibe a função plaquetária (FIBTEM®).

Os animais portadores apresentaram alteração nas concentrações de albumina, quando comparados aos animais não portadores. A alteração do diâmetro ventricular durante a sístole e durante a diástole confirma uma possível disfunção diastólica, nos animais portadores da mutação A31P-MYBPC3. Os animais portadores também apresentaram tempo de coagulação diminuído e aumento da lise máxima em relação aos valores de referência no teste INTEM®, porém tais alterações não são confirmatórias de quadros de hipercoagulabilidade quando não associadas a outros testes hemostáticos.

Nota-se a importância de associar as alterações do ecocardiograma com exames laboratoriais específicos como a tromboelastometria, pois podem identificar em conjunto alterações que, mesmo sem valor significativo, se correlacionam pela importância clínica. Portanto, são necessários estudos clínicos para comprovação de que os achados de hipercoagulabilidade sanguínea estão relacionados a essas doenças e impliquem na ocorrência de eventos trombóticos. Assim, o diagnóstico preventivo destas alterações, principalmente em animais geneticamente predispostos, contribuirá com a busca para a melhoria do prognóstico e sobrevida destes animais.

9. REFERÊNCIAS:

ABBOTT, J.A. Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: An Update. **Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice**, v.40, p.685-700, 2010.

BATY, C. J. Feline hypertrophic cardiomyopathy: an update. **Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice**, v.34, p.1227-1234, 2004.

BEDARD, C.; LANEVSCHI-PIETERSMA, A.; DUNN, M. Evaluation of coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy. **Veterinary Clinical Pathology**. v.36, p.79–84, 2007.

BONAGURA, J. D. Feline cardiomyopathies. In: FUENTES, V. L.; JOHNSON, L. R.; DENNIS, S. **BSAVA Manual of canine and feline cardio respiratory medicine**. 2. ed. Gloucester: BSAVA, 2010. cap. 25, p. 220-236.

BORGEAT, K.; CASAMIAN-SORROSAL, D.; FUENTES, V. L.; CONNOLLY, D. J. Association of the myosin binding protein C3 mutation (MYBPC3 R820W) with cardiac death in a survey of 236 Ragdoll cats. **Journal of Veterinary Cardiology**, v.16, p. 73-80, 2014.

BOON J.A. **Manual of veterinary echocardiography**. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2 edição, p.610, 2011.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 542-558, 2007.

CAMERER E, KOLSTO AB, PRYDZ H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. **Thromboses Research**.v.81, p.1-41, 1996.

CÉRON, J.J; ECKERSALL, P.D.; MARTINEZ- SUBIELA, M. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p. 85-99, 2005.

CHETBOUL, V.; SAMPEDRANO, C. C.; GOUNI, V.; NICOLLE, A. P.; POUCHELON, J. L. Two-dimensional color tissue Doppler imaging detects myocardial dysfunction before occurrence of hypertrophy in a young Maine Coon cat. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 47, n. 3, p. 295-300, 2006b.

CHETBOUL, V.; GOUNI, V.; SAMPEDRANO, C. C.; TISSIER, R.; SERRES, F.; POUCHELON, J. L. Assessment of regional systolic and diastolic myocardial functions

using Tissue Doppler and Strain Imaging in dogs with dilated cardiomyopathy, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 719-739, 2007.

CHETBOUL, V. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 532-541, 2012.

CONNOLLY, D. J.; MAGALHAES, R. J.; SYME, H. M.; BOSWOOD, A.; FUENTES, V. L.; CHU, L.; METCALF, M. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 1, p. 90-105, 2008.

CÔTÉ, E. Feline Congestive Heart Failure: Current Diagnosis and Management. **Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice**, v.47, n.5, p.1055-1064, 2017.

CÔTÉ, E.; MCDONALD, K.A.; MEURS, K.M.; SLEEPER, M.M. Hypertrophic cardiomyopathy. In: CÔTÉ, E.; MCDONALD, K. A.; MEURS, K. M.; SLEEPER, M. M. **Feline Cardiology**. Wiley Blackwell, p.103–175, 2011.

DA CUNHA, M.G.M.C.M; PIPPI, N.L; GOMES, K.; BECHMANN, D.V.; Hipertireoidismo felino. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1486-1494, 2008.

DANDEL, M.; LEHMKUHL, H.; KNOSALLA, C.; SURAMELASHVILI, N.; HETZER, R. Strain and Strain Rate Imaging by Echocardiography – Basic Concepts and Clinical Applicability. **Current Cardiology Reviews**. v.5, n.2, p.133-148, 2009.

DENGATE, A.L.; MOREL-KOPP, M.C.; BEATTY, J.D.; BARRS, V.; BRADDOCK, J.A.; CHURCHER, R.K.; WILSON, B.J.; WARD, C.M.; Differentiation between dogs with thrombosis and normal dogs using the overall hemostasis potential assay. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v. 26, p.446–452, 2016.

DODERLEIN, E. AND MISCHKE, R. Reference intervals for thromboelastometry with the ROTEM delta in cats, **Research Veterinary Science**, v.100, p. 271-276, 2015.

DE LAFORCADE, A. Diseases Associated with Thrombosis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.27. p. 59-64, 2012.

FERASIN, L. Feline cardiomyopathy. **In Practice**. v.34, p.204-213, 2012.

FERASIN, L. Feline myocardial disease- diagnosis, prognosis and clinical management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 183-194, 2009.

FOX, P.R.; SCHOBBER, K.E.; Management of asymptomatic (occult) feline cardiomyopathy: challenges and realities. **Journal of Veterinary Cardiology**. v.17, p.150-S158, 2015.

FOX, P. R., ET AL. International collaborative study to assess cardiovascular risk and evaluate long-term health in cats with preclinical hypertrophic cardiomyopathy and apparently healthy cats: The REVEAL Study, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.32, n.3, p.930-943, 2018.

FREEMAN, L. M., et al. Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: A Spontaneous Large Animal Model of Human HCM, **Cardiology Research**, v.8, n.4, p.139-42,2017.

FUENTES, V.L; WILKIE, L.J. Asymptomatic Hypertrophic Cardiomyopathy: Diagnosis and Therapy. **Veterinary Clinical Small Animals**. v.47, p. 1041–1054, 2017.

FUENTES, V. L. Arterial thromboembolism: risks, realities and a rational first-line approach. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 7, p. 459-470, 2012.

GAILANI D, RENNÉ T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. **Arterioscleroses Thromboses Vascular Biology**, v.27, p.2507-2513, 2007.

GODIKSEN, M. T.; GRANSTROM, S.; KOCH, J.; CHRISTIANSEN, M. Hypertrophic cardiomyopathy in young Maine Coon cats caused by the p. A31P cMyBP-C mutation- the clinical significance of having the mutation. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 9, p. 53-57, 2011.

GORLINGER K, DIRKMANN D, SOLOMON C, et al. Fast interpretation of thromboelastometry in non-cardiac surgery: reliability in patients with hypo-, normo-, and hypercoagulability. **Brazilian Journal Anaesthesiology** , v.110, p. 222- 230, 2013.

GRAZIANO, P.; ACQUATELLA, H. Ecocardiografia clínica na cardiomiopatia hipertrófica- importância do diagnóstico diferencial na tomada de decisões. In: SILVA, C. R. S. Ecocardiografia: princípios e aplicações clínicas. Rio de Janeiro: Revinter, 1 edição, p. 681-712, 2007.

HAAS T, SPIELMANN N, MAUCH J, et al. Comparison of thromboelastometry (ROTEM(R)) with standard plasmatic coagulation testing in paediatric surgery. **Brazilian Journal Anaesthesiology**, v.108, p.36-41, 2012

HÄGGSTRÖM J, FUENTES VL and WESS G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats. **Journal Veterinary Cardiology**. v.17, p. 134-S149, 2015.

HOFFMAN M., MONROE D.M, ROBERTS H.R. Cellular interactions in hemostasis. **Haemostasis**. v.26, n.1, p.12-16, 1996.

HOGAN, D. F. Feline Cardiogenic Arterial Thromboembolism: Prevention and Therapy, **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v.47, p.1065-82, 2017.

KIMURA, Y., et al. Epidemiological and clinical features of the endomyocardial form of restrictive cardiomyopathy in cats: a review of 41 cases, **Journal Veterinary Medicine Science**, v.8, n.5, p.781-784, 2016.

KITTLESON, M. D.; MEURS, K. M.; MUNRO, M. J.; KITTLESON, J. A.; LIU, S. K.; PION, P. D.; TOWBIN, J. A. Familial hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats: an animal model of human disease. **Circulation**, v. 99, p. 3172-3180, 1999.

LANG T, BAUTERS A, BRAUN SL, ET AL. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. **Blood Coagulation Fibrinolysis** v.16, p.301-310, 2005.

LANG T., JOHANNING K., METZLER H. et al. The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. **Anesthesiology Analgesia**.v.108, p. 751-810, 2009.

LI, R. H., et al. Platelet Activation and Clopidogrel Effects on ADP-Induced Platelet Activation in Cats with or without the A31P Mutation in MYBPC3, **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.30, n.5, p.1619-1629, 2016.

LINNEY, C. J.; MCEWAN, J. D.; STEPHENSON, H. M.; ALVAREZ, J. L.; FONFARA, S. Left atrial size, atrial function and left ventricular diastolic function in cats with hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, p. 198-206, 2014.

MARLY-VOQUER, C., RIOND, B., SCHEFER, R. J., KUTTER A. P. N. Reference values for rotational thromboelastometry (ROTEM) in clinically healthy cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.2, p. 185 – 192, 2017.

MARON, B. J.; FOX, P. R. Hypertrophic cardiomyopathy in man and cats, **Journal Veterinary Cardiology**, v.17, n. 1, p.6-9, 2015.

MARSIGLIA, J. D. C.; CREDIDIO, F. L.; OLIVEIRA, T. G. M.; REIS, R. F.; ANTUNES, M. O.; ARAUJO, A. Q.; PEDROSA, R. P.; FERREIRA, J. M. B. B.; MADY, C.; KRIEGER, J. E.; FERNANDEZ, E. A.; PEREIRA, A. C. Clinical predictors of a positive genetic test in hypertrophic cardiomyopathy in the Brazilian population. **Cardiovascular Disorders**, v. 14, n. 36, 2014.

MARSIGLIA, J.D.C.; PEREIRA, A.C. Hypertrophic Cardiomyopathy: How do Mutations Lead to Disease? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.102, n.3, p. 295-304, 2014.

MCDONALD, K. A.; KITTLESON, M. D.; KASS, P. H.; MEURS, K. M. Tissue Doppler imaging in Maine Coon cats with a mutation of myosin binding protein C with

or without hypertrophy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 232-237, 2007.

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

MEURS, K. M.; SANCHEZ, X.; DAVID, R. M.; BOWLES, N. E.; TOWBIN, J. A.; REISER, P. J.; KITTLESON, J. A.; MUNRO, M. J.; DRYBURGH, K.; MCDONALD, K. A.; KITTLESON, M. D. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 23, p. 3587-3593, 2005.

MULLER F.; RENNÉ T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. **Current Opinion Hematology**, v.15, p.516-521, 2008 19.

MURATA, H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, p.28–40, 2004.

OYAMA, M. A. Advances in echocardiography. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v. 34, p. 1083-1104, 2004.

PAIGE, C. F.; ABBOTT, J. A.; ELVINFER, F.; PYLE, R. L. Prevalence of cardiomyopathy in apparently healthy cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 11, p. 1398-1403, 2009.

PAYNE, J. R.; BORGEAT, K.; CONNOLLY, D. J.; BOSWOOD, A.; DENNIS, S.; WAGNER, T.; MENAUT, P.; MAERZ, I.; EVANS, D.; SIMONS, V. E.; BRODBELT, D. C.; FUENTES, V. L. Prognostic indicators in cats with hypertrophic cardiomyopathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1427-1436, 2013.

PAYNE, J. R., et al. Risk factors associated with sudden death vs. congestive heart failure or arterial thromboembolism in cats with hypertrophic cardiomyopathy, **Journal Veterinary Cardiology**, v.17, p.318-28, 2015.

PELLEGRINO, A.; DANIEL, A.T.; PEREIRA, G.G.; JR. LIMA, F.F.; ITIKAWA, P.H.; LARSSON, M.H.M.A. Avaliação da função diastólica por meio de Doppler tecidual pulsado e colorido em gatos da raça Maine Coon geneticamente testados para a mutação no gene MyBPC-A31P. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.3, p.290-300, 2014.

RENNÉ T., POZGAJOVÁ M., GRUNER S. et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. **Journal Experimental Medicine** v.202, p. 271-281, 2005.

RUSH, J. E.; FREEMAN, L. M.; FENOLLOSA, N. K.; BROWN, D. J. Population and survival characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990-1999). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 202 – 207, 2002.

SANTOS M.T, VALLES J., MARCUS A.J., et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. **Journal Clinic Investigation**. v.87, n.2, p.571-580, 1991.

SCHOBER, K. E., SAVINO, S. I., AND YILDIZ, V. Right ventricular involvement in feline hypertrophic cardiomyopathy, **Journal Veterinary Cardiology**, v.18, p 297-309 2016.

SCHMALBACH B, STEPANOW O, JOCHENS A, et al. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. **Cerebrovasc Dis**. v.39, p. 176–180, 2015.

SIGRIST, N.E; JUD SCHEFER, R.J; KUTTER, A.P.N. Characteristics of hyperfibrinolysis in dogs and cats demonstrated by rotational thromboelastometry (ROTEM), **The Veterinary Journal**, v. 242, p. 67-73, 2018.

SILLER-MATULA JM, PLASENZOTTI R, SPIEL A, et al. Interspecies differences in coagulation profile. **Thromboses Haemostasis** v.100, p.397-404, 2008.

SMITH, S.A.; TOBIAS, A.H.; JACOB, K.A.; FINE, D.M.; GRUMBLES, P.L. Arterial Thromboembolism in Cats: Acute Crisis in 127 Cases (1992–2001) and Long-Term Management with Low-Dose Aspirin in 24 Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.17, p.73–83, 2003.

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

STANZANI, G., et al. Evaluation of red blood cell distribution width in cats with hypertrophic cardiomyopathy, **Journal Veterinary Cardiology**, v.17 n. 1, p. 233-243, 2015.

STOKOL, T. et al. Hypercoagulability in Cats with Cardiomyopathy, **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 22, p. 546–552, 2008.

TABLIN, F., et al. Platelet activation in cats with hypertrophic cardiomyopathy, **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.28, n.2, p. 411-418, 2014.

TEARE, D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. **British Heart Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 1958.

THIJS T., NUYTTENS B.P., DECKMYN H, et al. Platelet physiology and antiplatelet agents. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**.v. 48, n.1, p. 3-13, 2010

TREHIOU-SECHI, E.; TISSIER, R.; GOUNI, V.; MISBACH, C.; PETIT, A. M.; BALOUKA, D.; SAMPEDRANO, C. C.; CASTAIGNET, M.; POUCHELON, J. L. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, n.3, p. 532-541, 2012.

THOMAS, W. P.; GABER, C. E.; JACOBS, G. J.; KAPLAN, P. M.; LOMBARD, C. W.; MOÏSE, N. S.; MOSES, B. L. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 247-252, 1993.

WARE, W. **Cardiovascular disease in small animal medicine**. London: Manson Publishing Ltd, p.396, 2007.

WEIKERT U, KUHL U, SCHULTHEISS HP, RAUCH U. Platelet activation is increased in patients with cardiomyopathy: Myocardial inflammation and platelet reactivity. **Platelets**, v.13, p.487-491, 2002.

WINNENBERG, B; JESSEN, L.R; TAINOW, I.; KRISTENSEN, A.T. Diagnostic and treatment of platelet hyperactivity in relation to thrombosis in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n.1, p. 42–58, 2012.

UEDA, J.A; STERN, Y. A One Health Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy, **Yale Journal of Biology and medicine**, v.90, p. 433-498, 2017.

CAPÍTULO II

***ARTIGO A SUBMISSÃO DA REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ANEXO 8***

1 **Perfil Tromboelastométrico de gatos da raça Maine Coon portadores e não portadores da**
2 **mutação (A31P-MYBPC3).**

3 **Tromboelastometry profile of Cats of Maine Coon breed carriers and non-carriers (A31P-**
4 **MYBPC3).**

5 ¹Pedrita Carvalho F. Assunção*; ²Arine Pellegrino.; ²Alexandre G. T. Daniel.; ¹ Tatiana G.
6 Gorensttein; ¹ Felipe Gazza Romão; ¹ Adriana A. Lopes; ¹ Grazielly M. da Cunha; ¹Regina
7 Kiomi Takahira.

8
9 ¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Paulista “Júlio de Mesquita
10 Filho”- Campus Botucatu- São Paulo- SP.

11 ² Gattos – Clínica Médica Especializada em Medicina Felina- São Paulo- SP.

12 *pedritacfassuncao@gmail.com

13
14 **Resumo**

15 A raça Maine Coon tem predisposição ao desenvolvimento da miocardiopatia hipertrófica e
16 existem mutações relacionadas a doença, uma delas é a A31P localizada no gene da proteína C
17 miosina ligante (MYBPC3). Estados de hipercoagulabilidade e alterações hemostáticas nesta
18 raça podem estar relacionados a presença desta mutação. Um dos testes que avalia o perfil
19 hemostático é a tromboelastometria (TEM). Gatos da raça Maine Coon portadores (G1= 15) e
20 não portadores (G2=15), da A31P-MYBPC3, foram submetidos ao perfil tromboelastométrico.
21 Foram coletadas amostras de sangue em momento único em tubo contendo citrato de sódio e
22 analisadas em até 20 minutos no equipamento ROTEM com os reagentes: INTEM®, EXTEM®
23 e FIBTEM; E avaliadas as variáveis: CT (tempo de coagulação); CFT (tempo de formação do
24 coágulo); Ângulo α ; A10 a A20 (firmeza do coágulo, entre os tempos 10 e 20 minutos); MCF
25 (firmeza máxima do coágulo); ML (lise máxima). A análise estatística considerou-se o nível de
26 5 % de significância e usados os testes t student e Wilcoxon Mann-Withney (WMW). Não
27 foram observadas alterações significativas quando comparados os grupos portadores e não
28 portadores, portando dentro das condições e para os animais avaliados não foi possível
29 identificar quadros de hipercoagulabilidade relacionados a presença da mutação (A13P-
30 MYBPC3).

31 Palavras chave: miocardiopatia, hipercoagulabilidade, hemostasia, tromboelastometria.

32
33 **Abstract**

34 The Maine Coon breed is predisposed to the development of hypertrophic cardiomyopathy and
35 there are mutations related to a disease, one of which is an A31P located in the protein C myosin
36 ligand (MYBPC3) gene. States of hypercoagulability and hemostatic correction may be listed
37 as the presence of this mutation. One of the tests that evaluates the hemostatic is a
38 thromboelastometry (TEM). Maine Coon carriers (G1 = 15) and non-carriers (G2 = 15) of
39 A31P-MYBPC3 were along the thromboelastic profile. Blood samples were taken during the
40 course of life. Single in tube containing sodium citrate and analyzed in up to 20 minutes in
41 ROTEM with reagents: INTEM®, EXTEM® and FIBTEM; And evaluated as variables: CT
42 (coagulation time); CFT (clot formation time); Angle α ; A10 to A20 (clot firmness between 10
43 and 20 minutes); MCF (maximum clot firmness); ML (maximum lysis). A statistical analysis
44 considered the significance level of 5% and the use of testicles and Wilcoxon Mann-Withney
45 (WMW). The changes were not observed when comparing the carrier and non-carrier groups,
46 taking the conditions and comparing the groups of patients with high capacity of
47 hypercoagulability related to the presence of the mutation (A13P-MYBPC3).

48 **Key words:** myocardiopathy, hypercoagulability, hemostasis, tromboelastometry.

49

50 **Introdução**

51 Na medicina felina a classificação da doença miocárdica segue as definições da WHO (*World*
52 *Helth Organization*) e guidelines padronizados por meio de diagnósticos reportados e descritos
53 na literatura. (Godiksen *et al.*, 2011; Chetboul, 2012; Freeman *et al.*, 2017) A classificação
54 comum da miocardiopatia é hipertrófica, restritiva e dilatada. Ademais, a miocardiopatia
55 secundária a condições valvulares, isquêmicas ou inflamatórias, podem geram o mesmo
56 mecanismo para o desenvolvimento da doença e estudos relacionados a mecanismos
57 compensatórios e as alterações causadas pela doença tem sido cada vez mais estudados, não só
58 aqueles relacionados a contratilidade, mas também a arritmogenicidade (Haggstrom, 2015;
59 Maron e Fox , 2015; Fox *et al.*, 2018)

60 A prevalência da mutação A31P em Maine Coon é de aproximadamente 34% em todo o mundo.
61 A penetrância da mutação não é 100% e alguns animais da raça Maine Coon com a mutação
62 A13P não desenvolvem hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), por outro lado alguns animais
63 são diagnosticados com miocardiopatia hipertrófica (MCH) e não são portadores da mutação
64 A31P O prognóstico é desfavorável em gatos afetados homozigotos em comparação com
65 heterozigotos afetados. O teste genético é de suma importância para garantir a viabilidade
66 reprodutiva dos animais (Paige *et al.*, 2009; Pellegrino *et al.*, 2014)

67 Embora a compressão dos fatores de risco para o desenvolvimento das miocardiopatias tenha
68 avançado, muitos animais ainda permanecem sem diagnóstico e ou sem acompanhamento, até
69 que apresentem uma crise clínica relacionada a quadros de tromboembolismo arterial. Embora
70 a ecocardiografia seja a principal ferramenta diagnóstica para a identificação e classificação das
71 miocardiopatias e da MCH (Ferasin, 2009), o acompanhamento de gatos portadores e a
72 avaliação do seu perfil hemostático auxilia previamente em intervenções clínicas garantindo o
73 bem-estar e o estado de hígidez destes animais e reconhecer possíveis gatos vulneráveis.

74 A MCH em felinos, se assemelha a MCH no homem em seu aspecto clínico e patológico e esta
75 espécie representa um modelo animal importante para a pesquisa da doença em humanos,
76 nenhuma outra espécie animal desenvolve espontaneamente MCH como o humano além dos
77 felinos (Kittelson *et al.*, 1999; Rush *et al.*, 2002; Meurs *et al.*, 2009).

78 Em humanos a literatura descreve 11 genes que codificam proteínas do sarcômero e que são
79 responsáveis pelo desenvolvimento da MCH, estes apresentam uma heterogeneidade genética
80 substancial com mais de 1500 mutações relatadas em pacientes, em sua maioria patogênicos e
81 associados a herança familiar com risco de desenvolver o fenótipo da doença (Marsiglia e
82 Pereira, 2014)

83 Nos gatos, a miocardiopatia hipertrófica é também doença familiar com transmissão
84 autossômica dominante. Dados genéticos surgiram nos últimos muitos anos. Duas mutações
85 causais na miosina proteína de ligação C (MYBPC3) gene foram identificados com MCH no
86 gato Maine Coon (mutação A31P) (Meurs *et al.*, 2005; Mc Donald *et al.*, 2007; Mary *et al.*,
87 2010).

88 A MCH em gatos é associada a ocorrência de morte súbita, insuficiência cardíaca e
89 tromboembolismo arterial, pois esta doença pode causar danos endoteliais graves ou
90 disseminados que levam a perda das funções endoteliais antiplaquetárias, anticoagulantes e
91 fibrinolíticas normais (Payne *et al.*, 2015) A trombose patológica é favorecida pelo aumento da
92 coagulabilidade e da ativação plaquetária. O endotélio lesado libera fator tecidual e fatores
93 antifibrinolíticos e o tecido subendotelial exposto causa trombose por agir como substrato à
94 formação de coágulos e estimular a adesão e a agregação plaquetárias. Em todas as formas de
95 miocardiopatia felina há lesão miocárdica. Estas lesões podem desencadear um processo
96 trombótico por indução da adesão e agregação das plaquetas aos substratos expostos pelo tecido
97 lesionado com subsequente ativação da cascata de coagulação. A trombose é capaz de causar
98 variadas sequelas clínicas, podendo ser descoberta apenas na necropsia ou ainda, nunca ser
99 descoberta. A localização e o tamanho dos coágulos são fatores que irão definir a grau de

100 comprometimento funcional da área atingida (Stokol *et al.*, 2008; Tablin *et al.*, 2014; Payne *et*
101 *al.*, 2015).

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

113 A avaliação da participação das plaquetas pela TEM é indireta (Smith *et al.*, 2010). Os
114 parâmetros analisados pelo teste são: tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo
115 (CFT), ângulo α (alfa), firmeza máxima do coágulo (MCF) e a porcentagem de fibrinólise
116 máxima (ML). O tempo de coagulação é o tempo para o início da formação da fibrina sendo
117 um indicador da atividade dos fatores de coagulação plasmáticos. O tempo de formação do
118 coágulo corresponde ao início da ativação das plaquetas e fibrinogênio, formando no gráfico
119 uma angulação α que corresponde à cinética da formação do coágulo. A firmeza máxima do
120 coágulo depende das plaquetas e da ativação do fibrinogênio e fator XIII (McMichael e Smith,
121 2011). A técnica foi validada para monitoração hemostática em caninos (Smith *et al.*, 2010),
122 equinos (Kol e Borjesson, 2010) e felinos (Marscher, 2010; Marly Voquer *et al.*, 2017).

123 O presente trabalho tem como objetivo avaliar o perfil hemostático através do teste de
124 tromboelastometria de animais portadores e não portadores da mutação A31P no gene
125 MYBPC3 (A31P-MYBPC3).

126

127 **Material e Métodos**

128 O estudo foi realizado em gatos atendidos na rotina da Clínica Especializada em Medicina
129 Felina Gattos, situada na região Metropolitana de São Paulo, em parceria com a Associação da
130 Raça Maine Coon no Brasil (AMACCOON) e as análises laboratoriais realizadas no Laboratório
131 Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP. Foram incluídos
132 30 gatos, sem predileção por sexo e com idade variada entre dois e 12 anos sendo 15 não
133 portadores (G1) e 15 portadores da mutação A31P - MYBPC3, com *screening* genético (PCR-

134 reação de cadeia polimerase) prévio. Todos os tutores (criadores), assinaram um termo de
135 consentimento “Livre e Esclarecido” para conhecimento dos procedimentos que foram
136 realizados e todas as normas seguiram os protocolos e avaliação da Comissão de Ética no Uso
137 de Animais (protocolo n 0164/2018) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
138 (FMVZ)- Unesp/ Botucatu.

139 No *screening* genético por PCR, dos animais selecionados o sequenciamento do DNA revela
140 troca no par de bases (G por C) no códon 31 (exon 3) em gatos afetados e este teste é padrão os
141 animais raça Maine Coon, que são usados como reprodutores em gatis.

142 Para determinação do estado de higidez dos gatos foram realizados hemograma, dosagem de
143 proteína total plasmática e sérica, albumina, enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato
144 aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (GGT), ureia,
145 creatinina, glicose, frutossamina, creatinaquinase (CK). Para inclusão no estudo os resultados
146 deveriam se apresentar dentro dos intervalos de referência para a espécie.

147 **Amostras**

148 Foram colhidos em momento único, 1,8 ml de sangue em tubo citratado a 3,2% (BD
149 Vacuntainer®) pela da veia jugular no grupo G1 (n=10) e no grupo G2 (n=15) e em cinco
150 animais do G1 as coletas foram realizadas por punção da veia femoral, devido ao
151 comportamento dos animais e com a intenção de garantir o bem estar dos animais avaliados
152 pelas boas práticas da medicina felina. As amostras foram processadas no ROTEM (Delta ®)
153 20 minutos após a colheita. A colheita de sangue foi realizada preferencialmente na veia jugular,
154 quando não foi possível devido ao comportamento do animal e visando sempre o bem-estar do
155 animal de acordo com as boas práticas clínicas da medicina felina.

156 A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM (Delta®, Pentapham, Munique,
157 Alemanha) mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles
158 foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio
159 0,2 mol/L) sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal,
160 empregando-se os seguintes reagentes: INTEM® (20µL, fosfolipídios de 26 tromboplastina
161 parcial, Pentapham, Munique, Alemanha), EXTEM® (20µL, tromboplastina tecidual,
162 Pentapham, Munique, Alemanha) e FIBTEM® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL
163 citocalasina, Pentapham, Munique, Alemanha). E avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo
164 de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo):
165 velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de
166 fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); A10 a A20: firmeza do coágulo, pela
167 amplitude entre os tempos 10 e 20 minutos; MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do

168 pico da força/resistência do coágulo; ML (lise máxima): medida do tempo para perda da
169 resistência de um coágulo.

170 O hemograma para a triagem e inclusão dos animais foi realizado no Laboratório Clínico
171 Veterinário da UNESP de Botucatu em contador hematológico Procyte (Idexx®), e o
172 hematócrito confirmado através da técnica do microhematócrito, a contagem diferencial de
173 leucócitos realizada manualmente em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico
174 rápido (Laborclin®).

175 Os testes bioquímicos alanina amino-transferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST),
176 fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil-transferase (GGT), uréia e creatinina, proteínas totais
177 séricas, albumina, glicose, frutossamina, cálcio foram realizados em equipamento de bioquímica
178 automatizada (Mindray® - BS200 E) utilizando kits comerciais (Bioclin® e Labtest®).

179

180 **Resultados**

181 Foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis
182 estudadas. O teste de normalidade utilizado foi o teste de Shapiro Wilk e para comparar os
183 resultados entre os dois grupos com variáveis não paramétricas utilizou-se o teste de Wilcoxon-
184 Mann-Whitney (WMW). Todas as análises foram consideradas significativas com 5% de
185 significância ($p < 0,05$), e o programa estatístico utilizado foi o Graphpad Prism® Versão 6.

186 Foram observadas 15 fêmeas (60% G1 e 40% G2) e 15 machos (40% G1 e 60% G2), a média
187 da idade dos animais em ambos os grupos foi de 7 anos ($\pm 6,7$) sendo G1 6 anos ($\pm 5,6$) e G2 8
188 anos ($\pm 7,9$). A média de idade das fêmeas do G1 foi de 6 anos ($\pm 5,5$) e do G2 10 anos ($\pm 9,5$).
189 Para os machos a média de idade do G1 $\pm 5,5$ e para o G2 $\pm 5,6$.

190 Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), para os parâmetros do ROTEM®,
191 quando comparados os os grupos G1 (positivos para a mutação) e G2 (negativos para a
192 mutação), para as variáveis da avaliação pelo EXTEM® (Tab.1) INTEM® (Tab. 2) e
193 FIBTEM® (Tab.3). Na avaliação descritiva foram observadas alterações para os valores das
194 medianas quando comparados aos valores de referência para o grupo G2 nas variáveis CT e
195 A10 no EXTEM (Tab. 1 e Fig. 1) e para as variáveis CT e LM no INTEM (Tab. 2 e Fig. 2).

196 Tabela 1: Mediana e intervalos interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®-
197 EXTEM®), nos grupos G1 e G2 de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT (34-52)	28	21	40	19	74	29	15	34	9	52	0,22
CFT (41-260)	57	50	70	40	696	81	66	99	46	340	0,05
A° alpha (59-82)	78	70	80	31	82	76	74	80	54	81	0,86
A10 (59-82)	57	44	62	19	70	52	44	56	25	64	0,21
A20 (30-68)	62	49	66	24	72	56	48	65	29	69	0,36
MCF (36-73)	63	56	67	31	73	57	50	67	36	73	0,47
LM (0-23)	5	1	7	0	33	14	1,5	26,7	0	55	0,22

198 CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10
 199 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise máxima (%) porcentagem;
 200 Min: mínimo; Máx: máximo.

201
202

203

204 Tabela 2: Mediana e intervalos interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®-
 205 INTEM®), nos grupos G1 e G2 de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT (126-254)	160	152	180	67	237	117	98	198	31	259	0,56
CFT (48-251)	94	61	183	52	423	94	79	151	68	909	0,47
A° alpha (53-80)	72	59	77	26	80	72	68	75	28	78	0,86
A10 (31-68)	53	40	58	21	64	45	35	52	16	63	0,22
A20 (37-73)	55	51	63	28	68	51	27	60	22	67	0,08
MCF (40-78)	57	53	63	33	70	46	35	63	5	67	0,06
LM (0-8)	6	3	18	0	54	17	6,7	61,7	0	100	0,09

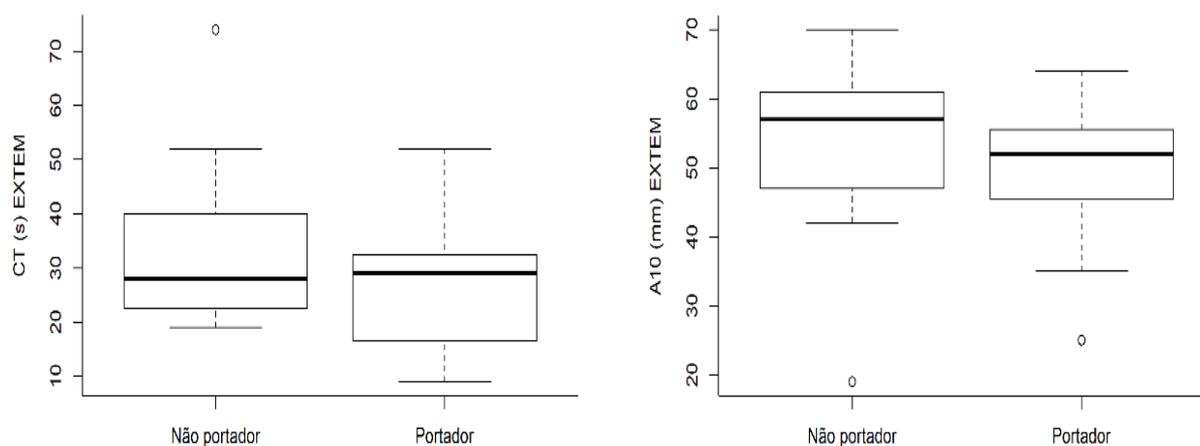
206 CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10-
 207 amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise
 208 máxima (%) porcentagem; Min: mínimo; Máx: máximo;

209 Tabela 3: Mediana e intervalos interquartis dos parâmetros da tromboelastometria (ROTEM®-
 210 FIBTEM®), nos grupos G1 e G2 de gatos da raça Maine Coon.

Parâmetro	G1					G2					Valor de p
	Mediana	25%	75%	Min	Máx	Mediana	25%	75%	Min	Máx	
CT (-)	60	53	66	15	117	41	32	59	22	112	0,07
A° alpha (-)	54	68	76	46	79	67	59	72	7	77	0,58
A10 (2-9)	10	7	14	5	18	10	6	12	3	15	0,38
A20 (2-10)	10	7	15	5	20	10	7	12	2	15	0,28
MCF (3-10)	10	7	16	5	20	11	7	12	2	15	0,21
LM (-)	13	9	22	0	35	18	5,5	25	0	77	0,83

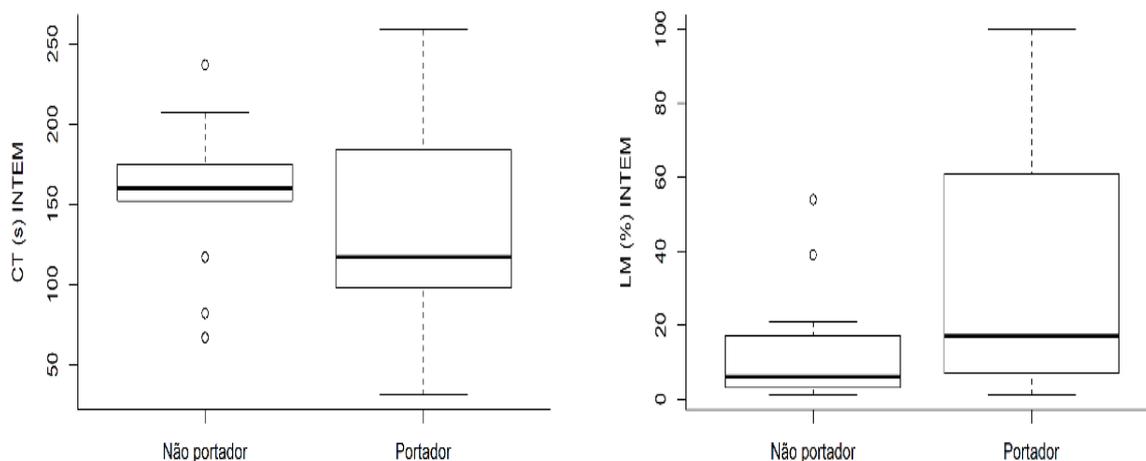
211 CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10
 212 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise máxima (%) porcentagem;
 213 Min: mínimo; Máx: máximo.

214



215 Figura 1: Boxplot das variáveis CT (tempo de coagulação) e A10 (amplitude em 10 minutos)
 216 para o EXTEM nos grupos G1(não portador) e G2 (portador) de gatos da raça Maine Coon.

217



218 Figura 2. Boxplot das variáveis CT (tempo de coagulação) e LM (lise máxima) para o
 219 INTEM nos grupos G1(não portador) e G2 (portador) de gatos da raça Maine Coon.

220
 221
 222
 223
 224

225 **Discussão**

226 Os animais avaliados não apresentavam alterações clínica laboratoriais que indicassem
 227 evidência clínica de MCH ou que justificassem alterações no exame da tromboelastometria
 228 relacionadas a alterações secundárias e a outras comorbidades.

229 O desenvolvimento de trombos em gatos com miocardiopatia hipertrófica é classicamente
 230 atribuído à Tríade de Virchow (lesão endotelial, anormalidades do fluxo sanguíneo e
 231 hipercoagulabilidade (Fuentes, 2012; Hogan, 2017). A hipercoagulabilidade é alteração da
 232 homeostase dos fatores de coagulação e dos seus inibidores que estimulam a geração patológica
 233 de trombina levando a formação do trombo (Stokol *et al.*, 2008). Estes quadros não foram
 234 observados nos animais avaliados, pois não foram observadas diferenças estatísticas entre os
 235 grupos para nenhuma das variáveis observadas.

236 No presente estudo não foram observadas alterações de hipercoagulabilidade sanguínea, pela
 237 TEM, já que não foram observadas alterações de encurtamento do tempo de coagulação (CT) e
 238 do tempo de formação do coágulo (CFT), aumento do ângulo α e da firmeza máxima do coágulo
 239 (MCF), indicadores de estados de hipercoagulação (Stokol *et al.*, 2008). Com a utilização dos
 240 reagentes INTEM® e EXTEM®, constatou-se que a formação da trombina foi normal em
 241 ambos os grupos e a mesma foi avaliada de forma exclusiva em cada via da coagulação,

242 intrínseca e extrínseca respectivamente. Ademais a formação da fibrina a partir do fibrinogênio
243 nos animais avaliados, de acordo com a TEM se mostrou normal, pelo teste FIBTEM, mas esta
244 avaliação não identifica alterações nas funções plaquetárias (McMichael e Smith, 2011).

245 Para ambos os grupos não foram alterações significativas para as os parâmetros do ROTEM®
246 quando analisados pelos testes EXTEM®, INTEM®, FIBTEM® Em estudo com valores de
247 referência as análises realizadas na TEM podem ser comparadas com as análises de tempo de
248 protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, e fibrinogênio (Marly Voquer *et al.*,
249 2017).

250 Quando observadas as variações descritivas mesmo sem diferença significativa dos parâmetros
251 do ROTEM®, e comparados aos valores de referência (Marly Voquer *et al.*, 2017), nota-se a
252 diminuição das medianas para a variável tempo de formação do coágulo CT e aumento na
253 variável LM no grupo G1, no INTEM®, como não foram realizados testes de função
254 plaquetária, fibrinogênio e a comparação com os resultados dos testes convencionais, não é
255 possível relacionar a diminuição a estados de hipercoagulabilidade e hiperfibrinólise, portanto
256 mais avaliações devem ser realizadas para confirmar se os animais amostrados apresentam
257 alterações em algum fator de coagulação relacionado a via intrínseca e ao fator de von
258 Willebrand.

259 Não foi realizada a avaliação conjunta da função plaquetária com a tromboelastometria e a
260 correlação de seus resultados com os testes convencionais de hemostasia, portanto mais estudos
261 devem ser realizados a fim de fornecer mais informações sobre o estabelecimento do perfil
262 hemostático dos animais portadores e não portadores da mutação.

263 Amostras em duplicata não foram realizadas, tendo em vista o proposto anteriormente que
264 ensaios duplicados não sejam necessários quando ativadores são usados e que apenas em
265 amostras recalcificadas o uso é recomendado, o que não ocorreu com as análises realizadas (De
266 Laforcade *et al.*, 2014).

267 A falta de valores de referência completos e disponíveis na literatura para a espécie com o
268 reagente FIBTEM® comprometeram a análise, portando mesmo sem alteração significativa
269 entre os grupos, de forma descritiva, não é possível prever se os valores estão de acordo com
270 a referência para a espécie (Marly Voquer *et al.*, 2017), com o reagente FIBTEM®, levando
271 em consideração as variáveis CT, MCF e LM.

272 As concentrações de substâncias pro coagulantes e marcadores de geração de trombina
273 fornecem evidências mais fortes de desequilíbrio hemostático (Stokol *et al.*, 2008). Para este
274 estudo não foram realizadas nenhuma das análises mencionadas, mas não se pode descartar a

275 informação obtida através da tromboelastometria, mesmo sem alterações significativas e sim
276 aliar as análises obtidas por ela com outros biomarcadores para avaliação da hemostasia.

277

278 **Conclusão**

279 Com base neste estudo e levando em consideração a metodologia utilizada, pode-se afirmar que
280 não foram observadas alterações significativas na tromboelastometria pela ativação da via
281 extrínseca (EXTEM®), intrínseca (INTEM®), e pela adição de citocalasina D que inibe a
282 função plaquetária (FIBTEM®), nos animais portadores e não portadores da mutação do gene
283 MYBPC3, e por esta avaliação não foi possível afirmar que os animais apresentam alteração
284 de hipercoagulabilidade.

285

286 **Agradecimentos**

287 Os autores agradecem a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior),
288 ao Laboratório Clínico Veterinário (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-
289 Unesp/Botucatu), a Clínica Veterinária Gattos (São Paulo- Sp), pelo suporte e auxílio.

290 **Referências**

291 CHETBOUL, V. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic
292 cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). *Journal*
293 *of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, n. 3, p. 532-541, 2012.

294 DE LAFORCADE, A. Diseases Associated with Thrombosis. *Topics in Companion Animal*
295 *Medicine*, v.27. p. 59-64, 2012.

296 FERASIN, L. Feline myocardial disease- diagnosis, prognosis and clinical management.
297 *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 11, p. 183-194, 2009.

298 FOX, P. R., ET AL. International collaborative study to assess cardiovascular risk and evaluate
299 long-term health in cats with preclinical hypertrophic cardiomyopathy and apparently healthy
300 cats: The REVEAL Study, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.32, n.3, p.930-943, 2018.

301 FREEMAN, L. M., et al. Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: A Spontaneous Large Animal
302 Model of Human HCM, *Cardiology Research*, v.8, n.4, p.139-42,2017.

303 FUENTES, V. L. Arterial thromboembolism: risks, realities and a rational first-line approach.
304 *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 14, n. 7, p. 459-470, 2012.

305 GODIKSEN, M. T.; GRANSTROM, S.; KOCH, J.; CHRISTIANSEN, M. Hypertrophic
306 cardiomyopathy in young Maine Coon cats caused by the p. A31P cMyBP-C mutation- the
307 clinical significance of having the mutation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 9, p. 53-57, 2011.

- 308 HÄGGSTRÖM J, FUENTES VL and WESS G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in
309 cats. *Journal Veterinary Cardiology*. v.17, p. 134-S149, 2015.
- 310 HOGAN, D. F. Feline Cardiogenic Arterial Thromboembolism: Prevention and Therapy,
311 *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*, v.47, p.1065-82, 2017.
- 312 KITTLESON, M. D.; MEURS, K. M.; MUNRO, M. J.; KITTLESON, J. A.; LIU, S. K.; PION,
313 P. D.; TOWBIN, J. A. Familial hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats: an animal
314 model of human disease. *Circulation*, v. 99, p. 3172-3180, 1999.
- 315 KOL, A. BORJESSON, D. L. Application of thrombelastography/thromboelastometry to
316 veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39, p.405–416, 2010.
- 317 MARY, J.; CHETBOUL, V.; SANPEDRANO, C. C.; ABITBOL, M.; GOUNI, V.; THEHIU-
318 SECHI, E.; TISSIER, R.; QUENEY, G.; POUCHELON, J. L.; THOMAS, A. Prevalence of the
319 MYBPC3-A31P mutation in a large European feline population and
320 association with hypertrophic cardiomyopathy in the Maine Coon breed. *Journal of Veterinary*
321 *Cardiology*, v.12, p. 155-161, 2010.
- 322 MARSCHNER, C. B.; BJORNVAD, C. R.; KRISTENSEN, A. T.; WIINBERG, B.
323 Thromboelastography results on citrated whole blood from clinically healthy cats depend on
324 modes of activation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.52, p.38, 2010.
- 325 MARLY-VOQUER, C., RIOND, B., SCHEFER, R. J., KUTTER A. P. N. Reference values for
326 rotational thromboelastometry (ROTEM) in clinically healthy cats. *Journal of Veterinary*
327 *Emergency and Critical Care*, v.2, p. 185 – 192, 2017.
- 328 MARON, B. J.; FOX, P. R. Hypertrophic cardiomyopathy in man and cats, *Journal Veterinary*
329 *Cardiology*, v.17, n. 1, p.6-9, 2015.
- 330 MARSIGLIA, J.D.C.; PEREIRA, A.C. Hypertrophic Cardiomyopathy: How do Mutations
331 Lead to Disease? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v.102, n.3, p. 295-304, 2014.
- 332 MCDONALD, K. A.; KITTLESON, M. D.; KASS, P. H.; MEURS, K. M. Tissue Doppler
333 imaging in Maine Coon cats with a mutation of myosin binding protein C with or without
334 hypertrophy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, p. 232-237, 2007.
- 335 MCMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A. Viscoelastic coagulation testing: technology,
336 applications, and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, v.10,p.140–153, 2011.
- 337 MEURS, K. M.; SANCHEZ, X.; DAVID, R. M.; BOWLES, N. E.; TOWBIN, J. A.; REISER,
338 P. J.; KITTLESON, J. A.; MUNRO, M. J.; DRYBURGH, K.; MCDONALD, K. A.;
339 KITTLESON, M. D. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with
340 familial hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, v. 14, n. 23, p. 3587-3593,
341 2005.

- 342 MEURS, K. M.; NORGDARD, M. M.; KUAN, M.; HÄGGSTRÖM, J.; KITTLESON, M.
343 Analysis of 8 sarcomeric candidate genes for feline hypertrophic cardiomyopathy mutations in
344 cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p. 840-
345 843, 2009.
- 346 PAIGE, C. F.; ABBOTT, J. A.; ELVINFER, F.; PYLE, R. L. Prevalence of cardiomyopathy in
347 apparently healthy cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 234, n. 11, p.
348 1398-1403, 2009.
- 349 PAYNE, J. R., et al. Risk factors associated with sudden death vs. congestive heart failure or
350 arterial thromboembolism in cats with hypertrophic cardiomyopathy, *Journal Veterinary*
351 *Cardiology*, v.17, p.318-28, 2015.
- 352 PELLEGRINO, A.; DANIEL, A.T.; PEREIRA, G.G.; JR. LIMA, F.F.; ITIKAWA, P.H.;
353 LARSSON, M.H.M.A. Avaliação da função diastólica por meio de Doppler tecidual pulsado e
354 colorido em gatos da raça Maine Coon geneticamente testados para a mutação no gene MyBPC-
355 A31P. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.34, n.3, p.290-300, 2014.
- 356 RUSH, J. E.; FREEMAN, L. M.; FENOLLOSA, N. K.; BROWN, D. J. Population and survival
357 characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990 -1999). *Journal of*
358 *American Veterinary Medical Association*, v. 220, p. 202 – 207, 2002.
- 359 SMITH, S.A.; MCMICHAEL, M.A.; GALLIGAN, A.J.; GILOR, S.; HOH, C.M. Clot
360 formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced
361 by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v.21, p. 692-
362 702, 2010.
- 363 STOKOL, T. et al. Hypercoagulability in Cats with Cardiomyopathy, *Journal Veterinary*
364 *Internal Medicine*. v. 22, p. 546–552, 2008.
- 365 TABLIN, F., et al. Platelet activation in cats with hypertrophic cardiomyopathy, *Journal*
366 *Veterinary Internal Medicine*, v.28, n.2, p. 411-418, 2014.

CAPÍTULO III

***ARTIGO A SUBMISSÃO DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA-
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ANEXO 9.***

Comparação entre o perfil tromboelastométrico (ROTEM®), de gatos da raça Maine Coon portadores da mutação A31P-MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica com alterações e sem alterações ecocardiográficas.

¹Assunção, P.C.F.; ²Pellegrino, A.; ²Daniel, A.G.T.; ¹Gorenstein, T.G.; ¹Romão, F.G.; Basso, R.M.; Krammer, G.; ¹dos Santos, B.; ¹Takahira, R.K.

¹Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FMVZ- Unesp- Botucatu

²Clínica Especializada em Medicina Felina – GATTOS- São Paulo- Sp.

ABSTRACT- Assunção, P.C.F.; Pellegrino, A.; Daniel, A.G.T.; Gorenstein, T.G.; Romão, F.G.; Takahira, R.K. 2018. [Comparison between the thromboelastometric profile (ROTEM®) of Maine Coon cats with the A31P-MYBPC3 mutation for hypertrophic cardiomyopathy with changes and without echocardiographic changes.] Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Cx Postal 560, 18618-000 - Botucatu, SP. E-mail: pedritacfassun@gmail.com

The Maine Coon breed is a race predisposing to the development of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and mutations associated with it are known to be present, one of which is A31P located in the MYBPC3 binding protein myosin C gene. Echocardiographic examination is the main diagnostic tool for HCM, and alterations present in this examination are presumptive for the diagnosis of the disease. Animals carrying the mutation and with echocardiographic changes should be monitored clinically and laboratorially. With this objective, 15 Maine Coon cats (G1 = 15) from the A31P-MYBPC3 mutation (MCH) were submitted to echocardiographic examination and thromboelastic profile. Of these animals, the blood pressure was evaluated in the right lateral decubitus, cuff 3/5 moments and later blood samples were collected, in a single moment in the sodium citrate content tube and then analyzed until 20 minutes after collection with the reagents: INTEM®, EXTEM® and FIBTEM® on the ROTEM® equipment. Negative animals on the echocardiogram (MYBPC3 + -) were considered as animals with alterations in the interventricular septum region of less than 0.5cm and the suspect carriers (MYBPC3 ++), with a mean of 0.5 to 0.6 cm. The statistical analysis considered the distribution of variables at the 5% level of significance and the t student and Wilcoxon Mann-Withney (WMW) tests were used. No significant changes were observed when comparing the groups evaluated, but descriptive changes were observed when comparing the medians of the variables in thromboelastometry for both groups, suggesting that animals with echocardiographic alterations are more likely to present changes in the reference values for parameters in ROTEM®.

INDEX TERMS: echocardiogram, myocardiopathy, interventricular septum, thromboelastometry, hemostasis.

Resumo- A raça Maine Coon é uma raça predisponente ao desenvolvimento da miocardiopatia hipertrófica (MCH) e sabe-se que existem mutações ligadas a presença da mesma, uma delas é a A31P localizada no gene da proteína C miosina ligante MYBPC3. O exame ecocardiográfico é a principal ferramenta diagnóstica de MCH, e alterações presentes neste exame são presuntivos para o diagnóstico da doença. Animais portadores da mutação e com alterações ecocardiográficas devem ser acompanhados clinicamente e laboratorialmente. Com este objetivo 15 gatos da raça Maine Coon portadores (G1= 15) da mutação A31P-MYBPC3 para (MCH), foram submetidos ao exame ecocardiográfico e ao perfil tromboelastométrico. Destes animais foi avaliada a pressão arterial, em decúbito lateral direito, manguito 3/ 5 momentos e posteriormente colhidas amostras de sangue, em momento único no tubo contendo citrato de sódio e então analisadas até 20 minutos pós coleta com os reagentes: INTEM®, EXTEM® e FIBTEM®, no equipamento ROTEM®. Foram considerados como animais portadores negativo no ecocardiograma (MYBPC3 + -) os animais com alterações em região de septo interventricular menor que 0,5cm e os animais portadores suspeitos (MYBPC3 ++), com a mediada entre 0,5 a 0,6 cm. A análise estatística considerou-se a distribuição das variáveis ao nível de 5 % de significância e usados os testes t student e Wilcoxon Mann-Withney (WMW). Não foram observadas alterações significativas quando comparados os grupos avaliados, mas foram observadas alterações descritivas quando comparadas as medianas das variáveis na tromboelastometria para ambos os grupos, sugerindo que os animais com alterações ecocardiográficas têm mais propensão a apresentar alterações nos valores de referência para parâmetros no ROTEM®.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ecocardiograma, miocardiopatia, septo interventricular, tromboelastometria, hemostasia.

INTRODUÇÃO

A miocardiopatia hipertrófica é a principal doença cardíaca que acomete os felinos, se apresenta como uma doença de caráter heterogêneo e está diretamente ligada a presença de mutação genéticas em diferentes raças de felinos. Os gatos que desenvolvem a doença seja ela de origem familiar ou não, normalmente são encaminhados ao atendimento clínico quando a doença se agrava e aparecem sintomatologias respiratórias associadas, que podem levar a quadros de dispnéia e morte súbita (Fuentes, 2017; Pellegrino, 2014).

Segundo Godiksen e Meurs, em estudo relacionado a mutação e a MCH, revelam que gatos com herança autossômica recessiva, podem não apresentar a mutação ou desenvolve-la fenotipicamente, mas podem transmitir-la aos descendentes. Estes também afirmam que a mutação como causa da MCH familiar em gatos da raça Maine Coon, ocorre pela troca do aminoácido reservado, alterando a conformação da proteína C miosina ligante e a penetrância da mesma é variável. A avaliação da presença desta mutação tem favorecido o controle dos animais portadores e a realização do controle reprodutivo dos mesmos e assim evitar a disseminação do gene de origem familiar (Pellegrino, 2014).

Em um estudo retrospectivo realizado por Fox et al. (2018), observou-se que avaliação pré-clínica de animais assintomáticos para miocardiopatias, pode refletir em uma maior sobrevivência dos animais, como já é observado em humanos e nesse aspecto da similaridade e como exemplo de modelo experimental em humanos a raça Maine Coon merece destaque, pois a os aspectos hereditários, fenotípicos e características fisiológicas da MCH são similares às observadas na MCH em humanos de origem familiar (Kittelsohn et al., 1999; Meurs et al., 2005; Abbott et al., 2010; Côté et al., 2011).

A ecocardiografia é o método complementar de eleição para o diagnóstico das cardiomiopatias felinas (Dandel et al., 2009). O método permite uma avaliação não invasiva da estrutura e função cardíaca bem como define os diferentes tipos de miocardiopatias (Ferasin, 2009). Os gatos com MCH discreta podem permanecer assintomáticos por anos, muitas vezes atendidos apenas quando apresentam manifestações respiratórias ou sinais de tromboembolismo arterial (TEA) agudo (Fox et al., 2015).

Segundo Payne et al. (2015), em todas as formas de miocardiopatia felina há lesão miocárdica. Estas lesões podem desencadear um processo trombótico por indução da adesão e agregação das plaquetas aos substratos expostos pelo tecido lesionado com subsequente ativação da cascata de coagulação. As válvulas cardíacas desempenham um papel importante na promoção da circulação, o fluxo diminuído nessa região, pela presença de lesão miocárdica tem sido associado com hipóxia. A contribuição do endotélio presente em estados trombóticos é tradicionalmente fundamentada na citocinética e expressão do fator tecidual. Ademais, a lesão resultante de eventos hipóxicos, ocasiona o aumento de plaquetas, o recrutamento de leucócitos e a concentração de fatores de coagulação.

A ativação plaquetária associada à MCH pode ocorrer devido a uma correlação entre a ativação plaquetária espontânea e a hipertrofia do VE, bem como o aumento da expressão de P-selectina. A associação de doença cardíaca, presença de AE aumentado, lesão endotelial e presença de regurgitação mitral promovem maior ativação de plaquetas e liberação dos componentes de grânulos plaquetários (Bedard et al., 2007).

Segundo Tablin et al. (2014), as plaquetas de gatos com MCH são pró coagulantes e podem levar a um maior risco de desenvolver TEA. Como a trombose pode ocorrer devido a qualquer combinação de aumento de atividade de fatores pró-coagulantes, diminuição da atividade endógena anticoagulante, decréscimo da fibrinólise, estase sanguínea ou dano vascular endotelial, esses testes provavelmente não preverão o risco geral de trombose (Dengate et al., 2016). Portanto, a avaliação da cascata de coagulação e de quadros de hipocoagulabilidade e hipercoagulabilidade têm sido validadas por outras técnicas como a tromboelastometria.

A avaliação e a comparação dos dados fornecidos na tromboelastometria em gatos portadores da mutação A31P no gene MYBPC3 para MCH, em animais com alterações ecocardiográficas e não, contribuirá com o estabelecimento do perfil hemostático e identificação de tendências trombóticas em gatos portadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Clínica Médica Especializada em Felinos, situada na região de São Paulo - Sp, com gatos provenientes de gatis de criadores da raça Maine Coon em parceria com a Associação da Raça Maine Coon no Brasil (AMACOON), já previamente testados com o screening genético exigido. e as análises laboratoriais realizadas no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da FMVZ - UNESP, Botucatu/SP, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (protocolo no 0164/2018). Foram incluídos 15 animais portadores da mutação A31P-MYBPC3, para miocardiopatia hipertrófica.

A avaliação dos animais para a identificação da presença de doenças de base ou secundárias a miocardiopatia foi realizada através de hemograma, dosagem de proteína total plasmática e sérica, albumina, globulinas, enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase

alcalina (FA), gama-glutamyl transferase (GGT), ureia, creatinina, glicose, frutossamina, creatinaquinase (CK), sendo mantidos no experimento aqueles com resultados do perfil hematológico e bioquímico dentro dos limites de referência.

Ecocardiograma-A avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada por método não invasivo, dispositivo de Doppler vascular (marca MedMega®, modelo DV610). E realizadas cinco determinações, considerando-se a média dos valores obtidos. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e a aferição realizada no membro torácico direito, manguito 3, no terço médio da região radio-ulna. O transdutor foi posicionado entre os coxins do carpo e metacarpo, sob a região da artéria medial, iniciando-se a insuflação do manguito até a interrupção do pulso. A pressão arterial sistólica foi caracterizada no momento do retorno da percepção do pulso (ao desinflar o manguito), e considerados normais os valores de pressão arterial sistólica até 150 mmHg., segundo o descrito por Pellegrino et al. (2014).

O exame ecocardiográfico foi realizado no ecocardiógrafo portátil modelo *Vivid-I* (General Electric Co- GE®), livres de sedação e/ou tranquilização, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo com o transdutor (setorial de 3 a 8 MHz) sobre o tórax, para a obtenção das imagens através da janela paraesternal direita e paraesternal, conforme recomendações da *Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology – American College of Veterinary Internal Medicine* (Thomas et al., 1993) e *American Society of Echocardiography* (ASE) (Boon, 2011; Oyama, 2004; Chetboul et al., 2012; Pellegrino, 2014).

No ecodopplercardiograma foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC); valvas atrioventriculares; valvas semilunares; função; fração de ejeção; aorta (AO) (cm); átrio esquerdo (cm); relação AE/AO; espessura do septo interventricular no final da diástole (SIVd); espessura da parede livre do ventrículo esquerdo no final da diástole (PVED); diâmetro diastólico final da cavidade do ventrículo esquerdo (DVED); diâmetro sistólico final da cavidade do ventrículo esquerdo (DVES); relação septo-parede na diástole (SIVd/PVED), parede livre do ventrículo direito; diâmetro diastólico final da cavidade do ventrículo direito (DVDd); fluxo máx artéria aorta (FL. AO máx), fluxo máximo da artéria pulmonar (FL.AP máx), fluxo mitral relação onda E/A, tempo de desaceleração da onda E (TDE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), região septal/basal e músculos papilares.

Amostras-As amostras de sangue para a tromboelastometria foram colhidas logo após o exame ecocardiográfico, em momento único e em tubo de 1,8 ml contendo citrato de sódio 3,2%, para ambos os grupos e processadas em até 20 minutos. Foi realizada preferencialmente na veia jugular, quando não foi possível devido ao comportamento do animal e visando sempre o bem-estar do mesmo de acordo com as boas práticas clínicas da medicina felina, realizadas então na veia femoral. Foram colhidos 0,5 mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 7,5% para o hemograma e 2,0 mL de sangue sem anticoagulante para a realização das dosagens bioquímicas. As amostras sem anticoagulante e (BD®, New Jersey, Estados Unidos) foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro e realização dos testes.

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM® (Delta, Pentapham, Munique, Alemanha) mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: INTEM® (20µL, fosfolípidios de 26 tromboplastina parcial, Pentapham, Munique, Alemanha), EXTEM® (20µL, tromboplastina tecidual, Pentapham, Munique, Alemanha) e FIBTEM® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina, Pentapham, Munique, Alemanha). E avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); A10 a A20: firmeza do coágulo, pela amplitude entre os tempos 10 e 20 minutos; MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML (lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo. A duração da análise em cada canal para os reagentes citados foi de uma hora.

O hemograma foi realizado no Laboratório Clínico Veterinário da UNESP de Botucatu em contador hematológico Procyte (Idexx®), e o hematócrito confirmado através da técnica do microhematócrito, a contagem diferencial de leucócitos realizada manualmente em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido (Laborclin®).

Os testes bioquímicos alanina amino-transferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil-transferase (GGT), uréia e creatinina, proteínas totais séricas, albumina, glicose, frutossamina, cálcio foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada (Mindray® - BS200 E) utilizando kits comerciais (Bioclin® e Labtest®).

Análise Estatística Foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. O teste de normalidade utilizado foi o teste de Shapiro Wilk e para comparar os resultados entre os dois grupos de animais foram utilizados o teste t de Student, em que são utilizados a média e o desvio padrão, e como o teste substituto de t de Student utilizou-se o teste não

paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW). Todas as análises foram consideradas significativas com 5% de significância ($p < 0,05$), e o programa estatístico utilizado foi o Graphpad®.

RESULTADOS

Foram observados 15 animais sendo 8 do grupo MYBPC3 +/- (5 fêmeas e 3 machos) e 7 do grupo MYBPC3 ++ (4 fêmeas e 3 machos), a média da idade dos animais em ambos os grupos foi de $\pm 6,7$ sendo a média de idade das fêmeas de $\pm 9,5$ e para os machos de $\pm 5,5$

Os animais com espessuras de SIVd e PVEd com 0,5 cm foram considerados normais; e os gatos com valores de espessuras diastólicas entre 0,5 e 0,6 cm foram considerados normais, porém suspeitos para a MCH. A maioria dos animais avaliados, independente da presença da mutação apresentaram na Ecocardiografia, alterações discretas relacionadas a Insuficiência da Valva Mitral, com presença ou ausência de movimento anterior sistólico. Alguns animais também apresentaram alterações em músculos papilares.

Quando comparados os animais portadores sem alteração no ecocardiograma (MYBPC3 +/-) e os portadores com alterações no ecocardiograma (MYBPC3 ++), para as análises EXTEM®, INTEM® e FIBTEM®, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

As figuras 1, 2,3, representam a variação nos parâmetros CT, CFT, ângulo α , A 10, A20, MCF e ML da tromboelastometria com os reagentes EXTEM®, INTEM® e FIBTEM®, para ambos os grupos.

A figura 4 e 5 representam o traçado tromboelastométrico de dois animais, sendo um MYBPC3 +/- e MYBPC3 ++, respectivamente.

DISCUSSÃO

O ecocardiograma é o melhor método diagnóstico para identificar a hipertrofia miocárdica, sendo este não invasivo e importante para diferenciar as alterações cardiovasculares, principalmente as miocardiopatias (Chetboul et al., 2006; Haggstrom et al., 2008), por isso o método foi escolhido para o acompanhamento e triagem dos animais no presente estudo.

De acordo com Trechiou Sechi et al. (2012) gatos da raça persa e Pellegrino et al. (2014), em gatos persas portadores de mutação, a hipertrofia miocárdica observada em seus estudos está relacionada com o aumento da região septal-basal (0,5- 0,6 cm suspeitos e superior a 0,6 positivos) e que a mesma foi considerada a alteração mais prevalente. O aumento dessa região mesmo sem diferença significativa, também foi observado no presente estudo, 46% (7/15) dos animais do grupo G1 apresentaram valores entre 0,52- 0,69 cm para a região septal basal. Mesmo com as alterações apresentadas nenhum dos animais, apresentava alterações de pressão arterial sistólica e outras alterações clínicas.

Autores relatam que o aumento na região septal basal pode justificar a presença de aumento na velocidade do fluxo aórtico e na passagem do sangue na via de saída do ventrículo esquerdo (Chetboul et al., 2012), o que não foi observado no presente estudo. Para os animais que apresentaram aumento da região septal basal citados anteriormente, foram observadas alterações como insuficiência discreta a moderada da valva mitral, movimento anterior sistólico (MAS) e alterações em músculos papilares. A avaliação dos músculos papilares é considerada uma avaliação subjetiva e não permite ser avaliada unicamente para determinação do risco para cada animal avaliado (Graziano, 2007); a progressão do, MAS pode acarretar na obstrução da via de saída do VE, e a presença da mesma causar uma isquemia miocárdica futura (Haggstrom, 2015). Portanto para os animais avaliados principalmente os portadores suspeitos (MYBPC3 ++), com alterações nas regiões septal basal existe a necessidade de um acompanhamento seriado, e o exame ecocardiográfico preventivo para progressão da doença, identificando precocemente a presença de disfunções diastólicas importantes e o desenvolvimento de uma possível hipertrofia atrial que levariam a quadros secundários graves, como o tromboembolismo arterial.

A avaliação da pressão arterial sistólica e alterações relacionadas a mesma não foram observadas em ambos os grupos avaliados. Esta análise é importante para diferenciar a hipertrofia miocárdica de outras doenças que causem alterações cardiovasculares e falso aumento pelo estresse (Brown et al., 2007), por tal fato foi utilizada como critério de inclusão e exclusão do estudo em questão. Para os animais amostrados as pressões arteriais sistólicas não ultrapassaram 150mmHg e os animais não apresentaram alterações clínicas que justificassem a presença de outras doenças sistêmicas.

Existem vários tipos de mutações relacionadas a MCH, o presente estudo foi relacionado apenas a uma raça e a uma mutação (mutação da cadeia leve do gene da proteína C miosina ligante) Devem ser realizados mais estudos relacionados a presença da mutação, alterações cardiovasculares e o perfil hemostático de gatos, algumas das limitações da pesquisa em questão foi o direcionamento a apenas uma determinada raça e a uma determinada mutação, o número de animais amostrados também foi limitante. Foi notável a dificuldade em encontrar animais portadores heterozigotos e não foi detectado nenhum portador homozigoto. Tal

afirmação é importante pois indica que para a raça Maine Coon, os animais reprodutores devem ser negativos para a mutação, ou seja, não portadores e assim monitorados constantemente para MCH, a dificuldade em encontrar animais homocigotos indica que a doença, principalmente quando relacionadas a gatis e criadores vem tentando ser controlada e todos os animais reprodutores, sejam machos ou fêmeas portadores, retirados da cadeia reprodutiva, evitando assim a disseminação da mutação.

Os animais avaliados não apresentavam alterações clínicas laboratoriais que indicassem doenças secundárias a MCH, que justificassem alterações no exame da tromboelastometria.

Para ambos os grupos não foram alterações significativas para os parâmetros do ROTEM quando analisados pelos testes EXTEM, INTEM, FIBTEM. Marly-Toucher et al. (2017), no seu estudo com valores de referência indica que as análises podem ser comparadas com as análises de tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, e fibrinogênio. Estas análises ainda não foram realizadas até o presente momento, portanto não se pode afirmar que os animais avaliados tenham alterações hemostáticas.

Segundo Marly-Toucher et al. (2017), em um estudo com valores de referência em gatos o MCF dos ensaios EXTEM e INTEM no método tromboelastométrico depende do grau de contagem de plaquetas e concentração plasmática de fibrinogênio e que a diferença entre o MCF nos ensaios EXTEM e FIBTEM também pode ser usado como um indicador de contribuição plaquetária ao coágulo, e afirmam que nesta espécie a coagulação é mais dependente da função plaquetas do que pela ação do fibrinogênio, o que não pode ser evidenciado no presente trabalho pois a análise do fibrinogênio não foi realizada e não foi observada uma relação entre a diminuição da contagem de plaquetas e o MCF.

A falta de valores de referência completos e disponíveis na literatura para a espécie com o reagente FIBTEM® compromete a análise, portando mesmo sem alteração significativa entre os grupos, de forma descritiva, não é possível prever se os valores estão de acordo com a referência para a espécie (24), com o reagente FIBTEM®, levando em consideração as variáveis CT, MCF e LM.

As concentrações de substâncias pro coagulantes e marcadores de geração de trombina fornecem evidências mais fortes de desequilíbrio hemostático (Stokol et al., 2008). Para este estudo não foram realizadas nenhuma das análises mencionadas, mas não se pode descartar a informação obtida através da tromboelastometria, mesmo sem alterações significativas e sim aliar as análises obtidas por ela com outros biomarcadores para avaliação da hemostasia.

Na tromboelastometria, a hipercoagulabilidade sanguínea é caracterizada pelo encurtamento do tempo de coagulação (CT) e do tempo de formação do coágulo (CFT), aumento do ângulo α e da firmeza máxima do coágulo (MCF) (Goggs et al. 2014). Já segundo Stokol et al. (2008), quadros de hipercoagulabilidade foram observados em gatos com TEA, secundário a MCH, que foram caracterizados pela alteração de dois dentre quatro parâmetros hemostáticos sendo eles: fibrinogênio, FVIII, proteína C, dímeros D, complexo trombina antitrombina (TAT), afirmando que a hipercoagulabilidade não poder ser caracterizada utilizando-se apenas um teste. Definiram, portanto, que o aumento nas concentrações de substâncias pro coagulantes e marcadores de geração de trombina fornecem evidências mais fortes de desequilíbrio hemostático. Para este estudo não foram realizadas nenhuma das análises mencionadas por Stokol et al. (2008), mas não se pode descartar a informação obtida através da tromboelastometria, mesmo sem alterações significativas e sim aliar as análises obtidas por ela com outros biomarcadores para avaliação da hemostasia.

A investigação mais acurada das alterações hemostáticas nesses pacientes, por meio de equipamentos precisos e com resultados rápidos como a TEM, se faz necessária haja vista o processo complexo que podem ser encontradas na MCH. Assim, com diagnóstico rápido e a intervenção terapêutica adequada, busca-se melhorar o prognóstico e sobrevida destes animais.

CONCLUSÃO

Com base neste estudo e levando em consideração a metodologia utilizada, pode-se afirmar que não foram observadas alterações significativas na tromboelastometria pela ativação da via extrínseca (EXTEM®), intrínseca (INTEM®), e pela adição de citocalasina D que inibe a função plaquetária (FIBTEM®), nos animais portadores com alterações ecocardiográficas.

A ecocardiografia se mostrou eficiente ao detectar a presença de alterações cardíacas relacionadas a MCH, sem que os animais apresentassem alterações clínicas notáveis.

Acompanhamento clínico e laboratorial seriados nos animais com alterações no ecocardiograma devem ser realizados, na tentativa de prevenir o surgimento de quadros secundários a MCH.

Agradecimentos. Os autores agradecem a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), ao Laboratório Clínico Veterinário (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Unesp/Botucatu), a Clínica Veterinária Gattos (São Paulo- Sp), pelo suporte e auxílio.

REFERÊNCIAS

- Abbott, J.A. 2010 Feline Hypertrophic Cardiomyopathy: An Update. *Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice* 40:685-700.
- Bedard, C.; Lanevski-Pietersma, A.; Dunn, M. 2007 Evaluation of coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Veterinary Clinical Pathology* 36:79-84.
- Boon J.A. 2011. *Manual of veterinary echocardiography*. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2:610.
- Brown, S.; Atkins, C.; Bagley, R.; Carr, A.; Cowgill, L.; Davidson, M.; Egner, B.; Elliott, J.; Henik, R.; Labato, M.; Littman, M.; Polzin, D.; Ross, L.; Snyder, P.; Stepien, R. 2007 Guidelines for the identification, evaluation and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 542-558.
- Chetboul, V.; Sampedrano, C. C.; Gouni, V.; Nicolle, A. P.; Pouchelon, J. L. 2006. Two-dimensional color tissue Doppler imaging detects myocardial dysfunction before occurrence of hypertrophy in a young Maine Coon cat. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 47(3):295-300.
- Chetboul, V. 2012. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3):532-541.
- Côté, E.; McDonald, K.A.; Meurs, K.M.; Sleeper, M.M. 2011. Hypertrophic cardiomyopathy. *Feline Cardiology*. Wiley Blackwell : 103-175.
- Dandel, M.; Lehmkuhl, H.; Knosalla, C.; Suramelashvili, N.; Hetzer, R. 2009. Strain and Strain Rate Imaging by Echocardiography – Basic Concepts and Clinical Applicability. *Current Cardiology Reviews* 5(2):133-148.
- Dengate, A.L.; Morel-Kopp, M.C.; Beatty, J.D.; Barrs, V.; Braddock, J.A.; Churcher, R.K.; Wilson, B.J.; Ward, C.M. 2016 Differentiation between dogs with thrombosis and normal dogs using the overall hemostasis potential assay. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26:446-452.
- Ferasin, L. 2009. Feline myocardial disease- diagnosis, prognosis and clinical management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11:183-194.
- Fox, P.R.; Schober, K.E. 2015 Management of asymptomatic (occult) feline cardiomyopathy: challenges and realities. *Journal of Veterinary Cardiology*. 17:150-158.
- Fox, P. R., Et Al. 2018. International collaborative study to assess cardiovascular risk and evaluate long-term health in cats with preclinical hypertrophic cardiomyopathy and apparently healthy cats: The REVEAL Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32 (3):930-943.
- Fuentes, V. L.; Wilkie, L.J. 2017. Asymptomatic Hypertrophic Cardiomyopathy: Diagnosis and Therapy. *Veterinary Clinical Small Animals* 47: 1041-1054.
- Graziano, P.; Acquatella, H. 2007. Ecocardiografia clínica na cardiomiopatia hipertrofica- importância do diagnóstico diferencial na tomada de decisões. In: SILVA, C. R. S. *Ecocardiografia: princípios e aplicações clínicas*. Rio de Janeiro: Revinter, 1: 681-712.
- Goggs, R., Brainard, B., Laforcade, A.M., Flatland, B., Hanel, R., Mcmichael, M. & Wiinberg, B. 2014. Partnership on Rotational Viscoelastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24(1):1-22.
- Häggström J, Fuentes V; Wess G. 2015. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats. *Journal Veterinary Cardiology* 17:134-149.
- Kittleson, M. D.; Meurs, K. M.; Munro, M. J.; Kittleson, J. A.; Liu, S. K.; Pion, P. D.; Towbin, J. A. 1999 Familial hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats: an animal model of human disease. *Circulation* 99: 3172-3180.
- Marly-Voquer, C., Riond, B., Schefer, R. J., Kutter A. P. N. 2017. Reference values for rotational thromboelastometry (ROTEM) in clinically healthy cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2:185 - 192.
- MEURS, K. M.; SANCHEZ, X.; DAVID, R. M.; BOWLES, N. E.; TOWBIN, J. A.; REISER, P. J.; KITTLESON, J. A.; MUNRO, M. J.; DRYBURGH, K.; MCDONALD, K. A.; KITTLESON, M. D. A 2005 Cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 14 (23):3587-3593.
- Oyama, M. A. 2004 Advances in echocardiography. *Veterinary Clinics of Small Animal Practice* 34:1083-1104.
- Payne, J. R., et al. 2015. Risk factors associated with sudden death vs. congestive heart failure or arterial thromboembolism in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal Veterinary Cardiology* 17:318-328.
- Pellegrino, A.; Daniel, A.T.; Pereira, G.G.; Jr. Lima, F.F.; Itikawa, P.H.; Larsson, M.H.M.A. 2014. Avaliação da função diastólica por meio de Doppler tecidual pulsado e colorido em gatos da raça Maine Coon

geneticamente testados para a mutação no gene MyBPC-A31P. Pesquisa Veterinária Brasileira. 34 (3):290-300.

Stokol, T. et al. 2008. Hypercoagulability in Cats with Cardiomyopathy, Journal Veterinary Internal Medicine. 22:546-552.

Tablin, F., et al. 2014. Platelet activation in cats with hypertrophic cardiomyopathy, Journal Veterinary Internal Medicine 28 (2):411-418.

Trehou-Sechi, E.; Tissier, R.; Gouni, V.; Misbach, C.; Petit, A. M.; Balouka, D.; Sampedrano, C. C.; Castaignet, M.; Pouchelon, J. L. 2012. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). Journal of Veterinary Internal Medicine 26(3): 532-541.

Thomas, W. P.; Gaber, C. E.; Jacobs, G. J.; Kaplan, P. M.; Lombard, C. W.; Moise, N. S.; Moses, B. L. 1993. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Journal of Veterinary Internal Medicine 7(4): 247-252.

Legenda das Figuras

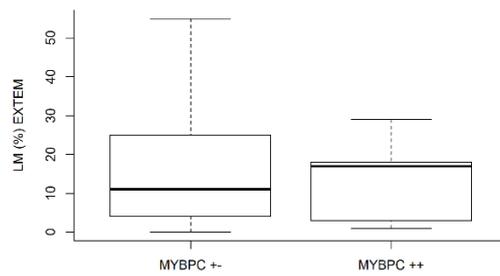
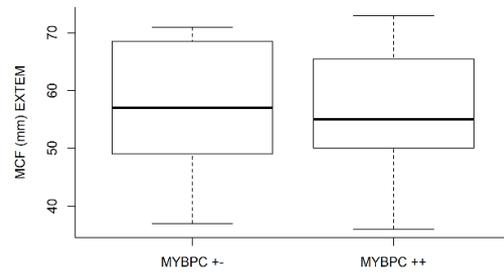
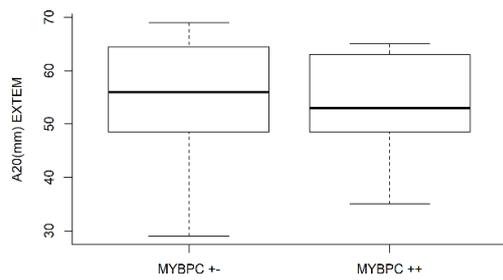
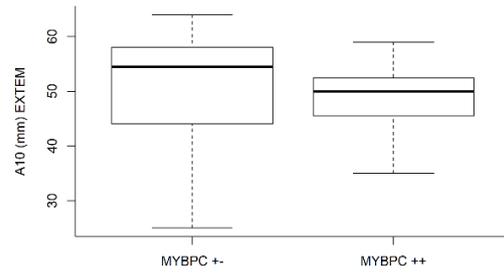
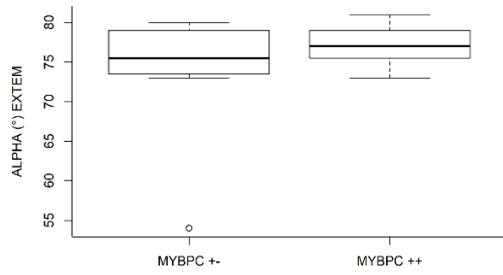
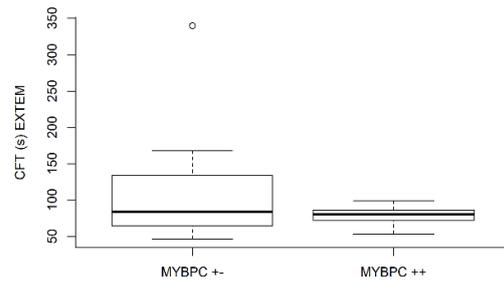
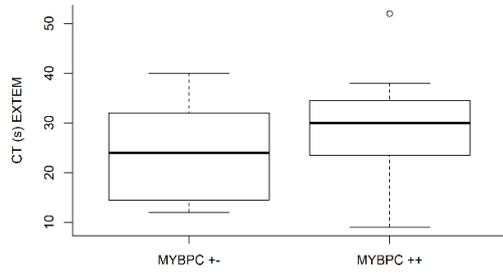
Figura 1. BoxBlot das variáveis EXTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos MYBPC3 +/- (portadores e sem alterações no ecocardiograma) e MYBPC3 ++ (portadores e com alterações no ecocardiograma).

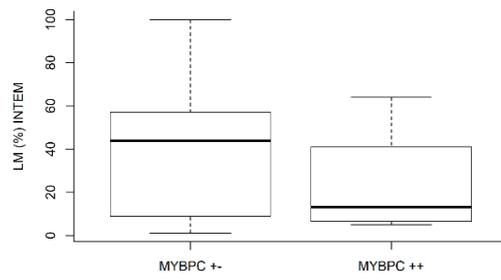
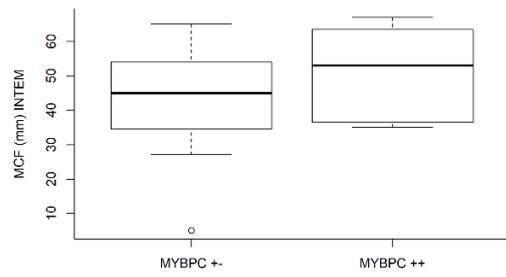
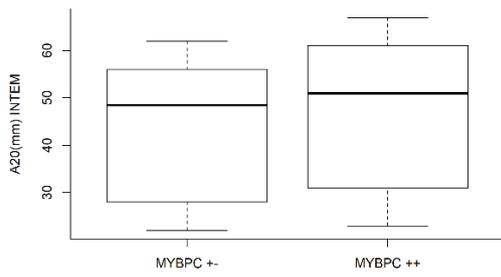
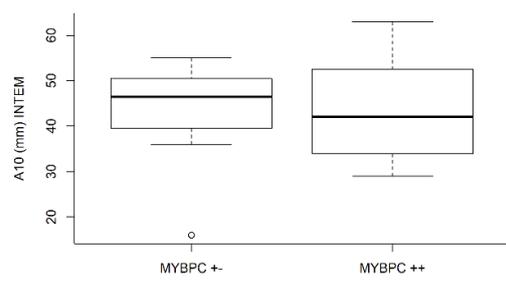
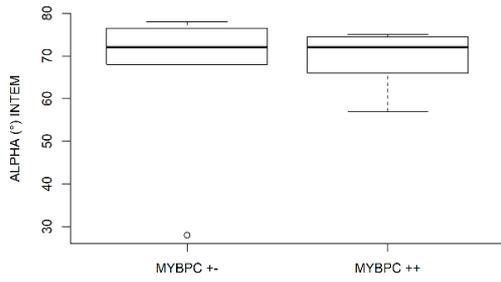
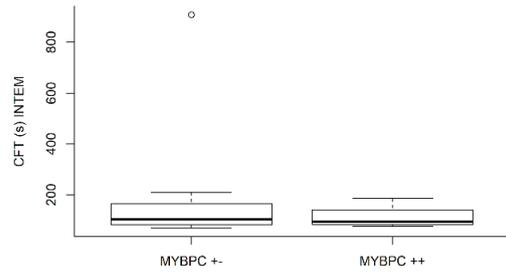
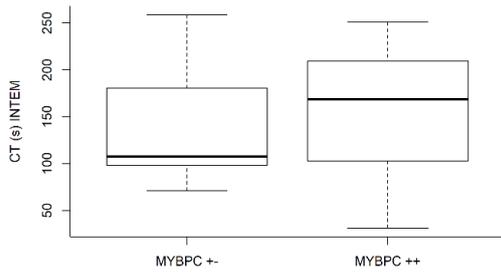
Figura 2. BoxBlot das variáveis INTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos MYBPC3 +/- (portadores e sem alterações no ecocardiograma) e MYBPC3 ++ (portadores e com alterações no ecocardiograma).

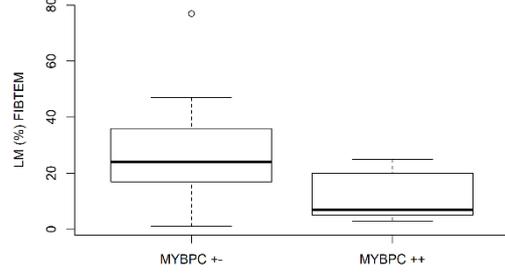
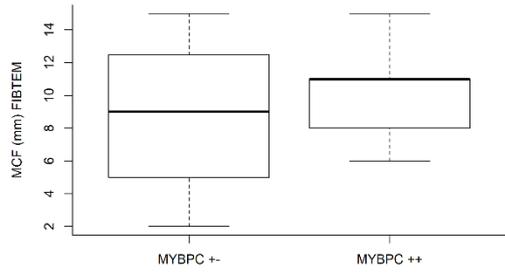
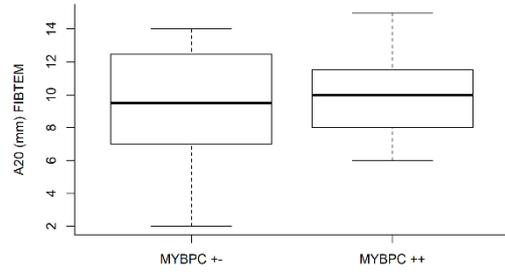
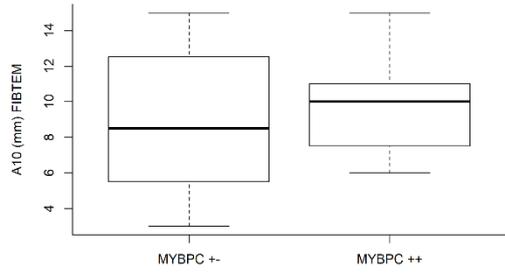
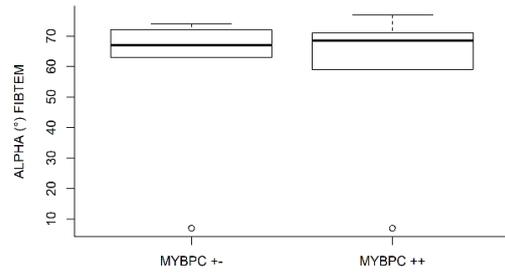
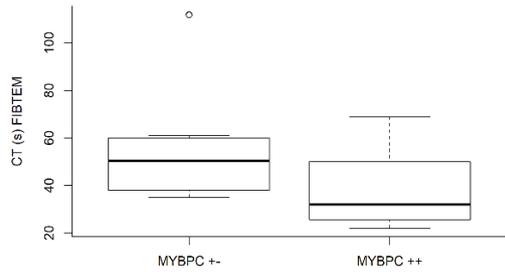
Figura 3. BoxBlot das variáveis no FIBTEM pela tromboelastometria (ROTEM). CT: Tempo de coagulação; CFT: tempo de formação do coágulo; Ângulo Alpha; A10 e A20: amplitude da curva em 10 e 20 minutos respectivamente, MCF: firmeza máxima do coágulo e LM: lise máxima, entre os grupos MYBPC3 +/- (portadores e sem alterações no ecocardiograma) e MYBPC3 ++ (portadores e com alterações no ecocardiograma).

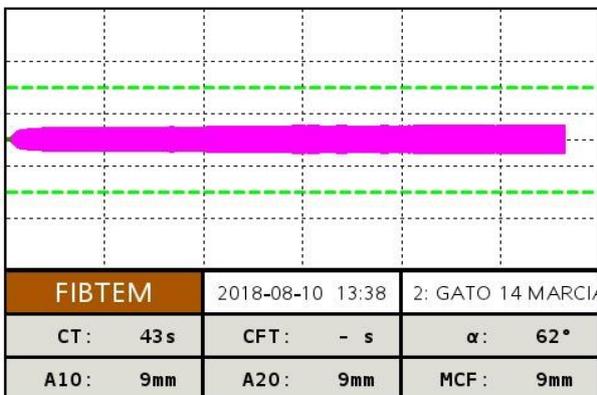
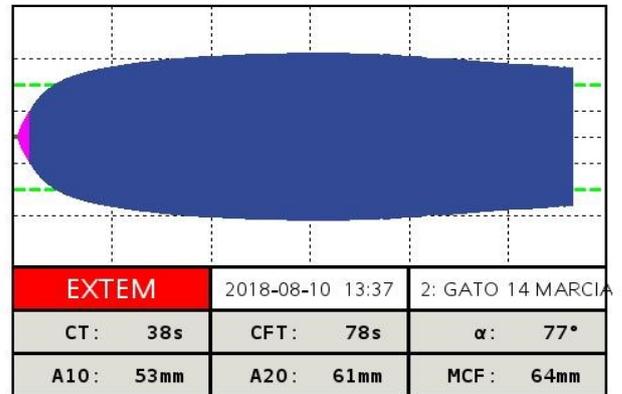
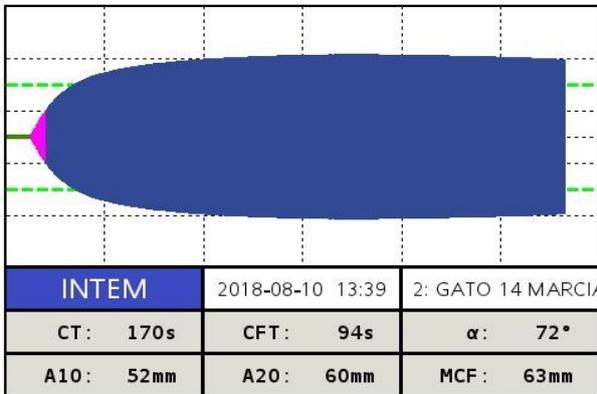
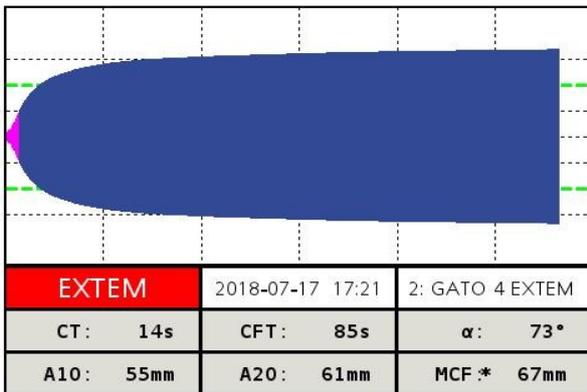
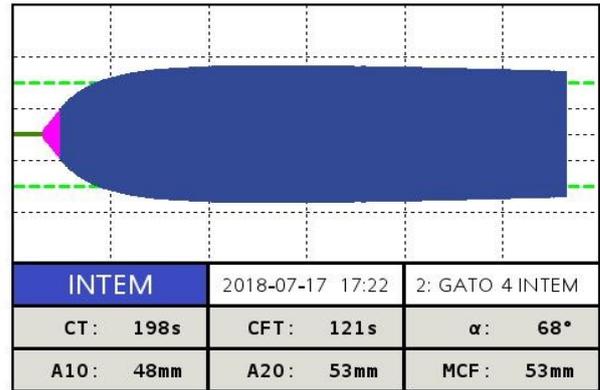
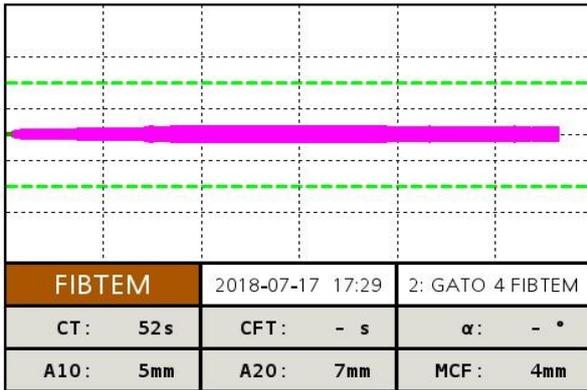
Figura 4. Representação gráfica dos testes EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, em um gato da raça Maine Coon, portador da mutação MYBPC3 para MCH sem alterações ecocardiográficas, pertencente ao grupo MYBPC3 +/-

Figura 5. Representação gráfica dos testes EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®, em um gato da raça Maine Coon, portador da mutação MYBPC3 para MCH sem alterações ecocardiográficas, pertencente ao grupo MYBPC3 ++.









ANEXOS

Anexo 1



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Avaliação pela tromboelastometria (ROTEM) em gatos da raça Maine Coon portadores da mutação MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica" **Protocolo CEUA 0164/2018**, a ser conduzido por Pedrita Carvalho Ferreira Assunção, responsável/orientador Regina Kiomi Takahira, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/08/2018 a 31/10/2018
Nome Comum / Espécie / Linhagem	FELINA / FELIS CATUS / NÃO SE APLICA
Raça	MAINE COON
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	30
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	3 ano(s) e 1 mes(es) e 1 dia(s).
Procedência	Atendimento Clínico- Possuem proprietários

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 19/07/2018

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Anexo 2



DECLARAÇÃO

Declaro que estou ciente da necessidade da assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” pelo proprietário, antes do início da realização de qualquer procedimento experimental.

O mesmo permanecerá em meu poder e ficará à disposição da Comissão de Ética no Uso de Animais, a qualquer momento.

NOME E ASSINATURA DO DOCENTE RESPONSÁVEL:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação pela tromboelastometria (ROTEM®) em gatos da raça Maine Coon portadores da mutação MYBPC3 para miocardiopatia hipertrófica” de responsabilidade de Pedrita Carvalho Ferreira Assunção.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica: será realizado ecocardiograma de controle e coleta de até 10 ml de sangue, por punção da veia jugular ou cefálica, para análise da cascata de coagulação através da tromboelastometria. Será necessária uma coleta, um momento. As coletas serão realizadas em dois grupos: um grupo portador da mutação e um grupo controle (negativo para a mutação).

Nome do animal ou Número de animais de produção: _____

NOME DO
RESPONSÁVEL: _____

RG: _____ Data: ___ / ___ / ___

Assinatura: _____

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof.Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
☐ (14) 3880-2176 – www.fmvz.unesp.br

Anexo 3

GENETIC ANALYSIS REPORT

OWNER'S DETAILS

Flavia Souza

Indaiatuba

Sao Paulo, 13332--810



Add: P.O. Box 110
St Kilda 3182 VIC

Ph: +61 3 9534 1544
Fax: +61 3 9525 3550

email: info@orivet.com.au
website: www.orivet.com.au

A.B.N. 8 722 516 58 99

ANIMAL'S DETAILS

Registered Name: BR* BeautifulToLive Kyra
Pet Name: BR* BeautifulToLive Kyra
Breed: Maine Coon
Date of Birth / Age: 08/05/15

Registration No: 38241
Microchip No: 981098104758395
Sex: Female
Colour: Red Blotched

COLLECTION DETAILS

Case Number: 17-119044
Collected By: Flavia Souza

Date of Test: 23/05/17
Approved Coll. Mthd.:

Sample with Lab ID Number 17-119044 was received at Orivet Genetics, DNA was extracted and analysed with the following results reported:

DISEASE(S): PYRUVATE KINASE (PK) DEFICIENCY - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
MUCOPOLYSACCHARADOSIS - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
NIEMANN PICK DISEASE - SPHYNGOMYELINOSIS - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
FAMILIAL EPISODIC HYPOKALEMIC POLYMYOPATHY - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY - MAINE COON - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY - RAGDOLL - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
PROGRESSIVE RETINAL ATROPHY (PRA-RDC) CEP 290 - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
SPINAL MUSCULAR ATROPHY (SMA) - MAINE COON - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE IV - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**

TRAIT(S): GANGLIOSIDOSIS - TYPE 1 & 2 - **NORMAL / CLEAR / NEGATIVE (NO VARIANT DETECTED)**
ALBINISM - **ALB N / ALB N - NO ALBINO MUTATION DETECTED**
AMBER - E/E - **NO COPIES OF AMBER MUTATION DETECTED**
DILUTE - D/D FULL COLOUR - **DOES NOT HAVE DILUTE ALLELE**
BLOOD GROUP - N/N = **TYPE A (non-b/non-b) CAN BE A/A, A/AB or AB/AB**
CHOCOLATE AND CINNAMON - B/B (FULL COLOUR - **CAT DOES NOT CARRY BROWN OR CINNAMON**)
COLOURPOINT RESTRICTION (COLOUR) - C/C FULL COLOR, **DOES NOT CARRY BURMESE (SEPIA)/SIAMESE**
AGOUTI (ASIP) DOMINANT BLACK - a/a **NON AGOUTI SELF COLORED (SOLID COLORED)**
LONGHAIR / SHORTHAIR - M1/M2, M1/M3, M1/M4, M2/M3, M2/M4, M3/M4 - **CARRIES TWO LHG**

Cat has tested as a compound heterozygote - carries 2 different long hair FGF5 variant – cat has long hair.

TRAIT(S): GLOVING PATTERN (BIRMAN) - N⁹/N⁹ - **NO GLOVE MUTATION DETECTED**

Colour
Statement

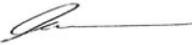
Please Note: That in some cases the DNA results alone cannot identify a cat's colour and pattern as genes such as Red (O gene), Bicolour (w's gene also known as S gene) and other genes such as Ticked (Ti gene) do not have an available DNA test at present. The dominant O gene, and the dominant Bicolour gene and other genes such as Ticked can mask or alter the appearance of any underlying coat colour and pattern genes. Orivet covers this in the statement (see below) that is attached to the 'What is My Cat's Colour?' Poster which describes 216 possible colour and patterns for four well known genes known as Agouti (A), Colour pigment (B), Colour intensity (C) and Density (D).

Poster statement: DNA Results represent Genetic Colour and Pattern provided there are **no other active** colour and/or pattern genes present eg. Silver; Golden; Tipped; Shaded; Ticked; sex-linked Red, Cream, Tortoiseshell; White, White Spotting aka Bicolour, Van, Mitted, Gloves; Amber; Dilute Modifier; Charcoal agouti allele and other yet to be determined alleles from Asian Leopard.



RESULTS REVIEWED AND CONFIRMED BY:


Dr. Noam Pik BVs MDSV


George Sofronidis BSc (Hons)

Anexo 4

Tabela com valores de referência para a tromboelastometria (ROTEM) na espécie felina.

	EXTEM	INTEM	FIBTEM
Parâmetro			
CT	34-52	126-254	
CFT	41-260	48-251	n/a
A° alpha	59-82	53-80	
A10	59-82	31-68	2-9
A20	30-68	37-73	2-10
MCF	36-73	40-78	3-10
LM	0-23	0-8	

EXTEM: ativador de via extrínseca; INTEM: ativador de via intrínseca; FIBTEM: ativação com adição de citocalesina D, CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise máxima

Anexo 5

Tabela com valores de referência de valores hematológicos e bioquímicos séricos para a espécie felina, adaptado de Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004; Kaneko, 2008.

	FELINOS
Hemácias	5,0-10,0
Hemoglobina	8-15
Hematócrito	24-45
VCM	39-55
CHCM	30-36
Plaquetas	300.000- 800.000
Leucócitos Totais	5,5-19,5
Uréia	42,8-64,2
Creatinina	0,8-1,8
ALT	6-83
AST	26-43
FA	25-93
GGT	1,3-5,1
Frutosamina	190-365
PTs	5,40-7,80
Albumina	2,10-3,30
Globulina	2,60-5,10
Glicose	70-110
CK	7,2-28,2

VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; AST: aspartatoamino transferase; ALT: aspartatoalanino transferase; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil transferase; PTs: proteína total sérica; CK: creatina quinase.

Anexo 6

Tabela 7. Perfil tromboelastométrico de gatos do grupo G1(n=15), não portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para MCH.

	EXTEM							INTEM							FIBTEM						
	CT	CFT	A°α	A10	A20	MCF	LM	CT	CFT	A°α	A10	A20	MCF	LM	CT	A°α	A10	A20	MCF	LM	
ANIMAIS																					
Gato 2	28	56	78	58	64	68		152	59	78	54	57	57	3	62	59	18	20	20	35	
Gato 3	40	65	50	50	55	60		199	94	71	53	53	54	6	68	49	10	10	11	30	
Gato 5	52	57	70	57	62	62	4	157	183	61	51	51	53	17	53	75	13	12	13	22	
Gato 6	51	124	66	42	48	56	6	180	172	58	40	54	59	3	60		7	7	7	21	
Gato 7	74	696	31	19	24	31		152	423	26	21	28	33		117		5	6	6	12	
Gato 8	20	53	79	60	64	66	3	160	198	59	38	45	51	21	15	64	10	10	10	18	
Gato10	38	50	80	62	66	66	5	167	87	72	59	65	66	6	65	68	14	14	14	9	
Gato11	40	50	80	67	71	72	7	207	52	80	62	68	70	6	77		10	10	10	7	
Gato13	21	40	82	63	67	67	0	117	69	76	56	63	63	10	26	77	16	19	19	23	
Gato16	19	68	76	53	57	57	7	170	64	77	53	59	62	1	60		5	5	5	12	
Gato17	28	142	74	42	49	50	1	237	374	40	26	34	34	12	55		7	8	7	16	
Gato18	26	42	81	60	63	63	6	165	61	77	58	61	61	5	66		7	7	8	11	
Gato20	24	57	80	70	72	74	1	152	56	78	64	68	68	2	59	79	17	17	17	2	
Gato21	19	58	79	54	59	63	0	67	102	74	51	55	55	39	37	73	14	15	16	13	
Gato26	35	70	76	44	42	45	33	82	113	67	49	53	54	54	60	46	6	9	8	0	

EXTEM: ativação de via extrínseca; INTEM: ativação da via intrínseca; FIBTEM: ativação pela citocalesina D. CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise máxima. Valores de referência para a espécie disponíveis em **Anexo 4** deste documento.

Anexo 7

Tabela 8. Perfil tromboelastométrico de gatos do grupo G2(n=15), portadores da mutação (A31P) no gene MYBPC3 para MCH.

	EXTEM							INTEM							FIBTEM						
	CT	CFT	A°α	A10	A20	MCF	LM	CT	CFT	A°α	A10	A20	MCF	LM	CT	A°α	A10	A20	MCF	LM	
ANIMAIS																					
Gato 1	31	91	75	44	48	50	1	251	185	57	33	35	35	21	32	66	11	10	11	15	
Gato 4	14	85	73	55	61	67		198	121	68	48	53	53	9	52		5	7	2		
Gato 9	34	82	74	60	68	71	1	259	112	68	55	62	65	1	61	63	12	12	12	21	
Gato 12	52	53	81	59	65	67		249	75	75	63	67	67	13	59	77	15	15	15	7	
Gato 14	38	78	77	53	61	64	18	170	94	72	52	60	63	6	41	7	6	7	7	25	
Gato 15	23	340	54	25	29	37	0	109	909	28	16	23	27		41	7	6	7	7	25	
Gato19	25	46	80	64	69	70	7	98	209	77	49	57	5	100	49	67	13	11	13	24	
Gato 22	40	62	78	54	56	57	20	71	79	78	45	44	46	44	112		3	2	3	77	
Gato 23	30	80	76	52	65	73		117	92	71	53	62	64	7	69	59	10	12	11	3	
Gato24	29	81	81	47	49	50	17	31	151	61	42	51	53	5	23		6	6	6	25	
Gato25	9	99	73	35	35	36	29	169	75	75	29	23	38	64	22	71	9	9	9	6	
Gato 27	15	66	80	56	56	57	55	106	83	73	43	33	44	49	35	72	11	14	11	1	
Gato 28	30	99	75	48	54	55	11	163	68	76	52	55	55	9	59		6	8	7	13	
Gato 29	12	168	76	40	43	43	30	98	94	71	36	22	42	65	35	74	15	13	15	47	
Gato 30	18	66	77	50	53	55	3	89	130	74	35	27	35	61	28	71	11	11	11	4	

EXTEM: ativação de via extrínseca; INTEM: ativação da via intrínseca; FIBTEM: ativação pela citocalesina D. CT tempo de coagulação-(s) segundos; CFT- tempo de formação do coágulo (s) segundos; A°. alpha- (°); A10- amplitude 10 minutos; A20 amplitude 20 min; MCF firmeza máxima do coágulo- (mm)- milímetros; LM – lise máxima. Valores de referência para a espécie disponíveis em **Anexo 4** deste documento

Anexo 8

ISSN 1678-4162 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Política Editorial

Reprodução de artigos publicados

Orientações Gerais

Comitê de Ética

Tipos de artigos aceitos para publicação

Preparação dos textos para publicação

Formatação do texto

Seções de um artigo

Taxas de submissão e de publicação

Recursos e diligências

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN

0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ:

16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação

de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área

(relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação

tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med.**

Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço

<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.

Leia "PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE"

Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.

O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Committee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract,

Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract,

Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
 mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971;
 Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):
 ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97.

(Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999.

44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas

Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical

College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em:

<<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

Taxa de submissão: A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação: A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um email

para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

Submission and Publication fee. The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be in the invoice issuance.

Recursos e diligências

No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail

abmvz.artigo@abmvz.org.br.

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]

Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 Belo Horizonte MG Brasil

Tel: +55 31 3409-2042

Tel: +55 31 3409-2041

abmvz.artigo@abmvz.org

Anexo 9

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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