

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VARIÁVEIS DA HEMOSTASIA SANGUÍNEA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA CANINA**

Luz Natalia Pedraza Castillo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VARIÁVEIS DA HEMOSTASIA SANGUÍNEA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA CANINA**

Luz Natalia Pedraza Castillo

Orientador: Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana

Co-Orientadora: Profa. Dr. Paola Castro Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária. (Área de concentração em cirurgia Veterinária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL

MAIO 2012

P371v Pedraza Castillo, Luz Natalia
Variáveis da hemostasia sanguínea primária e secundária na
doença renal crônica canina / Luz Natalia Pedraza Castillo. – –
Jaboticabal, 2012
xii, 52 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Áureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Márcia Sobreira de la Rosa Ferreira, Maria
Angélica Dias
Bibliografia

1. Cães. 2. Fibrinogênio. 3. Plaquetas. 4. Rim. 5. TTPA. 6. TP. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.616.61:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUZ NATALIA PEDRAZA – nascida em 18 de junho de 1984 na cidade de El Espino, BOY, filha de Oscar Alfonso Pedraza Mojica e Yolanda Castillo Guevara. Em 2008 graduou-se Medica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agropecuárias e Recursos Naturais da Universidade De Los Llanos (UNILLANOS). No ano 2010 participou do curso de aperfeiçoamento em Ortopedia canina e felina no Hospital veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Jaboticabal, SP. Ingressou em 2010 no curso de mestrado na área de Cirurgia Veterinária, do Programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, SP, obtendo o grau de mestre em Maio de 2012, sob orientação da Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana.

MARIPOSITA DE ENSUEÑO.

(Para el amor de mi corazón, mí amada hija: Natalia).

¿Qué has partido?, ¿Qué te has ido?

¡! nunca!!! solo te preste un ratico
al inexorable tañer de tu destino.

No te has ido y no te irás

Porque cada rincón de todas partes:

Del corazón, del alma, de la entraña
sabe a ti, huele a ti, respira a ti, y también
mucho, siempre mucho sonrío a ti.

II

Vuela mariposita de ensueño

y antes si puedes bágame un lucero

y en cualquier momento que estés triste
te lo presto, seguro, para tu consuelo.

III

En tu venturosa dicha

de arriesgarte al viento

sensaciona airosa

el susurro de tu arcano

y nunca sentirás el hastío ni el vacío

ese que atraganta el pecho

y estruja las bonanzas

de sueños, de ilusiones, de nostalgias.

IV

Vive en tu esperanza,

como el suave aroma en las rosas y el rocío,

Que sean tus perfúmenes el sol de las distancias

y su luz y su calor tu cercanía

Recuerda siempre donde vayas

que te amamos infinitamente

y que habrá para ti siempre una copa

desbordada de amor y de alegría

V

Vuela mariposita de ensueño

que tu raudo vuelo llegará aquí un día

Y nuestros brazos abiertos encontrarás lo mismo

con mas amor, con mas dicha, como tu querías.

PAPÁ

DEDICATORIA

A Deus... por ter posto no meu caminho as pessoas mais maravilhosas do mundo e com seu apoio conseguir atingir minha meta.

Aos amores da minha vida... minha família...meus eternos amigos...: à minha Mãe Yolanda por ter me dado a vida e me ensinar que o amor sempre será mais forte, ao meu Pai Oscar, por seu eterno amor e luta incansável por nos dar o melhor... ao meu irmão...Pablo...por me ensinar o que é a nobreza e a luta pelo que se quer...a minha irmã Carolina...pois com seu exemplo despertou em nós o mais profundo interesse pela investigação e a ciência...Amo vocês!!

Ao meu Avô Alvaro..." Quiero mirar la tierra hasta encontrarte y besarte la noble calavera y desamordazarte y regresarte...compañero del alma...compañero"...cada dia sinto mais saudade de você....

À minha segunda família... Lia, Vanete, Mateus e Alessandra (popô)...anjos que Deus colocou no meu caminho e que sempre que caí...com muita paciência e carinho, me levantaram...muito obrigada por estarem sempre aí...Adoro vocês!!

Aos meus pais brasileiros, e orientadores acadêmico-científicos, Aureo Evangelista Santana e Eugênio de Campos Filho...pela orientação sempre segura, pelo carinho, apoio, amizade...pelos momentos, pelos detalhes...pela companhia, pela paciência...pelas lembranças que jamais vou esquecer, sempre os levarei no meu coração...amo vocês!!

A meu eterno companheiro de batalhas...Expédito...que nunca me deixou sozinha!!

Muito Obrigada a todos por acreditarem em mim!.

AGRADECIMENTOS

A Márcia Sobreira sempre disponível para me ajudar e co-orientar...com muita nobreza e paciência...muito obrigada por esse sorriso no rosto

A meus “hermanos” e parceiros: Luisa Gaona, Daniel Zambrano, Paula Torres, Diana Cifuentes, Pamela dos Santos, Oniel Aguirre e Orlando Duitama, muito obrigada pela paciência, pela companhia e pelos corações nobres e sempre dispostos a me socorrer.

À Sofia e Leandro, por apontarem uma luz no fim do túnel e por me ajudarem a encontrar um horizonte seguro.

A minhas amigas...Mariana Miotto, Silvana, Cesaltina, Mônica, Manuela, pelo apoio incondicional e a amizade verdadeira.

Ao pessoal do laboratório: Lívia Maria, Ana Lívia, Letícia e Andressa Francisca, pelo apoio.

Aos meus alunos: Maria do Carmo B., Rosinha, Milton, Luiza, Rosa, Marcos, Márcia, Vera, Nélio, Rita, Rosangela, Eliane, Paulo, Maria do Carmo dos Santos, Carmen, Marina, Regina, Renata, Nivaldo, Washinton, Helier, Eugenio, Suely, Silvia...pelo carinho, por despertar em mim um gosto maravilhoso pela pedagogia e pelo binômio ensino-aprendizagem, pelo apoio, paciência e amizades verdadeiras.

Aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP/ Campus de Jaboticabal, por facilitarem o meu trabalho de mestrado.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
SUMMARY	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Hemostasia e componentes do processo hemostático	2
2.2 Hemostasia primária	3
2.3 Hemostasia secundária	5
2.4 Hemostasia terciária	10
2.5 Hemostasia e Doença Renal Crônica Canina.....	11
2.6 Alterações hemostáticas na DRC	13
2.7 Testes laboratoriais para avaliação da hemostasia	16
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos Gerais	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais e grupos experimentais	21
4.1.1 Grupo Controle (GC):.....	21
4.1.2 Grupos de Doentes Renais Crônicos (DRC):.....	21

4.2	Determinação das parcelas experimentais	22
4.2.1	Bioquímica Sérica e Urinária.....	22
4.2.2	Aferição da Pressão Arterial Sistólica	22
4.2.3	Determinação do Sangue Oculto	23
4.3	Análises laboratoriais para avaliação das parcelas experimentais	25
4.3.1	TTPA, TP e Fibrinogênio plasmático	25
4.3.2	Plaquetograma.....	25
4.4	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	27
5.1	Estatística Descritiva	27
5.2	Estudo de Correlação	31
6	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÕES	44
8.	REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Cascata da coagulação. Os algarismos romanos referem-se aos fatores coagulantes e a letra “a” indica seu estado de ativação (adaptado de JAIN, 1993)	7
Figura 2. Partes da cascata da coagulação avaliadas com o emprego dos tempos de coagulação ativada (TCA) de tromboplastina parcial ativada (TTPA), de protrombina (TP) y de coagulação de trombina (TCT). (adaptado de JAIN, 1993).	18
Figura 3. Ilustração da interpretação do teste de sangue oculto. A. Sem desenvolvimento de cor: Reação negativa; B. Coloração azulada: Traços de sangue; C. Coloração verde clara: +; D. Coloração verde escura: ++; E. Coloração verde azulada: +++	24
Figura 4. Representação gráfica do teste t de comparação de medias com um alfa de 5% para as variáveis nos diferentes estadiamentos da doença.	30
Figura 5. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC2 com TTPA, TP , fibrinogênio plasmático e plaquetas	32
Figura 6. Representação gráfica das correlações da uréia sérica dos animais do grupo DRC2 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas ..	33
Figura 7. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC3 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.	34
Figura 8. Representação gráfica das correlações da Uréia sérica dos animais do grupo DRC3 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas ..	35
Figura 9. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC4 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas	36
Figura 10. Representação gráfica das correlações da Ureia sérica dos animais do grupo DRC4 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas...	37

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Estadiamento da doença Renal crônica canina segundo a <i>international Renal Interest Society</i> (IRIS), 2009	11
Tabela 2. Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a <i>International Renal Interest Society</i> (IRIS), 2009	12
Tabela 3. Médias e respectivos desvios-padrão, valores mínimos e máximos do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e do tempo de protrombina (TP), em segundos, bem como da concentração plasmática de fibrinogênio (g/L), em pacientes da espécie canina, sadios (GC) ou portadores de doença renal crônica, em diferentes estadiamentos (segundo a IRIS). Jaboticabal, 2011.	27
Tabela 4. Médias e respectivos desvios-padrão, valores mínimos e máximos do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e do sangue oculto fecal em cães, sadios (GC) ou portadores de doença renal crônica, em diferentes estadiamentos (segundo a IRIS). Jaboticabal, 2011.	28
Tabela 5. Correlações de Pearson para as variáveis creatinina e ureia vs as diferentes variáveis avaliadas TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativada), TP (Tempo de protrombina), fibrinogênio plasmático e plaquetas nos grupos DRC2, DRC3 e DRC4.	31

VARIÁVEIS DA HEMOSTASIA SANGUÍNEA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA CANINA.

RESUMO - Realizou-se um estudo experimental acerca do processo de coagulação sanguínea em trinta nove (39) cães distribuídos em quatro grupos, sendo um grupo controle (n= 10) e os demais constituídos por cães com diferentes graus de doença renal crônica (DRC), que segundo a IRIS (2009) DRC estágio 2, DRC estágio 3 e DRC estágio 4. Os cães acometidos por DRC eram provenientes do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. O grupo controle incluiu animais adultos, de qualquer sexo, de qualquer raça, cujo bom estado de saúde foi aquilatado com base em exames clínicos gerais, laboratoriais de rotina e na estimativa da taxa de filtração glomerular, segundo o *clearance* de creatinina endógena de 24 horas. Como critério de inclusão no grupo DRC, foram levados em consideração a evolução clínica de mais de 30 dias e valores de creatinina sérica obtidos em dois ou três momentos diferentes ao longo de algumas semanas. As determinações laboratoriais de fibrinogênio, contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e sangue oculto fecal, foram utilizadas na avaliação da hemostasia a partir das supracitadas amostras de sangue. Ao analisar-se o comportamento das variáveis hemostáticas dos diferentes estadiamentos da DRC (2, 3 e 4), segundo a IRIS – *International Renal Interest Society*, 2009, verificou-se que não houve diferença significativa entre os valores de TP, TTPA, fibrinogênio plasmático, plaquetas e sangue oculto fecal, com relação à ureia e creatinina séricas. Isto indica que nos pacientes com doença renal crônica a deficiência na hemostasia, evidenciada principalmente na gastropatia urêmica, não está relacionada com os fatores de coagulação avaliados neste estudo.

Palavras-Chave: Cães, fibrinogênio, plaquetas, rim, TTPA, TP.

MEASUREMENTS OF PRIMARY AND SECONDARY BLOOD HEMOSTASIS IN DOG'S CHRONIC KIDNEY DISEASE.

SUMMARY – An experimental study was conducted on the blood coagulation process in 40 dogs divided into four groups: a control group (n = 10), stage 2 of CKD, stage 3 of CKD, and stage 4 of CKD (International Renal Interest Society – IRIS, 2009). Dogs with CKD from “Governador Award Natel” Veterinary Hospital of FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil, were used. The control group consisted of adult animals of either, sex, any race, whose good health was based on general clinical examination, routine laboratory tests and the glomerular filtration rate estimation, according to 24-hours endogenous creatinine clearance. For inclusion in CKD group, was considered more than 30-days of clinical evolution and serum creatinine values obtained from two or three different times over a few weeks. The laboratory measurements of fibrinogen, platelet count, prothrombin time (PT), time of partial activated thromboplastin (TPAT), and fecal occult blood, were used in the homeostasis evaluation from the above blood samples. Analyzing the different hemostatic variables behavior on the different stages of CKD, it was observed non-significant difference on urea and serum creatinine between PT, TPAT, plasma fibrinogen, platelets, and fecal occult blood. This result indicates that in patients with CKD, the hemostasis deficiency, as evidences mainly in uremic gastropathy, is not related to the coagulation factors evaluated in this study.

Keywords: dog, fibrinogen, kidney, platelets, TTPA, TP.

***Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da
FCAV-UNESP em 22 de abril de 2009 (protocolo nº 006137-09).***

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um mecanismo protetor que previne o sangramento excessivo após uma lesão no sistema vascular. Ela depende de interações complexas entre o endotélio dos vasos, plaquetas, fatores de coagulação e fatores fibrinolíticos. As plaquetas, fundamentais para a hemostasia normal, são ativadas, aderem ao local da lesão e secretam substâncias necessárias para a coagulação, formando agregados que impedem a perda sanguínea (SMITH, 2010). Esta etapa do processo de coagulação, definida como hemostasia primária, é seguida pela formação de um coágulo de fibrina e simultânea atividade fibrinolítica (GOPEGUI & FELDMAN, 2004a).

Os pacientes urêmicos apresentam, frequentemente, complicações hemorrágicas gastroentéricas que levam a importantes taxas de morbidade e mortalidade em tais pacientes. A primeira descrição \que se conhece de uma complicação hemorrágica severa na uremia foi referida em 1764 por Giovanni Battista Morgagni na Epístola Anatômico-Médica XLI. Em 1827, Richard Bright destacou que os pacientes com insuficiência renal crônica apresentavam púrpuras cutâneas muito frequentemente. Esta associação foi confirmada por Riesman em 1907, após ter concluído que as complicações hemorrágicas em pacientes urêmicos eram provavelmente devidas à ação de uma toxina que além de atuar sobre as paredes vasculares, também afetava a integridade do sangue. As pesquisas sobre a fisiopatologia da diátese hemorrágica em doentes renais crônicos aumentaram nos últimos anos, porém, há muitos pontos obscuros e contraditórios, e estudos mais recentes tentam correlacionar o estado urêmico com alterações na função plaquetária e na interação plaqueta-subendotélio vascular (REMUZZI, 1988; CASES & ESCOLAR, 1998).

Além da diátese hemorrágica, pacientes com doença renal crônica também podem desenvolver eventos tromboembólicos por excessiva estimulação da hemostasia ou por falha nos processos anticoagulantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemostasia e componentes do processo hemostático

Hemostasia pode ser definida como a interrupção do sangramento, e defeitos nesse processo podem incluir tanto uma excessiva coagulabilidade e consequente trombose, como numa insuficiente coagulabilidade e resultante hemorragia (BAKER, 2007; SMITH et al., 2011). Cabe esclarecer que coagulação não é sinônimo de hemostasia, mas sim um de seus componentes, podendo ser avaliada independentemente *in vitro* (BAKER, 2007; STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Uma hemostasia eficiente reflete uma resposta integrada de três componentes principais, sejam eles, os fatores solúveis da coagulação que levam à formação da fibrina estável e insolúvel, as plaquetas circulantes e a parede vascular formada por uma camada de células endoteliais, fibroblastos, fibras colágenas e fibras musculares lisas (GARCIA, 2005).

Os componentes acima referidos devem estar em equilíbrio, contribuindo para que o sangue mantenha sua fluidez no interior dos vasos. O rompimento desse equilíbrio, qualquer que seja a natureza, poderá ensejar desde extravasamento sanguíneo até a formação de trombos, e a intensidade de ambas (hemorragia ou trombose) dependerá da localização, amplitude das alterações e do grau do desequilíbrio atingido (VERRASTRO, 1999).

Após lesão vascular, as plaquetas entram em contato com constituintes da matriz extracelular, que normalmente estão sequestrados abaixo do endotélio intacto; incluindo colágeno, proteoglicanas, fibronectina e outras glicoproteínas aderentes, para formação do tampão plaquetário (COTRAN & MITCHEL, 2000). A hemostasia então decorre da agregação das plaquetas, da ação concatenada de fatores plasmáticos até a conversão de fibrinogênio em fibrina e de fatores liberados pela parede vascular, dentro de uma interação sequencial (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Dessa forma, didaticamente a hemostasia pode ser subdividida em três etapas, assim definidas; a hemostasia primária, envolvendo basicamente as plaquetas e a parede vascular e levando a formação do tampão hemostático primário; a hemostasia secundária, envolvendo os fatores plasmáticos da coagulação, com formação do tampão hemostático secundário; e a hemostasia terciária, envolvendo enzimas relacionadas com o processo fibrinolítico (BAKER, 2007).

2.2 Hemostasia primária

Como resposta inicial à lesão tecidual verifica-se a contração das fibras musculares lisas ao nível das paredes das pequenas artérias e veias, configurando, num primeiro momento, uma vasoconstrição. Os capilares não possuem tais fibras, porém possuem os esfíncteres pré-capilares que também podem servir no controle da perda de sangue (BOZZINI & MOLINAS, 2004).

O endotélio impede a coagulação ao exercer o papel de barreira mecânica para o tecido conjuntivo subendotelial. Este último é altamente trombogênico em função da presença do fator tecidual, que produz vários fatores inibidores da agregação plaquetária, bloqueando o sistema da coagulação, e favorecendo a dissolução de coágulos (JONES et al., 1997)

As células endoteliais modulam vários aspectos, frequentemente oponentes à hemostasia normal, visto que, por um lado, possuem propriedades antiplaquetárias, anticoagulantes e fibrinolíticas e, por outro lado, após uma lesão ou ativação, são capazes de exercer funções pró-coagulantes (JAIN, 1993; BAKER, 2007). Desta forma, a resposta fisiológica normal à injúria vascular tem início com vasoconstrição local seguida por adesão, secreção e agregação plaquetárias, fato que confere às plaquetas papel fundamental na hemostasia (JAIN, 1993; BAKER, 2007).

Ademais, as plaquetas caracterizadas como fragmentos citoplasmáticos oriundos dos megacariócitos, exercem as funções de manutenção do endotélio vascular e auxílio no reparo do endotélio lesado, sendo parte integrante do processo de coagulação. Promovem a coagulação do sangue, auxiliando na reparação da parede dos vasos sanguíneos e evitando a hemorragia; exercendo, de tal modo, um papel central na hemostasia normal (KERR, 2003).

Adicionalmente, é fato conhecido que as plaquetas são capazes de desenvolver essencialmente três respostas funcionais quando estimuladas, assim, podem, aderir às superfícies (adesão), liberar o conteúdo de seus grânulos (liberação) e, finalmente, sofrer agregação com outras plaquetas (agregação). Tais eventos parecem ser sequenciados e relacionados entre si, decorrentes da ativação plaquetária, porém estudos sugerem que eles podem ocorrer como eventos distintos (AULT, 1993). A reação de liberação é iniciada por um influxo de cálcio e mudança nos elementos contráteis do citoesqueleto, que resulta no movimento dos grânulos em direção à membrana plasmática seguida de fusão e liberação do conteúdo granular para o espaço extracelular (ZUCKER, 1994). Estudos de microscopia eletrônica sugerem que tal liberação ocorre através do sistema canalicular. As plaquetas possuem uma variedade de proteínas de adesão, em sua superfície, que favorecem sua aderência ao endotélio vascular lesado, bem como à matriz extracelular subendotelial, aos leucócitos, e, é claro, a outras plaquetas (AULT, 1993). Os mecanismos de adesão plaquetária estão relacionados com a ligação das glicoproteínas adesivas a macromoléculas tais como colágeno, fibrinogênio, trombospondina e fator de von Willebrand, entre outras (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Assim, no processo de hemostasia, logo após a lesão vascular, ocorre vasoconstricção reflexa local, o que reduz instantaneamente o fluxo sanguíneo. Em seguida, as plaquetas interagem com o local da lesão, formando o tampão plaquetário, caracterizando a fase primária da hemostasia (TROY, 1998). A interrupção do sangramento reflete a formação do tampão hemostático que caracteriza a hemostasia primária. A carência de fatores da coagulação não impede que essa fase da

hemostasia ocorra, embora o sangramento possa ser reiniciado uma vez que interferências na hemostasia secundária prejudicam o processo de estabilização do coágulo (BAKER, 2007).

O supracitado tampão plaquetário é, inicialmente, frouxo, porém, geralmente satisfatório para o controle da hemorragia se a lesão vascular for pequena. A ativação da cascata da coagulação resulta na formação de fibrina que estabiliza o tampão plaquetário primário, promovendo a formação do tampão hemostático definitivo (JAIN, 1993).

O equilíbrio entre as atividades endoteliais antitrombótica e pró-trombótica determina criticamente se ocorrerá formação, propagação ou dissolução do trombo. O endotélio intacto impede que as plaquetas e fatores plasmáticos da coagulação entrem em contato com a matriz extracelular subendotelial altamente trombogênica. Caso se tornem ativadas, após uma lesão endotelial focal, as plaquetas são inibidas especificamente da aderência ao endotélio íntegro circulante pela prostaciclina (PGI₂) endotelial e pelo óxido nítrico. Ambos mediadores são potentes vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária, os referidos mediadores, sintetizados por células endoteliais são estimuladas por uma série de fatores produzidos durante a coagulação. A ação anticoagulante é mediada por moléculas semelhantes à heparina associadas à membrana; e trombomodulina, um receptor específico da trombina. Ademais, as células endoteliais sintetizam ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), promovendo atividade fibrinolítica para remover os depósitos de fibrina nas superfícies endoteliais (COTRAN & MITCHEL, 2000).

2.3 Hemostasia secundária

Na sequência do fenômeno da coagulação é desencadeada uma série interconectada de etapas de ativação enzimática que leva à conversão de protrombina a trombina (fator IIa) que por sua vez leva à conversão do fibrinogênio solúvel (fator I) a fibrina insolúvel (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

A maioria das referidas etapas envolve uma enzima, um substrato (fibrinogênio) e um cofator (fatores Va, VIIIa e XIIIa) unidos a uma superfície fosfolipídica como a membrana de plaquetas, leucócitos ou células endoteliais (JAIN, 1993).

Os fatores da coagulação estão presentes no plasma em concentrações muito pequenas ($\mu\text{g/mL}$), sendo a maioria proteases. Tais fatores são ativados predominantemente pela exposição à tromboplastina tecidual expressada na superfície de células endoteliais ou fibroblastos. Após uma ativação inicial, os fatores de coagulação são ativados de forma seriada e por alças de amplificação de *feedback* aumentando, portanto, o estímulo inicial. O evento culminante dessa ativação é a conversão do fibrinogênio em fibrina e a formação de um coágulo estável de fibrina e plaquetas (BAKER, 2007).

A cascata da coagulação ou ativação sequencial dos fatores, tradicionalmente tem sido dividida em vias intrínseca, extrínseca e comum, pela exposição à tromboplastina tecidual ou pela ativação por contato à membrana basal e ao colágeno ou outras superfícies carregadas negativamente (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Assim, de uma forma mais detalhada, observa-se que a via extrínseca (Figura 1) é o meio pelo qual a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com os tecidos extravasculares (BANKS, 1992). A referida via se materializa quando a tromboplastina tecidual (fator III), com a intermediação do cálcio e do fator VII, leva à ativação do fator X inativo para sua forma ativada (Xa) (GUYTON & HALL, 2002; BOZZINI & MOLINA, 2004; SMITH et al., 2011). Geralmente, após a lesão, ambas as vias são ativadas, porém, a via intrínseca parece ser mais importante para ativação da via comum (BUSH, 2004).

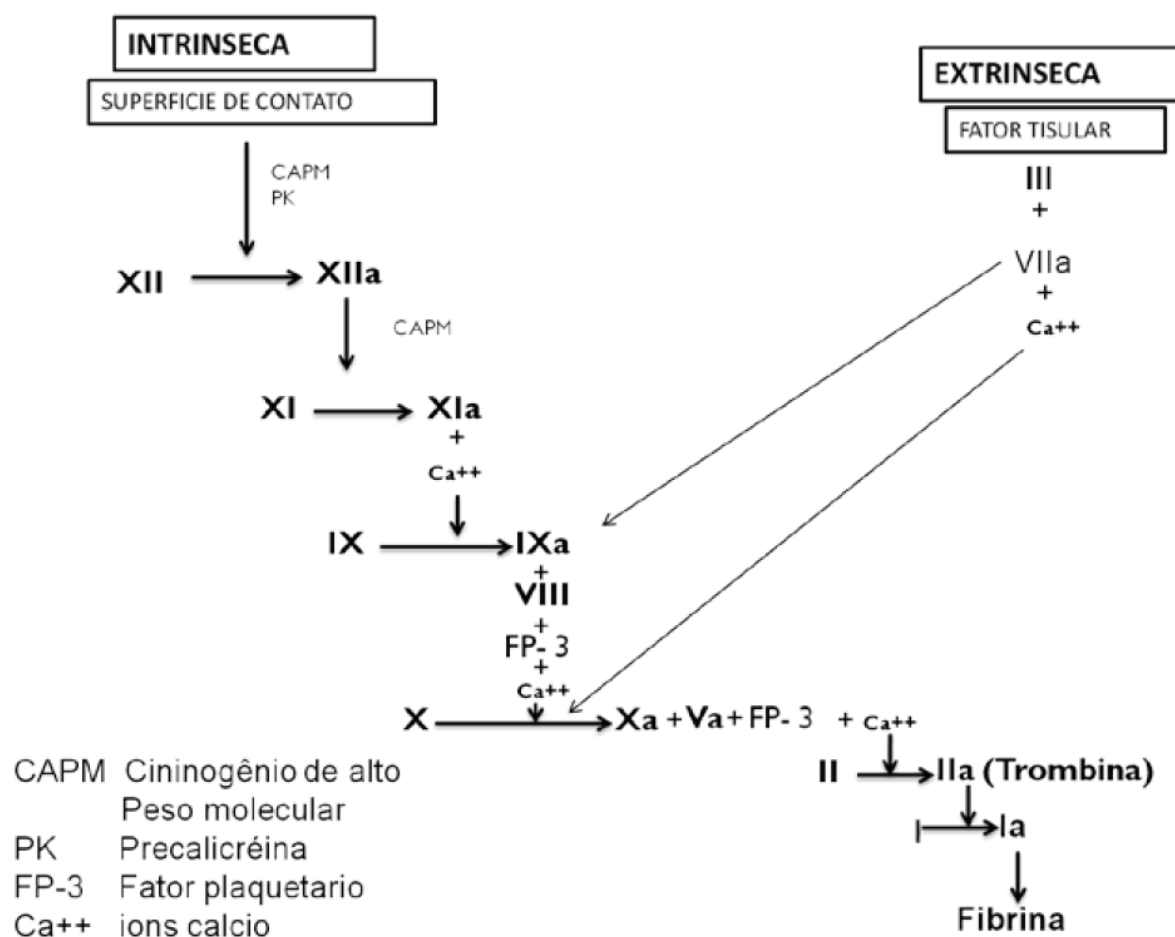


Figura 1. Cascata da coagulação. Os algarismos romanos referem-se aos fatores coagulantes e a letra “a” indica seu estado de ativação (adaptado de JAIN, 1993).

Já a via intrínseca inicia-se pelo contato do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas (BOZZINI & MOLINA, 2004). A fase de contato envolve o fator XII, pré-caliceína, fator XI e cininogênio de alto peso molecular (CAPM). Na presença de CAPM, o fator XI adere à superfície exposta e é ativado pelo fator XIIa ligado à superfície. As perturbações do sangue fazem com que o fator XII converta-se em uma enzima proteolítica (fator XIIa). A caliceína e o CAPM podem modular a ativação do fator XII. A lesão da parede vascular resulta na liberação de fosfolipídios plaquetários ou fator plaquetário 3 (FP3) (McVEY, 1994). O fator XII ativado atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo, constituindo a segunda etapa da via intrínseca. O fator XI atua sobre o fator IX ativando-o enzimaticamente. Por sua vez, o fator IXa, ao atuar com o fator VIIIa, fosfolipídios plaquetários e com o FP3, ativa o fator X (TROY, 1998).

Com a ativação do fator X, tem início a via comum, pela combinação de várias substâncias, tais como o fator III, cálcio, fator VII e fosfolipídios teciduais na via extrínseca e, da mesma forma, o FP3, fator IXa, o fator VIII:C e cálcio na via intrínseca (McVEY, 1994).

O fator X ativado forma o complexo ativador da protrombina ao combinar-se com os fosfolipídios teciduais ou liberados pelas plaquetas e fator V (TROY, 1998). Este complexo, na presença de quantidade suficiente de cálcio iônico, promove a conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que são interligados pelo fator XIII ativado, formando polímeros insolúveis de fibrina (SMITH et al., 2011). Assim, a transformação ou “estabilização” da fibrina solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel é catalisada pelo fator XIII, na presença de cálcio. O fator XIII normalmente circula no plasma sob a forma de proenzima inativa e é convertido em sua forma ativa pela trombina (GUYTON & HALL, 2002). A fibrina insolúvel envolve as plaquetas e as células sanguíneas para formar o tampão definitivo, caracterizando a fase secundária da hemostasia (TROY, 1998).

Estudos recentes, consagrados à análise da cinética individual de alguns fatores, sugerem um esquema no qual a ativação inicial da tromboplastina tecidual leva à formação de apenas uma pequena quantidade de trombina, a qual é então seguida e amplificada por subsequente alça de ativação das vias intrínseca, extrínseca e comum. A trombina, por sua vez, possui um importante papel na ativação dos fatores VII e XI e na aceleração dos fatores V e VIII (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Essas informações sugerem que a ativação por contato (via intrínseca) não é um contribuinte significativo para a ativação dos fatores da coagulação e que o sistema intrínseco primariamente é uma alça de amplificação que se torna ativada após a geração inicial de trombina pela tromboplastina tecidual (BAKER, 2007; STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Além das proteínas pró-coagulantes, existem proteínas plasmáticas anticoagulantes que regulam de forma negativa a cascata da coagulação. Isso assegura que a ativação da coagulação não exceda a necessidade de hemostasia no sítio de lesão vascular. Tais proteínas anticoagulantes estão em equilíbrio com as proteínas pró-coagulantes. Assim, uma deficiência dos fatores anticoagulantes resulta em trombose. Dessa forma, o equilíbrio pode ser desviado pela perda das proteínas anticoagulantes ou por aumento na concentração de proteínas pro-coagulantes (STOCKHAM & SCOTT, 2011). A proteína anticoagulante mais importante é a antitrombina III (AT-III) que é responsável por aproximadamente 70% da atividade anti-trombina total no plasma. A AT-III necessita da heparina para atuar na superfície endotelial, já que a heparina permite sua ligação à trombina numa relação 1:1 e inativa a trombina. O complexo AT-III:trombina subsequentemente é removido pelos hepatócitos. Em adição, a AT-III também é responsável pela inativação de outras proteases tais como os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa (BAKER, 2007).

Outras proteínas anticoagulantes são as proteínas C e S - que inibem os fatores Va e VIII:Ca, a α_2 -macroglobulina - que inibe a trombina, a plasmina, a calicreína, o inibidor da via extrínseca – que inativa a tromboplastina e o fator VIIIa, a α_1 -antitripsina,

α_2 -antiplasmina e a trombomodulina – um cofator da proteína C (BAKER, 2007; STOCKHAM & SCOTT, 2011).

A atividade normal dos fatores da coagulação, procoagulantes e anticoagulantes, requer vitamina K, que atua como um cofator para a carboxilação dos fatores II, VII, IX e X, tanto quanto das proteínas anticoagulantes C e S (JAIN, 1993).

A vitamina K normalmente é oxidada durante a carboxilação, e então, reduzida à forma ativa hidroquinona, num processo de dois passos, envolvendo a enzima epóxido redutase. Na presença de antagonistas de vitamina K ou na ausência da referida vitamina, as proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes são biossintetizadas porém sem atividade funcional. Essas proteínas afuncionais são designadas PIVKA, ou seja, proteínas na ausência de vitamina K ou na presença de antagonistas de vitamina K (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

O tampão hemostático secundário formado após a ativação dos fatores de coagulação, promove uma grande saliência para o interior do vaso, mas logo se contrai, graças à ação da actina, miosina e adenosina trifosfato (ATP) das plaquetas. A parede do vaso, protegida pelo coágulo, se restaura pela formação de um novo tecido e então o coágulo é removido pelas enzimas liberadas pelos lisossomos das plaquetas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

2.4 Hemostasia terciária

Refere-se à degradação do fibrinogênio e da fibrina em fragmentos de peptídeos menores, denominados fragmentos X, Y, E e D, às custas da plasmina, a forma ativada do plasminogênio. Tal ativação pode ser feita pela calicreína ou pelo fator XII ativado (BAKER, 2007).

2.5 Hemostasia e Doença Renal Crônica Canina

A doença renal crônica (DRC), principal afecção renal dos cães, caracteriza-se pela perda da capacidade excretora e concentradora dos rins, com redução da filtração glomerular e consequente perda de substâncias plasmáticas que deveriam ser retidas e, aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias normalmente eliminadas, dentre as quais se destaca a ureia, componente do catabolismo proteico (POLZIN et al., 2004).

Do ponto de vista diagnóstico, tanto para fins clínicos quanto experimentais, a classificação do paciente com DRC sem os sinais clínicos de uremia é um desafio para os pesquisadores da área. A *International Renal Interest Society* (IRIS) instituiu um estadiamento para a DRC, padronizando-a em 4 estádios: 1 – ausência de azotemia, 2 – azotemia leve, 3 – azotemia moderada e 4 – azotemia severa. Além disso, estabeleceu subestadiamento dos pacientes com DRC com base na avaliação da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistêmica.

Tabela 1. Estadiamento da doença Renal crônica canina segundo a *international Renal Interest Society* (IRIS), 2009.

ESTADIO	CREATININA (mg/dL)
1. – Não azotêmico	<1,4
2. – Levemente azotêmico	1,4 – 2,0
3. – Moderadamente azotêmico	2,1 – 5,0
4. – Severamente Azotêmico	> 5,0

*Adaptada de IRIS 2009

Tabela 2. Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS), 2009.

SUBESTÁDIOS	VALOR DE UP/C**
Não proteinúrico (NP)	< 0,2
Proteinúria limítrofe (PL)	0,2 – 0,5
Proteinúrico (P)	> 0,5
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)	
Risco mínimo (0)	< 150
Baixo risco (1)	150 – 159
Risco moderado (2)	160 – 179
Alto risco (3)	≥ 180

- Adaptada de IRIS (2009). ** Relação proteína- creatinina urinária.

O acúmulo das substâncias que deveriam ser adequadamente eliminadas pelos rins causa uma serie de sinais clínicos conhecida como síndrome urêmica, que inclui desequilíbrios hídrico e natrêmico, anemia, intolerância aos carboidratos, distúrbios neurológicos, distúrbios gastroentéricos, osteodistrofias, deficiência imunológica, acidose metabólica e processos inflamatórios que predis põem fibrose e esclerose renais (FINCO, 1995; OTS et al., 2000;).

Os distúrbios glomerulares primários são propostos como as principais causas de DRC em cães (GRAUER, 2005), porém amiloidose (RAVID et al., 1982), pielonefrite, urolitíase, displasia renal, nefrotoxinas, doença renal policística, hipercalcemia, linfoma, doenças auto-imunes e imunomediadas e leptospirose (PRESSLER & VADEN, 2003; POLZIN et al., 2004) também são referidos na etiologia da doença.

Entretanto, trata-se de uma doença progressiva que, independentemente da causa, leva à destruição lenta de uma porção dos néfrons, enquanto os néfrons ileos remanescentes sofrem hipertrofia compensatória, por um determinado tempo. Quando a DRC se instala, os néfrons hipertrofiados podem não conseguir mais manter a função

renal, mesmo quando retirada a causa ou instituída terapia adequada (POLZIN et al., 2004; WARE, 2006).

Vários pacientes com uremia, apresentam diátese hemorrágica. Essa predisposição torna-se especialmente relevante quando tais pacientes são submetidos a procedimentos invasivos tais como cirurgias, biopsias e colocação de cateteres, entre outros (GRALNICK H. et al., 1988).

2.6 Alterações hemostáticas na DRC

Durante a progressão da doença renal crônica as desordens hemostáticas podem apresentar complicações importantes, expressadas mais frequentemente pela tendência a sangramentos, ou, com menor frequência, ao risco de trombose. (MEZZANO et al., 1996; BERTHIL et al., 2003).

De acordo com RIESMAN (1907), Morgagni, já no início do século dezoito, descreveu uma mulher que apresentava hálito urêmico, hematoquesia e epistaxe. Desde então, inúmeros estudos buscam associar a uremia à tendência hemorrágica de pacientes doentes renais crônicos e agudos. Inicialmente foi verificado que poucos casos apresentavam trombocitopenia associada à hemorragia de fundo urêmico, na ausência de alterações consistentes nos testes de coagulação (NICODEMO et al., 1990). Relataram-se também aumentos do tempo de sangramento e da fragilidade capilar, porém tais variáveis apresentaram-se normais em outros estudos. Enterocolite urêmica foi citada como frequente causa da hemorragia gastroentérica na uremia, entretanto tal associação não acrescentou esclarecimentos à ocorrência de púrpuras, epistaxe e outras manifestações hemorrágicas neste grupo de pacientes (LARRAIN & ADELSON, 1956). Para DI BARTOLLA, (2004), o número de plaquetas e os fatores plasmáticos de coagulação, em geral, estão normais na insuficiência renal crônica.

Assim, indivíduos com uremia apresentam alterações hemostáticas traduzidas por episódios de sangramento, que são evidenciados por sintomas hemorrágicos brandos e por tempo de sangramento prolongado. Essa tendência ao sangramento tem sido classicamente atribuída às anormalidades da função plaquetária que incluem diminuição da adesão e da agregação. A patogênese de tal disfunção plaquetária é multifatorial e inclui defeitos intrínsecos das plaquetas, anemia, toxinas urêmicas, defeitos do fator de von Willebrand (fW) e anormalidades vasculares (HARVEY et al., 1993). É longamente estabelecido que os pacientes com uremia apresentam maior risco de complicações hemorrágicas influenciadas por um certo número de fatores que incluem o estado urêmico associado a diátese hemorrágica, condições co-morbidas e utilização de medicamentos que podem afetar a hemostasia e que predis põem o sangramento (AVTAR et al., 2006).

Com a verticalização das pesquisas na linha de confluência entre a DRC e alterações da coagulação, tem sido constatado que grande parte das ocorrências hemorrágicas deve-se, em parte, a trombopatia urêmica, um defeito hemostático primário (REBELINK et al., 1994). As alterações intrínsecas plaquetárias vão desde redução da concentração de serotonina e adenosina difosfato, elevação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (VLACOYANNIS et al., 1982), redução da capacidade de liberação de tromboxano A₂ (MACCONI, et al., 1992) e aumento intracelular de cálcio (WARE et al., 1989). Ademais, estudos com adesão plaquetária evidenciaram que apesar da concentração adequada do fator de “von Willebrand” (vWf) e sua satisfatória interação com a glicoproteína Ib, indicações de um defeito funcional na interação do vWf com a glicoproteína IIb-IIIa parece alterar de forma significativa a agregação plaquetária, etapa subsequente do processo hemostático (DI MINNO et al., 1985).

Num estudo feito em pacientes com DRC avançada, BINI et al. (2006), demonstraram que existe uma alta prevalência à inflamação e outras lesões gastrointestinais superiores da mucosa, podendo estas lesões sangrar por fatores diferentes a distúrbios na coagulação gerando um resultado positivo para o teste de SOF com danos clinicamente não importantes no diagnóstico da DRC.

Paradoxalmente, esse defeito na adesão plaquetária é acompanhado de um estado pró-trombótico com altos níveis de fibrinogênio e aumento da formação de trombina (SAGRIPANTI et al., 1993), que associado à resposta vascular inflamatória, resulta em complicações trombóticas com significativas taxas de morbidade e mortalidade (LIBBY et al., 2002).

Desta forma, as complicações trombóticas em pacientes urêmicos também podem ser frequentes, porém os dados disponíveis na literatura não esclarecem inteiramente os mecanismos envolvidos e futuras investigações são necessárias (MOLINO et al., 2006; JURK & KEHREL, 2007). É fato que a AT-III, uma das mais importantes proteínas anticoagulantes do plasma, por possuir baixo peso molecular, pode ser perdida na urina de pacientes com glomerulopatia severa ou amiloidose renal (BAKER, 2007). Diferentes estudos incluem ensaios de fatores hemostáticos em pacientes que apresentam graus variados de azotemia como ou sem manifestações hemorrágicas (LEWIS et al. 1956).

Aumento na concentração de fragmentos de fibrinogênio foi observado em cães urêmicos, embora não seja totalmente aceito que esse achado relaciona-se ao incremento da fibrinólise. Tais fragmentos ligam-se às glicoproteínas da superfície plaquetária (GPIIb-IIIa) e bloqueiam a interação de plaquetas ao fibrinogênio normal, diminuindo a adesão plaquetária (THEKKEDATH et al., 2006)

Assim, apesar da uremia ser uma desordem sistêmica que pode estar associada à disfunção plaquetária (SUE & BETHAM, 2011), levando a alterações na hemostasia primária, vários modelos de interferência entre a uremia e a falha na hemostasia já foram propostos (SHEN & FRENKEL, 2007; GALBUSERA et al., 2009), porém o mecanismo exato que envolve tal defeito hemostático ainda é desconhecido, e a tendência ao sangramento ou à trombose parece ser de origem multifatorial (VOLL, 2011).

Além disso, como a trombose é um problema comum em várias afecções de cães e gatos, esse achado em pacientes com DRC tem levado à necessidade do emprego de testes de diagnóstico de rotina mais confiáveis para a detecção de estados trombóticos ou protrombóticos, pois a detecção precoce de condições protrombóticas pode prover uma oportunidade para intervenção terapêutica num momento onde o animal esteja mais responsivo ao tratamento.

CASONATO et al. (2001), relatam que em pacientes urêmicos desenvolve-se um padrão hemostático complexo, referente tanto às anormalidades plaquetárias (diminuição de agregação plaquetária induzida pelo colágeno e diminuição do componente vWF em plaquetas), bem como aos outros componentes da coagulação.

No presente, testes tais como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), concentração de fibrinogênio plasmático e contagem de plaquetas são frequentemente utilizados (MORITZ et al., 2003).

2.7 Testes laboratoriais para avaliação da hemostasia

Como referido, os testes laboratoriais para avaliação da hemostasia envolvem, além da plaquetometria, determinação da concentração de fibrinogênio e da ativação *in vitro* de partes da cascata de coagulação (TSENG et al., 2001).

Os métodos laboratoriais para o diagnóstico das desordens hemostáticas se encontram divididos em dois grupos. O primeiro grupo que corresponde aos testes que avaliam o primeiro momento do sistema hemostático, no qual atuam os vasos sanguíneos e as plaquetas e o segundo grupo que corresponde aos testes que avaliam o segundo momento no qual atuam os fatores da coagulação (STEINER et al., 1979).

Para avaliar a primeira fase de hemostasia, os principais exames laboratoriais são tempo de sangria, contagem de plaquetas e agregação plaquetária. Para avaliar a segunda fase de hemostasia, também chamado de tempo plasmático, os principais

exames são tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e dosagem de fibrinogênio plasmático.

O tempo de protrombina (TP) é usado para avaliar as vias extrínseca (fator VII) e comum (fatores X, V, II e I), enquanto o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) é usado para monitorar as vias intrínseca (fatores XII, XI, IX e VIII) e comum (JAIN, 1993; COUTO, 1999).

Os reagentes utilizados para determinar automática ou manualmente o TP e o TTPA são desenvolvidos para determinação em plasma humano (GOUAULT, 2001), e são adaptados para uso em cães.

Assim, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e o tempo de protrombina (TP) são utilizados na avaliação da hemostasia secundária e auxiliam no diagnóstico de deficiências de fatores de coagulação. O TTPA é sensível à deficiência dos fatores da via intrínseca (XII, XI, IX, VIII) e da via comum (fibrinogênio, II, V, X) (Figura 2), enquanto o TP identifica anormalidades na via extrínseca (VII) e na via comum da coagulação (McCONNEL, 2000). A atividade pró-coagulante específica dos fatores pode ser mensurada por ensaio de TP e TTPA com base no ponto final de formação do coágulo. Distúrbios hepáticos, deficiência de vitamina K e processos de coagulação intravascular disseminada (CIVD) podem interferir no resultado destes testes (GOPEGUI & FELDMAN, 2004b).

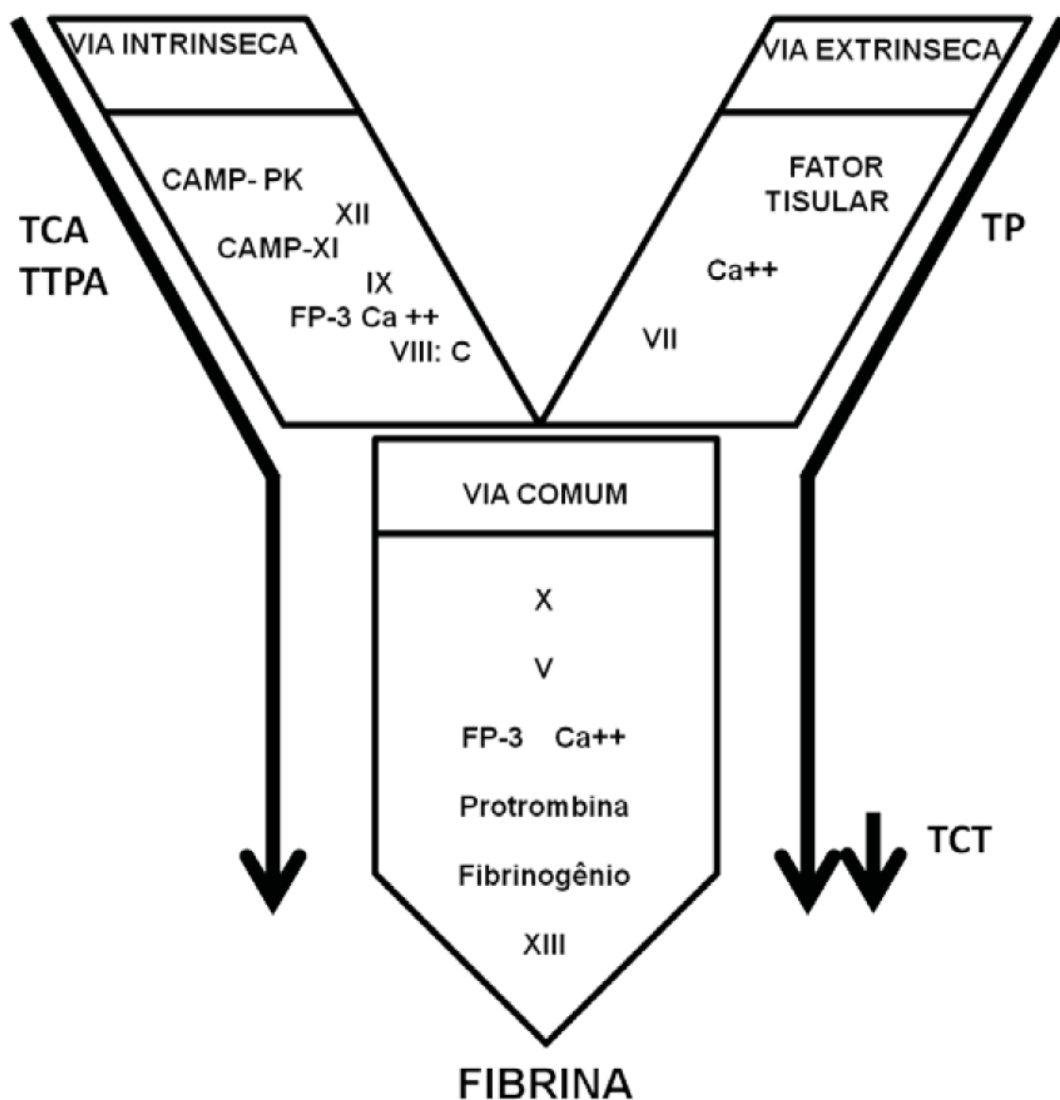


Figura 2. Etapas da cascata da coagulação avaliadas com o emprego dos tempos de coagulação ativada (TCA) de tromboplastina parcial ativada (TTPA), de protrombina (TP) y de coagulação de trombina (TCT). CAMP, cininogênio de alto peso molecular; PK, precalicreína; FP-3, fator plaquetario 3; Ca⁺⁺ íons cálcio; VIII:C, componente coagulante do complexo do fator VIII. Os algarismos romanos indicam os fatores de coagulação e as letras "a" indicam sua ativação (adaptado de JAIN, 1993).

O TP é o tempo necessário para a formação de um coagulo de fibrina após a adição de tromboplastina e cálcio ao plasma citratado, dando indicação sobre a quantidade total de protrombina presente no sangue. A adição de cálcio, fosfolipídios de

carga negativa e de uma substância particulada promoverá a ativação dos fatores XII e XI sendo possível determinar o TTPA (JAIN, 1993). A tromboplastina (fator tissular, fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formando , com o fator VII, um complexo dependente do cálcio. O fator VII é transformado em uma enzima ativa (fator VIIa), que atua sobre o fator X gerando o fator Xa e este juntamente com fosfolípidos do fator tissular, fator Va e cálcio formam o complexo ativador da protrombina, que transforma a protrombina em trombina. Esta, por sua vez, atua sobre o fibrinogênio polimerizando-o em fibrina. A formação de fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. Os resultados são obtidos a través da comparação entre os tempos de coagulação do plasma de pacientes e do plasma de referência, que representa a medida da atividade dos fatores do complexo protrombínico (fatores II, V, VII, X).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar variáveis da hemostasia sanguínea primária e secundária em cães com doença renal crônica em estádios dois, três e quatro, segundo a IRIS (2009).

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os tempos de Tromboplastina Parcial Ativada e de Protrombina, a concentração de Fibrinogênio plasmático e o número de plaquetas em cães com doença renal crônica.
- Avaliar a correlação entre creatinina sérica e tempos de tromboplastina parcial ativada e de protrombina, concentração de fibrinogênio e alterações numéricas plaquetárias, em cães doentes renais crônicos.
- Avaliar a correlação entre ureia sérica e tempos de tromboplastina parcial ativada e de protrombina, concentração de fibrinogênio e alterações numéricas plaquetárias, em cães doentes renais crônicos.
- Avaliar e descrever os achados laboratoriais relacionados a distúrbios hemostáticos em cães com doença renal crônica, de acordo com o estadiamento segundo a IRIS 2009.
- Avaliar UPC, pressão arterial e sangue oculto fecal para a classificação dos pacientes com doença renal crônica nos diferentes estádios segundo a IRIS (2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Neste ensaio foram avaliados 39 cães adultos, sadios, machos ou fêmeas, de quaisquer raças, atendidos junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, distribuídos em dois grupos experimentais, como a seguir:

4.1.1 Grupo Controle (GC):

Constituído de 10 cães adultos, sadios, machos ou fêmeas, de quaisquer raças e com idade superior a cinco anos cujo bom estado de saúde foi aquilatado com base em exames clínicos gerais, laboratoriais de rotina e pela estimativa da taxa de filtração glomerular, com base no clearance de creatinina endógena de 24 horas.

4.1.2 Grupos de Doentes Renais Crônicos (DRC):

Constituído de 29 cães, machos ou fêmeas de quaisquer raça e idade, com diagnóstico de DRC e sem histórico ou alterações clínicas e clínico-patológicas de outras doenças. Tais cães foram alocados, segundo a classificação da IRIS para DRC em um dos estádios 2, 3 ou 4 segundo a IRIS (2009) o que propiciou a instituição dos subgrupos DRC 2 (9 cães), DRC 3 (10 cães) DRC 4 (10 cães).

Como critério de inclusão das unidades experimentais no grupo DRC, foram levadas em consideração a evolução clínica de mais de 15 dias, valores de creatinina sérica superiores a 1,4 mg/dL, após devida hidratação do paciente, obtida em dois ou três momentos diferentes ao longo de algumas semanas. Além do mais, os pacientes foram subestadiados quanto à proteinúria renal e à hipertensão arterial sistólica (Tabela 2), segundo a classificação da IRIS (2009). A categorização do paciente como proteinúrico, foi estabelecida somente após a exclusão de fatores pré e pós-renais de perda urinária de proteínas e, também, após confirmação de sua persistência pela determinação do valor da razão proteína creatinina urinária (UP/C) em diferentes

momentos ou atendimentos clínicos (duas a três ocasiões com intervalo mínimo de 15 dias). Da mesma maneira, os valores da pressão arterial sistólica foram confirmados após três aferições realizadas em momentos ou atendimentos diferentes.

Cabe ressaltar que, diante das dificuldades em se diagnosticar a DRC em pacientes não azotêmicos, em razão da ausência de sinais clínicos e necessidade da realização de exames que comprovassem a redução da taxa de filtração glomerular, o grupo de pacientes DRC estágio 1 não fez parte deste protocolo experimental. Também, não foram incluídos no grupo/ subgrupos de doentes renais crônicos, pacientes com histórico de transfusões sanguíneas ou tratamento com quaisquer fármacos indutores de hematopoiese (Nandrolona, RhG-CSF, Timomodulina e/ou eritropoietina).

4.2 Determinação das parcelas experimentais

4.2.1 Bioquímica Sérica e Urinária

As provas bioquímico-séricas e urinárias para a classificação e seleção das parcelas experimentais foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, acima referido.

As amostras de soro foram processadas para determinação dos níveis de creatinina (método Jaffé modificado) e de ureia (método enzimático) séricas. As dosagens seguiram as recomendações do sistema Labtest para diagnóstico e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático para provas bioquímicas.

4.2.2 Aferição da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica sanguínea, de cada unidade experimental, nos diferentes momentos de avaliação, foi aferida junto ao Hospital Veterinário “GLN” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, por método ultrassônico com Doppler vascular (Microem[®]- Ribeirão Preto, SP, Brasil), conectado a um manguito de oclusão e a um

esfigmomanômetro (Latex Pri®). Após aclimação do paciente, foram realizadas cinco aferições sequenciais, das quais foram descartados o maior e o menor valores obtidos, registrando-se o valor da média aritmética das três leituras intermediárias remanescentes.

4.2.3 Determinação do Sangue Oculto

Para verificar a presença de sangue oculto nas fezes utilizou-se o teste da Benzidina (ONÓRIO & PINHEIRO, 2010), onde, sobre um papel de filtro, foi colocada uma quantidade de fezes (2 a 3 gramas) e adicionadas três gotas de solução de benzidina (benzidina a 1% em ácido acético diluído a 50%). Em seguida, eram acrescidas duas gotas de água oxigenada a 10 volumes. A presença de sangue oculto nas fezes era confirmada pela formação de um halo verde-azulado no derredor da mancha das fezes.

Interpretação do Exame:

- Sem desenvolvimento de cor: Reação negativa.
- Coloração esverdeada: Traços de sangue.
- Coloração verde clara: +
- Coloração verde escura: ++
- Coloração verde azulada: +++

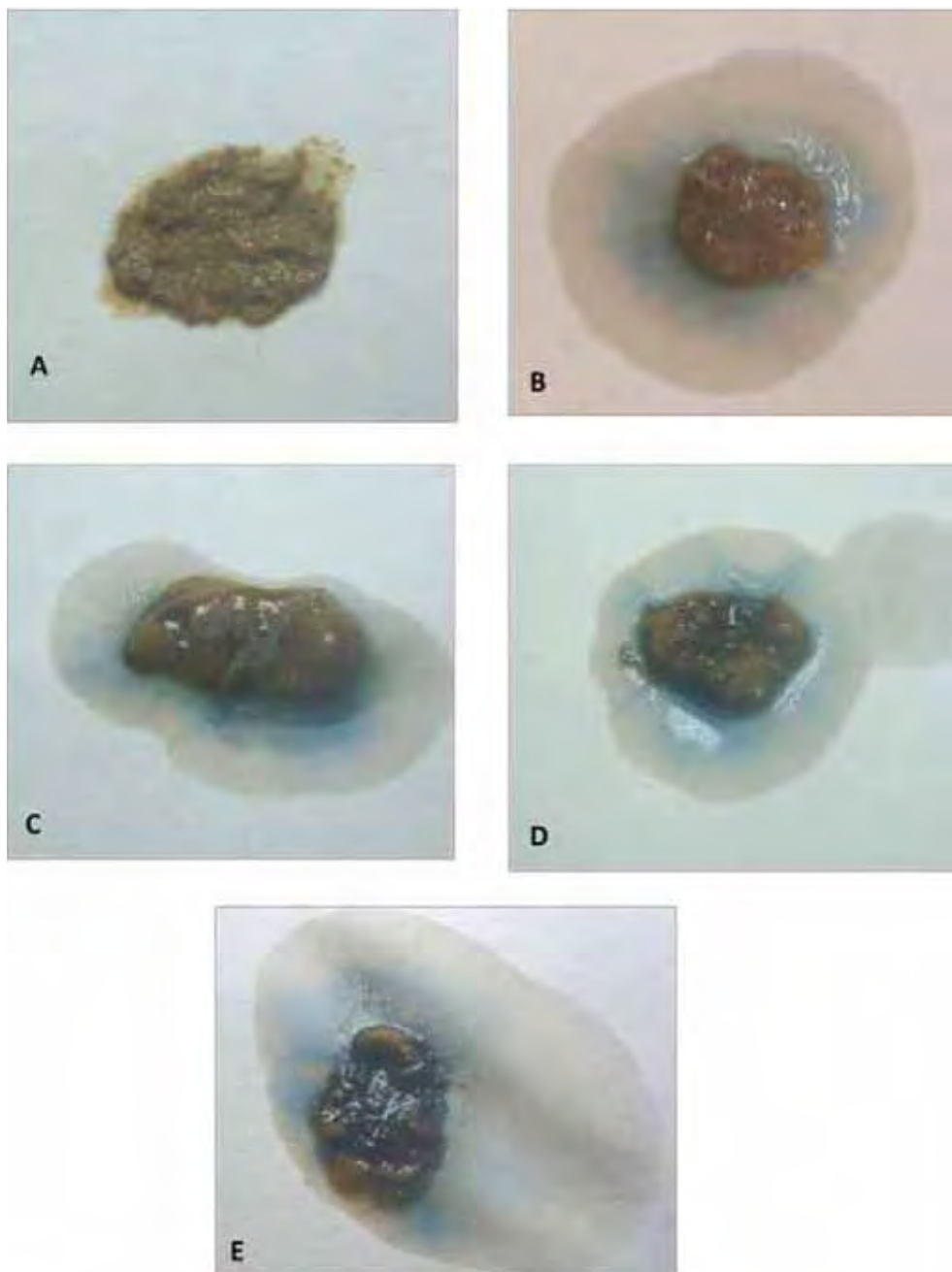


Figura 3. Ilustração da interpretação do teste de sangue oculto. A. Sem desenvolvimento de cor: Reação negativa; B. Coloração azulada: Traços de sangue; C. Coloração azul clara: +; D. Coloração azul escura: ++; E. Coloração verde azulada: +++.

4.3 Análises laboratoriais para avaliação das parcelas experimentais

As amostras de sangue periférico foram obtidas por venipunção jugular e foram envasadas em tubos contendo citrato de sódio, para obtenção de plasma destinado às provas de coagulação; K₂EDTA, para obtenção do hemograma e sem anticoagulante para obtenção do soro. As alíquotas de plasma e soro foram refrigeradas até o momento do processamento. O sangue preservado em EDTA foi processado imediatamente para obtenção do trombograma/Plaquetograma.

4.3.1 TTPA, TP e Fibrinogênio plasmático

As determinações de TTPA, TP e Fibrinogênio, foram conduzidas com o auxílio de um coagulômetro Quick Timer (Drake – São Paulo/Brasil). O modelo determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma sanguíneo (150µL) utilizando um sistema ótico que detecta a variação brusca da densidade ótica da amostra no instante da coagulação. Para a determinação de tais variáveis, foi utilizado o teste TP Hemostasis Labtest®, TTPA Hemostasis Labtest® e Fibrinogen Hemostasis Labtest®.

4.3.2 Plaquetograma

As contagens globais de plaquetas foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células (ABC Vet HORIBA ABX – São Paulo/Brasil), que integra o parque de equipamentos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “GLN” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

4.4 Análise estatística

Para os dados obtidos foi feito inicialmente uma análise de estatística descritiva, eliminando previamente os outlier (valores atípicos) para cada variável. Os estatísticos obtidos foram: a média, desvio padrão e os valores máximos e mínimos. Finalmente foram estimadas as correlações de Pearson, entre as variáveis Creatinina e Ureia com

as variáveis de coagulação sanguínea (TTPA, TP, Fibrinogênio plasmático e Paquetas), em cada um dos estádios da doença renal crônica. Para determinar a significância da correlação foi feito o teste de t com diferentes valores de alfa (0,01=***, 0,05=**, 0,1=*).

5 RESULTADOS

5.1 Estatística Descritiva

La estatística descritiva para os tempos de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e de protrombina (TP) em segundos, para a concentração plasmática de fibrinogênio (g/L), contagem de plaquetas ($10^3 \mu\text{L}$) e sangue oculto fecal, em pacientes da espécie canina, portadores de doença renal crônica, em diferentes estádios (segundo a IRIS, 2009), estágio 2 (DRC2), estágio 3 (DRC3) e estágio 4 (DRC4) encontram-se apresentados na Tabela 3 e 4.

Tabela 3. Médias e respectivos desvios-padrão, valores mínimos e máximos do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e do tempo de protrombina (TP), em segundos, bem como da concentração plasmática de fibrinogênio (g/L), em pacientes da espécie canina, sadios (GC) ou portadores de doença renal crônica, em diferentes estadiamentos (segundo a IRIS). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	TTPA (segundos)	TP (segundos)	Fibrinogênio (g/L)
GC	11,510±0,297 ^{ab} (10,10-13,50)	6,600±0,129 ^a (6,0-7,20)	0,280±0,013 ^a (0,20-0,30)
DRC2	12,833±0,639 ^a (10,60-16,70)	7,044±0,446 ^a (6,10-10,30)	0,322±0,032 ^a (0,20±0,50)
DRC3	11,296±0,660 ^{ab} (8,4-16,10)	6,850±0,266 ^a (6,0-8,70)	0,310±0,276 ^a (0,20-0,50)
DRC4	10,130±1,221 ^b (6,20-20,40)	7,270±0,512 ^a (6,20-11,10)	0,322±0,022 ^a (0,20-0,40)

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais, nas colunas, não diferem entre si ($p>0,05$) e estabelecem a comparação entre os diferentes grupos avaliados (Teste T).

Os resultados obtidos para contagem global de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e a presença de sangue oculto fecal para o grupo controle, DRC2, DRC3 e DRC4 acham-se ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4. Médias e respectivos desvios-padrão, valores mínimos e máximos do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e do sangue oculto fecal em cães saudáveis (GC) ou classificados em diferentes estádios da doença renal crônica (segundo a IRIS), estágio 2 (DRC2), estágio 3 (DRC3) e estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	Sangue Oculto
GC	268,5 $\pm$ 28,28 ^b (161,0-426,0)	0 ^c
DRC2	426,8 $\pm$ 54,36 ^a (200,0-657,0)	1,66 $\pm$ 0,28 ^b (0-3)
DRC3	284,8 $\pm$ 28,59 ^b (171,0-468,0)	1,3 $\pm$ 0,33 ^b (0-3)
DRC4	278,6 $\pm$ 48,98 ^b (112,0-532,0)	2,7 $\pm$ 0,21 ^a (0-3)

No DRC2, a média geral obtida para TTPA foi de 12,83 segundos, com um desvio padrão de 0,63, um valor mínimo de 10,60 e máximo de 16,70. Para TP, a média foi de 7,04 segundos, com um desvio padrão de 0,44, valor mínimo de 6,10 e Máximo de 10,30. No caso do fibrinogênio plasmático, a média geral foi de 0,32 g/dL, desvio padrão de 0,032, valor mínimo de 0,20 e Máximo de 0,50. Para as plaquetas a média foi de 426,8 ($10^3/\mu\text{L}$), com desvio padrão de 54,36, valor mínimo de 200,0 e Máximo de 657,0. Para o teste de SOF, a média geral foi de 1,66, com desvio padrão de 0,28, valor mínimo de 0 e Máximo de 3.

Para o DRC3, no caso do TTPA, a média obtida foi de 11,29 segundos, com um desvio padrão de 0,66, valor mínimo de 8,4 e máximo de 16,10. TP mostrou uma média de 6,85 segundos, um desvio padrão de 0,26, valores Máximo e mínimo de 6,0 e 8,7 respectivamente. No caso do fibrinogênio plasmático a média foi de 0,31 g/dL, com desvio padrão de 0,27, valor mínimo de 0,20 e Máximo de 0,50. Para as plaquetas, a média foi de 284,8 ($10^3/\mu\text{L}$), com desvio padrão de 28,59, com valor mínimo de 171,0 e

máximo de 468,0. Para o SOF, a média foi de 1,3, com desvio padrão de 0,33, valor mínimo de 0 e Máximo de 3.

No caso do DRC4, para o TTPA a média geral foi de 10,13 segundos, com desvio padrão de 1,22, valor mínimo de 6,20 e máximo de 20,40. O TP, com média de 7,27 segundos, um desvio padrão de 7,27, valor mínimo de 6,20 e máximo de 20,40. O fibrinogênio plasmático com uma média de 0,32 g/dL, um desvio padrão de 0,022, valor mínimo de 0,20 e máximo de 0,40. As contagens de plaquetas apresentaram uma média de 278,6 ($10^3/\mu\text{L}$), com um desvio padrão de 48,98, valor mínimo de 112,0 e máximo de 532,0. O SOF alcançou uma média de 2,7 e um desvio padrão de 0,21, com valores mínimo e Máximo de 0 e 3 respectivamente

Conforme pode ser observado, o TTPA dos animais do grupo de doentes renais crônicos, estadiamento 2 (DRC2), apresentou valores estatisticamente diferentes e maiores do que aqueles do grupo DRC4. Porém não houve diferenças entre os animais DRC2 e controle e DRC3, assim como, entre animais DRC4 e controle (GC) e DRC3.

Já, com relação ao TP e à concentração plasmática de fibrinogênio, os quatro grupos em questão não apresentaram diferenças significativas.

Com relação às plaquetas, os animais do grupo DRC2 evidenciaram maior número de plaquetas quando comparados aos animais dos demais grupos.

Por fim, para a variável sangue oculto fecal, todos os animais doentes renais crônicos, ou seja, DRC2, DRC3 e DRC4, apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais controle (GC). Além disso, animais dos grupos DRC2 e DRC3 apresentaram menor escore de sangue oculto fecal quando comparados àqueles do grupo DRC4.

A representação gráfica do teste t de comparação de medias para as variáveis nos diferentes estádios da doença renal crônica segundo a IRIS (2009) são apresentadas na Figura 4.

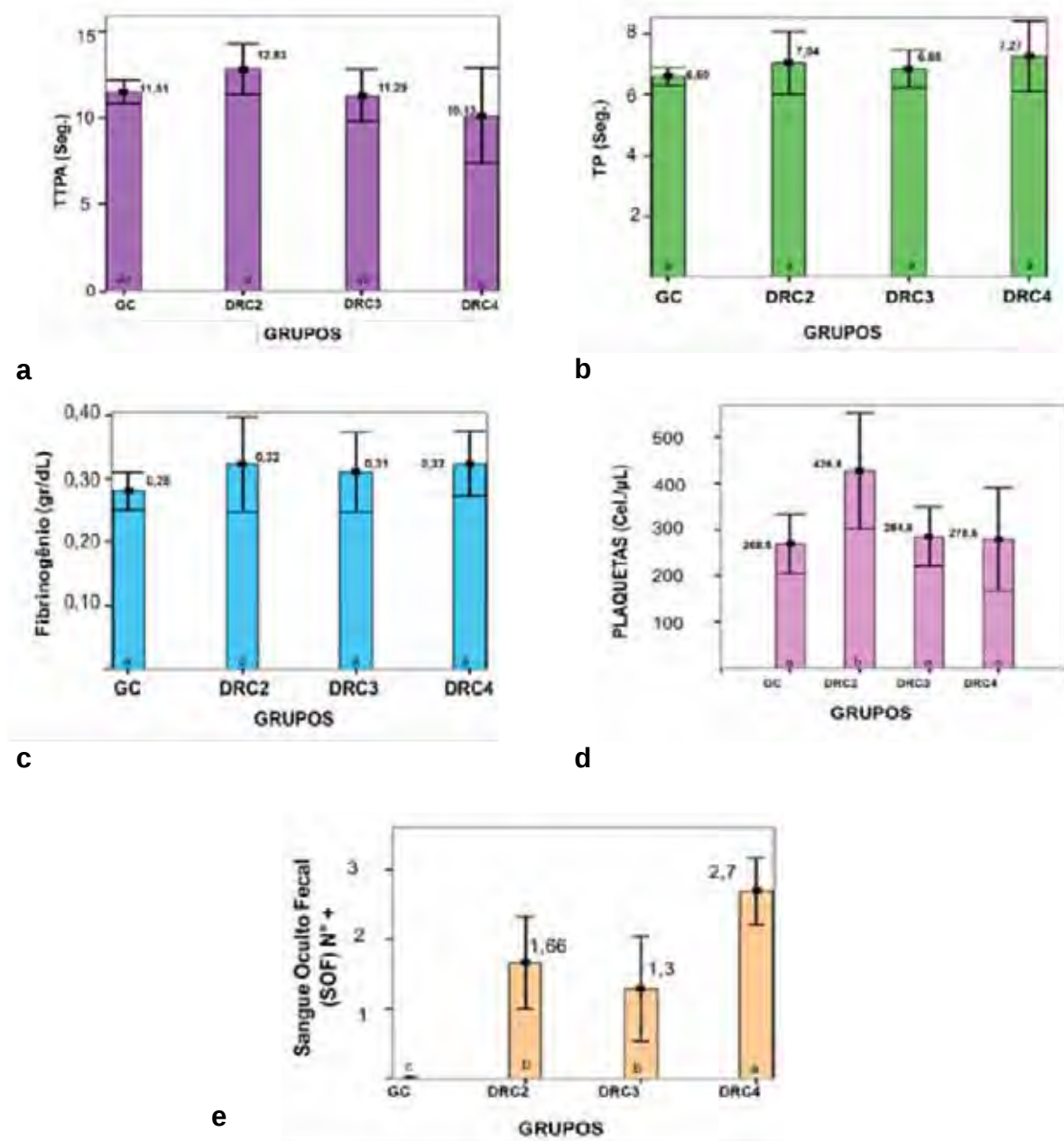


Figura 4. Representação gráfica do teste t de comparação de médias com um alfa de 5% para as variáveis nos diferentes estadiamentos da doença segundo a IRIS (2009). GC (grupos controle), DRC2 (Doente Renal Crônico estadiamento 2), DCR3 (Doente Renal Crônico estadiamento 3) e DRC4 (Doente Renal Crônico estadiamento 4). **a)** Tempo de Tromboplastina Parcial Activada, **b)** Tempo de Protrombina, **c)** Fibrinogênio e **d)** Plaquetas.

5.2 Estudo de Correlação

Os valores das correlações de Pearson junto com o teste de t são apresentados na tabela 6.

Tabela 5. Correlações de Pearson para as variáveis creatinina e ureia vs as diferentes variáveis avaliadas TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativada), TP (Tempo de protrombina), fibrinogênio plasmático e plaquetas nos grupos DRC2, DRC3 e DRC4.

DRC2				
	TTPA	TP	FIB.	PLAQ.
CREATININA	-0,046 ns	-0,168 ns	-0,45 ns	-0,085 Ns
UREIA	-0,586 *	0,076 ns	-0,102 ns	0,487 Ns
DRC3				
CREATININA	-0,146 ns	-0,457 ns	0,141 ns	-0,013 Ns
UREIA	-0,328 ns	-0,116 ns	0,217 ns	-0,198 Ns
DRC4				
CREATININA	0,321 ns	0,522 ns	-0,222 ns	-0,31 Ns
UREIA	0,566 *	0,497 ns	-0,423 ns	-0,649 **

Teste de t. ns (não significativo) = $p > 0.1$; * = $p < 0.1$; ** = $p < 0.05$; *** = $p < 0.01$

Nas figuras 4 e 5 representam-se graficamente as correlações da tabela 6 para o grupo DRC2. Na qual a creatinina não apresenta correlação estatisticamente significativa com as variáveis avaliadas TTPA, TP, Fibrinogênio plasmático e plaquetas. No caso da ureia somente apresentou uma correlação positiva com o TTPA ($p > 0,1$).

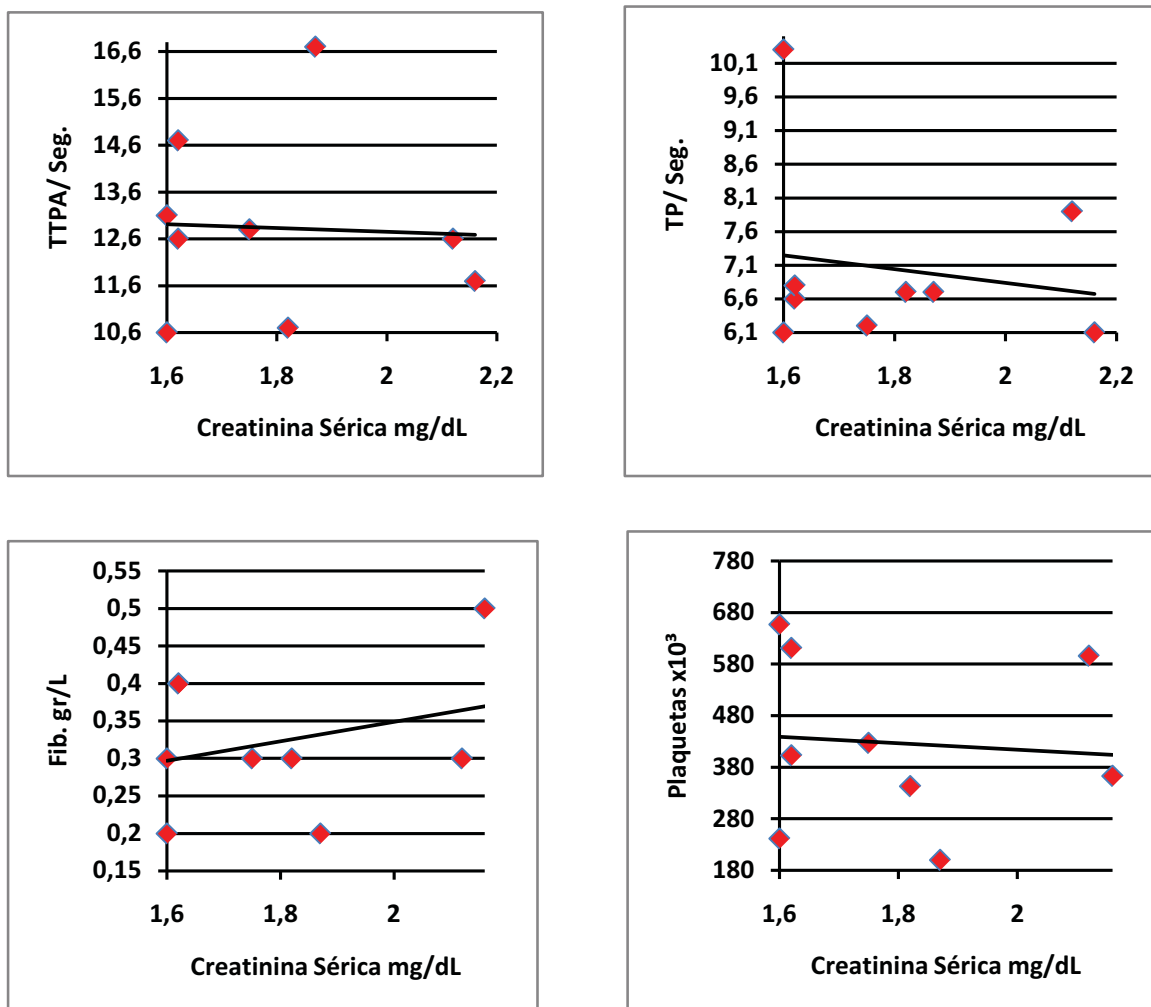


Figura 5. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC2 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.

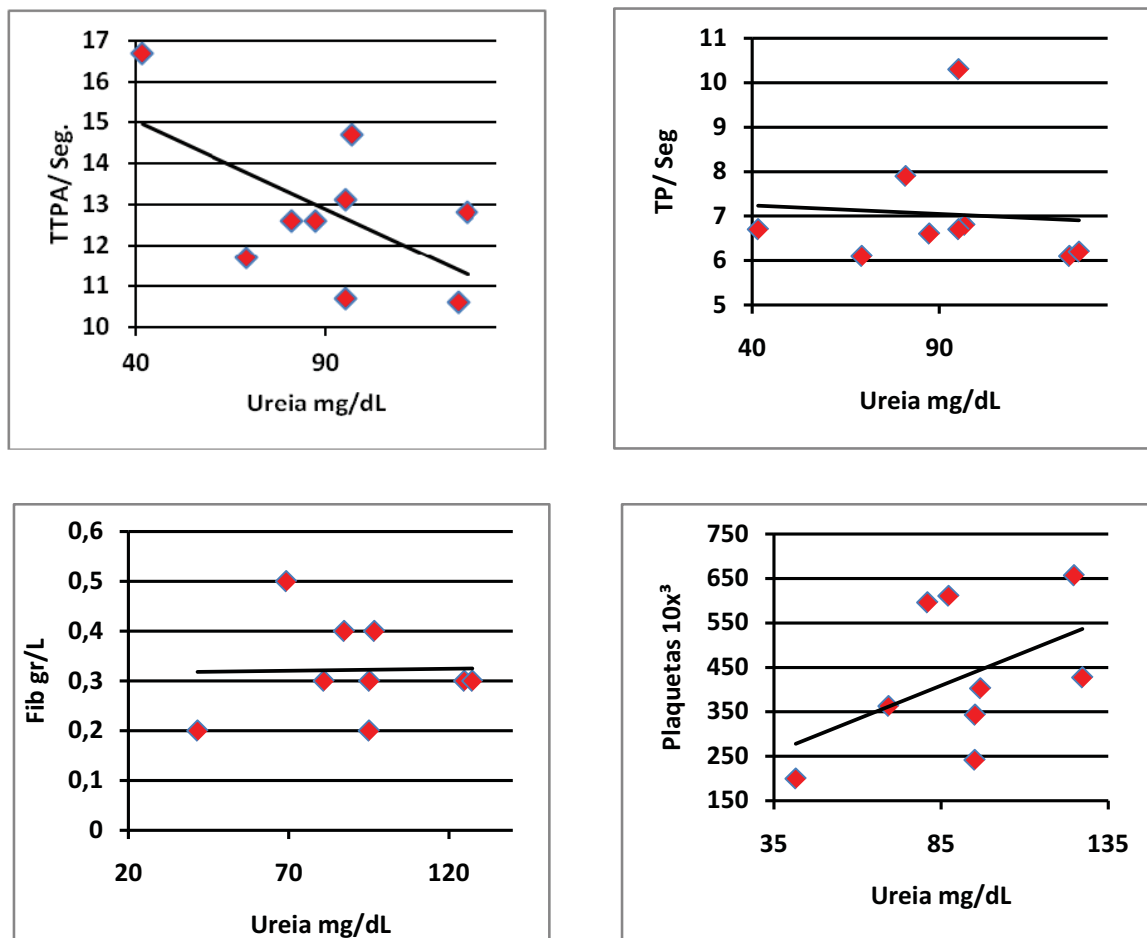


Figura 6. Representação gráfica das correlações da uréia sérica dos animais do grupo DRC2 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.

Nas figuras 6 e 7 representam-se graficamente as correlações da tabela 6 para o grupo DRC3. Na qual nem a creatinina nem a ureia apresentaram correlação estatisticamente significativa com as variáveis avaliadas TTPA, TP, Fibrinogênio plasmático e plaquetas.

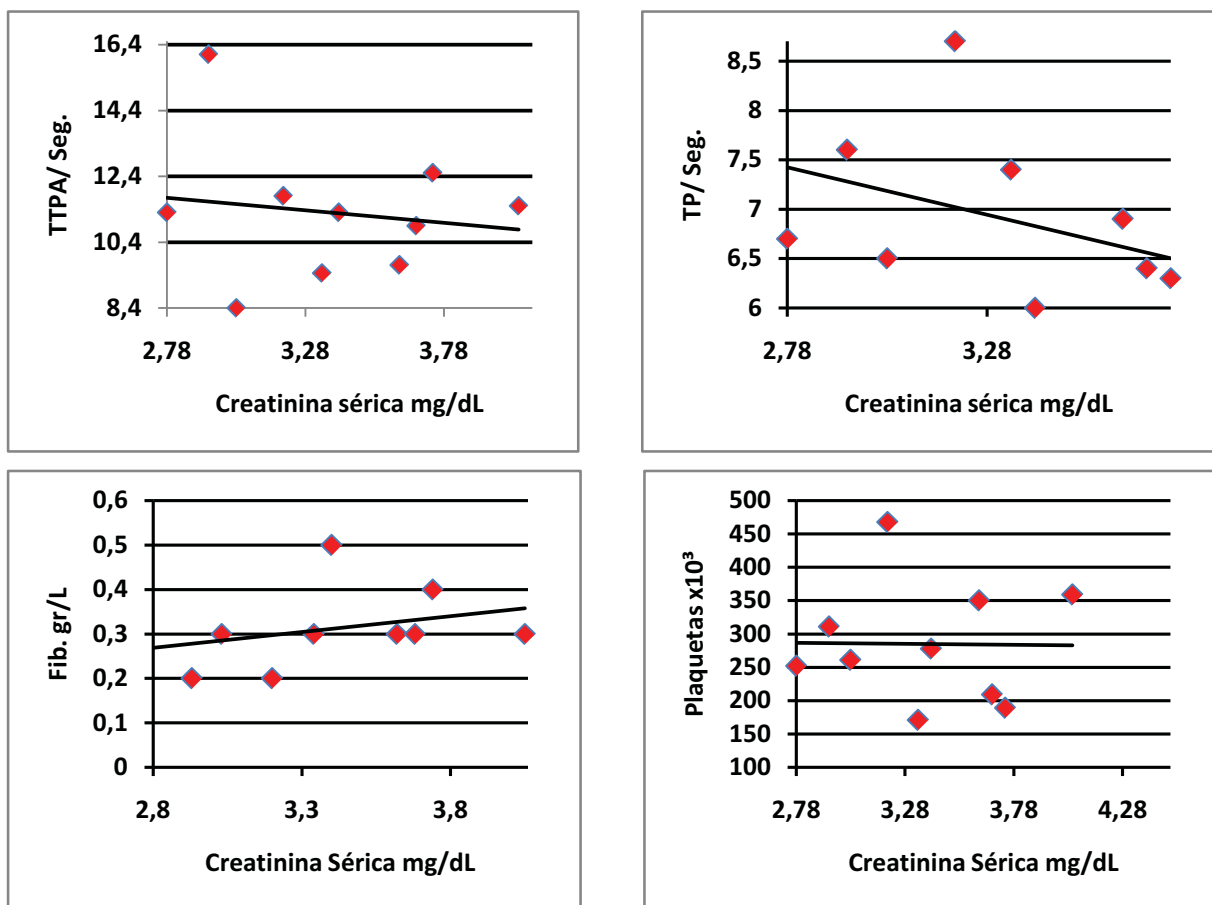


Figura 7. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC3 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.

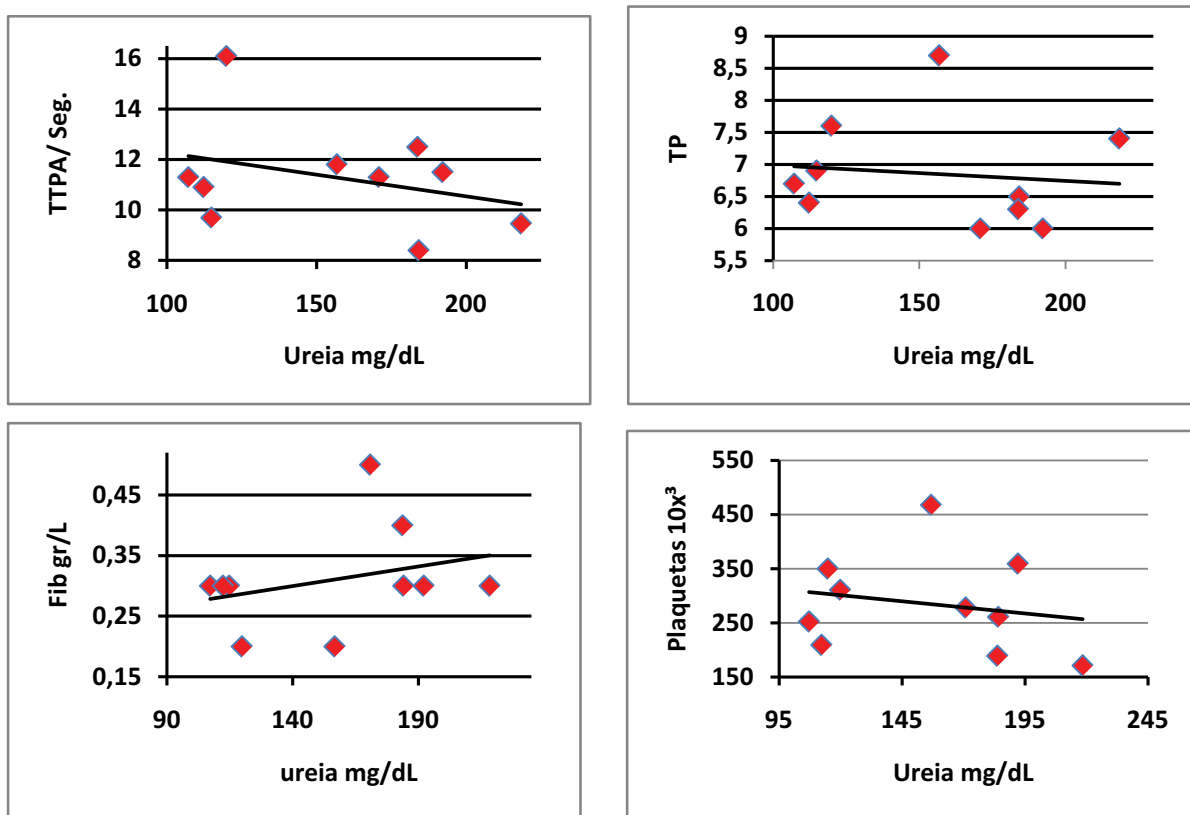


Figura 8. Representação gráfica das correlações da Uréia sérica dos animais do grupo DRC3 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas

Como descrito, os animais do grupo DRC3 não evidenciaram correlação significativa entre as variáveis estudadas.

Nas figuras 8 e 9 representam-se graficamente as correlações da tabela 6 para o grupo DRC4. Na qual a creatinina não apresentou correlação estatisticamente significativa com as variáveis avaliadas TTPA, TP, Fibrinogênio plasmático e plaquetas. No caso da ureia apresentou uma correlação positiva com o TTPA ($p > 0,1$) e com as plaquetas ($p < 0,05$).

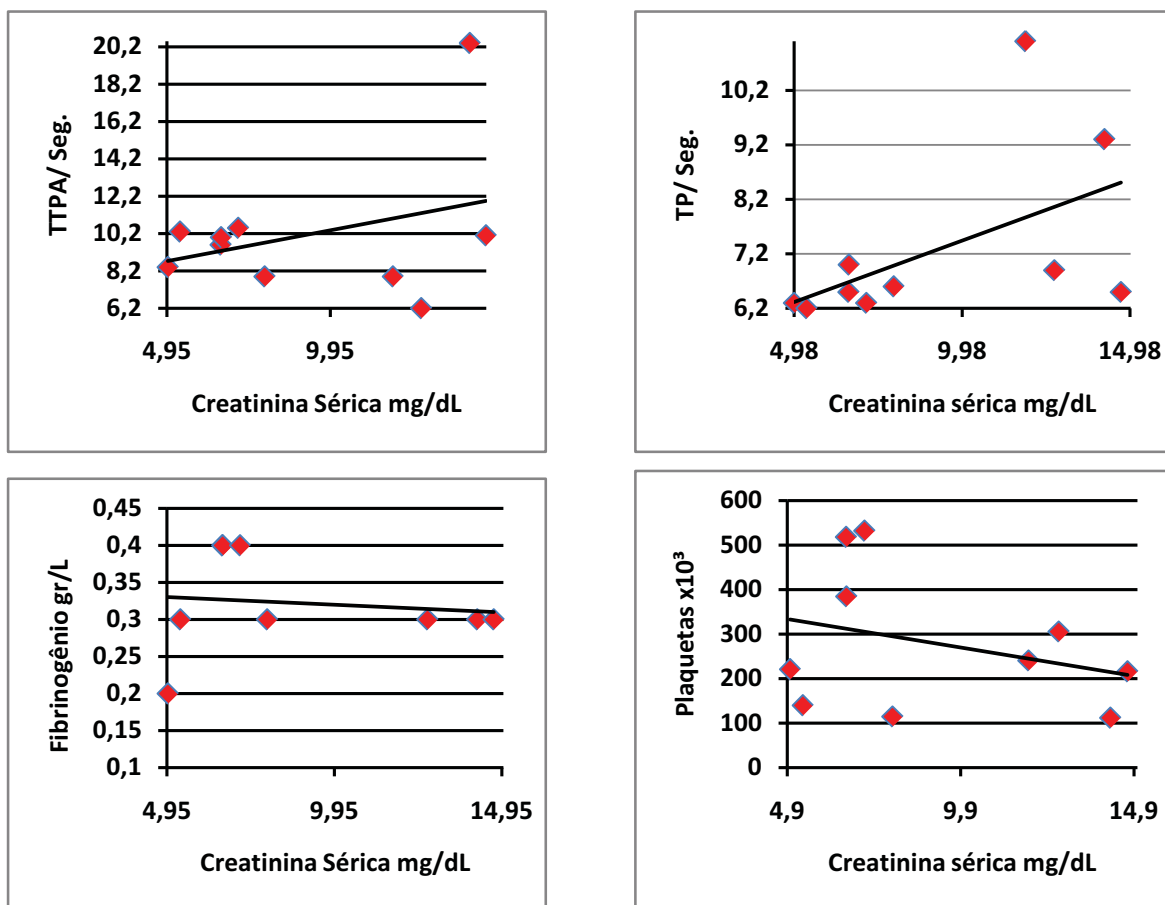


Figura 9. Representação gráfica das correlações da creatinina sérica dos animais do grupo DRC4 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.

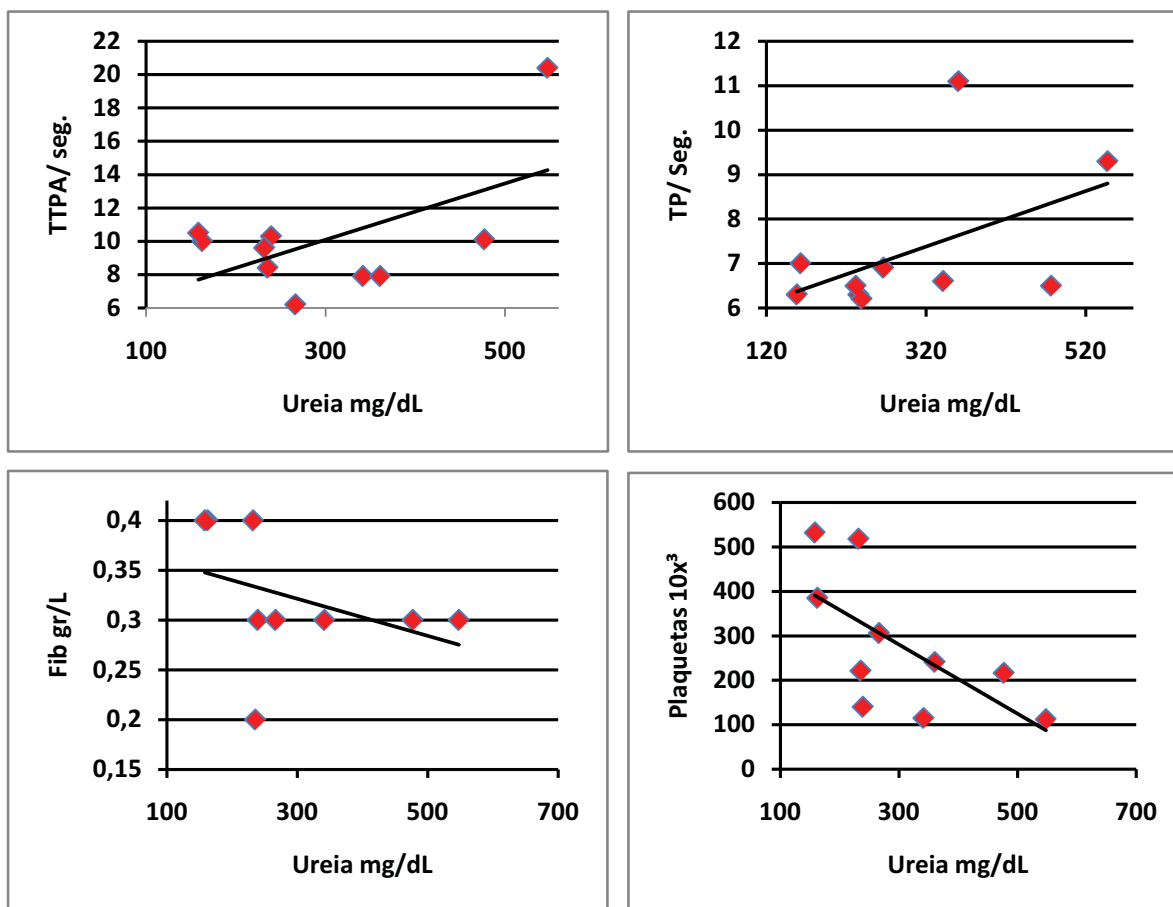


Figura 10. Representação gráfica das correlações da Ureia sérica dos animais do grupo DRC4 com TTPA, TP, fibrinogênio plasmático e plaquetas.

6 DISCUSSÃO

Os sinais clínicos secundários à alteração dos rins incluem manifestações extra-renais variáveis (Di BARTOLA, 2004), dentre elas as diáteses hemorrágicas, tais como equimoses, epistaxe, sangramento por mucosas, especialmente de trato gastrointestinal (TGI) entre outros, que caracterizam a uremia (VAISBICH et. al., 1995; POLZIN et al., 2004). Estas complicações parecem ser devidas a múltiplos fatores como: anormalidades na agregação, adesividade e liberação de plaquetas, consumo anormal de protrombina e geração anormal de tromboplastina (WILLOUGHBY & CROUCH, 1961).

Até o presente momento, o impacto da severidade da DRC nas características do sangue oculto fecal (SOF) é desconhecido. Devido a DRC poder estar associada ao sangramento gastrointestinal de lesões comuns da mucosa, pode ser sugerido que a avaliação do SOF seja um dado importante na determinação do prognóstico e até gradação desses pacientes. BINI et al. (2006), asseveraram que a presença de SOF aumenta conforme a gravidade da DRC, o que pode ser observado neste estudo, onde os animais do grupo DRC4 apresentaram reação mais forte para SOF. Esses achados suportam a indicação da determinação do SOF como teste de triagem em pacientes com DRC. Resultados assim são de grande importância clínica já que a incidência e prevalência da DRC em cães, bem com a progressão dos estágios mais avançados estão aumentando.

Como o teste de SOF possui algumas limitações, elas devem ser consideradas no momento da interpretação de seus achados, por exemplo, o sangramento gastrointestinal pode estar relacionado a alterações paralelas à DRC como a presença de parasitas intestinais, de neoplasias gastrointestinais e da dieta do paciente, entre outras. Tem sido postulado que o aumento da incidência de hemorragia gastrointestinal é um reflexo da hemostasia insuficiente no cenário de anormalidades da mucosa do trato gastrointestinal e da hipergastrinemia (AVTAR et al., 2006). Como referido,

pacientes com DRC podem apresentar diminuição da função das plaquetas, apesar de numericamente normais, que pode estar correlacionada a presença de quantidades insuficientes do complexo fator VIII-FvW na circulação.

Para a classificação das parcelas experimentais foi feita uma avaliação da presença de sangue oculto fecal, o qual foi o principal sintoma indicativo do comprometimento da hemostasia e que foi evidenciado em todos os grupos de doentes renais DRC2, DRC3 e DRC4, revelando, de tal forma, um quadro de hemorragia conhecida como gastropatia urêmica no qual estão presentes os distúrbios de coagulação.

A etiologia da alteração hemostática é complexa, e diferentes mecanismos têm sido propostos como causa do sangramento urêmico (JURK & KEHREL, 2007; SHEN & FRENKEL, 2007; GALBUSERA et al., 2009). Neste senso, a uremia é reconhecida como uma causa de disfunção plaquetária em animais e seres humanos. Várias moléculas, em diferentes vias estão envolvidas nos defeitos de adesão, agregação e secreção plaquetária (FRY, 2010).

Neste trabalho além da avaliação da integridade dos fatores de coagulação mediante os testes de Fibrinogênio plasmático, TTPA e TP, também foi realizada a plaquetometria. O TTPA dos animais do grupo de doentes renais crônicos, estadiamento 2 (DRC2), apresentou valores estatisticamente diferentes do que aqueles do grupo DRC4, podendo estar relacionado com o começo da doença no estágio DRC2 o qual apresentou valores mais altos e, possivelmente, um estado menos comprometido do paciente, com uma resposta mais forte; muito pelo contrário no grupo DRC4 no qual existe maior comprometimento do estado do paciente com outras alterações além da doença renal tais como hipertensão, as quais aumentam o risco de hemorragia. Mesmo o paciente apresente um número de plaquetas normal, como foi visto neste trabalho, no caso do estágio 4, a via intrínseca da coagulação e a interação com a parede do vaso se encontram mais prejudicadas no caso desses pacientes, em grande parte devido ao aumento de substâncias como a ureia, retenção de solutos como creatinina, ácidos fenólicos e metilguanidina. Apresentação de defeitos em todas as fases da função

plaquetária tem sido descritos (SUE & BETHAM, 2011). VOLL (2011), constataram que em 40 cães com DRC, os resultados de TTPa acima dos valores de referência foram observados em 15% (6/40) dos animais azotêmicos não classificados. BRASSARD et al. (1994) relatam que o prolongamento no tempo de sangramento observado em cães azotêmicos com contagem de plaquetas e testes de agregação normais sustenta a presença de uma disfunção plaquetária adquirida associada a interferências sobre a excreção renal mais, não foram feitos teste de avaliação de hemostasia secundária para descartar a presença duma deficiência nos fatores de coagulação.

Os resultados obtidos neste ensaio não revelaram diferenças significativas entre o grupo de animais doentes e o grupo controle no teste de TTPA, indicando que a hemorragia presente (verificada pelo teste de sangue oculto nas fezes), não era devido a distúrbios na hemostasia secundária e inerentes às vias intrínseca e comum as quais são avaliadas pelo referido teste. Desta mesma forma, na avaliação do TP, os animais do grupo controle, DRC2, DRC3 e DRC4, não apresentaram valores estatisticamente diferentes, mostrando que a presença da hemorragia evidenciada no teste de SOF, também não era devida a distúrbios nas vias extrínseca e comum da hemostasia secundária, comunmente aferidas pelo TP.

Os testes laboratoriais para avaliar os fatores plasmáticos da coagulação são considerados apropriados para predizer o sangramento clínico em pacientes com distúrbios coagulativos (STEINER et al. 1979). BRASSARD et al. (1994) induziram insuficiência renal em cães e verificaram a ocorrência de resultados normais nos testes de coagulação (TP e TTPA), semelhantemente aos achados deste ensaio, além de provas de agregação e contagem plaquetária também dentro da normalidade, similarmente ao que tem sido visto em pacientes humanos urêmicos e compatível com a presença de uma disfunção plaquetária adquirida associada a interferências sobre excreção renal. O prolongamento do tempo de protrombina, asseverado por outros autores (LEWIS 1956; RATH et. al., 1957), tem se revelado inconsistente.

Em nenhum dos grupos encontrou-se valores de plaquetas diminuídos, muito pelo contrario, foram observados valores aumentados de plaquetas.Os achados deste

ensaio discordam dos de NICODEMO et al. (1990) que descreveram a presença de trombocitopenia leve na uremia. Segundo PACE (2010) habitualmente a contagem global de plaquetas, avaliação dos tempos de protrombina e da tromboplastina parcial ativada se encontram dentro dos valores normais nos pacientes com DRC e as diáteses hemorrágicas são decorrentes de disfunção plaquetária, com diminuição na produção do fator 3 de adesividade plaquetária e uma alteração na interação das plaquetas com o endotélio dos vasos, concordando com FRY (2010), que descreve que a uremia é reconhecida como uma causa de disfunção plaquetária em animais e humanos.

Quanto ao fibrinogênio plasmático, estudos precedentes tem revelado que a hiperfibrinogenemia é frequentemente observada em pacientes com doença renal crônica, associada com enfermidade cardiovascular, cujo mecanismo ainda é desconhecido (BERTHIL et al., 2003). Neste trabalho não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas de valores de fibrinogênio plasmático, entre os animais de diferentes grupos experimentais. Contrariamente, segundo HONG (1993) a taxa de fibrinogênio não somente não esta aumentada, mas frequentemente diminuída na uremia .

Nos pacientes com doença renal crônica, a correlação dos achados laboratoriais é muito importante no momento do diagnostico e prognostico da DRC, já que os resultados podem indicar qual é o melhor tratamento ou procedimento em cada caso. A análise de correlação é um indicador que atende à necessidade de se estabelecer a existência ou não de uma relação entre variáveis. Para a analise de correlação foram utilizadas a creatinina e a ureia séricas para a comparação com as demais variáveis. Nessa análise nenhum dos grupos apresentou correlação entre a creatinina e número de plaquetas, concentração de fibrinogênio, tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada.

No caso da ureia, o estudo de correlação evidenciou que no grupo DRC 2 existe correlação negativa entre ureia e TTPA; não existindo uma correlação para as demais

variáveis em questão. Para o grupo DRC 3, não ficou evidenciada correlação entre a ureia e as diferentes variáveis e, para o grupo DRC 4, evidenciou-se uma correlação positiva entre a ureia e as plaquetas; ou seja que as variáveis crescem no mesmo sentido. Em um estudo envolvendo oito cães com lesão renal induzida, BRASSARD et al. (1994) encontraram uma correlação positiva entre o tempo de sangramento e taxa de ureia sanguínea e afirmaram que a tendência ao sangramento associada à uremia não pode ser atribuída a deficiências no FvW, visto que níveis sanguíneos elevados deste fator tem sido observados em pacientes humanos com doença renal (ZWAGINGA et al. 1990). A adesão ineficaz ao subendotélio decorre da expressão reduzida de receptores Gp1b e de uma afinidade reduzida para o fator de Von Willebrand (vWf).

A etiologia multifatorial do sangramento urêmico e as possíveis associações para o diagnóstico e o prognóstico, entre o sangramento, exames de fácil acesso como o hemograma, análises quantitativas séricas de creatinina e ureia, relações entre indicadores laboratoriais associados à azotemia e a presença de alterações hemostáticas em cães naturalmente afetados (VOLL, 2011), incentivaram à necessidade de confirmar ou excluir uma diátese hemorrágica causada pela DRC em cães, a qual representa uma situação pouco comum na prática clínica veterinária, mas, pelo fato de se dificultar o diagnóstico e das complicações que implica a perda de sangue é preciso a otimização da avaliação clínico laboratorial que dependerá, fundamentalmente, de uma história clínica bem conduzida, do exame físico dirigido para a procura de sinais indicativos de distúrbios da hemostasia, e da solicitação e interpretação corretas dos exames utilizados na avaliação laboratorial do sistema hemostático.

Neste trabalho, foi evidenciada a presença unicamente de SOF e, embora não tenham sido observadas outras alterações hemostáticas, cabe ressaltar que nem sempre o encontro de SOF num paciente com doença renal crônica, significa que a doença renal seja responsável pelo referido comprometimento da hemostasia. Mesmo não sendo um teste de rotina na prática veterinária, a mensuração da antitrombina III no

plasma de pacientes com DRC pode ser importante para a determinação de estados de hipercoagulabilidade em tais pacientes, já que se trata de uma proteína de baixo peso molecular e que a perda urinária pode acontecer facilmente. Alias, até o presente momento o impacto da positividade de sangue oculto nas fezes com relação à gravidade da DRC é ainda desconhecido, devido a que pode estar associado ao sangramento gastrointestinal com lesões clinicamente importantes de cólon, e sem relação direta com estágios mais graves da doença renal. Consequentemente, mesmo que o sangramento gastrointestinal superior seja uma das consequências da doença renal crônica, como tem sido descrito, há possibilidades outras do sangramento ser o resultado de doenças independentes.

Enfim, as alterações no TTPA, TP e fibrinogênio plasmático, não foram significativas, semelhante ao observado nos resultados de FRY 2010 e VOLL 2011, que descreveram animais com diátese hemorrágica sem alterações significativas nesses tempos.

7. CONCLUSÕES

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que os valores de TTPa, TP, fibrinogênio plasmático e numero de plaquetas em pacientes com doença renal crônica segundo a IRIS (2009), DRC2, DRC3 e DRC4 encontram-se dentro dos valores normais.

Se conclui que não existe correlação significativa entre a creatinina serica e os tempos de tromboplastina parcial ativada e de protrombina, concentração de fibrinogênio nem com a contagem global de plaquetas. Os supracitados testes não poderam ser utilizados como predictivos de sangramento em cães azotemicos. Mesmo tenham se apresentado correlações estatisticamente significativas entre a ureia e o TTPA do DRC2 e do DRC4, não foram o suficientemente fortes para concluir que realmente esteja influenciada uma variável com a outra.

Não existiu correlação significativa entre a ureia e os tempos de tromboplastina parcial ativada e de protrombina e concentração de fibrinogênio. Encontrou-se uma correlação estatisticamente significativa, com um valor maior, expressando uma correlação mais forte, embora não tenham sido feitos testes do tempo de sangramento, sugeriu-se nos próximos estudos, a avaliação laboratorial da hemostasia primaria completa, junto com um estudo morfofuncional e de agregação plaquetaria.

Por meio deste estudo experimental, conclui-se que a diátese hemorrágica que se apresenta em pacientes caninos com doença renal crônica, não se encontra relacionada com alterações na hemostasia secundaria avaliada com os testes de TTPA, TP e fibrinogênio plasmático nem com alterações na contagem global de plaquetas.

8. REFERÊNCIAS

- AULT, K. A. Flow cytometry measurement of platelet function and reticulated platelets. **Annals new york academy of sciences**, New York, v. 20, n. 677, p. 293-308, 1993.
- AVTAR, S. et al. Uremic bleeding: Pathophysiology and clinical risk factors. **Thrombosis research**, Hamilton, v. 118, n. 3, p. 417-422, 2006
- BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 14, p. 170-187.
- BANKS, W. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992. p. 200-213.
- BERTHIL, H. C. et al. Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure. **Kidney International**, California, v. 64, n. 4, p. 1495–1504, 2003.
- BINI, E. J.; KINKHABWALA, A.; GOLDFARB, D. S. Predictive value of a positive fecal occult blood test increases as the severity of ckd worsens. **American journal of kidney diseases**, New York, v. 48, n. 4, p. 580-586, 2006.
- BOZZINI, C. E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY, A. B.; CIRIGOLANI, H. E. **Fisiologia humana de houssay**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 9.
- BRASSARD, J. A. et al. Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model of uremic bleeding. **Journal of laboratory and clinical medicine**, New York, v. 124, n.1, p. 48-54, 1994.
- BUSH, B. M. Nutrientes e metabólitos. In: _____. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 167-223.

CASES, A.; ESCOLAR, G. Diátesis hemorrágica en la uremia. **Nefrologia**, Barcelona, v. 18, n. 4, p. 270- 277, 1998.

CASONATO, A. et al. Plasma and platelet von Willebrand factor abnormalities in patients with uremia: lack of correlation with uremic bleeding. **Clinical application thrombosis and hemostasis**, Massachusetts, v. 7, n. 2, p. 81-86, 2001.

COTRAN, R. S.; MITCHEL, R. N. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: COTRAN, R. S. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 4, p.126-150.

COUTO, C. G. Clinical approach to the bleeding dog or cat. **Veterinary medicine**, Tucson, v. 94, p. 450-459, 1999.

DI BARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.) **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 167, p. 1686-1701.

DI MINNO, G. et al. Platelet dysfunction uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. **The american journal of medicine**, New York, v. 7, n. 5, p. 552-559, 1985.

FINCO, D. R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Willians e Wilkins. 1995. p. 29-46.

FRY M. M. Acquired platelet dysfunction. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.) **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. New York: Willey-Blackwell, 2010. p. 626-631.

GALBUSERA, M.; REMUZZI, G.; BOCCARDO, P. Treatment of bleeding in dialysis patients. **Sem Dialysis**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 279-286, 2009.

GARCIA N. **Manual de hematologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Varela 2005. p. 109-124.

GOPEGUI, R. R.; FELDMAN, B. F. Coagulopatias e trombose. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. v. 2, cap. 180, p. 1927-1941.

GOPEGUI, R. R.; FELDMAN, B. F. Plaquetas e doença de von Willebrand. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. v. 2, cap. 179, p. 1915-1927.

GOUAULT M. **Manual de hemóstase**. Fortaleza, UFC, 2001. Cap. 1, pag. 13-20.

GRALNICK, H. P.; McKEOWN, L.P.; WILLIAMS, S. B. Plasma and platelet von Willebrand's factor defects in uremia. **The american journal of medicine**, New York, v. 85, n. 6, p. 806-810, 1988

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria e treatment. **Journal of small animal practice**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 469-478, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e coagulação sangüínea. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 36, p. 394-404.

HARVEY, M. D. et al. Plasma and platelet von Willebrand factor defects in uremia. **The american journal of medicine**, New York, v. 85, n. 6; p. 806-810,1988.

HONG SY, YANG D. H: Fibrinolytic activity in end-stage renal disease, **Nephron**, Basel, v. 63, n. 2, p. 188-192, 1993.

HONÓRIO J.; PINHEIRO M. Analise dos métodos na pesquisa de sangue oculto nas fezes. **Revista brasileira de coloproctologia**, São Paulo, v. 28, n. 4, p 425-430, 2008.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (RIS) - **Staging system for chronic kidney disease** (CKD), 2009. Disponível em <[http:// www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)>. Acessado em: 10 jul 2011.

JAIN, N. C. Coagulation and its disorders. In: _____. **Essentials of veterinary hematology**. 1.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 82-104.

JONES, T. C.; HUNT, R. D. ; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1997.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. **Biologia celular e Molecular**. Rio de Janeiro: 5 ed. Cap. 3. 1991, p. 301-316,

JURK, K.; KEHREL, B. E. Inherited and acquired disorders of platelet function. **Transfusion medicine and hemotherapy**, Berlim, v. 34, n. 1, p. 6-19, 2007.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003, p. 45-47.

LARRAIN, C.; ADELSON, E. The hemostatic defect of uremia. I. Clinical investigation of three patients with acute post-traumatic renal insufficiency. **Blood**, Boston, v. 11, n. 12, p. 1059-1066, 1956.

LEWIS J.; ZUCKER M.; FERGUSON J. Bleeding tendency in uremia. **Blood**, Boston, v. 11, p. 1073-1076, 1956.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, Harvard, v. 105, n. 9, p. 1135–1143, 2002.

MACCONI, D. et al. Defective platelet aggregation in response to platelet-activating factor in uremia associated with low platelet thromboxane A2 generation. **American journal of kidney diseases**, New York, v. 19, n. 4, p. 318-325, 1992.

McCONNEL, M. F. Overview of haemostasis. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. (Ed). **Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. Montreal: Compendium, 2000. cap. 9, p. 165-171.

MCVEY, J. H. Tissue factor pathway. **Bailliere's clinical haematology**, London, v. 7, n. 3, p. 469-484, 1994.

MEZZANO, D. et al. Hemostatic disorder of uremia: The platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. **Thrombosis and haemostasis**, New York, v. 76, n. 3, p. 312-321, 1996.

MOLINO, D; De LUCIA, D; GASPARE DE SANTO, N. Coagulation disorders in uremia. **Seminars nephrology**, New York, v. 26, n. 1, p. 46-51, 2006.

MORITZ, A.; WALCHECK, B.K.; WEISS, D.J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Veterinary clinical pathology**, Santa Barbara, v. 32, n. 1, p. 6-12, 2003.

NICODEMO, C.; DEL NEGRO, G.; NETO, V. A. Thrombocytopenia and leptospirosis. **Instituto de medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 252-259. 1990.

OTS, M.; PECHTER, U.; TAMM, A. Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam. v. 297, n. 1-2, p. 29-41, 2000.

PACE LASMAR E. **Cirurgia no paciente urêmico**. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med6/euler.htm>. Acesso em: 15 jul. 2010.

POLZIN, D. et. al. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.) **Tratado de medicina interna veterinária, doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 169, p. 1721-1751.

PRESSLER. B. M.; VADEN, S. L. Managing renal amyloidosis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v. 98, n. 4, p.320-333, 2003.

RATH, C. E.; MAILLARD, J. A.; SCHEREINER, G. E. Bleeding tendency in uremia. **New England Journal of medicine**, Massachusetts, v. 257, p. 808-810, 1957.

RAVID, M. et al. I. Prolonged dimethylsulphoxide treatment in 13 patients with systemic amyloidosis. **Annals of the rheumatic diseases**, London, v. 41, p. 587-592, 1982.

REBELINK, T. J. et al. Thrombosis and hemostasis in renal disease. **Kidney international**, New York, v. 46, p. 287-296, 1994.

REMUZZI, G. Bleeding in renal failure. **Lancet**, London, v.1, n. 8596, p. 1205-1208, 1988

RIESMAN, D. Hemorrhages in the course of Bright's disease with special reference to the occurrence of a hemorrhagic datehis of nephritie origin. **American journal of the medicine science**, Philadelphia, v. 134, p. 709- 712, 1907.

SAGRIPANTI, A. et al. Plasma parameters of the prothrombotic state in chronic uremia. **Nephron**, Basel, v. 63, n. 3, p. 273-278, 1993.

SHEN, Y.; FRENKEL E. Acquired platelet dysfunction. **Hematology/Oncology Clinics of North American**, New York, v. 21, n. 4, p. 647-661, 2007.

SMITH, J. W.; DAY, T. K.; MACKIN, A. **Diagnosing bleeding disorders**. Disponivel em: <<http://www.futurevows.com/doc/AdvancedMedicine/Diagnosing%20Bleeding%20Disorders.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2011

SMITH, S. A. Overview of hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. New York: Willey-Blackwell, 2010. cap. 84, p. 635-653.

STEINER, R. W.; COGGINS, C.; CARVALHO, A. C. Bleeding time in uremia: a useful test to assess clinical bleeding. **American journal of hematology**, New York, v. 7, n. 2, p. 107-117, 1979

STOCKHAM, S.T.; SCOTT, M.A. Hemostasia. In: _____. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011. p. 213-262.

SUE, P.; BETHAN, M. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. **Blood Reviews**, Malden UK, v. 25, n. 6, p. 271–278, 2011.

THEKKEDATH U. et al. Elevated fibrinogen fragment levels in uremic plasma inhibit platelet function and expression of glycoprotein IIb-IIIa. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 12, p. 915–926, 2006.

TROY, G. C. An overview of hemostasis. **Veterinary clinics of North america small animal practice**, Texas, v. 18, n. 1, p. 5-20, 1988.

TSENG, L. W. et al. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 62, n. 9, p. 1455-1460, 2001.

VAISBICH, M. H. et al. Sangramento gastrointestinal baixo em uremia. **Journal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 237-239 237, 1995.

VERRASTRO, T. Hemostasia. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

VLACOYANNIS, J.; SCHOEPE, W. Adenyl cyclase activity and cAMP content of human platelets in uraemia. **European journal of clinical Investigation**, Hamburgo, v. 12, n. 5, p. 379—381, 1982.

VOLL COSTA, V. F. **Transtornos da hemostasia em cães azotêmicos. Programa de pós-graduação em ciências veterinárias**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WARE, W. A. Manifestações clínicas das doenças do trato urinário. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. (Ed.) Medicina interna de pequenos animais. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap.41, p. 547-561.

WARE, J. A. et. al. Abnormalities of cytoplasmic Ca in platelets from patients with uremia. **Blood**, Boston, v. 73, n. 1, p. 172—176, 1989.

WILLOUGHBY, M.; CROUCH S. An investigation of the haemorrhagic tendency in renal failure. **British ournal of haematology**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. 312-315, 1961

ZUCKER, M. B. Platelet function. In: WILLIAMS, J. W et al. **Hematology**, 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1994. p.1176-1184.

ZWAGINGA, J. J. et al. High von Willebrand factor concentration compensates a relative adhesion defect in uremic blood. **Blood**, Boston, v. 75, n. 7, p. 1498-1508, 1990.