

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**APLICAÇÃO DA TROMBOELASTOMETRIA NA AVALIAÇÃO
HEMOSTÁTICA EM FRANGOS DE CORTE**

CAMILA MARTOS THOMAZINI

Botucatu – SP

Dezembro 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

APLICAÇÃO DA TROMBOELASTOMETRIA NA AVALIAÇÃO
HEMOSTÁTICA EM FRANGOS DE CORTE

CAMILA MARTOS THOMAZINI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós - graduação em Medicina Veterinária como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof^a Adj^a Regina Kiomi Takahira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Thomazini, Camila Martos.

Aplicação da tromboelastometria na avaliação hemostática em frangos de corte / Camila Martos Thomazini. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50503030

1. Tromboelastografia. 2. Hemostase. 3. Frango de corte. 4. Viscoelasticidade. 5. Sangue - Coagulação.

Palavras-chave: Aves; Coagulação; Tromboelastografia; Viscoelasticidade sanguínea.

Nome: Camila Martos Thomazini

Título: **Aplicação da tromboelastometria na avaliação hemostática em frangos de corte**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ- Unesp- Botucatu

Profª Drª Izolete Aparecida T Santos
Membro
Hemocentro
HC FMB – Unesp – Botucatu

Prof. Dr. Benedito Carlos Prezoto
Membro
Divisão de Desenvolvimento Científico - Laboratório de Farmacologia
Instituto Butantan

Data de defesa: 10 de dezembro de 2012.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de certa forma tenham contribuído para o desenvolvimento deste projeto, desde a elaboração passando pelo desenvolvimento até a sua finalização. A concretização desse projeto é fruto de diferentes parcerias, profissionais e afetivas, das quais recebi ajuda suficiente para a realização desse mestrado.

Agradeço toda a formação que recebi e todo o suporte vindo desta instituição de ensino, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp campus de Botucatu.

Ao curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária desta faculdade pela oportunidade de realizar este curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo subsídio financeiro por meio do Auxílio à Pesquisa (2011/12972-1) e bolsa de Mestrado (2011/16792-8).

Agradeço a minha formação familiar que me estruturou desde cedo a seguir o meu caminho: minha querida família (in memoria) que tanto amo e que continuam a me motivar! Aos meus familiares que me deram o suporte necessário para eu chegar até aqui. E ao meu namorado que caminha ao meu lado me incentivando.

Aos docentes desta faculdade que tanto colaboraram para a realização deste projeto, em especial ao Prof. Dr. José Roberto Sartori que concebeu o uso das câmaras para alojar os animais, o seu laboratório para que pudesse analisar as amostras além da equipe do aviário para me dar o auxílio necessário.

Aos companheiros de trabalho Thays de Campos Trentin, Guilherme Maino de Azevedo e Thaísa Cândido que me auxiliaram na realização prática do experimento.

Aos docentes do Laboratório Clínico Veterinário em especial a Prof^a. Dr^a. Elizabeth M. Dos Santos Schmidt por todo auxílio e colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

À minha orientadora que prestou sua colaboração e seu conhecimento para me encaminhar na área da patologia clínica veterinária.

Aos residentes e pós –graduandos do Laboratório Clínico Veterinário pela convivência durante este período.

Aos técnicos do Laboratório Clínico Veterinário e aos funcionários desta Faculdade que estavam dispostos a contribuir e que muito me ajudaram.

Agradeço todas as oportunidades conquistadas e todas as conversas e conhecimento trocados ao longo de todos esses anos nesta instituição. Também sou muito grata por conhecer pessoas incríveis que levarei para sempre em meu coração!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Hemostasia	4
2.2 Testes diagnósticos	10
3. TRABALHOS CIENTÍFICOS	13
Artigo 1	14
Artigo 2	22
4. DISCUSSÃO GERAL	32
5. CONCLUSÕES GERAIS	33
6 .BIBLIOGRAFIAS	33

THOMAZINI, C.M.; “Aplicação da tromboelastometria na avaliação hemostática em frangos de corte” - Botucatu/SP (2012), Mestrado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

A hemostasia é um mecanismo de equilíbrio delicado que depende de diversas interações de componentes interdependentes. A medicina de aves e o interesse nos estudos fisiopatológicos desses animais vem aumentando nos últimos anos, porém de forma lenta. A rotina laboratorial ainda é uma dificuldade para o avanço do conhecimento e do diagnóstico de doenças nas aves, em especial na análise da hemostasia, uma vez que testes de coagulação utilizados para mamíferos, nem sempre podem ser usados nesses animais. Este presente estudo utilizou a tromboelastometria para avaliar as características viscoelásticas do sangue de frangos de corte, ativado por diferentes agonistas como as tromboplastinas homóloga e heteróloga para a via extrínseca, que também foram comparadas em diferentes temperaturas (37 e a 40°C). A tromboelastometria demonstrou ser uma metodologia eficiente em detectar as alterações viscoelásticas do sangue que sofreu a influência de temperaturas e de especificidade de agonistas. Avanços na utilização de métodos laboratoriais devem ser incentivados na rotina da patologia clínica veterinária, porque dessa forma poderemos melhor compreender os mecanismos do equilíbrio e desequilíbrio da coagulação e assim progredir no diagnóstico de distúrbios que acometem as aves.

THOMAZINI, C.M.; “Application of thromboelastometry in poultry hemostasis evaluation” - Botucatu/SP (2012), Mestrado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ABSTRACT

Hemostasis depends on a delicate balanced mechanism of several interactions between components of blood that are interdependent. The avian medicine and the interest in pathophysiological studies of these animals have increased, but slowly. Routine laboratory is still a difficulty in advancing diagnosis of diseases in birds. Tests for coagulation analysis used in mammals, can't always be used in these patients. This study used thromboelastometry to evaluate viscoelastic properties of poultry blood, that was activated with different agonists to extrinsic pathway activator, as homologous and heterologous thromboplastins, and also different temperatures were compared (37 and 40°C). The thromboelastometry is an efficient method to detect changes in blood viscoelasticity that was influenced by temperature and specificity of agonists. Advances in the use of laboratory methods should be encouraged in the routine of veterinary clinical pathology, because in that way, we better understand the mechanisms of balance and imbalance of coagulation and thus progress in diagnosis of diseases that affect these animals.

1. INTRODUÇÃO

A hemostasia é um mecanismo fundamental para manter o fluxo sanguíneo em equilíbrio fisiológico em todos os vertebrados, controlando a fluidez do sangue e o reparo tecidual localizado ao microambiente da lesão vascular. Este mecanismo envolve complexas interações entre os componentes do sangue como o endotélio vascular, os trombócitos, as células brancas como os monócitos predominantemente, e as proteínas plasmáticas como os fatores de coagulação, inibidores e substâncias fibrinolíticas (*Harr, 2010; Oldenburg et al., 2008; Powers, 2000*). Alterações que ocorram nesse equilíbrio fisiológico vascular podem causar disfunções que levam a quadros hemorrágicos e/ou trombóticos (*Gentry, 2004; Stockham e Scott, 2008*).

No entanto, a medicina aviária cresce com o interesse nas aves como animais de estimação, além de a avicultura ser uma das maiores indústrias de produção de carne do mundo. E somado a esses fatores, os distúrbios na coagulação sanguínea das aves são de grande importância e cada vez mais são evidenciados na clínica. Na indústria de produção de carne de aves, os distúrbios hemorrágicos também apresentam relevância econômica, pois além de causar aumento na condenação de carcaça, provocam aumento da mortalidade na granja (*Thomson et al., 2002*).

O processo fisiológico da coagulação nas aves assemelha-se ao que ocorre nos mamíferos, no entanto, todas essas interações decorrem da propagação de complexos mecanismos que são interdependentes, o que vem levando a discussões sobre as verdadeiras similaridades entre a hemostasia de aves e de mamíferos. Por mais que a maior parte dos fatores de coagulação não apresente especificidade entre espécies (*Harr, 2010; Lumeij, 2008*), é sabido, como sugeriu Sturrie (1967), que há diferenças entre as classes.

A avaliação diagnóstica dos distúrbios da coagulação em aves ainda é um desafio na patologia clínica veterinária. Métodos laboratoriais de rotina utilizados para mamíferos nem sempre podem ser aplicados nas aves, e poucos são os testes também validados para aplicação diagnóstica nesses animais. Diferenças no processo de coagulação entre aves e mamíferos, principalmente nas funções e estruturas das proteínas envolvidas, provocam divergências nas análises laboratoriais de aves. Diversas metodologias de

análises como a técnica manual ou automatizada por meio de equipamentos, diferentes reagentes e disponibilidade no mercado contribuem para a variabilidade de resultados obtidos para esses animais. As discrepâncias de resultados encontradas na literatura sugerem que são necessárias metodologias específicas de avaliação laboratorial, além de maiores esclarecimentos sobre a fisiologia da coagulação para uma abordagem clínica adequada para com esses pacientes (*Harr, 2010; Oldenburg et al., 2008; Powers, 2000*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemostasia

O estudo da hemostasia de aves teve início em meados dos anos 30, em um experimento conduzido por Dam (1935), que avaliou o papel das vitaminas na dieta de frangos. Foram observadas hemorragias em animais que apresentaram deficiência em vitamina K na dieta. Desde então, a pesquisa em hemostasia de aves apresenta um avanço lento quando comparada à hemostasia dos animais mamíferos (*Harr, 2010; Oldenburg et al., 2008; Powers, 2000*).

O processo fisiológico da coagulação nas aves assemelha-se ao que ocorre nos mamíferos - com agregação dos trombócitos e a formação do coágulo, ativação e desencadeamento da cascata da coagulação, resultando no tampão hemostático no local da injúria vascular e por fim a dissolução do coágulo com o reparo do tecido vascular. Todo este processo é decorrente da propagação de complexos mecanismos que são interdependentes, o que leva a discussões sobre as verdadeiras similaridades entre a hemostasia de aves e de mamíferos (*Harr, 2010; Lumeij, 2008*).

Assim como as plaquetas, os trombócitos das aves são as principais células atuantes no processo de coagulação. Eles são originados de precursores presentes na medula óssea, localizados supostamente nos sinusóides medulares. Porém, este precursor é originário de uma linhagem mononuclear e é conhecido como tromboplasto, que segue na maturação celular pelo estágio de trombócito imaturo até chegar a sua forma madura por

meio de divisões celulares sem endomitose. Os tromboplastos são células semelhantes ao eritroblasto, e quando comparados aos trombócitos maduros, apresentam maior tamanho celular e nuclear, além de um citoplasma mais basofílico (*Campbell et. al., 2010*).

O conhecimento científico sobre a origem da produção celular, a hematopoiese, em vertebrados teve seu início em estudos experimentais primeiramente realizados em embriões de aves. E, a partir desse ponto de partida, expandiu-se para os animais vertebrados em geral. Com isso, verificou-se que a hematopoiese primitiva no embrião de frango é localizada no saco vitelínico e tem início a partir do segundo dia de incubação, constituído apenas da produção de células vermelhas e de trombócitos. A produção de células sanguíneas ocorre no saco vitelínico por quase todo o estágio embrionário, até o estabelecimento da hematopoiese pela medula óssea. A hematopoiese definitiva passa a ocorrer a partir do quinto dia de incubação na área do mesênquima dorsal (fossa aórtica e para-aórtica), e dura até o oitavo dia de incubação. Do dia 9 ao 18, as células hematopoiéticas migram e colonizam o baço, e somente no dia 12 de incubação é que a medula óssea passa a apresentar atividade hematopoiética, seguindo até a vida adulta das aves. Diferentemente dos mamíferos, o fígado não é o principal órgão hematopoiético durante a fase fetal (*Claver e Quaglia, 2009*).

Morfologicamente, os trombócitos maduros têm formato ovóide a discóide, e tamanho menor que os eritrócitos. Seu núcleo apresenta uma cromatina bastante condensada que é de aparência mais picnótica do que as outras células sanguíneas, e também acompanha o formato celular que varia de redondo a oval. Os trombócitos possuem uma moderada quantidade de citoplasma podendo apresentar grânulos e/ou vacuolizações (*Powers, 2000*), e quando ativados, os trombócitos formam projeções citoplasmáticas conhecidas como pseudópodes (*Du Plessis e Van Wilpe, 2009*). Análises em microscopia eletrônica demonstraram que os trombócitos possuem, além do núcleo, um desenvolvido complexo de Golgi, mitocôndrias, escasso retículo endoplasmático, grânulos, lisossomos e um sistema de vesículas que se ligam à membrana celular (*Claver, 2005*). Os componentes dos grânulos dos trombócitos, tais como proteínas básicas, ácidos graxos insaturados, açúcares ligados a proteínas ou lipídeos, e a fosfatase ácida estão relacionados à

atividade fagocitária. A presença de atividades de peroxidase e catalase também foram observadas em trombócitos de frango (*Meseguer et al., 2002*).

Os trombócitos das aves apresentam função análoga à das plaquetas dos mamíferos, porém morfologicamente, os trombócitos apresentam pequena semelhança quando comparados (*Claver, 2005; Powers, 2000*). As plaquetas são células derivadas de prolongamentos do citoplasma de seus precursores poliplóides, os megacariócitos, que localizam-se principalmente na medula óssea, mas também são encontrados em outros órgãos como baço, fígado e pulmão, podendo produzir plaquetas em casos de necessidade. O megacariócito, durante sua maturação, sofre um processo de endomitose ao qual gera uma poliploidia nuclear que está diretamente relacionada à quantidade de plaquetas a serem produzidas por este precursor. As plaquetas são então produzidas a partir da derivação de projeções citoplasmáticas do megacariócito e lançadas diretamente para a circulação sanguínea pelos capilares sinusóides da medula óssea (*Boudreaux, 2010*).

A fagocitose atribuída aos trombócitos é bastante discutida entre os especialistas da área e também foi encontrada em crustáceos, anfíbios e répteis. Entretanto, esta capacidade é limitada nos trombócitos em aves, como demonstrado em microscopia eletrônica por *DaMatta et al. (1998)*, os trombócitos apresentaram pequena capacidade em fagocitar bactérias, somada à ausência de fagocitose de protozoários como *Trypanossoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*; uma maior capacidade fagocítica foi observada nos monócitos. Relatos da importância dos trombócitos em participar da depuração de substâncias indesejáveis do sangue foram observados em experimentos *in vivo* e *in vitro*, e sugerem que os trombócitos são a primeira célula de fagocitose. *Awadhiya et al. (1980)* encontraram maior quantidade de trombócitos com material fagocitado após a administração de carbono coloidal em poedeiras, e a partir de duas horas houve uma inversão de atividade com os monócitos.

Os trombócitos também são capazes de migrar através dos capilares (*Claver, 2005*), e esta habilidade migratória excede a dos linfócitos tímicos. A regulação desse mecanismo é realizada pelo inibidor de migração dos trombócitos (ThrlF) que é sintetizado por ambos os linfócitos, B e T (*Stinson et al., 1979*). Além da atividade fagocitária e da reatividade a estímulos externos

outras funções também são investigadas nos trombócitos, como a possibilidade dos trombócitos serem capazes de substituir as células vermelhas em casos de anemias severas (*Lane, 1991*).

Na hemostasia, os trombócitos são as células que apresentam função fundamental, suportando a fase inicial da coagulação para a formação do coágulo. Este mecanismo decorre da ativação dos trombócitos, os quais irão aderir na parede vascular lesionada e conseqüentemente provocar a agregação dos trombócitos presentes na região afetada. A adesão dos trombócitos no local da lesão ocorre em resposta a pequenas injúrias vasculares, desencadeando o mecanismo de agregação dos trombócitos com conseqüente formação do tampão hemostático localizado (*Harr, 2010; Lumeij, 2008*). Injúrias vasculares maiores também geram uma vasoconstrição reflexa com a finalidade de auxiliar no processo de agregação dos trombócitos.

O processo de agregação é mediado pela ligação do fibrinogênio em receptores específicos nos trombócitos. Estes receptores são glicoproteínas GPIIb-IIIa expressas na membrana citoplasmática, assim como nas plaquetas dos mamíferos. A agregação é provocada pela atuação de diferentes substâncias ativadoras como a trombina, a serotonina e o colágeno. E desencadeia uma reação de liberação dessas substâncias para o plasma sanguíneo. Diferentemente ao que ocorre com as plaquetas dos mamíferos, não há agregação dos trombócitos em resposta ao ADP ou ATP (*Claver, 2005*).

Após a formação do tampão hemostático, é necessário a estabilização do mesmo que é decorrente do desencadeamento de um mecanismo em cascata que envolve a ativação de diversas proteínas e que resulta na formação da fibrina. Esse processo da coagulação pode ser iniciado por duas vias distintas - pelo fator tecidual e pela via de contato, ou extrínseca e intrínseca respectivamente. No entanto, as proteases envolvidas circulam em suas formas inativadas (ou zimogênios) no sangue de animais saudáveis, e necessitam ser ativadas para assim promover o processo de coagulação (*Gentry, 2004*).

Nas aves a via da coagulação mais rápida e eficiente é a via extrínseca, assim como na maioria dos vertebrados. Esta via é iniciada a partir da reação com o fator tecidual e atua como via primária para a geração de trombina, sendo necessária apenas uma pequena quantidade de fator VII para iniciar a

formação do coágulo (*Thomson et al., 2002*). O fator tecidual ou tromboplastina tecidual (fator III) é uma glicoproteína transmembrana lipídeo dependente presente em células endoteliais e monócitos, e também livre no plasma. Quando ocorre um trauma no tecido vascular ou um estímulo inflamatório, o fator tecidual é exposto na membrana plasmática dessas células e reage com o fator VII ou fator VII ativado, que irão transformar o fator X em sua forma ativada – Xa (*Gentry, 2004*). A via do fator tecidual é a de maior relevância fisiológica nos vertebrados, uma vez que deficiências nesta via estão associadas a severos quadros hemorrágicos. As deficiências na via de contato (calicreína – fator XII) não apresentam a mesma associação com hemorragias ou trombozes em humanos (*Foley et al., 2012*).

A via de contato é relatada como ausente nas aves, tendo elas perdido os genes para os fatores XII e XI durante o processo evolutivo (*Doolittle, 2010*). A calicreína e pré-calicreína foram encontradas em avestruzes em baixas concentrações (*Frost et al., 1999*). Porém, as evidências de atividade dos fatores VIII e IX em frangos sustentam a sugestão de atividades análogas aos fatores humanos no sistema intrínseco (*Doerr e Hamilton, 1981*). Hipóteses sugerem, inclusive, que aves podem possuir uma forte via alternativa suprimindo a deficiência de fatores (*Powers, 2000*).

A trombina é a enzima de maior importância, sendo gerada em demanda às duas vias de ativação da coagulação. Ela representa o grau de complexidade dos componentes da coagulação, com funções distintas e opostas. Uma delas é a função pró-coagulante que envolve a transformação do fibrinogênio em fibrina insolúvel, a agregação dos trombócitos, a estabilização do coágulo com a ativação do fator XIII, e o *feedback* de sua própria geração a partir da ativação da protrombina pelos fatores V e VIII, e também do XI, no caso dos mamíferos. A outra função exercida pela trombina é a anticoagulante por meio da conversão da proteína C em uma forma ativa, que juntamente com a proteína S irá clivar e inativar o fator Va. A trombina apresenta meia-vida curta na circulação, sendo depurada pela antitrombina (*Di Cera et al., 1997*).

Ao contrário dos mamíferos, poucas proteínas foram isoladas em aves. A protrombina é uma das proteínas mais estudadas, sendo reconhecida como substrato das proteínas dependentes de vitamina K (*Frost et al., 2000*). Segundo *Banfield e MacGillivray (1992)*, o cDNA da protrombina de frangos é

homóloga à dos mamíferos em apenas 72%. A antitrombina e a trombina isoladas de avestruz também são bastante similares em propriedades cinéticas e físico-químicas com outras espécies (Frost *et al.*, 2002). Todas as proteases (fatores II, VII, IX e X) e os co-fatores (V e VIII) de mamíferos foram encontrados em aves e apresentam a mesma origem genética (Harr, 2010), incluindo a proteína C (Davidson *et al.*, 2003).

Fatores como a protrombina (fator II), o VII, IX (fator Christmas) e X (fator Stuart), além da proteínas C e S são dependentes da vitamina K para sua ativação (Harr, 2010; Lumeij, 2008; Oldenburg *et al.*, 2008). A vitamina K está envolvida no processo de coagulação, além do metabolismo ósseo (por meio do cálcio) e outros processos. Sua forma hidroquinona participa da carboxilação que ativa os fatores de coagulação, e funciona como doadora de elétrons para a enzima gama – glutamil carboxilase que modifica os fatores dependentes da vitamina K (Oldenburg *et al.*, 2008).

Dentre as proteínas que participam da coagulação sanguínea, o fibrinogênio é a proteína que apresenta maior informação disponível sobre seus aspectos bioquímicos e fisiológicos. É uma molécula que consiste de 3 cadeias polipeptídicas não-idênticas chamadas α , β e γ ligadas por pontes de dissulfeto. A síntese de cada cadeia é controlada por diferentes genes do organismo, e que apesar disso, parece que apenas a cadeia α apresenta variação estrutural nesta proteína entre as diferentes espécies de vertebrados. O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda positiva e que também está associada a condições inflamatórias não-infecciosas e algumas doenças metabólicas nas aves, proporcionando uma resposta por hiperfibrinogenemia sanguínea. O aumento da produção de fibrinogênio decorrente de um estímulo inflamatório pode contribuir para o aumento da migração e proliferação de fibroblastos, além de facilitar a adesão entre leucócitos e células endoteliais e a transmigração aos sítios inflamatórios. Desse modo, esta proteína deve ser rotineiramente avaliada nos exames hematológicos, assim como ocorre com os mamíferos domésticos, para a avaliação da hiperfibrinogenemia devido à relevância na clínica de aves (Gentry, 2004; Hawkey e Hart, 1988).

O mecanismo que completa o ciclo da manutenção da hemostasia é o processo de fibrinólise que promove a degradação da fibrina. Este mecanismo ainda é pouco estudado nas aves, porém foram identificadas algumas serina

proteases nessa classe, como é o exemplo da uroquinase, do ativador do plasminogênio tecidual e o plasminogênio (Harr, 2010). A α_2 -antiplasmina e também o dímero-D foram encontrados em avestruzes em níveis semelhantes aos humanos, indicando que o sistema fibrinolítico pode ser assim comparável (Frost et al., 1999).

2.2 Testes Diagnósticos

A avaliação dos trombócitos deve ser realizada de rotina, e sua contagem é geralmente realizada por estimativa em esfregaço sanguíneo. Porém, há na literatura a descrição da diluição manual com contagem em câmara de Neubauer, seguindo o método de Natt e Herrick. O valor de referência utilizado em aves é de 20.000 a 30.000/ μ L (Campbell e Ellis, 2007).

A avaliação do perfil de coagulação das aves ainda apresenta dificuldades na rotina laboratorial e tem como principal desafio a aplicação direta de métodos diagnósticos e reagentes disponíveis no mercado para a descoberta de coagulopatias das aves (Harr, 2010). Estudos pioneiros comparando a hemostasia dos animais vertebrados documentaram que tanto o tempo de sangramento *in vivo* como o tempo de coagulação *in vitro* com sangue total eram semelhantes entre aves, peixes e carnívoros. No entanto, as observações realizadas atualmente diferem desses resultados especialmente quando comparam-se exames *in vitro* das vias extrínscica e intrínscica para a geração de trombina (Gentry, 2004).

O tempo de protrombina (TP) é um teste bastante utilizado na hemostasia de aves e serve para avaliar as vias extrínscica e comum da cascata de coagulação. O exame consiste da adição de uma mistura de fator tecidual – cálcio – fosfolipídeo ou tromboplastina ao plasma do animal para desencadear a reação e gerar o tempo de coagulação do sangue. É sabido que a tromboplastina tecidual apresenta especificidade por espécie, com isso, a utilização de preparações homólogas apresenta resultados melhores e mais fidedignos. As tromboplastinas disponíveis no mercado são geralmente extraídas de tecido de coelho, não havendo a disponibilidade de tromboplastinas aviárias comerciais. O uso de tromboplastinas não homólogas como as de mamíferos acarreta em um aumento dos valores de TP em aves,

gerando um questionamento de seu uso na medicina desses animais (*Gentry, 2004; Harr, 2010; Lumeij, 2008*).

Dessa forma, podem existir discrepâncias de resultados na literatura que em parte são devidas ao uso de reagentes comerciais de fator tecidual não homólogo. Testes *in vitro* confirmaram que há uma baixa reatividade enzimática entre as proteínas da coagulação de frangos e humanos (*Thomson et al., 2002*). Outra causa da variabilidade dos resultados é devido às diferentes formas de análise do exame, como a leitura manual por meio da observação da formação do coágulo por um indivíduo que deve ser bem treinado e experiente, ou a leitura automatizada com o auxílio de equipamentos próprios para realização desses exames (*Doerr et al., 1975*).

O tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) pode ser aplicado na avaliação de fatores que não o fator VII, pela ativação da coagulação na via de contato ou intrínseca. Porém também apresenta limitações ao uso dos reagentes comerciais, compostos por uma substância não-fisiológica de carga negativa como é o caso da caolin, celite e o ácido elágico que irão ativar o fator XII, o qual irá converter o fator XI em XIa e seguir para ativação do fator IX. Discrepâncias de resultados na literatura são decorrentes especialmente da deficiência dos fatores XII e XI que as aves apresentam (*Harr, 2010; Gentry, 2004*). O tempo de coagulação ativada (TCA) é outro teste laboratorial que também pode ser utilizado para avaliar as vias intrínseca e a comum da coagulação (*Harr, 2010*).

A avaliação dos fatores de coagulação também é possível em aves, por meio de técnica laboratorial capaz de quantificar os níveis de atividade dos diferentes fatores. Correlacionando-os com a habilidade do plasma analisado em corrigir o tempo de coagulação de um plasma humano deficiente no fator específico a ser avaliado. Portanto, a aplicação desse teste na medicina veterinária, assume que há similaridade suficiente na estrutura das proteínas humanas e de outras espécies. E apesar das divergências encontradas, este método é usado na aplicação diagnóstica em aves, uma vez que deve ser analisado um plasma de um animal controle saudável em conjunto na mesma bateria de exames com o mesmo reagente, para servir de comparação (*Gentry, 2004*).

A mensuração do fibrinogênio pode ser realizada pela técnica de precipitação a 56°C preferencialmente associada à leitura em analisador bioquímico pelo método do biureto, uma vez que a utilização do refratômetro não apresenta acurácia suficiente (*Fudge, 2000*). No entanto, esta técnica é mais sensível para casos de normo ou hiperfibrinogenemia, com o valor de referência variando de 100 a 300mg/dL (*Harr, 2010*). Como em quadros hemorrágicos o que se espera é uma hipofibrinogenemia, uma opção sensível seria a avaliação de sua concentração por meio do Tempo de Trombina (TT) (*Stockham e Scott, 2008*).

Testes disponíveis demonstram que há uma limitação para o entendimento da coagulação *in vivo*. Atualmente, os testes hemostáticos convencionais usados na rotina laboratorial, avaliam fases ou componentes isolados da coagulação. Testes como o TP e o TTPA utilizam apenas o plasma e não englobam os elementos celulares em suas avaliações. Estudos recentes nessa área demonstram que há importância na contribuição das células durante a coagulação. E os modelos de estudo baseado em células fornecem dados com ênfase nas plaquetas e nas células que liberam fator tecidual, e também levam em consideração a superfície de membrana, o sistema enzimático e as micropartículas, além das células endoteliais. Esses modelos demonstram que as células contribuem em todo o processo de coagulação (*Kol e Borjesson, 2010; McMichae e Smith, 2011*).

Com a utilização da tromboelastometria na avaliação da hemostasia, é possível documentar a interação das plaquetas com os fatores de coagulação desde o início do processo da formação do coágulo. O coágulo apresenta uma característica viscoelástica com formação e retração do coágulo que são captadas pelo teste. A quantificação das alterações na viscosidade sanguínea durante a formação do coágulo, é sugerida desde 1889 por Hayem para servir de base para o monitoramento do processo de coagulação. Desde então, diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para contribuir para o avanço de novos conhecimentos sobre a hemostasia e seus distúrbios. Esta avaliação é a que melhor reflete a participação celular na coagulação, fornecendo dados sobre as cinéticas da geração de fibrina por meio da ativação dos fatores, além de resultados que refletem as propriedades

mecânicas e viscoelásticas do coágulo em formação, com a consequente retração do coágulo e por fim a fibrinólise (*McMichae e Smith, 2011*).

A utilização da tromboelastometria foi iniciada por Hartert na Alemanha no final da década de 1940 e vem sendo utilizada na medicina veterinária. Esta tecnologia é capaz de fornecer informações acuradas da coagulação por um princípio de detecção óptica que monitora os movimentos do sangue através de um pino suspenso. Com a formação da fibrina, a oscilação do pino diminui e capta a impedância da rotação por um sistema de transdução que converte os momentos da coagulação em tracejados que por fim geram um gráfico. Nesse gráfico, pode-se observar resultados como o tempo de coagulação (TC) dado em segundos que está relacionado ao tempo levado para o início da formação do coágulo, a partir da ativação dos fatores de coagulação e a cinética da fibrina. Seguidamente é gerado o valor do tempo de formação do coágulo (CFT) dado em segundos, o qual está relacionado à interação entre os fatores de coagulação e as plaquetas na formação e estabilização do coágulo. Essa alteração na viscoelasticidade do sangue ao atingir sua resistência máxima no pino suspenso, gera no gráfico uma amplitude máxima que é dada em milímetros considerada a firmeza máxima do coágulo (MCF). A partir do MCF e do início do CFT é gerado uma angulação chamada de ângulo alfa dado em graus, o qual também auxilia na interpretação da viscoelasticidade sanguínea. Dessa forma, a tromboelastometria é a avaliação capacitada a detectar com acurácia tanto o estado de hipocoagulabilidade sanguínea com risco hemorrágico quanto a hipercoagulabilidade de risco trombótico (*Kol e Borjesson, 2010; McMichae e Smith, 2011*).

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS

C.M. Thomazini¹, R.K. Takahira¹, L.F. Moraes¹, T.C. Trentin¹, J.R. Sartori².

INFLUÊNCIA DE TEMPERATURA E DE TROMBOPLASTINA
HOMÓLOGA E HETERÓLOGA EM TROMBOELASTOMETRIA DE AVES

¹Departamento de Clínica Veterinária e ²Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. UNESP-Botucatu, Brasil.

Endereço Distrito de Rubião Junior s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP

Resumo

O uso de aves e outras espécies animais como modelo experimental para o estudo de hemostasia representa um desafio à pesquisa científica. A dificuldade decorre da falta de testes específicos e reagentes homólogos comerciais para acessar os mecanismos funcionais da coagulação das aves. As diferenças entre as aves e os mamíferos estão presentes especialmente na estrutura e função das proteínas envolvidas na coagulação. A tromboelastometria é o exame que melhor reflete a participação celular na coagulação fornecendo uma avaliação completa do sistema hemostático a partir dos dados sobre as cinéticas da geração do coágulo até o processo de fibrinólise. O interesse no uso da tromboelastometria vem aumentando, especialmente pelo potencial desta avaliação em captar eventos hemorrágicos e trombóticos com antecipação, porém a utilização de reagentes heterólogos pode comprometer o diagnóstico das coagulopatias. O objetivo desse estudo foi comparar as tromboplastinas de ave e mamífero como ativadores da coagulação em duas temperaturas diferentes para a realização da tromboelastometria de aves. As amostras de sangue total citratado foram coletadas da veia jugular de cinco frangos de corte machos de 31 dias de idade e submetidas à tromboelastometria (ROTEM®) a 37 e a 40°C dentro de 15 a 20 minutos após a coleta. A tromboplastina comercial derivada de mamífero (Extem®) foi obtida do fabricante (ROTEM®) e a aviária foi extraída do encéfalo de frango de corte. Os resultados mostraram que a tromboplastina homóloga apresentou um TC (Tempo de Coagulação) mais curto e um MCF maior (Firmeza Máxima do Coágulo) em ambas as temperaturas. A tromboplastina homóloga resultou num MCF maior (Firmeza Máxima do Coágulo) a 37°C do que a 40°C, a despeito desta ser a temperatura corporal das aves. O CFT (Tempo de Formação do Coágulo) e o ângulo alfa não demonstraram nenhuma diferença com a mudança do fator tecidual ou temperatura. Estas diferenças podem implicar em baixa sensibilidade ou especificidade nos resultados dos testes quando utilizados diferentes tipos de tromboplastinas e temperaturas na tromboelastometria como ferramenta de estudo e diagnóstico da hemostasia de aves. Os autores reforçam a importância da escolha de protocolos e reagentes no estudo de hemostasia comparada utilizando o modelo aviário.

Introdução

A avaliação da coagulação das aves ainda apresenta dificuldades nos dias atuais da rotina laboratorial. O principal desafio é a aplicação direta de métodos diagnósticos e reagentes disponíveis no mercado (Harr 2010). Métodos laboratoriais de rotina utilizados para mamíferos não podem sempre ser aplicados nas aves, e também poucos são os testes validados para a aplicação diagnóstica nesses animais. Diferenças nas características da coagulação entre aves e mamíferos, principalmente nas funções e estruturas das proteínas envolvidas nesses processos, provocam divergências de padrões nas análises laboratoriais de aves (Oldenburg et al. 2008; Powers 2000). Estudos comparados nesses animais utilizando diferentes tromboplastinas, originária das aves e também dos mamíferos, como agonistas para a ativação da via extrínseca confirmaram a especificidade do fator tecidual (Kase et al. 1980; Tahira et al. 1977).

Testes disponíveis demonstram que há uma limitação para o entendimento da coagulação *in vivo*. Atualmente, os conceitos de modelos de interação celular e tecidual fornecem novos caminhos para a visualização de variação farmacológica da hemostasia, que podem ser extrapolados para diferentes espécies (Brooks et al. 2011). Os testes convencionais avaliam fases ou componentes isolados da coagulação. Testes como o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) utilizam apenas o plasma e não englobam os elementos celulares em suas avaliações. Estudos recentes nessa área demonstram a importância da contribuição das células durante a coagulação. Os modelos de estudo baseados em células fornecem dados com ênfase nas plaquetas e nas células que liberam fator tecidual, também levando em consideração a superfície de membrana, o sistema enzimático e as micropartículas (MPs) liberadas, além das células endoteliais (Kol e Borjesson 2010; McMichael e Smith 2011).

Esses modelos demonstram que as células contribuem em todo o processo de coagulação. Com a utilização da tromboelastometria na avaliação da hemostasia, é possível documentar a interação das plaquetas com as células sanguíneas e os fatores de coagulação, desde o início do processo de

formação até a retração do coágulo. Essa característica viscoelástica é captada pelo teste, podendo ser avaliada nas diferentes vias de ativação e em diferentes temperaturas (Wiinberg e Kristensen 2010).

Várias funções fisiológicas estão interligadas ou dependem da regulação constante da temperatura adequada do animal, considerada a temperatura termoneutra. O organismo dispõe de mecanismos capazes de controlar a temperatura dentro de pequenas variações corpóreas, e assim manter a homeostase na finalidade de otimização de suas reações bioquímicas. Nas aves a temperatura corpórea é de 41,1°C e seu equilíbrio pode ser baseado em duas variáveis, sendo uma relacionada às reações ao aumento da temperatura, especialmente pelo ambiente, e uma outra relacionada à redução da temperatura corpórea (Macari et al. 2004). O objetivo desse estudo foi avaliar a coagulação de frangos de corte ativada por tromboplastina homóloga e heteróloga nas temperaturas de 37°C e de 40°C, temperatura considerada próxima a termoneutra das aves.

Materiais e Método

Amostras citratadas de sangue total (1:10) foram coletadas da veia jugular de cinco frangos de corte machos de 31 dias de idade. O sangue total foi recalcificado e submetido à tromboelastometria (ROTEM®) a temperatura padrão de 37°C e a 40°C, temperatura máxima alcançada pelo equipamento, dentro de 15 a 20 minutos após a coleta. Para o teste, 300 µL de sangue citratado foi adicionado de 20 µL cálcio a 0,2M e de 20 µL de fator tecidual como ativador da via extrínica da coagulação. Duas diferentes tromboplastinas foram utilizadas, sendo uma comercial derivada de mamífero (Extem®) obtida do fabricante (ROTEM®) e uma tromboplastina aviária que foi extraída de macerado de encéfalo de frango usando solução acetona. Uma solução de uso foi preparada a partir do sobrenadante de 0,1g do pó de encéfalo em 5 mL de solução salina a 0,85% (Denson 1976).

Foram coletados os dados da viscoelasticidade do coágulo como o Tempo de coagulação (TC, em segundos), o Tempo de formação do coágulo (CFT, em segundos), o ângulo alfa (α , em graus) e a Firmeza máxima do coágulo (MCF, em milímetros).

Os resultados foram submetidos à análise do teste t para amostras pareadas. O nível de significância de 5% para análises biológicas foi utilizado nesse estudo.

Resultados

Os resultados mostraram que a coagulação ativada por tromboplastina homóloga apresentou um encurtamento significativo do TC e um aumento do MCF em ambas as temperaturas quando comparada à tromboplastina comercial ou mamífera.

As amostras com tromboplastina aviária resultaram em MCF maior a 37°C do que a 40°C, a despeito desta ser a temperatura corporal das aves. O CFT e o ângulo alfa não demonstraram nenhuma diferença com a mudança do fator tecidual ou temperatura.

Discussão

A hemostasia é um mecanismo delicadamente equilibrado por diversos componentes do sangue que devem interagir em harmonia para manter a homeostase com a finalidade de evitar distúrbios hemorrágicos e ou trombóticos. É sabido que a tromboplastina tecidual apresenta especificidade por espécie, com isso, a utilização de preparações homólogas apresenta resultados melhores e mais fidedignos ao padrão que ocorre *in vivo* (Kase et al. 1980; Tahira et al. 1977). No entanto, as tromboplastinas disponíveis no mercado são de mamíferos, geralmente extraídas de tecido de coelho, não havendo a disponibilidade no comércio de tromboplastinas aviárias.

O fator tecidual é essencial para o desenvolvimento vascular e da coagulação. O fator tecidual é exposto *in vivo* por células perivasculares no animal e inicia a formação de fibrina por meio da ativação da cascata de coagulação. O fator VII se liga ao fator tecidual e forma um complexo enzimático capaz de ativar os fatores IX e X. A ativação das plaquetas também participa do mecanismo de geração de trombina. No entanto, a geração de trombina por esta via é limitada pela inibição pelo inibidor da via do fator tecidual (Brooks et al. 2011).

A especificidade das proteínas é evidente, e assim como em outros trabalhos (Kase et al. 1980; Tahira et al. 1977), a ativação da coagulação por tromboplastina extraída da mesma classe, ou seja homóloga, resultou em um encurtamento no tempo necessário para a formação do coágulo. Contudo, como a tromboelastometria é capaz de fornecer uma avaliação da viscoelasticidade do coágulo, foi possível verificar que a especificidade do fator tecidual também interfere na estabilidade do coágulo, partindo do aumento do MCF que representa a firmeza máxima do coágulo. O MCF é a amplitude máxima da curva, definida pela firmeza máxima do coágulo e depende da ativação dos trombócitos e do fibrinogênio além da função do fator XIII (McMichae e Smith 2011). Desse modo, o uso de tromboplastina homóloga deve ser considerada como uma ativação mais fidedigna à que ocorre fisiologicamente no animal.

A manutenção constante da temperatura corpórea é também um mecanismo essencial para todos os animais homeotermos, promovendo as condições ótimas para as propriedades celulares e das reações enzimáticas e bioquímicas. A temperatura padrão usada para testes hemostáticos na rotina laboratorial é a de 37°C para os mamíferos e que também é expandida para os outros animais. No entanto, no caso das aves, esta temperatura extrapola o limite da variação da homeostase termoneutra essencial para a vida das aves, que é próxima a 41,1°C (Macari et al. 2004).

A tromboelastometria mostrou-se capaz de detectar variações na viscosidade sanguínea em pequenas variações de temperaturas. Na comparação da viscoelasticidade do coágulo de aves ativado por tromboplastina homóloga em tromboelastometria na temperatura de 37 e 40°C, verificamos que houve um aumento da firmeza máxima do coágulo na temperatura de 37°C. Esta variação na viscosidade do sangue ocorre com a variação da temperatura corpórea, e está de acordo com pesquisas anteriores em que frangos foram submetidos a condições adversas de temperaturas ambiente. A temperatura ambiente é capaz de influenciar a temperatura corpórea do frango e dessa forma, os animais que sofreram um estresse hipotérmico apresentaram um aumento na viscosidade do sangue (Fontes et al. 2000). E no caso dos animais que foram submetidos à alta temperatura,

tiveram uma diminuição da viscosidade do sangue devido à expansão do volume plasmático (Zhou et al. 1999). Os padrões da viscosidade sanguínea se assemelham ao encontrado em nosso estudo.

Temperaturas baixas no ambiente de criação de frangos de corte podem ser um fator predisponente para doenças como a síndrome da hipertensão pulmonar que pode representar até 50% do total de condenações dos meses mais frios (Macari et al. 2004). A mudança na viscosidade sanguínea também é reportada em algumas patologias de frangos de corte, como na síndrome da hipertensão pulmonar e nos casos de ascites. O manejo da temperatura do ambiente na criação desses animais é fundamental para controle da mortalidade na granja (Zhou et al. 1999).

Conclusão

A temperatura e a especificidade das proteínas que participam da coagulação interferem ativamente na cinética do coágulo. Essas diferenças podem implicar em baixa sensibilidade ou especificidade nos resultados dos testes quando utilizados diferentes tipos de tromboplastinas e temperaturas na tromboelastometria como ferramenta de estudo e diagnóstico da hemostasia de aves. Os autores reforçam a importância da escolha de protocolos e reagentes no estudo de hemostasia comparada utilizando o modelo aviário.

Referências bibliográficas

Brooks MB, Stokol T, Catalfamo JL (2011) Comparative hemostasis: animal models and new hemostasis tests. *Clin Lab Med* 31:139-159.

Denson KWE (1976). The preparation of general reagents and coagulation factors. In: Biggs R. (ed). *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis*, 2nd.edn, Oxford: Blackwell Scientific Publications pp.657-669.

Fontes SF, Hernandez R, Macari M, Bernal FM (2000) Viscosidade do sangue como parâmetro de diagnóstico de síndrome ascítica em linhagens de frangos de corte com diferentes susceptibilidade. *Rev Bras Cienc Avic* 2:45-52.

Harr KE (2010) Overview of Avian Hemostasis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (ed) *Schalm's Veterinary Hematology*, 6st edn. Blackwell Publishing Ltd pp 703-707.

Kase F, Butchers J, Spurling NW (1980) Comparison of the rate-limiting influence of factor VII on mammalian plasma coagulation following extrinsic activation by avian and mammalian tissue thromboplastins. *Comp Biochem Physiol* 65A:421-426.

Kol A, Borjesson DL (2010) Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 39 (4):405-416.

Macari M, Furlan RL, Maiorka A (2004) Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M (ed) Produção de Frangos de Corte. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas pp 137-155.

McMichae MA, Smith SA (2011) Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Vet Clin Pathol* 40 (1):1-13.

Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M (2008) The vitamin K cycle. *Vitam Horm* 78:35-62.

Powers LV (2000) Avian Hemostasis. In: Fudge AM (ed) *Laboratory Medicine of Avian and Exotic Pets*, W. B. Saunders Company pp 35-46.

Tahira N, Dube B, Agrawal GP(1977) Blood coagulation studies in some wild Indian birds: effect of different tissue thromboplastins. *J Comp Pathol* 87:451-457.

Theusinger OM, Nürnberg J, Asmis LM, Seifert B, Spahn DR (2010) Rotation thromboelastometry (ROTEM®) stability and reproducibility over time. *Eur J Cardio-thorac Surg* 37:677-683.

Wiinberg, B.; Kristensen, AT (2011) Thromboelastography in veterinary medicine. *Comp Sem Thromb Hemost* 36 (7):747-756.

Zhou WT, Fujita M, Yamamoto S (1999) Effects of ambient temperatures on blood viscosity and plasma protein concentration of broiler chickens (*Gallus domesticus*). *J Therm Biol* 24:105-112.

C.M. Thomazini¹, R.K. Takahira¹, T.C. Trentin¹, J.R. Sartori².

EFEITOS DA SULFAQUINOXALINA NA VISCOELASTICIDADE DO
SANGUE DE AVES

¹Departamento de Clínica Veterinária e ²Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. UNESP-Botucatu, Brasil.

Endereço Distrito de Rubião Junior s/n, CEP: 18618-970, Botucatu/SP

Resumo

Distúrbios hemorrágicos são relevantes na medicina aviária devido sua importância econômica e na prática privada. Métodos diagnósticos na rotina laboratorial nem sempre podem ser usados na hemostasia de aves, uma vez que o processo hemostático não é esclarecido nesses animais. A tromboelastometria vem sendo amplamente aplicada na medicina veterinária para detectar hipocoagulabilidade com acurácia. A sulfaquinoxalina pode causar processo hemorrágicos por deficiência de vitamina K, portanto, o objetivo desse estudo foi verificar a presença de hipocoagulabilidade por meio da tromboelastometria, em frangos submetidos ao tratamento de sulfaquinoxalina. Frangos saudáveis de 28 dias de idade foram submetidos ao tratamento com sulfaquinoxalina (30 mg/kg) por cinco dias. Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo controle (GI) sem tratamento (n=15) e um grupo (GII) que recebeu sulfaquinoxalina contínua misturada em água (n=15). A dieta continha um nível normal de vitamina K. As amostras foram coletadas antes do tratamento, 48 horas e cinco dias após o início do tratamento. A tromboelastometria foi analisada por meio do ROTEM® a 40°C para avaliar as vias intrínsecas e extrínsecas entre 15 e 20 minutos após a colheita do sangue. Uma tromboplastina homóloga extraída de cérebro de frango foi usada como reagente para ativar a via extrínseca e um reagente comercial para ativar a via intrínseca (INTEM®). Na análise estatística aplicada foi o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Wilcoxon para checar a significância a cada 2 grupos. Os resultados mostraram que não houve estado de hipocoagulabilidade significativo no grupo tratado. Os autores reforçam de que a avaliação da hemostasia em sangue total deve ser criteriosa, especialmente em aves por não apresentarem protocolos definidos que estabeleçam um padrão adequado.

Introdução

O aprofundamento no estudo da fisiopatologia do sistema hemostático de aves é de grande importância econômica e clínica, uma vez que eles estão sujeitos a distúrbios sanguíneos de causas variadas. Alterações hemorrágicas de origem genética, como a síndrome hemorrágica do fígado gorduroso e a hemorragia muscular pelo crescimento rápido de perus e frangos de corte são descritas. Outras coagulopatias que acometem as aves podem ter origem ambiental como a intoxicação por rodenticidas dicumarínicos e administração excessiva de óleo de canola na alimentação (Thomson et al., 2002).

Há também as coagulopatias relacionadas à deficiência da vitamina K que prejudicam a ativação dos fatores II, VII, IX e X dependentes da vitamina. A deficiência pode ocorrer por baixos níveis da vitamina na dieta ou por intoxicação com rodenticidas ou fármacos anticoagulantes, embora as aves apresentem maior limiar de resistência à intoxicação pelos dicumarínicos do que os mamíferos. Coagulopatias decorrentes de doenças hepáticas ou associadas à aflatoxicose e infecções virais, principalmente pelo poliomavírus, além de septicemia bacteriana, coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia de causas variadas causam quadros hemorrágicos que podem ser graves (Powers, 2000). As alterações dos trombócitos são raramente diagnosticadas e distúrbios de função ainda não foram descritas em aves (Claver e Quaglia, 2009).

A sulfaquinoxalina pode provocar a deficiência da vitamina K por inibição de sua síntese pelas bactérias do intestino além de ser um potente inibidor da epóxido redutase que transforma a vitamina K para a sua forma hidroquinona, necessária como substrato para a carboxilase dependente de vitamina K (Preusch et al., 1989). A sulfaquinoxalina é usada na terapia em aves, principalmente para a coccidiose, e é um composto derivado sulfonamídico de rápida absorção e de excreção mais lenta. Ela é administrada por via oral, apresenta boa distribuição pelos tecidos ultrapassando a barreira hematoencefálica e possui meia-vida plasmática de até 18 horas nas aves (Paes, 2012).

Há testes que são comumente usados para a triagem de alterações na hemostasia, sendo eles a contagem de trombócitos, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), os produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio e o fibrinogênio. A tromboelastografia é capaz de fornecer alta relação entre os resultados desses testes, no entanto contém informações adicionais sobre a cinética da coagulação (Zuckerman et al., 1981). O objetivo desse estudo foi utilizar a tromboelastometria para verificar a presença de hipocoagulabilidade em frangos submetidos ao tratamento de sulfaquinoxalina.

Materiais e métodos

Delineamento experimental

Frangos de corte da linhagem Cobb, adquiridos com um dia de vida de criador comercial, foram alojadas em gaiolas em ambiente climatizado e alimentadas com ração para frangos de corte adequadas para sua idade e níveis de vitamina K em sua composição. Água e alimento foram disponibilizados *ad libitum* aos animais.

As aves foram divididas em dois grupos, sendo o Grupo 1 o Grupo Controle (n=15) sem tratamento e o Grupo 2 (n=15) com frangos tratados com sulfaquinoxalina na dose de 30 mg/kg veiculada na água ao longo do dia. O tratamento foi realizado por cinco dias consecutivos a partir do 28^o dia de vida.

As coletas de sangue foram realizadas: no 28^o dia de vida (no momento 0), antes de instituir o tratamento; após 48 horas do início da terapia com sulfaquinoxalina (momento 1); e ao final de cinco dias do tratamento (momento 3). A colheita de sangue foi realizada em veia jugular ou ulnar, por punção única e regular para garantir a qualidade da amostra. O sangue foi coletado em citrato de sódio a 3,8% na proporção de 10:1 de anticoagulante para a tromboelastometria e com EDTA-K3 a 5% para o hemograma.

Exames Laboratoriais

Hemograma

O hemograma foi realizado por técnica manual com diluição de 10 μL de sangue em 1 mL de azul de toluidina a 0,01%. A contagem das células foi determinada em câmara de Neubauer conforme o método de Natt e Herrick, e incluiu eritrócitos, leucócitos totais e trombócitos. A contagem de eritrócitos foi realizada nos 5 quadrantes do retículo central da câmara de Neubauer e os leucócitos e trombócitos foram contados nos quatro retículos localizados no vértice do quadrado geral. A leitura de hematócrito foi realizada em capilar pelo método do microhematócrito, e a determinação das proteínas plasmáticas totais por refratometria.

Perfil Hemostático

A tromboelastometria (ROTEM®) foi analisada a 40°C para avaliar as vias intrínsecas e extrínsecas. Uma tromboplastina aviária foi extraída de macerado de encéfalo de frango usando solução acetona. Uma solução de uso foi preparada a partir do sobrenadante de 0,1g do pó de encéfalo em 5 mL de solução salina a 0,85% (Denson, 1976). Um reagente comercial (INTEM®) foi utilizado para ativar a via intrínseca. Para a tromboelastometria, 360 μL de sangue citratado foi recalcificado com 20 μL cálcio 0,2M e analisado entre 15 e 20 minutos após a colheita do sangue. Foram coletados os dados do Tempo de coagulação (TC, em segundos), o Tempo de formação do coágulo (CFT, em segundos), o ângulo (α , em graus) e a Firmeza máxima do coágulo (MCF, em mm).

Análise Estatística

Os resultados laboratoriais foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis usando a diferença dos valores entre os momentos (M1-M0 e M2-M1), afim de excluir o vies de variação entre os grupos. Em associação foi utilizado o teste de Wilcoxon para checar a significância a cada 2 grupos. O nível de significância de 5% para análises biológicas foi utilizado nesse estudo.

Resultados

Não houve alterações significativas nos valores hematológicos e hemostáticos neste presente estudo. Os resultados estão apresentados nas tabelas que seguem os valores da tromboelastometria com agonista da via extrínseca (Tabela 1), tromboelastometria com agonista da via intrínseca (Tabela 2) e os valores hematológicos (Tabela 3).

Tabela 1. Valores de tromboelastometria ativada com agonista da via extrínseca, para cada momento por grupo, demonstrados por mediana \pm desvio padrão

	Momento	Grupo I (Controle)	Grupo II (Tratados)
ExTC (s)	0	172 \pm 15,10	136 \pm 20,92
	1	175 \pm 71,18	155 \pm 30,69
	2	154,5 \pm 32,70	121 \pm 7,05
ExCFT (s)	0	52 \pm 7,79	49 \pm 11,71
	1	48 \pm 142,26	66 \pm 13,65
	2	44,5 \pm 37,05	48 \pm 3,35
ExALFA (°)	0	80 \pm 1,50	80 \pm 1,75
	1	80 \pm 5,23	77 \pm 2,11
	2	81 \pm 3,89	80 \pm 0,62
ExMCF (mm)	0	72 \pm 1,72	67 \pm 1,18
	1	73 \pm 4,00	65 \pm 1,16
	2	72 \pm 1,82	69 \pm 1,27

Tabela 2. Valores de tromboelastometria ativada com agonista da via intrínseca, para cada momento por grupo, demonstrados por mediana \pm desvio padrão

	Momento	Grupo I	Grupo II
		(Controle)	(Tratados)
InTC (s)	0	803 \pm 443,36	705 \pm 227,74
	1	893 \pm 358,03	1076 \pm 117,04
	2	495 \pm 218,49	362 \pm 63,76
InCFT (s)	0	258 \pm 241,59	186 \pm 174,95
	1	311 \pm 134,11	514 \pm 143,53
	2	184,5 \pm 328,90	128 \pm 25,73
InALFA (°)	0	55 \pm 5,84	60 \pm 6,71
	1	53 \pm 5,58	44 \pm 5,89
	2	60 \pm 5,14	68 \pm 2,87
InMCF (mm)	0	62 \pm 3,02	59 \pm 4,20
	1	62 \pm 3,52	53 \pm 2,10
	2	64,5 \pm 3,07	62 \pm 1,77

Tabela 3. Valores hematológicos de cada momento por grupo demonstrados por mediana \pm desvio padrão

	Momento	Grupo I (Controle)	Grupo II (Tratados)
Hematócrito (%)	0	30 \pm 0,89	30 \pm 0,69
	1	30 \pm 0,92	28 \pm 0,72
	2	29 \pm 0,78	28 \pm 0,41
Trombócitos (/ μ L)	0	21715 \pm 3038,67	21715 \pm 1965,9
	1	26260 \pm 2916	26512,5 \pm 2236,7
	2	25376,25 \pm 3461,76	20200 \pm 3272,56
Leucócitos (/ μ L)	0	13635 \pm 3381,65	8080 \pm 956,80
	1	11362,5 \pm 1639,20	8332,5 \pm 663,25
	2	10478 \pm 954,58	7322,5 \pm 697,40
Hemácias (/ μ L)	0	2191700 \pm 115166	2004850 \pm 59784,51
	1	1959400 \pm 72835,5	1929100 \pm 59025,4
	2	1954350 \pm 111444,3	1727100 \pm 50344,57
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	0	3 \pm 0,15	3 \pm 0,07
	1	3 \pm 0,21	2,8 \pm 0,08
	2	3 \pm 0,06	2,8 \pm 0,07

Discussão

O distúrbio hemostático por deficiência da vitamina K é causado pela não ativação dos fatores VII, IX, X e da protrombina da cascata de coagulação, ocorrendo assim um prolongamento no início da formação do coágulo. Essa

alteração pode ser avaliada laboratorialmente por meio de testes que determinam o tempo levado pela amostra para a formação do coágulo. Esses testes podem utilizar plasmas citratados como é no caso do tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca ou via do fator tecidual, e do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), que avalia a via intrínseca da coagulação ou via de contato. O TP funciona como melhor marcador para as aves já que a via extrínseca é mais bem definida nesses animais. Além disso, a variação entre espécies dos mecanismos relacionados à via intrínseca ainda não está bem esclarecida. Há hipóteses de que as aves possuam uma fraca via de contato ou mesmo uma via alternativa (Harr, 2010; Lumeij, 2008).

A deficiência de fatores pode ser observada na tromboelastometria, dependendo o grau de intensidade, pois esta técnica inclui a avaliação das duas vias de ativação da coagulação. Nielsen et al. (2005) demonstraram o perfil da coagulação intrínseca e extrínseca por tromboelastografia de plasmas deficientes de fatores de coagulação, e concluíram que a deficiência dos fatores afetam diferentes parâmetros da tromboelastografia dependendo tanto do fator como da via de ativação. Deficiências com níveis de atividade < 1% para os fatores VII e X impedem a formação de coágulo ativado por fator tecidual. Na deficiência do fator II ou protrombina (< 2% de atividade) não houve a formação do coágulo em ambas as vias. O prolongamento no tempo para a formação do coágulo é proporcional à intensidade da deficiência, e sendo variável de acordo com a resposta de cada fator.

A deficiência de vitamina K provocada pela sulfaquinoxalina é documentada na literatura e considerada uma das causas de hemorragia em frangos de corte (Harr, 2010; Lumeij, 2008). Em nosso estudo, a sulfaquinoxalina administrada em doses terapêuticas de 30 mg/kg não foi capaz de provocar um estado de hipocoagulabilidade significativo, mesmo em cinco dias de tratamento, um período superior ao comumente utilizado que é de três dias. Houve um prolongamento não significativo do tempo de formação do coágulo (CFT) nas primeiras 48 horas em ambas as vias e logo após um retorno a valores semelhantes aos iniciais.

Contudo a coagulação é um mecanismo multifatorial que sofre a interferência de diferentes fatores como a coleta, tempo de armazenamento, temperatura entre outras. A avaliação da hemostasia em sangue total deve ser criteriosa, especialmente em aves por não apresentarem protocolos definidos que estabeleçam um padrão adequado.

Referências

Claver, J.A. and A.I.E. Quaglia. 2009. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *J Exot Pet Med.* 18 (2):87-97.

Denson, K.W.E. 1976. The preparation of general reagents and coagulation factors. Pages 657-669 in *Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis.* R. Biggs, ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Harr, K.E. 2010. Overview of Avian Hemostasis. Pages 703-707 in *Schalm's Veterinary Hematology.* D.J. Weiss and K.J. Wardrop, ed. Blackwell Publishing Ltd.

Lumeij, J.T. 2008. Avian Clinical Biochemistry. Pages 839-872 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* J.J. Kaneko, J.W. Harvey and M.L. Bruss, ed. Academic Press.

Nielsen, V.G.; B.M. Cohen and E. Cohen. 2005. Effects of coagulation factor deficiency on plasma coagulation kinetics determined via thrombelastography®: critical role of fibrinogen and factors II, VII, X and XII. *Acta Anaesthesiol Scand.* 49:222-231.

Paes, A.C. Sulfonamidas. 2012. Pages 344-354 in: *Farmacologia Veterinária.* C.M. Barros and L.C. Di Stasi, ed editora Manole Ltda.

Powers, L.V. 2000. Avian Hemostasis. Pages 35-46 in *Laboratory Medicine of Avian and Exotic Pets.* A.M. Fudge, ed. W. B. Saunders Company.

Preusch, P.C.; S.E. Hazelett and K.K. Lemasters. 1989. Sulfaquinoxaline inhibition of vitamin K epoxide and quinone reductase. *Arch Biochem Biophys.* 269 (1):18-24.

Thomson, A.E.; E.J. Squires and P.A. Gentry. 2002. Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. *Brit Poult Sci.* 43: 313-321.

Zuckerman, L.; E. Cohen; J.P. Vagher; E. Woodward and J.A. Caprini, 1981. Comparison of thromboelastography with common coagulation tests. *Thromb Haemost (Stuttgart).* 46 (4): 752-756.

4. DISCUSSÃO GERAL

Diversos modelos animais são usados para os estudos da hemostasia. Para o avanço da medicina veterinária e também a humana. São realizadas pesquisas básicas e aplicadas que utilizam animais como modelos de experimentação, que funcionam como um sistema substituto utilizado para acessar de forma mais fidedigna os processos biológicos comuns aos organismos, como é o caso dos mecanismos moleculares e celulares da hemostasia (*Brooks et al., 2011*).

O processo fisiológico da coagulação nas aves assemelha-se ao que ocorre nos mamíferos (*Harr, 2010; Powers, 2000*), no entanto, todas essas interações decorrem da propagação de mecanismos interdependentes em um conjunto de complexas interações entre células, enzimas, cofatores enzimáticos, inibidores de proteases e não-proteases e proteínas de matriz. Essas interações devem ser analisadas com critério, e extrapolação dos dados obtidos de modelos animais, devem partir de uma seleção adequada para a validade e o significado desses resultados. Devem ser considerados a anatomia, a biologia celular e molecular, a fisiologia e a bioquímica que será comparada (*Brooks et al., 2011*).

Tanto na medicina humana quanto na veterinária, o interesse no uso da tromboelastometria vem aumentando, especialmente pelo potencial desta avaliação em captar eventos hemorrágicos e trombóticos com antecipação (*Wiinberg e Kristensen, 2010*). Esta avaliação vem sendo utilizada na medicina veterinária no acompanhamento clínico de animais como cavalos e cães. Sua aplicação também é citada em vacas, porcos, ovelhas, ratos, porquinhos-da-Índia e em algumas espécies de peixes. Contudo ainda não existem protocolos apropriados para o uso clínico nessas espécies (*Kol e Borjesson, 2010*), e a aplicação de testes utilizando a participação celular na análise da hemostasia, exige maior consideração com o local de coleta do sangue, o volume da amostra e a viabilidade de reagentes espécie-específico ou que promovam reações cruzadas (*Brooks et al., 2011*).

5. CONCLUSÕES GERAIS

Contudo, a hemostasia de aves necessita uma maior compreensão para a medicina veterinária. Um maior conhecimento relacionado ao funcionamento natural do processo de coagulação desses animais e a descoberta de distúrbios hemostáticos e suas fisiopatologias, representam a finalidade de melhor abordar clinicamente esses pacientes.

A medicina de aves ainda carece de uma amplificação da abordagem diagnóstica na patologia clínica veterinária, especialmente em se tratando de coagulação e seus distúrbios.

A tromboelastometria é uma metodologia eficiente em detectar as alterações viscoelásticas do sangue que sofreu a influência de temperaturas e especificidade de agonistas. O limitante relacionado aos métodos de avaliação laboratorial da coagulação, é a disponibilidade de encontrar comercialmente reagentes homólogos para esses pacientes. Avanços mais precisos devem ser realizados para melhor compreender os mecanismos do equilíbrio e desequilíbrio da coagulação desses animais.

6. BIBLIOGRAFIAS

AWADHIYA, R.P.; VEGAD, J.L; KOLTE, G.N. Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon. **Research in Veterinary Science**, v.29, p.120-122, 1980.

BANFIELD, D.K.; MACGILLIVRAY, R.T.A. Partial characterization of vertebrate prothrombin cDNAs: amplification and sequence analysis of the B chain of thrombin from nine different species. **Proceedings of National Academy of Science**, v.89, p.2779-2783, 1992.

BROOKS, M.B.; STOKOL,T.; CATALFAMO, J.L. Comparative hemostasis: animal models and new hemostasis tests. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.31, p.139-159, 2011.

BOUDREAUX, M.K. Thrombopoiesis. In: **WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology**. Blackwell Publishing Ltd, 6ª edição, capítulo 9, p.56-60, 2010.

CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. Hematology of birds. In: **CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. Avian & Exotic Animal Hematology & Cytology**. Blackwell Publishing Ltd, 3ª edição, capítulo 1, p.3-50, 2007.

CLAVER, J.A. El trombocito aviar. **Investigación Veterinaria**, v.7 (1), p.139-146, 2005.

CLAVER, J.A.; QUAGLIA, A.I.E. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.18 (2), p.87-97, 2009.

DAM,H. The antihaemorrhagic vitamin of the chick.: occurrence and chemical nature. **Nature**, v.135, p.652-653, 1935.

DaMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; DE SOUZA, W. Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.30 (2), p.271-277, 1998.

DAVIDSON, C.J.; HIRT, R.P.; LAL, K.; SNELL, P.; ELGAR, G.; TUDDENHAM, E.G.D.; MCVEY, J.H. Molecular evolution of the vertebrate blood coagulation network. **Thrombosis and Haemostasis**, v.89, p.420-428, 2003.

DI CERA, E.; DANG, Q.D.; AYALA, Y.M. Molecular mechanisms of thrombin function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, p.701-730, 1997.

DOERR, J.A.; HAMILTON, P.B. New evidence for intrinsic blood coagulation in chickens. **Poultry Science**, v.60, p.237-242, 1981.

DOERR, J.A.; WYATT, R.D.; HAMILTON, P.B. Investigation and standardization of prothrombin times in chickens. **Poultry Science**, v.54, p.969-980, 1975.

DOOLITTLE, R.F. Coagulation in vertebrates with a focus on evolution and inflammation. **Journal of Innate Immunity**, v.3, p.9-16, 2010.

DU PLESSIS, L.; VAN WILPE, E. Thrombocyte morphology and morphometric observations in two culture species. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38 (3), p.316-320, 2009.

FOLEY, J.H.; BUTENAS, S.; MANN, K.G.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.E. Measuring the mechanical properties of blood clots formed via the tissue factor pathway of coagulation. **Analytical Biochemistry**, v.422 (1), p.46-51, 2012.

FROST, C.L.; NAUDÉ, R.J.; MURAMOTO, K. Ostrich antithrombin III: kinetics and mechanism of inhibition of ostrich thrombin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.1164-1171, 2002.

FROST, C.L.; NAUDÉ, R.J.; OELOFSEN, W.; JACOBSON, B. Comparative blood coagulation studies in the ostrich. **Immunopharmacology**, v.45, p.75-81, 1999.

FROST, C.; NAUDÉ, R.; OELOFSEN, W.; MURAMOTO, K.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T. Purification and characterization of ostrich prothrombin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.32, p.1151-1159, 2000.

FUDGE, A.M. Avian Complete Blood Count. In: **FUDGE, A.M. Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. W. B. Saunders Company, capítulo 2, p.9-18, 2000.

GENTRY, P.A. Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal**, v.168, p.238-251, 2004.

HARR, K.E. Overview of Avian Hemostasis. In: **WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology**. Blackwell Publishing Ltd, 6ª edição, capítulo 91, p.703-707, 2010.

HAWKEY, C.; HART, M.G. An analysis of the incidence of hyperfibrinogenaemia in birds with bacterial infections. **Avian Pathology**, v.17, p.427-432, 1988.

KOL, A.; BORJESSON, D.L. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39 (4), p.405-416, 2010.

LANE, R. Basic techniques in pet avian clinical pathology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, p.1157-1179, 1991.

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: **KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press, 6ª edição, capítulo 28, p. 839-872, 2008.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A.; RODRÍGUEZ, A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? **Microscopy Research and Technique**, v.57, p.491-497, 2002.

McMICHAEL, M.A.; SMITH, S.A. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40 (1), p.1-13, 2011.

OLDENBURG, J.; MARINOVA, M.; MÜLLER-REIBLE, C.; WATZKA, M. The vitamin K cycle. **Vitamins and Hormones**, v.78, p.35-62, 2008.

POWERS, L.V. Avian Hemostasis. In: **FUDGE, A.M. Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. W. B. Saunders Company, capítulo 5, p.35-46, 2000.

STINSON, R.S., MASHALY, M.M.; GLICK, B. Thrombocyte migration and the release of thrombocyte inhibitory factor (ThrIF) by T and B cells in the chicken. **Immunology**, v.36, p.769-773, 1979.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Hemostasis. In: **STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. Blackwell Publishing Ltd, 2ª edição, capítulo 5, p.259-322, 2008.

STURRIE, P.D. Sangre: elementos formes, propiedades físicas y coagulación. In: **STURRIE, P.D. Fisiología Aviar**. Zaragoza, 2ª edição, capítulo 1, p.5-25, 1967.

THOMSON, A.E.; SQUIRES, E.J.; GENTRY, P.A. Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. **British Poultry Science**. v.43, p.313-321, 2002.

WIINBERG, B.; KRISTENSEN, A.T. Thromboelatrography in veterinary medicine. **Comparative Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.36,n.7, p.747-756, 2010.