

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

APLICAÇÃO DE TESTES HEMOSTÁTICOS NA
AVALIAÇÃO DO RISCO TROMBÓTICO EM CADELAS
COM CARCINOMA MAMÁRIO

THAYS DE CAMPOS TRENTIN

BOTUCATU-SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

APLICAÇÃO DE TESTES HEMOSTÁTICOS NA
AVALIAÇÃO DO RISCO TROMBÓTICO EM CADELAS
COM CARCINOMA MAMÁRIO

THAYS DE CAMPOS TRENTIN

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

Orientadora: Prof^ª. Adj. Regina Kiomi
Takahira.

BOTUCATU-SP

2014

Nome: Thays de Campos Trentin

Título: APLICAÇÃO DE TESTES HEMOSTÁTICOS NA AVALIAÇÃO DO RISCO TROMBÓTICO EM CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Regina Kiomi Takahira

Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profª Drª Sheila Canevese Rahal

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Andrigo Barbosa De Nardi

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

FCA-UNESP-Jaboticabal

Data da defesa: 30 de outubro de 2014.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Regina, por toda ajuda ensinamentos, apoio, compreensão em momentos difíceis, confiança, e oportunidade de trabalhar ao seu lado. Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento.

À Deus, por estar sempre ao meu lado, por me dar sabedoria e por me mostrar sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus pais Maria Helena e Ivaldo, obrigado pelas conversas, atenção, conselhos infalíveis, pelo elogio que só vem de quem ama e principalmente por acreditarem em meu sonho e vive-lo junto comigo.

Ao meu marido André que permaneceu sempre ao meu lado durante todo este período, mesmo durante esses dois anos de distância, sempre me apoiando, ajudando e se mostrando um grande amigo e companheiro, dividindo as conquistas e angustias dessa etapa de minha vida.

Aos meus irmãos Fábio e Junior por todos os conselhos e apoio.

Aos residentes do Laboratório Bob, Carol, Cristiane e Jussara por toda a ajuda no processamento das amostras e companheirismo.

Ao prof. Raimundo pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Andrigo e Sheila por fazerem parte da minha banca de mestrado.

Aos amigos residentes e ex-residentes e pós da família LCV que vou guardar com carinho no coração por toda a vida Bruno, Carol, Carol Kimi, Kati, Lesma, Poka, Nara e Soraya por toda amizade, aprendi muito com vocês e recebi muita ajuda.

Às amigas Camila, Claudinha e Dani Silvano, por toda amizade, companheirismo, meninas sem a grande ajuda de vocês este trabalho não se concretizaria, vocês são demais, minha gratidão por vocês será eterna.

À grande amiga de sempre Dani Dabus, que desde a graduação vem me acompanhando nesta jornada. Obrigada por estar presente nos momentos difíceis e alegres, amiga pra toda vida.

À professora Danieli Brolo Martins, Joyce, Evelyn, Fabrício, Léo por todo apoio, incentivo e paciência, durante a reta final da minha dissertação.

Aos pós-graduandos Luciana e Washington por toda ajuda durante o experimento.

Aos funcionários do Laboratório, Adriana, Marcio, Marcos e Rosana.

Aos proprietários de todos os cães que participaram deste estudo.

Finalmente, gostaria de agradecer à UNESP/Botucatu pelo ensino de qualidade, sem os quais essa dissertação dificilmente poderia ter sido realizada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das raças dos animais com carcinoma mamário.....	38
Tabela 2 - Distribuição dos resultados das glândulas mamárias acometidas...	38
Tabela 3 - Média dos resultados laboratoriais de hemograma e bioquímica sérica dos grupos 1, 2 e valores de referência.....	39
Tabela 4 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da agregação plaquetária dos grupos 1 e 2.....	39
Tabela 5 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis do TP e TTPa dos grupos 1 e 2.....	40
Tabela 6 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da tromboelastometria dos grupos 1 e 2.....	40
Tabela 7 – Distribuição da mediana, e intervalo de referência das variáveis da tromboelastometria dos grupos 1 e 2.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Variação média do parâmetro CT (tempo de coagulação) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas (** $p < 0,01$).....42
- Figura 2** – Variação média do parâmetro CFT (tempo de formação do coágulo) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$43
- Figura 3** – Variação média do parâmetro ângulo α dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$44
- Figura 4** – Variação média do parâmetro MCF (Firmeza Máxima do Coágulo) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0.05$).....44
- Figura 5** – Variação média do parâmetro ML (Lise Máxima) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$45

LISTA DE ABREVIATÖES E SIGLAS

% - por cento

µL – microlitros

°C – graus Celsius

ADP – difosfato adenosina

ALT – alanina amino transferase

CID – coagulação intravascular disseminada

CFT – tempo de firmeza máxima do coágulo

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CT – tempo de coagulação

EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético

et al – e colaboradores

FA – fosfatase alcalina

g/dL – gramas por decilitro

GGT – gama glutamil transferase

MCF – Firmeza máxima do coágulo

mg/dL – miligramas por decilitro

ML – Lise máxima

mL – mililitros

mm – milímetros

cm - centímetros

mol/L – mol por litro

NaCl – cloreto de sódio

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDFs – produtos de degradação da fibrina

PRP – plasma rico em plaquetas

RPM – rotações por minuto

s - segundos

SRD – sem raça definida

t-PA – plasminogênio-tecidual

µ-PA – substância ativadora do plasminogênio

TEG - tromboelastografia

TEM – tromboelastometria

TEV – tromboembolismo venoso

TEP- tromboembolismo pulmonar

TP – tempo de protrombina

TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada

UI/L – unidade internacional por litro

VCM – volume corpuscular médio

SUMÁRIO	Página
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Seleção dos animais.....	31
4.2 Delineamento experimental.....	31
4.3 Colheita das amostras.....	32
4.4 Exames laboratoriais.....	32
4.4.1 Hemograma.....	32
4.4.2 Perfil bioquímico.....	33
4.4.3 Tromboelastometria.....	33
4.4.4 Agregação plaquetária.....	33
4.4.5 Coagulograma.....	34
4.4.6 Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF).....	34
4.4.7 Histopatológico.....	34
4.5 Exame radiográfico.....	34
4.6 Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS.....	53
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	60

TRENTIN, THAYS DE CAMPOS. **Aplicação de testes hemostáticos na avaliação do risco trombótico em cadelas com carcinoma mamário.** Botucatu, 2014. 96p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

As neoplasias mamárias são consideradas os tumores mais frequentes em cadelas, podendo frequentemente predispor estes animais a complicações hemostáticas secundárias à neoplasia. Neste contexto, a trombose é uma das maiores alterações hemostáticas de pacientes com câncer, e muitas vezes é descoberta tardiamente. Testes hemostáticos vêm sendo utilizados na medicina humana para um diagnóstico mais precoce, permitindo um melhor prognóstico das condições neoplásicas. Entretanto, em cães com neoplasias raramente utilizam-se testes para diagnosticar estados de hipercoagulabilidade. Na medicina veterinária a correlação entre neoplasia e hipercoagulabilidade tem sido um achado constante em cães, porém na maioria das vezes sem alterações clínicas evidentes como ocorre na medicina. A necessidade da avaliação hemostática para se estabelecer um melhor protocolo terapêutico e prognóstico nos diferentes tipos de neoplasia fica evidente nestes pacientes. Com o objetivo de avaliar o perfil hemostático e os possíveis sinais de hipercoagulabilidade em cadelas com carcinoma mamário foram selecionadas 30 cadelas, sendo 15 fêmeas saudáveis (grupo controle) e 15 fêmeas com carcinoma mamário, confirmada por exame citológico e histopatológico. Ambos os grupos foram submetidos à avaliação hemostática por meio do teste da tromboelastometria (intem, extem, fibtem), agregação plaquetária, TP e TTPa. Os resultados foram submetidos à análise descritiva e, em seguida, foi realizada a comparação das médias dos grupos para as variáveis, pelo teste T, ao nível de significância de $p < 0,01$ e $p < 0,05$. Observou-se diferença significativa nos testes hemostáticos de rotina resultando em hiperagregabilidade plaquetária e aumento do TP. Na tromboelastometria houve diminuição significativa no CT (EXTEM, FIBTEM), CFT (INTEM, EXTEM), e ML (INTEM, EXTEM) e elevação no ângulo α (INTEM EXTEM) e MCF (INTEM, EXTEM). Após a análise dos resultados e nas condições deste trabalho, conclui-se que cadelas com carcinoma mamário apresentam maior

risco trombótico associado a um estado de hipercoagulabilidade e hiperagregabilidade plaquetária.

Palavras-chave: cães, hemostasia, neoplasia mamária, tromboembolismo tromboelastometria.

TRENTIN, THAYS DE CAMPOS. **Application of hemostatic tests in the thrombotic risk in dogs with mammary carcinoma.** Botucatu, 2014. 96p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Mammary tumor are considered the most common tumors in dogs and can often predispose these animals to hemostatic complications secondary to neoplasia. In this context, thrombosis is a major hemostatic abnormality in patients with cancer, that is often discovered late. Hemostatic tests have been used in human medicine for an earlier diagnosis, allowing a better prognosis of neoplastic conditions. However, in dogs with cancer tests to diagnose hypercoagulable states are rarely used. In veterinary medicine the correlation between cancer and hypercoagulability has been a constant finding in dogs, but most of the times, unlike human medicine, it is devoided of clear clinical signs. The need for hemostatic evaluation to establish a better treatment protocol and prognosis in different types of cancer is evident in these patients. Aiming to evaluate the hemostatic profile and the possible hypercoagulable states in dogs with mammary carcinoma, 30 female dogs were selected, 15 healthy female (control group) and 15 female dogs with breast carcinoma confirmed by cytology and histopathology. Both groups were submitted to underwent hemostatic evaluation by the tromboelastometry (INTEM, EXTEM, FIBTEM), platelet aggregation, PT and aPTT. The results collected, were submitted to descriptive analysis, and then the means between groups was compared by the t test at the level $p < 0,01$ and $p < 0,05$. The results, showed significant differences in hemostatic routine tests resulting in increased platelet aggregability and TP. Thromboelastometry had demonstrated a significant reduction in CT (EXTEM, FIBTEM), CFT (INTEM, EXTEM), and ML (INTEM, EXTEM) and an elevation in α angle (INTEM, EXTEM) and MCF (INTEM, EXTEM). It is concluded that dogs with mammary carcinoma present a higher thrombotic state risk associated to a hypercoagulable state.

Keywords: dogs, hemostasis, mammary tumors, thromboelastometry thromboembolism.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O risco tromboembólico de algumas doenças é reconhecido e estudado há muitos anos, e vem ganhando notoriedade por contribuir na evolução de muitas doenças (MEIS e LEVI, 2006). Ainda assim, são poucos os estudos do efeito das neoplasias sobre a hemostasia em cães (AKAY et al., 2009; ANDREASEN et al., 2012; KRISTESEN et al., 2008). A ausência de uma investigação sistemática dos estados de hipercoagulabilidade pode mascarar a real importância da neoplasia sobre o risco tromboembólico (SAAVEDRA et al., 2011).

Algumas situações como a malignidade de um tumor podem induzir um estado pró-trombótico e tornar o tratamento das neoplasias difícil. Em humanos, cerca de 15 a 20% de todos os pacientes com câncer apresentam riscos de desenvolver trombose durante o curso da doença (HOFFMAN et al., 2001). Na medicina veterinária, os estados de hipercoagulabilidade em pacientes com câncer ainda não são bem reconhecidos, tornando difícil a identificação *antemortem* dessa condição (KRISTENSEN et al., 2008). Em um estudo com cães após o óbito por doenças de causa tromboembólica, o câncer foi o achado mais comum sendo observado em 41% dos pacientes (JOHNSON et al., 1999).

A incidência de trombose associada ao câncer varia de acordo com o tipo de tumor primário. Apesar da difícil identificação das disfunções hemostáticas provocadas por neoplasias, o tromboembolismo venoso (TEV), tromboembolismo pulmonar (TEP) e a coagulação intravascular disseminada (CID) estão entre as mais frequentes (MEIS e LEVY, 2006). Humanos com tumor primário de mama apresentam maiores chances de desenvolvimento de TEV em comparação com a população em geral (CHEW et al., 2007).

Em cães, poucos estudos têm sido publicados (AKAY et al., 2009; ANDREASEN et al., 2012; KRISTESEN et al., 2008; SAAVEDRA et al., 2011), porém os resultados sugerem que mais pesquisas devem ser realizadas utilizando diferentes tipos de neoplasias malignas até que seja estabelecido o potencial trombótico de cada neoplasia, semelhante ao que ocorre na medicina. Por ser a neoplasia maligna de maior prevalência em cadelas (MORRIS e DOBSON, 2007; OLIVEIRA et al., 2003), o estudo da neoplasia

mamária torna-se interessante para avaliação do efeito do câncer na hemostasia.

Para avaliar os efeitos que as neoplasias provocam na hemostasia alguns testes como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Dímeros-D e fibrinogênio vem sendo realizados para antecipar o diagnóstico desta condição e aumentar a sobrevivência dos pacientes (AKAY, et al., 2009; ANDREASEN, et al., 2012). Entretanto, testes mais específicos como a tromboelastometria (TEM), que é uma análise mais sensível na detecção de estados de hipo ou hipercoagulabilidade, permite a avaliação integral do sistema hemostático (KOL e BORJESSON, 2010), o que nos possibilita a determinação real do risco tromboembólico associado ao carcinoma mamário.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil hemostático e detectar possíveis sinais de hipercoagulabilidade por meio do teste de agregação plaquetária, tromboelastometria, TP e TTPa em cadelas com carcinoma mamário.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

O sistema hemostático abrange as plaquetas, vasos sanguíneos, o fator de von Willebrand, os fatores de coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico. A ativação dos fatores de coagulação resulta na formação de um tampão hemostático, constituído de plaquetas e fibrina, que deve manter-se restrito ao local da lesão vascular, de forma a prevenir a coagulação disseminada e a doença tromboembólica. Duas vias de coagulação são reconhecidas: a via extrínseca, ou via do fator tecidual, e a via intrínseca, ou via de ativação por contato. Estas duas vias da cascata de coagulação convergem para uma via comum, a qual leva à geração da principal enzima de coagulação, a trombina. Esta não apenas catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina, mas também exerce um papel fundamental na amplificação da cascata pela ativação por *feedback* de fatores de coagulação em vários locais (FURIE e FURIE, 2008).

Vários mecanismos fisiológicos antitrombóticos e/ou anticoagulantes e fibrinolíticos atuam, em conjunto, para prevenir a formação de coágulos sob circunstâncias normais. A atividade otimizada de cada um dos sistemas anticoagulantes depende da integridade do endotélio vascular. Os anticoagulantes naturais, cujos principais representantes são a antitrombina, anteriormente denominada antitrombina III, e as proteínas C e S, atuam principalmente por meio da degradação de fatores da coagulação. Já o sistema fibrinolítico atua sobre a fibrina formada no local da lesão vascular, degradando-a. No sistema fibrinolítico, a plasmina que é uma forma ativa do plasminogênio, atua na degradação da fibrina em produtos da degradação da fibrina (PDFs) (FRANCHINI et al., 2010). Desta forma, em condições normais, os mecanismos anticoagulantes prevalecem sobre os pró-coagulantes (VIEIRA et al., 2007). Estes sistemas servem para manter o sangue em um estado de fluidez normal sob condições fisiológicas, e ainda para prevenir perdas sanguíneas importantes no momento da lesão (JACOBY et al., 2001).

O sistema hemostático normal pode sofrer alterações nos mecanismos anticoagulantes favorecendo o desenvolvimento da trombose. Os elementos da tríade de Virchow são fatores predisponentes para formação do coágulo. Mudança em dois desses elementos pode gerar um quadro trombótico

(KUMAR et al., 2010). Os fatores são: lesão endotelial, estase vascular e hipercoagulabilidade. Em pequenos animais, as principais causas de trombose são: lesão do endotélio vascular associada a infecções (dirofilariose, sepse, endocardite bacteriana), ou por deposição de complexos imunes; injúria ao endocárdio e estase sanguínea resultante de cardiopatias (cardiomiopatia hipertrófica felina); trombocitopatias (diabetes mellitus); e distúrbios associados à hipercoagulabilidade ou hipofibrinólise (hiperadrenocorticismo, neoplasias ou deficiência de antitrombina secundária a glomerulopatia) (BAINES et al., 2001; BURNS et al., 1981; FELDMAN e RASEDEE, 1986; JACOBY et al., 2001; LARUE e MURTAUGH, 1990; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001; TESHIMA et al., 2008).

As neoplasias têm sido associadas à trombose, o que agrava as condições clínicas dos pacientes, com consequente aumento da morbidade e mortalidade (CHEW et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a trombose é desenvolvida em pacientes com neoplasia é multifatorial, alterando os três aspectos da tríade de Virchow, contudo a fisiopatologia deste fenômeno ainda não está completamente esclarecida (BOCACCIO e COMOGLIO, 2009). Uma série de mecanismos diretos e indiretos tem sido relacionados à fisiopatologia dos distúrbios de coagulação em pacientes com neoplasias. Inicialmente ocorre injúria no endotélio, ativação de plaquetas, ativação da coagulação e redução das funções anticoagulantes. As células tumorais ativam o sistema hemostático por atuação direta, produzindo moléculas com ações pró-coagulantes, fibrinolíticas e pró-agregantes, e indiretamente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (AKAY et al., 2009; CHEN et al., 2001; NASCHITZ et al., 1993; RICKLES e FALANGA; 2001).

Neste contexto ocorre síntese de mediadores (peptídeos ou polipeptídios), onde se sobressaem moléculas pró-coagulantes como o pró-coagulante neoplásico e o fator tecidual. A expressão destas moléculas podem estar relacionadas à produção de interleucina 1 β e o fator de necrose tecidual (citocinas inflamatórias). Estas citocinas produzidas por células neoplásicas estimulam os monócitos e as células endoteliais íntegras a expressarem o fator tecidual em sua membrana externa, ativando desta maneira a cascata de

coagulação (BROMBERG e CAPPELLO, 1999; HILLEN, 2001; LEONE et al., 2001) .

O fator pró-coagulante neoplásico é expresso apenas em tecidos neoplásicos e em tecido fetal de humanos, ativando diretamente o fator X, não necessitando da ativação prévia do fator VII. Vários tipos de pró-coagulantes neoplásicos podem ser encontrados nas células dos diferentes tipos de neoplasias (HOFFMAN et al., 2001).

Algumas neoplasias produzem ainda moléculas fibrinolíticas como o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), uroquinase, substância ativadora do plasminogênio (u-PA) e inibidores do ativador do plasminogênio (DANO et al., 2005).

A hiperatividade plaquetária também vem sendo documentada em vários tipos de tumores, e têm sido sugerido que atividade inadequada de plaquetas pode promover metástases. O aumento de micropartículas de plaquetas foram documentadas em vários tipos de neoplasias; estas micropartículas proporcionam maior exposição das superfícies de fósfolipídeos e aumento da expressão do fator tecidual, podendo estar ligados ao desenvolvimento de metástases e risco de trombose. Além disso, as citocinas induzidas por lesão endotelial podem causar mudanças no antígeno do fator de von Willebrand, contribuindo no aumento da adesão plaquetária, elevando o risco de tendência trombótica (SILVA e D'AMICO, 2010).

Além dos fatores que contribuem para um estado de hipercoagulabilidade, a compressão externa dos vasos por tumores também podem contribuir para a trombose (DANO et al., 2005).

Armand Trousseau foi o primeiro a mostrar a relação entre câncer e trombose por meio da observação de trombose venosa em pacientes humanos com suspeita de neoplasia. No entanto, devido à deficiência de métodos diagnósticos eficazes na época, essa observação não pôde ser comprovada (MEIS e LEVI, 2006).

Estima-se que cerca de 15 a 20% dos pacientes humanos com neoplasia terão o diagnóstico de evento trombótico durante a evolução da doença (HOFFMAN et al., 2001; SOUSOU e KHORANA, 2009). Entretanto, apenas 1,5% dos pacientes com doença metastática no momento do diagnóstico desenvolvem sinais clínicos de TEV ou TEP, sendo maior a prevalência para

TEV (BLOM et al., 2006; CHEW et al., 2006). Ambas, no entanto, são subestimadas, uma vez que um estudo em necropsias mostrou a presença de trombose em 50% dos pacientes (HILLEN, 2001). A frequência de trombose também está relacionada amplamente com a evolução e o tipo da neoplasia (BICK et al., 1996; RICKLES e LEVINE, 1992), sendo considerada a segunda causa mais frequente de óbito em pacientes com câncer (SOUSOU e KHORANA, 2009).

Em alguns estudos realizados com causas de TEP em cães as neoplasias foram identificadas como a principal causa associada ao TEP (cerca de 30% e 41% dos casos) (JOHNSON et al., 1999; LARUE e MURTAUGH, 1990). Em gatos doenças cardíacas e neoplasias foram cerca de 41 e 35% (NORRIS et al., 1999; SCHERMERHORN et al., 2004).

Em cães as alterações hemostáticas causadas por neoplasias é pouco documentada diferentemente da medicina humana. O tromboembolismo raramente é diagnosticado *antemortem*, e as alterações hemostáticas subclínicas são descritas na literatura veterinária apenas para algumas neoplasias malignas (ANDREASEN et al., 2012; KRISTESEN, et al., 2008; SAAVEDRA, et al., 2011).

Os tumores primários de mama estão dentre as neoplasias que levam a um quadro trombótico em humanos (SOUSOU e KHORANA, 2009). Porém, em cães ainda não está claro se os tumores malignos mamários podem contribuir para o risco tromboembólico assim como ocorre em outras neoplasias. Os tumores mamários são responsáveis por cerca de 50% a 70% das neoplasias que acometem as cadelas (DALECK et al., 1998; JOHNSTON, 1993; MORRISON, 1998), tornando importante seu estudo.

Além da neoplasia outros fatores podem contribuir ainda mais para a evolução do quadro trombótico em pacientes oncológicos tais como: cateteres intravenosos (77%), corticoesteróides (48%), fármacos citotóxicos (38%), procedimentos cirurgicos (21%) e transfusão sanguínea (10%), agravando ainda mais o quadro clínico (JOHNSON et al., 1999).

A frequente ocorrência de tromboembolismo clinicamente silencioso e as complicações geradas por ele destaca a necessidade de protocolos de anticoagulação em medicina veterinária para a profilaxia, ao invés de

anticoagulação após a manifestação de sinais clínicos associados à trombose (KRISTESEN et al., 2008).

Inúmeros resultados de testes de coagulação anormais em pacientes com neoplasia foram descritos na medicina (SOUSOU e KHORANA, 2009). Cerca de 50% de pacientes com câncer e 90% dos pacientes com metástase apresentam anormalidades na coagulação detectadas por exames laboratoriais, sem trombose evidente (RICKLES e EDWARDS, 1983).

Grande parte dos pacientes humanos com neoplasias variadas apresentam alterações na coagulação como aumento dos fatores V, VIII, IX, XI e XII, além do prolongamento do TP e do TTPa e hiperfibrinogenemia (FERRIGNO et al., 2001). Entretanto, em um estudo realizado em cães por Akay et al. (2009), com tumores gastrointestinais, respiratórios e outros (renal, mesotelial ou de origem desconhecida), não houve alterações significativas nos testes de TTPa, TP e fibrinogênio.

Madewall et al. (1980) encontraram parâmetros de coagulação anormais em 83% dos cães com diversos tipos de tumores em estágio avançado, incluindo aumento de fibrinogênio, dependendo do tipo de neoplasia, trombocitopenia, prolongamento do TTPa e aumento dos produtos de degradação da fibrina (PDFs).

Em pesquisa realizada em cães por Saavedra et al. (2011), em neoplasias sem metástase, os animais com carcinomas apresentaram aumento no TTPa e fibrinogênio em comparação com os que apresentavam mastocitomas e linfomas, evidenciando que o tipo de neoplasia pode influenciar nos parâmetros hemostáticos. No grupo de cães com metástase notou-se aumento significativo de fibrinogênio, tanto em carcinomas quanto nos linfomas e mastocitomas.

Neste mesmo estudo, verificou-se que a trombocitose foi o achado mais comum nos 32 cães com carcinoma, em comparação com os 19 caninos saudáveis do grupo controle. Neste contexto, algumas pesquisas retrospectivas em cães com trombose também demonstraram correlação entre trombocitose e neoplasias malignas (LAFORCADE, 2012). Em outro estudo, as neoplasias também foram a principal condição associada aos casos de trombocitose (NEEL et al., 2012).

Na medicina humana, a contagem de plaquetas em pacientes com tumores têm se mostrado excelente ferramenta para o estabelecimento do prognóstico da doença, uma vez que pacientes com trombocitose apresentaram menor sobrevida devido à correlação com neoplasias sólidas malignas e maior chance de desenvolvimento de metástase (BUERGY et al., 2012).

Porém, em estudo retrospectivo com cães trombocitopênicos, a associação com neoplasias foi a quarta causa observada, principalmente em animais idosos (BOTSCH et al., 2009). Segundo Slichter et al. (1982), houve redução significativa na concentração de plaquetas em animais com metástase em comparação aos com tumores localizados, porém dentro dos valores de referência. Tal diminuição na contagem de plaquetas está possivelmente relacionada à interação tumor-plaqueta, onde ocorre ativação na agregação e aderência plaquetária resultando em remoção precoce da circulação. Entretanto, em estudos realizados por O'Donnell et al. (1981) com tumores espontâneos em cães, não foi constatada diferença significativa nas contagens de plaquetas entre animais com ou sem metástase e raramente foi observada trombocitopenia.

Desde a descoberta das plaquetas em 1881, existe uma série de estudos para a avaliação e entendimento da função plaquetária. As plaquetas são componentes importantes da hemostasia, possuindo papel-chave na formação de trombos devido a sua capacidade de adesão e acúmulo em lesões nos vasos sanguíneos (PATRONO et al., 2004; REBAR et al., 2005; NURDEN, 2007).

As plaquetas apresentam maior capacidade de agregar-se em pacientes com neoplasias malignas e metástase (MCNIEL et al., 1997). A hiperagregação das plaquetas pode causar a formação de um trombo e posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando à isquemia. A agregação plaquetária é uma análise que visa a monitoração da atividade plaquetária. Sua análise pode ser feita por meio do plasma rico em plaquetas (PRP) por turbidometria, onde por meio de variações ópticas do plasma rico em plaquetas mediante a adição de agonistas (difosfato adenosina (ADP), adrenalina, colágeno, ácido araquidônico) se quantifica a função plaquetária, ou por impedância elétrica em sangue total, onde um eletrodo é inserido em uma amostra de sangue citratado,

quantificando a variação da resistência elétrica à medida que as plaquetas nele se aderem e agregam por ação de agonistas (SILVA e D'AMICO, 2010). Em cães com neoplasias malignas, foi identificado presença de um aumento na agregabilidade sem correlação com a possibilidade de metástase (MCNIEL et al., 1997).

Para cães, a determinação dos níveis de Dímeros D é o teste mais utilizado, por ser o mais específico para verificar a fibrinólise (STOKOL, 2003). Em comparação à mensuração dos PDFs, a avaliação dos Dímeros D apresentou melhor sensibilidade para detectar alterações tromboembólicas (NELSON e ANDREASEN, 2003). Para cães com neoplasias, notou-se elevação significativa dos Dímeros D em pacientes com metástase em relação aos com tumores localizados (ANDREASEN et al., 2012).

A identificação de estados de hipercoagulabilidade é difícil, e nem sempre detectável por testes de coagulação de rotina, entretanto a tromboelastometria vem sendo usada com sucesso para identificar hipercoagulabilidade em cães (KOL & BORJESSON, 2010; OTTO et al., 2000; GOGGS et al., 2012) com parvovirose (OTTO, et al., 2000), anemia hemolítica imunomediada (GOGGS, et al., 2012) e neoplasia (ANDREASEN et al., 2012; KRISTENSEN, 2008).

A tromboelastometria e/ou tromboelastografia (TEG) (ANDREASEN et al., 2012; KRISTENSEN et al., 2008) é capaz de medir *in vitro* a função hemostática global de uma amostra de sangue, documentando a interação das plaquetas com proteínas da cascata de coagulação, desde o início da interação plaqueta-fibrina, da agregação plaquetária e do desenvolvimento do coágulo, até sua eventual lise (MAIA, et al., 2006).

Em 1940, a utilização da tromboelastometria foi iniciada por Hartert na Alemanha. Esta análise possibilita o fornecimento de informações acuradas da coagulação por um princípio de detecção óptica que monitora os movimentos do sangue por meio de um pino suspenso. Com a formação da fibrina, a oscilação do pino diminui e é captada a impedância da rotação por um sistema de transdução, que converte os momentos da coagulação em traços no gráfico. Os gráficos geram parâmetros como o tempo de coagulação que é dado pelo tempo a partir da ativação dos fatores de coagulação, com a cinética da fibrina e início da formação do coágulo. Essa alteração da viscoelasticidade do sangue com o pino suspenso indica também parâmetros como, a firmeza

máxima do coágulo e a fibrinólise. 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).

A ativação da coagulação na tromboelastometria pode ser realizada empregando alguns reagentes como: INTEM® (via de ativação da coagulação por contato); EXTEM® (via de ativação da coagulação com fator tecidual); FIBTEM® (via de ativação da coagulação com fator tecidual com inibição das plaquetas com a citocalasina) (KOL e BORJESSON, et al., 2010).

Kristensen et al. (2008) encontraram disfunção hemostática em 57% dos cães com neoplasia submetidos ao TEG. A análise por tromboelastografia demonstrou estados de hipercoagulabilidade semelhantes aos que ocorrem em pacientes humanos com câncer. Além disso, pacientes com tumores malignos apresentaram maior grau de disfunções hemostáticas comparados com pacientes com tumores benignos (ANDREASEN et al., 2012). A ocorrência de CID também é revelada pela tromboelastografia em cães com tumores sólidos (SAAVEDRA et al., 2011) e em pacientes com metástases (ANDREASEN et al., 2012).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Avaliar as possíveis tendências trombóticas em pacientes com carcinoma mamário por meio da tromboelastometria, agregação plaquetária, TP e TTPa.
2. Avaliar o uso da tromboelastometria, agregação plaquetária, TP, TTPa para a detecção de possível tendência trombótica em pacientes com carcinoma mamário.
3. Avaliar a participação das plaquetas, das vias intrínseca e extrínseca da coagulação e da fibrinólise em cadelas com carcinoma mamário.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FMVZ-UNESP/Botucatu-SP sob o protocolo nº32/2013.

Foram selecionados 15 cães, sem raça definida, fêmeas, provenientes do atendimento no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu-SP, apresentando carcinoma mamário previamente diagnosticado por exame citológico, seguido por exame histopatológico, e 15 cadelas saudáveis para compor o grupo controle, provenientes de proprietários voluntários.

Pacientes que foram detectados com tumores benignos ou com doenças concomitantes ao diagnóstico de carcinoma mamário que pudessem influenciar os resultados, foram excluídos do estudo, bem como animais submetidos ao tratamento com quimioterápicos e o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, dentro dos últimos 15 dias previamente as análises. Animais trombocitopênicos foram submetidos ao exame da PCR para *Ehrlichia* sp. Os animais positivos foram excluídos do estudo.

Os proprietários dos animais a serem utilizados no experimento assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para o uso dos animais.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em 2 grupos:

- 1- Fêmeas saudáveis sem neoplasia mamária (grupo controle: G1, número de 15 animais).
- 2- Fêmeas com carcinoma mamário (grupo carcinoma: G2, número de 15 animais).

As cadelas de ambos os grupos foram submetidas ao exame físico, hemograma, perfil bioquímico (ureia, creatinina, ALT - alamina amino transferase, FA - fosfatase alcalina, GGT - gama-glutamyl transferase, proteína total sérica, albumina e cálcio) e hemostático por meio da tromboelastometria, TP, TTPa, e

agregação plaquetária. Os momentos e análises foram semelhantes em ambos os grupos.

Os animais pertencentes ao grupo G2 foram submetidos ao exame citológico, seguido de exame histopatológico, para classificação do tipo tumoral. Foram realizadas radiografias torácicas e ultrassom abdominal para verificar presença de metástase em outros órgãos.

4.3 Colheita das Amostras

A colheita de sangue foi realizada preferencialmente na veia jugular. Foram colhidos 3,0 mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 (ácido etilenodiamino tetra acético) a 7,5%¹ para o hemograma e 3,0 mL de sangue para as análises bioquímicas em tubo sem anticoagulante¹.

Para a tromboelastometria, coagulograma (TP, TTPa) e agregação plaquetária foram colhidos 9 mL de sangue em tubo com citrato de sódio 3,2%¹.

A tromboelastometria foi realizada 50 minutos após as coletas em sangue total citratado. A agregação plaquetária foi realizada também em sangue total citratado e analisadas após 30 minutos da coleta. Para o coagulograma, foram aliquotados 3 mL da amostra que foi centrifugada a 3000 rpm, para separação do plasma e imediato congelamento a -80°C², para posterior análise.

4.4 Exames laboratoriais

4.4.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em contador hematológico³. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada para 100 células, com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos corados pelo corante panótico rápido.

¹ BD®, New Jersey, Estados Unidos.

² Sanyo® Ultra Low, Osaka, Japão.

³ Sysmex® - Poch-110 iV, Miami, Estados Unidos.

4.4.2 Perfil bioquímico

Os testes bioquímicos (ALT, FA, GGT, ureia, creatinina, cálcio, proteínas totais e albumina) foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada⁴ utilizando kits comerciais⁵.

4.4.3 Tromboelastometria

A tromboelastometria foi realizada no aparelho ROTEM®⁶ mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente. Em cada um deles foram adicionados 300µL de sangue total citratado, recalcificado com 20µL de cloreto de cálcio 0,2 mol/L (STARTEM®⁶), sendo que a ativação da coagulação foi realizada separadamente em cada canal, empregando-se os seguintes reagentes: INTEM® (20µL, fosfolipídeos de tromboplastina parcial⁶), EXTEM® (20µL, tromboplastina tecidual⁶), FIBTEM® (20µL tromboplastina tecidual e 20µL citocalasina⁶).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML(Lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo.

4.4.4 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada em duplicata mediante a adição de 2µL de Colágeno⁷ em 500µL de sangue citratado + 500µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%⁸). A resposta das plaquetas frente ao agonista foi mensurada por impedância elétrica em um agregômetro de plaquetas de sangue total⁷.

⁴ Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça.

⁵ Katal®, Belo Horizonte, Brasil.

⁶ Pentapharm, Munique, Alemanha.

⁷ Chrono-log®, Chicago, Estados Unidos.

⁸ Equiplex®.

4.4.5 Coagulograma

O TP e o TTPa foram realizados em coagulômetro (ClotTimer®⁹) em duplicata, utilizando os Kits específicos (Clot®⁹) para cada teste.

4.4.6 Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF)

A massa tumoral mamária foi imobilizada manualmente. As punções foram feitas empregando-se uma seringa de 10 mL e agulha 30 x 0,7 mm acopladas ao citoaspirador Valeri. O material colhido foi depositado sobre no mínimo três lâminas para a realização do *squash* procedido de secagem e fixação do material em álcool metílico durante cinco minutos e corado pelo método de Giemsa.

4.4.7 Exame histopatológico

Os animais com diagnóstico positivo para neoplasia mamária maligna em exame citológico foram posteriormente submetidos à mastectomia parcial ou radical. As peças cirúrgicas foram direcionadas para processamento e análise histopatológica.

O material foi coletado em diferentes áreas da formação tumoral, dependendo do tamanho da massa. Foram evitadas regiões com necrose e áreas com contaminação e secreção.

No caso de mais de uma formação, no mesmo animal, foi colhido material de todas as massas. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina e eosina.

4.5 Exames radiográfico e ultrassonográfico

Os animais foram monitorados em relação à presença de metástase através de exame radiográfico da região torácica, e ultrassonográfico da região abdominal no mesmo período das análises. Foram realizadas três projeções radiográficas: latero-lateral direita e esquerda e ventro-dorsal.

⁹ Laser Sensor, Sorocaba, Brasil.

4.6 Análise estatística

Após a constatação da normalidade dos resultados obtidos, os mesmos foram submetidos à análise descritiva, e em seguida, foi realizada a comparação das médias dos grupos para as variáveis, pelo teste T, ao nível de 1% e 5% de probabilidade. O programa utilizado para as análises foi o SSPS Statistics 17.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Um total de 15 de 30 animais, do grupo 2, foram aptos e incluídos ao estudo, sendo que a idade média dos animais pertencentes a este grupo foi de 9,3 anos (7 a 13 anos).

A avaliação citológica e histopatológica dos tumores mamários resultou em três tipos de carcinoma: carcinoma complexo (n=4; 26,7%), carcinoma tubulopapilar (n=4; 26,7%), carcinoma simples (n=7; 46,6%).

Os animais deste estudo pertenciam a 8 raças distintas, incluindo os sem raça definida (SRD) (tabela 1). As raças mais acometidas foram Poodle (n = 4; 26,7%), SRD (n=4; 26,7%) e Daschund (n=2; 13,3%).

As mamas que apresentaram maior acometimento (tabela 2) foram as inguinais (n=7; 46,7%), seguida de abdominal caudal/inguinal (n=3; 20,0%).

Ambos os grupos foram submetidos ao exame físico, hemograma e bioquímico (ureia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteína total, albumina, globulina e cálcio). As médias das variáveis dos exames de rotina de hemograma e bioquímica dos grupos 1 e 2 não apresentaram-se alterados em relação aos valores de referência para a espécie avaliada (tabela 3).

Os valores de tromboelastometria, agregação plaquetária, TP e TTPa do G1 foram empregadas para a avaliação da hemostasia do G2 (tabela 4, 5 e 6).

Na comparação entre os grupos 1 e 2, todos os parâmetros da agregação plaquetária foram significativos ($p<0,01$), evidenciando que o grupo 2 apresentou resultados superiores ao grupo 1. Nos testes de TP e TTPa, o TP foi significativo ($p<0,05$), enquanto que o TTPa não apresentou significância estatística.

Os grupos 1 e 2, apresentaram significância de $p<0,01$ para as variáveis da tromboelastometria de CT (EXTEM e FIBTEM), CFT (INTEM e EXTEM), ângulo α (INTEM), ML (EXTEM) e significância de $p<0,05$ nas variáveis CFT (EXTEM), ângulo α (EXTEM), MCF (INTEM e EXTEM) e ML (INTEM). As variáveis CT (INTEM), CFT, ângulo α , MCF e ML (FIBTEM) não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos avaliados.

Tabela 1 - Distribuição das raças dos animais com carcinoma mamário.

Raça	Número de animais	Frequência (%)
Poodle	4	26,6
SRD	4	26,6
Daschund	2	13,3
Pastor alemão	1	6,7
Yorkshire	1	6,7
Maltês	1	6,7
Akita	1	6,7
Rottweiler	1	6,7
Total	15	100

Tabela 2 - Distribuição dos resultados das glândulas mamárias acometidas.

Mama acometida	Número de animais	Frequência (%)
Torácica abdominal	1	6,7
Torácica caudal	1	6,7
Abdominal cranial	1	13,3
Abdominal caudal	2	13,3
Inguinal	7	46,7
Abdominal cranial/Inguinal	3	20,0
Total	15	100

Tabela 3 - Média dos resultados laboratoriais de hemograma e bioquímica sérica dos grupos 1, 2 e valores de referência.

Variáveis	Média (G1)	Média (G2)	Valores de referência*
Hemácias/ μL	7.480.000	6.840.000	5,5-8,5 ($\times 10^6$)
Hematócrito (%)	51	46	37-55
Hemoglobina (g/dL)	17,4	15,5	12-18
VCM (fL)	67,4	67,4	60-77
CHCM (%)	34	33,7	32-36
Plaquetas/ μL	293.000	372.000	200-500 ($\times 10^3$)
PTP (g/dL)	7,3	7,3	6,0-8,0
Leucócitos totais/ μL	10.200	9.800	6,0-17,0 ($\times 10^3$)
Ureia (mg/dL)	35,6	31,0	21,4-59,9
Creatinina (mg/dL)	0,8	0,7	0,5-1,5
ALT (UI/L)	40,3	55,9	21,0-73,0
FA (UI/L)	45,4	46,0	20,0-156,0
GGT (UI/L)	1,5	3,3	1,2-6,4
PTS (g/dL)	6,1	6,3	5,4-7,1
Albumina (g/dL)	3,3	3,2	2,6-3,3
Globulina (g/dL)	2,9	3,2	2,7-4,4
Cálcio (mg/dL)	9,1	10,1	9,0-11,3

VCM: volume corpúscular médio. CHCM: concentração de hemoglobina corpúscular média. PTP: proteína total plasmática. PTS: proteína total sérica. GGT: gama glutamil transferase. FA: fosfatase alcalina. ALT: alanina amino transferase.

*Valores de referência obtidos na literatura para hemograma (JAIN, 1993) e bioquímico (KANEKO, 2008).

Tabela 4 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da agregação plaquetária dos grupos 1 e 2.

AP	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
Amplitude (ohm)	12,77 $\pm$ 2,55	0,66	15,87 $\pm$ 3,68	0,95	**
Slope	5,80 $\pm$ 2,76	0,71	9,93 $\pm$ 4,25	1,10	**
Under área (min)	273,59 $\pm$ 65,54	16,92	409,40 $\pm$ 108,00	27,89	**

AP = Agregação Plaquetária; e = erro padrão; ** Significativo a $p < 0,01$.

Tabela 5 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis do TP e TTPa dos grupos 1 e 2.

	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
TP (s)	7,90±0,89	0,23	8,76±1,10	0,28	*
TTPa (s)	13,37±1,92	0,50	13,4±1,86	0,48	ns

TP = Tempo de protrombina; TTPa = Tempo de tromboplastina parcial ativado; e = erro padrão;

* Significativo a $p<0,05$; ns = não significativo.

Tabela 6 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da tromboelastometria dos grupos 1 e 2.

	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
INTEM					
CT (s)	143,40±26,37	6,81	128,27±25,33	6,54	ns
CFT (s)	127,67±54,12	13,97	71,40±38,86	10,03	**
α (%)	68,07±8,60	2,22	76,47±6,20	1,60	**
MCF (mm)	55,80±6,19	1,60	63,20±8,87	2,29	*
ML (%)	24,80±17,58	4,54	12,47±5,49	1,52	*
EXTEM					
CT (s)	109,60±60,62	15,65	51,27±31,19	8,05	**
CFT (s)	115,93±39,23	10,13	79,00±33,64	8,69	*
α (%)	69,13±5,40	1,39	74,77±5,68	1,47	*
MCF (mm)	58,73±8,02	2,07	65,87±10,38	2,68	*
ML (%)	17,73±7,06	1,82	9,67±5,41	1,40	**
FIBTEM					
CT (s)	175,60±122,81	31,71	58,20±35,82	9,25	**
CFT (s)	167,65±109,37	54,68	55,00±109,11	44,55	ns
α (%)	56,00±26,21	10,70	72,00±8,08	2,33	ns
MCF (mm)	14,87±13,07	3,37	21,33±16,53	4,27	ns
ML (%)	36,60±13,81	3,57	27,73±14,86	3,84	ns

INTEM = Ativador de contato; EXTEM = Ativador de fator tecidual; FIBTEM= Fator tecidual ativado (EXTEM) + cytochalasin; CT = Tempo de coagulação; CFT = Tempo de formação do coágulo; α = Ângulo α ; MCF = Firmeza máxima do coágulo; ML = Lise máxima; e = erro padrão; ** Significativo a $p<0,01$; * Significativo a $p<0,05$; ns = não significativo.

As medianas, e os intervalos de referência, 25 e 75 percentil, para tromboelastometria em pacientes do grupo 1 e 2, estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição da mediana, e intervalo de referência das variáveis da tromboelastometria dos grupos 1 e 2.

	Grupo1	Intervalo de referência*	Grupo2	Intervalo de referência*
INTEM				
CT (s)	135	123-151	119	111-142
CFT (s)	107	82-196	66	40-100
α (%)	72	58-75	77	70-82
MCF (mm)	57	50-59	64	55-72
ML (%)	18	16-27	13	9-15
EXTEM				
CT (s)	107	59-170	46	30-61
CFT (s)	111	79-159	79	56-89
α (%)	70	59-74	74	72-80
MCF (mm)	60	51-65	69	59-73
ML (%)	18	13-20	9	5-13
FIBTEM				
CT (s)	141	74-294	40	29-82
CFT (s)	214	53-235	98	61-242
α (%)	64	41-74	73	63-79
MCF (mm)	13	7-16	17	14-23
ML (%)	40	25-50	24	14-42

*Dados obtidos dos valores das medianas (25/75 percentil); INTEM = Ativador de contato; EXTEM = Ativador de fator tecidual; FIBTEM= Fator tecidual ativado (EXTEM) + citochalasin; CT = Tempo de coagulação; CFT = Tempo de formação do coágulo; α = Ângulo α ; MCF = Firmeza máxima do coágulo; ML = Lise máxima.

As figuras 1, 2, 3, 4 e 5 representam a variação nos parâmetros CT, CFT, ângulo α , MCF e ML dos reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM, para os grupos 1 e 2.

Em relação a figura 1, verificou-se para o parâmetro CT que apenas o reagente INTEM não apresentou diferença significativa entre os grupos, sendo que os demais foram significativos a $p < 0,01$. Os valores de CT foram inferiores para o grupo 2, evidenciando menor tempo de coagulação para este grupo.

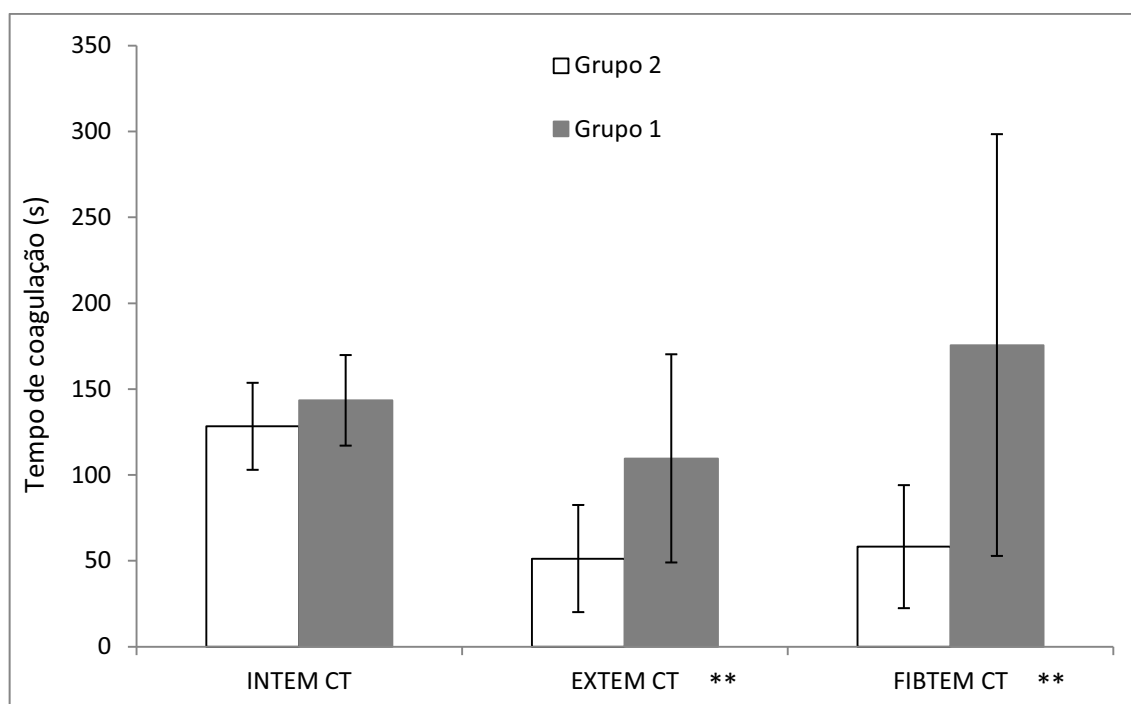


Figura 1 – Variação média do parâmetro CT (tempo de coagulação) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas (** $p < 0,01$).

Para o parâmetro CFT (Figura 2), constatou-se diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), entre os grupos 1 e 2, para os reagentes INTEM E EXTEM, respectivamente, enquanto que para o FIBTEM não foi observada diferença significativa principalmente devido a alto valor do desvio padrão observado. O tempo de formação do coágulo foi menor para o grupo 2 diferindo do grupo 1.

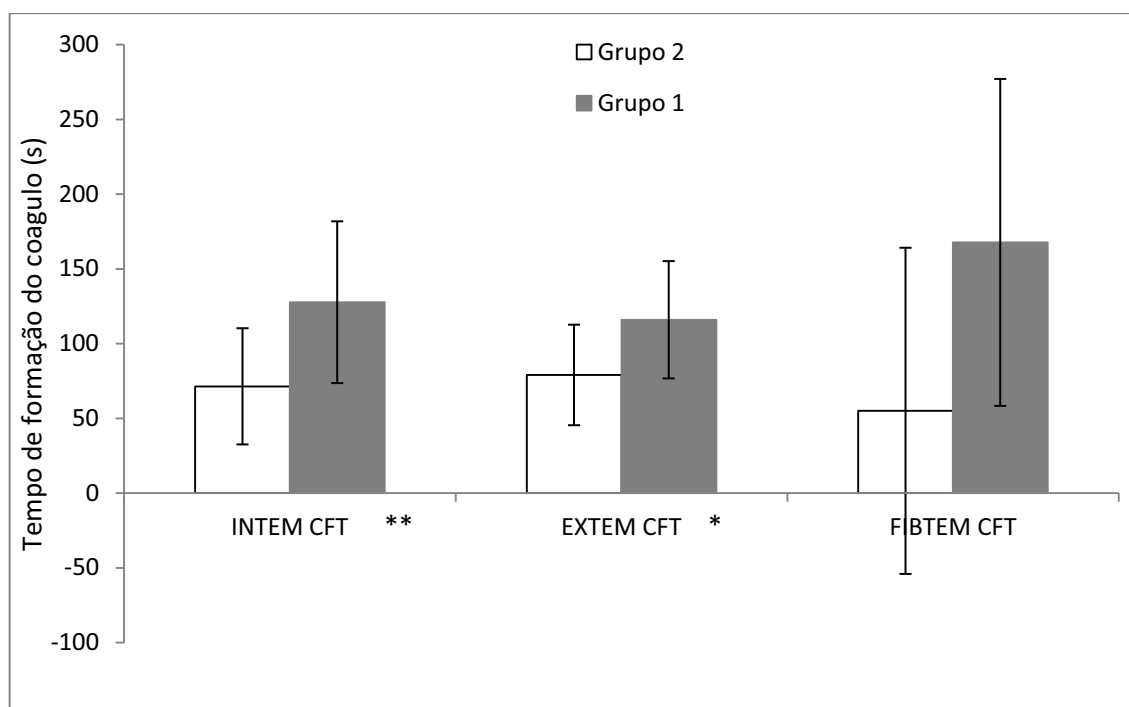


Figura 2 – Variação média do parâmetro CFT (tempo de formação do coágulo) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Na figura 3, apresenta-se a variação em porcentagem do ângulo α para os três reagentes analisados. Verificou-se diferença significativa entre os grupos apenas para o INTEM ($p < 0,01$) e EXTEM ($p < 0,05$), evidenciando porcentagens mais elevadas para o grupo 2.

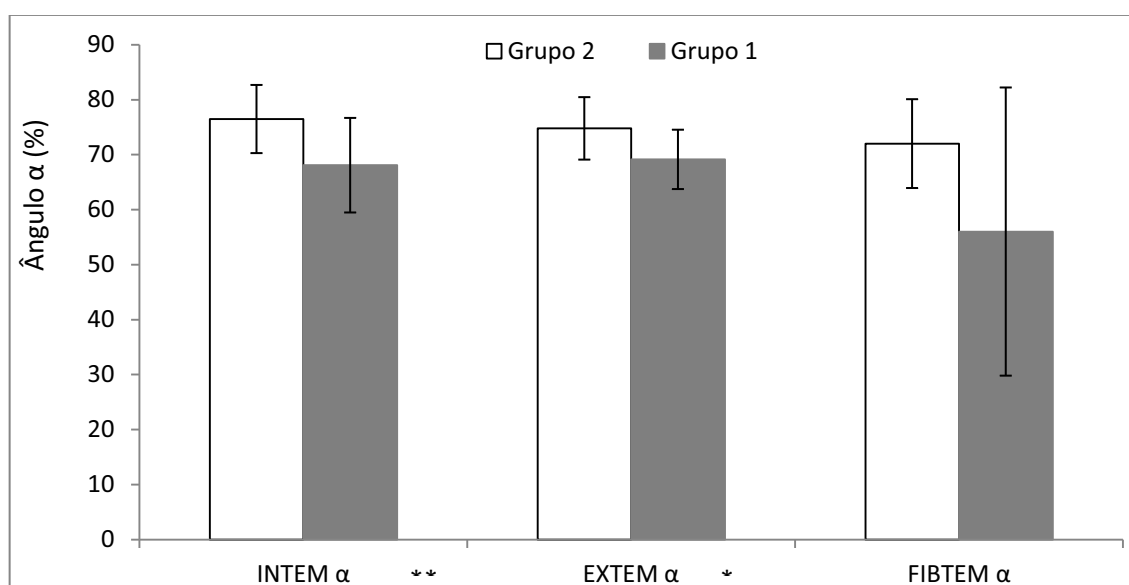


Figura 3 – Variação média do parâmetro ângulo α dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

No caso da figura 4, que trata da firmeza máxima do coágulo (MCF) para os grupos 1 e 2, observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) para todos os reagentes analisados, com exceção apenas para o FIBTEM. O grupo 2 proporcionou os maiores valores para esse parâmetro, provavelmente devido a neoplasia observada nos animais.

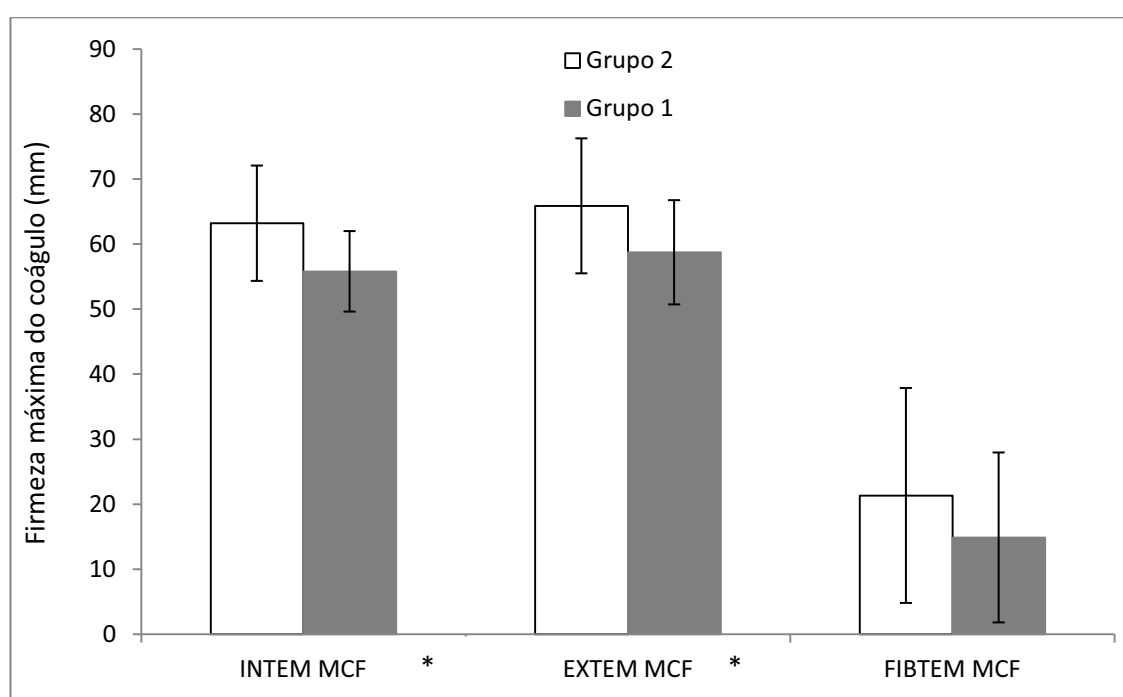


Figura 4 – Variação média do parâmetro MCF (Firmeza Máxima do Coágulo) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas (* $p < 0,05$).

Em relação à lise máxima (Figura 5), os resultados propiciaram menores porcentagens para o grupo 2 em relação ao grupo 1, não diferindo significativamente somente para o reagente FIBTEM, fato esse devido aos valores elevados do desvio padrão para ambos os grupos.

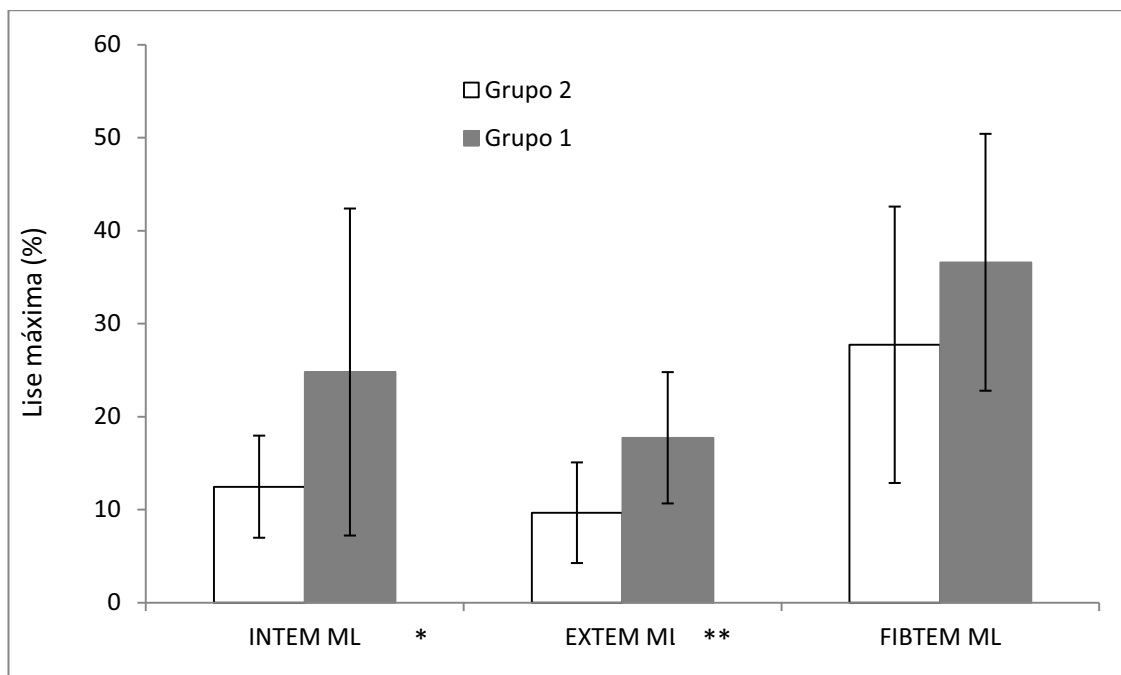


Figura 5 – Variação média do parâmetro ML (Lise Máxima) dos grupos 1 e 2 para os reagentes INTEM, EXTEM e FIBTEM. Variáveis que apresentaram diferenças significativas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A idade média dos animais com carcinoma mamário foi de 9,3 (variando de 7 a 13 anos), corroborando com outros estudos de Oliveira et al. (2003), em que a idade média de cadelas com tumores mamário malignos foi de 9,6 anos; e de Duda (2014), com idade média de 9,7 anos. Millanta et al. (2006), observaram que a faixa etária de cadelas com neoplasias mamárias malignas possa estar entre os 6 e 10 anos. Entretanto, Rutteman et al. (2001) afirmaram que a idade média está entre os 10 e 11 anos, acometendo raramente cães com idade inferior a 4 anos.

A maior prevalência de carcinoma simples observada no presente estudo foi semelhante ao apontado em um estudo retrospectivo com tumores mamários realizado por Oliveira filho et al. (2010) que demonstraram que cerca de 24,47% (n=263) dos animais apresentaram carcinoma complexo, 40,46% (n=435) carcinoma simples e 32,37 (n=348) carcinoma túbulo papilar. Oliveira et al. (2003) e Duda (2014) também observaram que dentre os carcinomas mamários diagnosticados os de maiores incidência foram os complexos, seguidos dos carcinomas simples e tubulares, ressaltando a elevada incidência desses três tipos de carcinomas. Com base neste e em outros estudos pode-se comprovar que o carcinoma está associado com o tumor de maior incidência dentre as neoplasias mamárias malignas de cadelas (DALECK et al., 1998; FERREIRA et al., 1997).

Os tumores mamários deste estudo envolveram, com maior frequência, os dois últimos pares de mamas, podendo estar relacionada a maior concentração de receptores hormonais, culminando em uma maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA FILHO et al., 2010) ou em decorrência de maior quantidade de parênquima nessas mamas (QUEIROGA e LOPES, 2002).

Os resultados da avaliação hemostática evidenciaram sinais de hipercoagulabilidade significativa em cadelas com carcinoma mamário, detectados por meio da tromboelastometria, além de hiperagregabilidade plaquetária pela agregação plaquetária. Esta hipercoagulabilidade foi caracterizada pela uma formação de coágulo acelerada, conforme evidenciado pelo encurtamento de CFT, CT e ML e aumento do ângulo α e do MCF em

comparação ao animais do grupo controle, corroborando com estudos que evidenciam o potencial de determinados tipos de neoplasias malignas serem mais propensos a trombose (AKAY, 2009; ANDREASEN et al., 2012; KRISTENSEN, 2008). Essas alterações ocorreram tanto em reações mediadas pelo INTEM quando EXTEM, demonstrando o envolvimento da via intrínseca e extrínseca na fisiopatogenia do risco trombotico em pacientes com neoplasias mamárias malignas.

A aplicação do TEG/TEM para avaliação da hipercoagulabilidade em cães, tem sido bem documentada em inúmeras pesquisas, que incluem anemia hemolítica imunomediada (GOOGS et al., 2011), parvovirose (OTTO et al., 2000), doenças renais (FALCO et al., 2013) e neoplasias (ANDREASEN et al., 2012; AKAY et al., 2009; KRISTENSEN, 2008). Entretanto, a literatura é escassa em pacientes com carcinoma mamário. Em estudo realizado por Akay et al. (2009), em cães com tumores sólidos diversos, o principal parâmetro utilizado para detectar a hipercoagulabilidade foi o MCF. Entretanto, quando avaliados apenas os animais com carcinoma mamário não foram observadas alterações nos parâmetros do TEG, TTPa e fibrinogênio quando comparado aos cães com mastocitomas, linfomas e outros tipos de carcinomas.

Andreasen et al. (2012), demonstraram que 50 dos 71 cães com tipos variados de câncer apresentaram distúrbios hemostáticos. Desses 50 cães, 94% apresentaram sinais de hipercoagulabilidade com aumento do MCF, CFT e trombocitose, semelhante ao ocorrido com os animais do presente estudo, com excessão da trombocitose que não foi observada neste estudo.

Devido à participação das plaquetas e do fibrinogênio na hipercoagulabilidade induzida por neoplasias e sua participação na formação do coágulo, o MCF torna-se a principal ferramenta para avaliar a hipercoagulabilidade em pacientes com câncer, fazendo com que o TEG seja uma ferramenta superior a qualquer outro teste hemostático (AKAY et al., 2009). Sabe-se que alguns tipos de câncer em cães e humanos pode levar a hipercoagulabilidade, diagnosticados por anormalidades nos parâmetros de análises hemostáticas como elevação dos níveis de fibrinogênio, trombocitose, elevação de TP e TTPa, dímeros D, PDFs, e alterações nos parâmetros da tromboelastometria (ZWICKER et al., 2007). Da mesma forma, os pacientes

com carcinoma mamário deste estudo apresentaram alterações hemostáticas com evidências de hipercoagulabilidade com risco trombótico.

A TEM é um método sensível, capaz de identificar e mensurar o estado de hipercoagulabilidade, que não é detectado por testes laboratoriais de rotina, a menos que a contagem de plaquetas e a concentração de fibrinogênio estejam acentuadamente elevadas (AKAY et al., 2009).

No presente estudo, avaliou-se a função plaquetária por meio da agregação, no qual notou-se aumento significativo da agregabilidade plaquetária dos pacientes com carcinoma mamário. Em estudos anteriores avaliando a função plaquetária de cães com neoplasias malignas por agregação plaquetária, houve uma hiperagregabilidade plaquetária, corroborando com o observado no presente estudo (MCNIEL et al., 1997; THOMAS e ROGERS, 1999).

A hiperagregação das plaquetas pode induzir a formação de um trombo e a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando à isquemia, se tornando um importante parâmetro a ser avaliado. Entretanto, a oclusão arterial por trombos plaquetários frequentemente é independente de hiperagregação plaquetária, já que normalmente existe uma lesão de parede vascular, sobre a qual ocorrem a adesão e agregação plaquetárias, que são funções normais das plaquetas (SUDO et al., 2001; SILVA e D'AMICO, 2010).

Em relação ao TTPa, o mesmo não apresentou alteração significativa, fato que confirma os achados de Akay et al. (2009), em que cães com neoplasias variadas demonstraram hipercoagulabilidade apenas quando avaliados pela tromboelastometria, evidenciando que a hipercoagulabilidade é dificilmente detectada por testes de hemostasia convencionais, como já citado anteriormente. Por examinarem partes isoladas deste processo, a detecção destas afecções não é notada por testes de rotina a menos que essas alterações sejam acentuadas (ANDREASSEN et al., 2012; AKAY et al., 2009; SAAVEDRA et al., 2001). Entretanto, em um estudo realizado por Stockhaus et al. (1999), foi encontrado aumento de TP e TTPa em cadelas com carcinoma mamário com estadiamento tumoral IV, discordando deste estudo.

Por outro lado, o TP de cadelas com carcinoma mamário estava maior que o grupo controle do presente estudo, podendo estar relacionado à secreção de citocinas pró-inflamatórias que promovem o aumento do consumo

dos fatores de coagulação (ANDREASEN et al., 2012), corroborando com os achados de Stockhaus et al. (1999).

Distúrbios hemostáticos e de hipercoagulabilidade em pacientes com neplasias malignas são complexos devido a sua etiologia multifatorial que inclui a expressão de moléculas pró-coagulantes, tais como o fator de necrose tecidual na superfície de células malignas, liberação de péptidos fibrinolíticos, inibição de anticoagulação endógena, liberação de citocinas por células cancerosas, e interação com células hospedeiras, incluindo células endoteliais e leucócitos do sangue (MEIS e LEVY, 2007).

Neste contexto a identificação de hipercoagulabilidade em pacientes com câncer pode ajudar a identificar pacientes com risco de eventos tromboembólicos induzido por neoplasias malignas (ANDREASEN et al., 2008).

Em um estudo realizado por Kristesen et al.(2008), constatou-se que 67% dos cães com neoplasia maligna têm disfunção hemostática, dos quais 50% dos cães estavam hipercoaguláveis. Estes resultados juntamente com esta pesquisa sugere que a avaliação da hemostasia deve ser incluída na rotina de avaliação de cães com câncer. Também sugere-se que estudos adicionais são necessários para avaliar se cães com hipercoagulabilidade apresentarão doença tromboembólica e se uma intervenção terapêutica com anticoagulante se justifica.

Em humanos, estudos têm mostrado um aumento da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes com doença maligna em risco de TVP, quando são tratadas com anticoagulantes como a heparina e varfarina (LECUMBERRI et al., 2005). Muitas drogas que modulam a hemostasia estão disponíveis, mas as informações são limitadas com base em evidências disponíveis sobre a sua utilização em medicina veterinária. Na medicina, o tratamento anticoagulante é usado rotineiramente para trombopprofilaxia em pacientes com câncer (KRISTESEN, et al., 2008).

Os resultados também indicam que os cães com neoplasia maligna e hipercoagulabilidade podem servir como modelo para a doença humana.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que cadelas com carcinoma mamário apresentam evidências de risco trombótico caracterizado por alterações da coagulação e agregação plaquetária.

A tromboelastometria é uma ferramenta eficiente para detectar evidências de hipercoagulabilidade e avaliar o risco trombótico em pacientes com neoplasias.

As plaquetas e as vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação participam das tendências trombóticas apresentadas por cadelas com carcinoma mamário.

A utilização de exames que avaliem a hemostasia em pacientes com neoplasias ainda é escassa na rotina clínica veterinária para uma investigação mais acurada dos eventos tromboembólicos, assim como o uso de equipamentos mais precisos. Desta forma, técnicas como a tromboelastometria podem ser aplicadas no atendimento clínico, como se tem observado na medicina, melhorando o prognóstico e sobrevida destes animais.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- AKAY, O. M.; USTUNER, Z.; CANTURK, Z.; MUTLU, F. S.; GULBAS, Z. Laboratory investigation of hypercoagulability in cancer patients using rotation thrombelastography. *Medical Oncology*, v.26, p.358-364, 2009.
- ANDREASEN, E. B.; TRANHOLM, M.; WIINBERG, B.; MARKUSSEN, B.; KRISTENSEN, A. T. Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.54, n.3, 2012.
- BAINES, E.A.; WATSON, P.J.; STIDWORTHY, M.F.; HERRTAGE, M E. Gross pulmonary thrombosis in a greyhound. *Journal of Small Animal Practice*, v.42, n.9, p.448-452, 2001.
- BICK, R. L.; STRAUSS, J. F.; FRENKEL, E. P. Thrombosis and hemorrhage in oncology patients. *Haematology/Oncology Clinics of North America*, v.4, n.10, p.876-907, 1996.
- BLOM, J. W.; DOGGEN, C. J.; OSANTO, S.; ROSENDAAL, F. R. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, n.293, p.715-722, 2006.
- BOCACCIO, C.; COMOGLIO, P. M. Genetic link between cancer and thrombosis. *Journal of Clinical Oncology*, v.27, n.29, p.4827-4833, 2009.
- BOTSCH, V.; KÜCHENHOFF, H.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERG, J. Retrospective study of 871 dogs with thrombocytopenia. *The Veterinary Record*, v.164, p.647-651, 2009.
- BROMBERG, M.E.; CAPPELLO, M. Cancer and blood coagulation: molecular aspects. *The Cancer Journal from Scientific American*, v.5, n.3, p.132-38, 1999.
- BUERGY, D.; WENZ, F.; BROCKMANN, M. A. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Internacional Journal of Cancer*, v.130, p.2747-2760, 2012.
- BURNS, M.G.; KELLY, A.B.; HORNOF, W.J.; HOWERTH, E.W. Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.178, n.4, p.388-393, 1981.
- CHEN, J.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; ANDRASSY, M.; CHEN, B.; STERN, D.M.; et al. Tissue factor. A receptor involved in the control of cellular proprieties, including angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. v.86, n.1, p.334-351, 2001.
- CHEW, H. K.; WUN, T.; HARVEY, D.; ZHOU, H.; WHITE, R. H. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Archives Internal Medicine*, n.16, p. 458-464, 2006.

CHEW, H.K.; WUN, T.; HARVEY, D.J.; ZHOU, H.; WHITE, R.H. Incidence of venous thromboembolism and the impact on survival in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, n.25 p.70-76, 2007.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*, n. 28, p. 95-100, 1998.

DANO, K.; BEHRENDT, N.; HEYER-HANSEN, G.; JOHNSEN, M.; LUND, L.R.; PLOUG, M.; et al. Plasminogen activation and cancer. *Thrombosis and Haemostasis*. v.93, n.4, p.676-681, 2005.

DUDA, N.C.B. *Anormalidades hematológicas, bioquímicas e hemostáticas de origem paraneoplásica em fêmeas caninas com neoplasia mamária*. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FALCO, S.; ZANATTA, R.; BRUNO, B.; MAURELLA, C.; SCALONE, A.; TARDUCCI, A.; BORRELLI, A. Thromboelastometry used for evaluation of blood coagulability in dogs with kidney diseases. *Acta veterinaria brno*, v.82, p.209-214, 2013.

FELDMAN, B.F.; RASEDEE, A. Haemostatic abnormalities in canine Cushing's Syndrome. *Research in Veterinary Science*, v.41, n.2, p.228-230, 1986.

FERREIRA, G.A.; PEDRAZA, F.O.; ARANGO, M.R. Neoplasias de glândula mamária canina diagnosticadas em Medellín, Colombia, entre 1968 e 1994. *Veterinária México*, v.28, p.257-259, 1997.

FERRIGNO, D.; BUCCHERI, G.; RICCA, I. Prognostic significance of blood coagulation tests in lung cancer. *European Respiratory Journal*, v.17, p.667-673, 2001.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G.; MANZATO, F.; VESCOVI, P.P.; TARGHER, G. Hemostatic abnormalities in endocrine and metabolic disorders. *European Journal of Endocrinology*, v.162, n.3, p.439-451, 2010.

FURIE, B.; FURIE, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, v.359, n.9, p.938-949, 2008.

GOOGS, R.; WIINBERG, B.; KJELGAARD-HANSEN, M.; CHAN, D.L. Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia using thromboelastography. *The veterinary Journal*, v.191, p. 347-353, 2012.

HILLEN, H. F. Thrombosis in cancer patients. *Annals Oncology*, n.11, p.273-276, 2001.

HOFFMAN, R.; HAIM, N.; BRENNER, B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood Reviews*, v.2, n.15, p.61-67, 2001.

JACOBY, R.C.; OWINGS, J.T.; ORTEGA, T.; GOSSELIN, R.; FELDMAN, E.C. Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing Syndrome. *Archives of Surgery*, v.136, n.9, p.1003-1006, 2001.

JOHNSTON, S. D. Reproductive systems. *Textbook of Small Animal Surgery*. 2 ed., p.2177-2199, 1993.

JOHNSON, L. R.; LAPPIN, M. R.; BAKER, D. C. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n.13, p.338-345, 1999.

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

KUMAR, D.R.; HANLIN, E.R.; GLURICH, I. et al: Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. *Clinical Medicine & Research*, v.8, n.3/4, p.168-172, 2010.

KRISTENSEN, A. T.; WIINBERG, B.; JESSEN, L. R.; ANDREASEN, E.; JENSEN, A. L. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, p.140-147, 2008.

LAFORCADE, A. Diseases associated with thrombosis. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.27, p.59-64, 2012.

LARUE, M.J.; MURTAUGH, R.J. Pulmonary thromboembolism in dogs: 47 cases. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.197, n.10, p.1368-1372, 1990.

LECUMBERRI, R.; PARAMO, J.A.; ROCHA, E. Anticoagulant treatment and survival in cancer patients. The evidence from clinical studies. *Haematologica*, v.90, p.1258-1266, 2005.

LEONE, G.; SICA, S.; CHIUSOLO, P.; TEOFILI, L.; DE STEFANO, V. Blood cell diseases and thrombosis. *Haematologica*, v.86, n.12, p.1236-1244, 2001.

MADEWALL, B. R.; FELDMAN, B.F.; O'NEILL, S. Coagulation abnormalities in dogs with neoplastic disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, n.44, p.35-38, 1980.

MAIA, P. V.; ARAÚJO, G. Z.; DE FARIA, M. D. Tromboelastógrafo em cirurgia cardíaca: estado atual. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.56, n.1, p.78-88, 2006.

MCNIEL, E. A.; OGILVIE, G. K.; FETTMAN, M. J.; SALMAN, M. D. Platelet hyperfunction dogs with malignancies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.11, n.3, p.178-182, 1997.

MEIS, E.; LEVY, R. A. Câncer e trombose: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, n.53, p.183-193, 2006.

MICHELSON, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*, v.87, n.12, p.4925-4936, 1996.

MILLANTA, F., CITI, S., DELLA SANTA, D., PORCIANI, M. & POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.98, p.115-120, 2006.

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em pequenos animais*. São Paulo:Roca, p.185-192, 2007.

MORRISON, W. B. Canine and feline mammary tumors. *Medical and Surgical Management*, n.32, p.591-598, 1998.

NASCHITZ, J. E.; YESHURUN, D.; LEV, L. M. Thromboembolism in cancer. *Cancer*, v.71, n.4, p.1384-1390, 1993.

NEEL, J. A.; SNYDER, L.; GRINDEM, C. B. Trombocytosis: a retrospective study of 165 dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v.41, n.2, p.216-222, 2012.

NELSON, O. L.; ANDREASEN, C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, p.830-834, 2003.

NURDEN, A.T. Platelets and tissue remodeling: extending the role of the blood clotting system. *Endocrinology*, v.148, n.7, p.3053-3055, 2007.

NORRIS, C.R.; GRIFFEY, S.M.; SAMII, V.F. Pulmonary thromboembolism in cats: 29 cases (1987-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.215, n.11, p.1650-1654, 1999.

O'DONELL, M. R.; SLICHTER, S. J.; WEIDEN, P. L.; STORB, R. Platelet and fibrinogen kinetics in canine tumors. *Cancer Research*, v.41, p.1379-1383, 1981.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.105-110, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.2, 2010.

OTTO, C.M.; RIESER, T.M.; BROOKS, M.B.; RUSSELL, M.W. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, v.217, p1500-1504, 2000.

PATRONO, C.; BACHMANN, F.; BAIGENT, C.; BODE, C.; DE CATERINA, R.; CHARBONNIER, B.; FITZGERALD, D.; HIRSH, J.; HUSTED, S.; KVASNICKA, J.; MONTALESCOT, G.; RODRÍGUEZ, L.A.G.; VERHEUGT, F.; VERMYLEN, J.; WALLENTIN, L. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European. *European Heart Journal*, v.25, n.2, p.166-181, 2004.

QUEIROGA, F. E LOPES, C. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. *Anais Congresso de Ciências Veterinárias*, Oeiras, Portugal, p.183-190. (Resumo expandido), 2002

REBAR, A.H.; MACWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, F.L.; POLLOCK, R.V.H.; ROCHE, J. Platelets: Overview, morphology, quantity, platelet function disorders (thrombocytopathia or thrombopathia). In: *A guide to hematology in dogs and cats*. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2005.

RICKLES, F.R.; FALANGA, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thrombosis Research*, v.102, n.6, p. 215-224, 2001.

RICKLES, F. R.; LEVINE, M.; EDWARDS, R. L. Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metastasis Review*. n.11, p.237-248, 1992.

RICKLES, F.R.; EDWARDS, R.L. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood*, v.62, p.14-31, 1983.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: S.J. WITHROW & E.G. MACEWEN. *Small animal clinical oncology*, 3 ed., p.455-477. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2001.

SAAVEDRA, P. V.; GARCÍA, L. A.; LÓPEZ, S. Z.; COUTO, G. Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *The Veterinary Journal*, v.180, p.78-83, 2011.

SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; TREADWELL, N.G.; MCCULLOUGH, S.M.; BROOKS, M.B. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of American Animal Hospital Association*. v.37, n.3, p.220-227, 2001.

SCHERMERHORN, T.; PEMBLETON-CORBETT, J.R.; KORNREICH, B. Pulmonary thromboembolism in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.18, p.533-535, 2004.

SILVA, L.L.; D'AMICO, E.A. Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.32, n.6, p. 463-468, 2010.

SLICHTER, S. J.; WEIDEN, P. L.; O'DONELL, M. R.; STORB, R. Interruption of tumor-associated platelet consumption with platelet enzyme inhibitors. *Blood*, v.59, n.6, p.1252-1258, 1982.

SOUSOU, T.; KHORANA, A. A. New insights into cancer-associated thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. n.29, p.316-320, 2009.

STOCKHAUS C, KOHN B, RUDOLPH R, BRUNNBERG L, GIGER U: Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma. *Journal Small Animal Practice*, v.40, p.326-331, 1999.

STOKOL, T. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v.33, p.1419-1435, 2003.

SUDO, T.; ITO, H.; OZEKI, Y.; KIMURA, Y. Estimation of anti-platelet drugs on human platelet aggregation with a novel whole blood aggregometer by a screen filtration pressure method. *British Journal of Pharmacology*, v.133, n.8, p.396-404, 2001.

TESHIMA, T.; HARA, Y.; TAODA, T.; KOYAMA, H.; TAKAHASHI, K.; NEZU, Y.; HARADA, Y.; YOGO, T.; NISHIDA, K.; OSAMURA, R. Y.; TERAMOTO, A.; TAGAWA, M. Cushing's disease Complicated with Thrombosis in a Dog. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.70, n.5, p.487-491, 2008.

THOMAS, J.S.; ROGERS, K.S. Platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in dogs with untreated multicentric lymphoma. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v.13, p.319-322, 1999.

VIEIRA, C.S.; OLIVEIRA, L.C.O.; SÁ, M.F.S. Hormônios femininos e hemostasia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.29, n.10, p.538-547, 2007.

ZWICKER J.I; FURIE B.C; FURIE B. Cancer-associated thrombosis. *Critical Review Oncology and Hematology*, v.62, n.2, p.126–36, 2007.

TRABALHO CIENTÍFICO

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

Aplicação de testes hemostáticos na avaliação do risco trombótico em cadelas com carcinoma mamário

**T.C. TRENTIN^{*1}, D.S. GONÇALVES¹, C.Z. GARCIA¹, S. C. RAHAL²,
R.K. TAKAHIRA³.**

Introdução: A hipercoagulabilidade é uma das maiores alterações hemostáticas em pacientes com neoplasias malignas, entretanto sua detecção vem sendo subdiagnosticada. Em pacientes com carcinoma mamário esta complicação ainda não está elucidada.

Hipótese: cadelas com carcinoma mamário apresentam sinais de hipercoagulabilidade.

Animais: 15 cadelas com carcinoma mamário e 15 cadelas clinicamente saudáveis para o grupo controle foram avaliadas.

Material e métodos: Foi realizado estudo prospectivo avaliando as alterações hemostáticas de cadelas com carcinoma mamário por meio da tromboelastometria, agregação plaquetária, TP e TTPa.

¹ Mestranda do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-Campus Botucatu.

*email: thays_trentin@hotmail.com

² Professora do Departamento de Cirurgia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-Campus Botucatu.

³ Professora do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-Campus Botucatu.

23 **Resultados:** As cadelas com carcinoma mamário apresentaram
24 hiperagregabilidade plaquetária e aumento do TP em relação a cadelas
25 saudáveis. Na tromboelastometria houve diminuição significativa no CT
26 (EXTEM, FIBTEM), CFT (INTEM, EXTEM), e ML (INTEM, EXTEM) e elevação
27 no ângulo α (INTEM EXTEM) e MCF (INTEM, EXTEM).

28 **Conclusões:** Cadelas com carcinoma mamário apresentam tendências
29 trombóticas caracterizadas por hiperagregabilidade plaquetária e
30 hipercoagulabilidade.

31 **Palavras-chave:** cães, hemostasia, neoplasia mamária,
32 tromboelastometria, tromboembolismo.

33

34 **Introdução**

35

36 O risco tromboembólico de algumas doenças é reconhecido e estudado
37 há muitos anos, e vem ganhando notoriedade por contribuir na sua evolução¹.
38 Ainda assim, são poucos os estudos do efeito das neoplasias sobre a
39 hemostasia em cães²⁻³⁻⁴. A ausência de uma investigação sistemática dos
40 estados de hipercoagulabilidade pode mascarar a real importância da
41 neoplasia sobre o risco tromboembólico⁵.

42 Algumas situações como a malignidade de um tumor podem induzir um
43 estado pró-trombótico e tornar o tratamento das neoplasias dificultoso¹. Em
44 humanos, cerca de 15 a 20% de todos os pacientes com câncer apresentam
45 riscos de desenvolver trombose durante o curso da doença⁶. Na medicina
46 veterinária, os estados de hipercoagulabilidade em pacientes com câncer ainda
47 não são bem reconhecidos, tornando difícil a identificação *antemortem* dessa

48 condição⁴. Em um estudo com cães após o óbito por doenças de causa
49 tromboembólica, o câncer foi o achado mais comum sendo observado em 41%
50 dos pacientes⁷.

51 A incidência de trombose associada ao câncer varia de acordo com o tipo
52 de tumor primário. Apesar da difícil identificação das disfunções hemostáticas
53 em cães provocadas por neoplasias, o tromboembolismo venoso (TEV),
54 tromboembolismo pulmonar (TEP) e a coagulação intravascular disseminada
55 (CID) estão entre as mais frequentes¹. Pacientes humanos com tumor primário
56 de mama apresentam maiores chances de desenvolvimento de TEV em
57 comparação com a população em geral⁸.

58 Em cães, poucos estudos têm sido publicados²⁻³⁻⁴⁻⁵, porém os resultados
59 sugerem que mais pesquisas devem ser realizadas utilizando diferentes tipos
60 de neoplasias malignas até que seja estabelecido o potencial trombótico de
61 cada neoplasia, semelhante ao que ocorre na medicina humana. Por ser o
62 segundo tumor mais frequente em cães e o de maior prevalência em cadelas⁹⁻
63 ¹⁰, o estudo da neoplasia mamária torna-se interessante para avaliação do
64 efeito do câncer na hemostasia.

65 Para avaliar os efeitos que as neoplasias provocam na hemostasia alguns
66 testes como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial
67 ativada (TTPa), Dímeros-D e fibrinogênio tem sido realizados para antecipar o
68 diagnóstico desta condição e aumentar a sobrevida dos pacientes²⁻³.
69 Entretanto, testes mais específicos como a tromboelastometria
70 (TEM)/Tromboelastografia (TEG), que é uma análise mais sensível na
71 detecção de estados de hipo ou hipercoagulabilidade, permitem a avaliação

72 integral do sistema hemostático¹¹, o que nos possibilita a determinação real do
73 risco tromboembólico associado ao carcinoma mamário.

74 Essa ferramenta tem confirmado que o risco tromboembólico em
75 pacientes com câncer tem sido subestimado quando comparado à análise
76 clínica ou por meio dos testes laboratoriais convencionais²⁻³⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

77 Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil hemostático e
78 detectar o potencial trombótico por meio do teste de agregação plaquetária,
79 tromboelastometria, TP e TTPa em cadelas com carcinoma mamário.

80

81 **Material e métodos**

82

83 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
84 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FMVZ-UNESP/Botucatu-SP

85 Foram utilizadas 30 cadelas divididas em 2 grupos, provenientes do
86 atendimento no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e
87 Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
88 FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu-SP, sendo grupo 1: 15 cadelas adultas e
89 saudáveis para compor o grupo controle e grupo 2: 15 cadelas apresentando
90 carcinoma mamário previamente diagnosticado por exame citológico seguido
91 por exame histopatológico.

92 Foram adotados como critérios de exclusão pacientes com tumores
93 benignos ou com doenças concomitantes ao diagnóstico de carcinoma
94 mamário que pudessem influenciar os resultados, bem como animais
95 submetidos ao tratamento com quimioterápicos e o uso de anti-inflamatórios
96 não esteroidais, dentro dos últimos 15 dias previamente as análises.

97 Adicionalmente, animais trombocitopênicos foram submetidos ao exame da
98 PCR *Ehrlichia* sp., sendo os positivos excluídos do estudo.

99 **Colheita das Amostras**

100 A colheita de sangue foi realizada preferencialmente na veia jugular. Foi
101 colhido 3,0 mL de sangue com anticoagulante EDTA K3 a 7,5%⁴ para o
102 hemograma e 3,0 mL de sangue para as análises bioquímicas em tubo sem
103 anticoagulante⁴.

104 Para a tromboelastometria, coagulograma (TP, TTPa) e agregação
105 plaquetária foram colhidas 9 mL de sangue em tubos com citrato de sódio a
106 3,2%⁴.

107 As análises por meio da tromboelastometria foram realizadas em até 50
108 minutos após as coletas. A agregação plaquetária foi analisada após 30
109 minutos da coleta. Para o coagulograma, 3 mL da amostra foram centrifugados
110 a 3000 rpm, para separação do plasma e congelamento a -80°C⁵, para
111 posterior análise.

112 **Hemograma**

113 O hemograma foi realizado em contador hematológico⁶. A contagem
114 diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células, com a avaliação da
115 morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos
116 corados pelo corante panótico rápido.

117 **Perfil bioquímico**

⁴ BD®, New Jersey, Estados Unidos

⁵ Sanyo® Ultra Low, Osaka, Japão

⁶ Sysmex® - Poch-110 iV, Miami, Estados Unidos

Os testes bioquímicos (ALT, FA, GGT, ureia, creatinina, cálcio, proteínas totais e albumina) foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada⁷ utilizando kits comerciais⁸.

Tromboelastometria

A tromboelastometria (TEM) foi realizada no aparelho ROTEM®⁹ mantido a 37°C. Três canais foram avaliados simultaneamente.

The following thromboelastometric tests were done: intrinsic pathway (STARTEM + INTEM⁹); extrinsic pathway: (STARTEM +EXTEM⁹) and fibrinogen activity (EXTEM + FIBTEM⁹).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: CT (tempo de coagulação): latência até a formação inicial de fibrina; CFT (tempo de formação do coágulo): velocidade até a obtenção de estabilidade do coágulo; Ângulo α : velocidade de acúmulo de fibrina e de ligação cruzada (nível de fibrinogênio); MCF (firmeza máxima do coágulo): medida do pico da força/resistência do coágulo; ML(Lise máxima): medida do tempo para perda da resistência de um coágulo.

Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada em duplicata em resposta ao colágeno¹⁰. A resposta das plaquetas frente ao agonista foi mensurada por impedância elétrica em um agregômetro de plaquetas de sangue total¹⁰.

Coagulograma

O TP, TTPa foi realizado em coagulômetro¹¹ em duplicata, utilizando os Kits específicos¹¹ para cada teste.

140

⁷ Roche® - Cobas Mira Plus, Basileia, Suíça

⁸ Katal®, Belo Horizonte, Brasil

⁹ Pentapharm, Munique, Alemanha

¹⁰ Chrono-log®, Chicago, Estados Unidos

¹¹ ClotTimer® Laser Sensor, Sorocaba, Brasil

Análise estatística

Após a constatação da normalidade dos resultados obtidos, os mesmos foram submetidos à análise descritiva, e em seguida, foi realizada a comparação das médias dos grupos para as variáveis, pelo teste T, ao nível de $p < 0,01$ e $p < 0,05$ de significância SSPS Statistics 17.0.

Resultados

As médias das variáveis dos exames de rotina de hemograma e bioquímica sérica dos grupos 1 (G1) e 2 (G2) não apresentaram-se alterados em relação aos valores de referência para a espécie avaliada.

Os valores de tromboelastometria, agregação plaquetária, TP e TTPa do G1 foram utilizadas para a comparação com os resultados do G2 (tabelas 1, 2 e 3).

Todos os parâmetros da agregação plaquetária do grupo 2 foram superiores ($p < 0,01$), ao grupo 1. Nos testes de TP e TTPa, o TP do G2 foi maior em relação ao G1 ($p < 0,05$), e TTPa não apresentou significância estatística.

O grupo 2 apresentou um encurtamento significativo para as variáveis da tromboelastometria de CT (EXTEM, e FIBTEM), CFT (INTEM e EXTEM) e ML (EXTEM e INTEM) e aumento nas variáveis, ângulo α (EXTEM e INTEM), MCF (EXTEM e INTEM) em relação ao grupo 1.

Tabela 1 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da agregação plaquetária dos grupos 1 e 2.

AP	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
Amplitude (ohm)	12,77±2,55	0,66	15,87±3,68	0,95	**
Slope	5,80±2,76	0,71	9,93±4,25	1,10	**
Under área (min)	273,59±65,54	16,92	409,40±108,00	27,89	**

AP = Agregação Plaquetária; e = erro padrão; ** Significativo a $p<0,01$.

Tabela 2 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis do TP e TTPa dos grupos 1 e 2.

	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
TP (s)	7,90±0,89	0,23	8,76±1,10	0,28	*
TTPa (s)	13,37±1,92	0,50	13,4±1,86	0,48	Ns

TP = Tempo de protrombina; TTPa = Tempo de tromboplastina parcial ativado; e = erro padrão;

* Significativo a $p<0,05$; ns = não significativo.

Tabela 3 – Distribuição da média, desvio padrão e erro padrão (e) das variáveis da tromboelastometria dos grupos 1 e 2.

	Grupo 1	e	Grupo 2	e	p-valor
INTEM					
CT (s)	143,40±26,37	6,81	128,27±25,33	6,54	Ns
CFT (s)	127,67±54,12	13,97	71,40±38,86	10,03	**
α (%)	68,07±8,60	2,22	76,47±6,20	1,60	**
MCF (mm)	55,80±6,19	1,60	63,20±8,87	2,29	*
ML (%)	24,80±17,58	4,54	12,47±5,49	1,52	*
EXTEM					
CT (s)	109,60±60,62	15,65	51,27±31,19	8,05	**
CFT (s)	115,93±39,23	10,13	79,00±33,64	8,69	*
α (%)	69,13±5,40	1,39	74,77±5,68	1,47	*
MCF (mm)	58,73±8,02	2,07	65,87±10,38	2,68	*
ML (%)	17,73±7,06	1,82	9,67±5,41	1,40	**
FIBTEM					
CT (s)	175,60±122,81	31,71	58,20±35,82	9,25	**
CFT (s)	167,65±109,37	54,68	55,00±109,11	44,55	Ns
α (%)	56,00±26,21	10,70	72,00±8,08	2,33	Ns
MCF (mm)	14,87±13,07	3,37	21,33±16,53	4,27	Ns
ML (%)	36,60±13,81	3,57	27,73±14,86	3,84	Ns

INTEM = Ativador de contato; EXTEM = Ativador de fator tecidual; FIBTEM= Fator tecidual ativado (EXTEM) + cytochalasin; CT = Tempo de coagulação; CFT = Tempo de formação do coágulo; α = Ângulo α; MCF = Firmeza máxima do coágulo; ML = Lise máxima; e = erro padrão; ** Significativo a p<0,01; * Significativo a p<0,05; ns = não significativo.

Discussão

Os resultados da avaliação hemostática evidenciaram sinais de hipercoagulabilidade significativa em cadelas com carcinoma mamário, detectados por meio da tromboelastometria, além de hiperagregabilidade plaquetária pela agregação plaquetária. Esta hipercoagulabilidade foi caracterizada pela formação de coágulo acelerada, conforme evidenciado pelo encurtamento de CFT, CT e ML e aumento do ângulo α e do MCF em comparação aos animais do grupo controle. Estes resultados estão de acordo com estudos que evidenciaram o potencial de determinados tipos de neoplasias malignas induzirem a trombose²⁻³⁻⁴. Essas alterações ocorreram tanto em reações mediadas pelo INTEM quanto EXTEM, demonstrando o envolvimento da via intrínseca e extrínseca na fisiopatogenia do risco trombótico em pacientes com neoplasias mamárias malignas.

A aplicação do TEG/TEM para avaliação da hipercoagulabilidade em cães tem sido utilizada em diversas afecções, incluindo anemia hemolítica imunomediada¹², parvovirose¹³, doenças renais¹⁴ e neoplasias²⁻³⁻⁴. Entretanto, há poucos relatos em pacientes com carcinoma mamário². Em estudo realizado por Akay et al.², em cães com tumores sólidos diversos, o principal parâmetro utilizado para detectar a hipercoagulabilidade foi o MCF. Entretanto, quando avaliados apenas os animais com carcinoma mamário não foram observadas alterações nos parâmetros do TEG, TTPa e fibrinogênio quando comparado aos cães com mastocitomas, linfomas e outros tipos de carcinomas.

Andreasen et al.³ demonstraram que 50 dos 71 cães com tipos variados de câncer apresentaram distúrbios hemostáticos, dos quais 94% apresentaram

216 sinais de hipercoagulabilidade com aumento do MCF, CFT e trombocitose. Isso
217 se assemelha ao ocorrido com os animais do presente estudo, com exceção da
218 trombocitose.

219 Sabe-se que alguns tipos de câncer em cães e humanos podem levar a
220 hipercoagulabilidade, diagnosticados por anormalidades nos parâmetros de
221 análises hemostáticas como elevação dos níveis de fibrinogênio, trombocitose,
222 elevação de TP e TTPa, dímeros D, PDFs, e alterações nos parâmetros da
223 tromboelastometria¹⁵. Devido à participação das plaquetas e do fibrinogênio na
224 hipercoagulabilidade induzida por neoplasias na formação do coágulo, o MCF
225 torna-se a principal ferramenta para avaliar a hipercoagulabilidade em
226 pacientes com câncer, fazendo com que o TEG seja uma ferramenta superior a
227 qualquer outro teste hemostático². Da mesma forma, os pacientes com
228 carcinoma mamário do presente estudo apresentaram alterações mais
229 evidentes no TEM do que em relação às plaquetas e ao coagulograma, pois a
230 TEM é um método sensível, que é capaz de identificar e mensurar o estado de
231 hipercoagulabilidade, que não é detectado por testes laboratoriais de rotina, a
232 menos que a contagem de plaquetas e a concentração de fibrinogênio estejam
233 acentuadamente elevadas².

234 No presente estudo, notou-se aumento significativo da agregabilidade
235 plaquetária dos pacientes com carcinoma mamário. Em estudos anteriores
236 também foi observada hiperagregabilidade plaquetária, corroborando com o
237 presente estudo¹⁶⁻¹⁷.

238 A hiperagregação das plaquetas pode induzir a formação de um trombo e
239 a posterior oclusão dos vasos sanguíneos levando à isquemia, se tornando um
240 importante parâmetro a ser avaliado. Entretanto, a oclusão arterial por trombos

241 plaquetários frequentemente é independente de hiperagregação plaquetária, já
242 que normalmente existe uma lesão de parede vascular, sobre a qual ocorrem a
243 adesão e agregação plaquetárias, que são funções normais das plaquetas ¹⁸⁻¹⁹.

244 Em relação ao TTPa, o mesmo não apresentou alteração significativa,
245 fato que confirma os achados de Akay et al.², em que cães com neoplasias
246 variadas demonstraram hipercoagulabilidade apenas quando avaliados pela
247 tromboelastometria, evidenciando que a hipercoagulabilidade é dificilmente
248 detectada por testes de hemostasia convencionais, como já citado
249 anteriormente. Por examinarem partes isoladas deste processo, a detecção
250 destas afecções não é notada por testes de rotina a menos que essas
251 alterações sejam acentuadas ²⁻³⁻⁵. Um estudo realizado por Stockhaus et al.²⁰,
252 observou aumento de TP e TTPa em cadelas com carcinoma mamário, porém
253 estas apresentavam estadiamento tumoral IV.

254 Apenas o TP das cadelas com carcinoma mamário estava maior que o
255 grupo controle do presente estudo, podendo estar relacionado à secreção de
256 citocinas pró-inflamatórias que promovem o aumento do consumo dos fatores
257 de coagulação³, corroborando com os achados de Stockhaus et al.²⁰

258 Em um estudo realizado por Kristesen et al.⁴ constatou-se que 67% dos
259 cães com neoplasia maligna têm disfunção hemostática, dos quais 50% dos
260 cães estavam hipercoaguláveis. A identificação de hipercoagulabilidade em
261 pacientes com câncer pode ajudar a identificar pacientes com risco de eventos
262 tromboembólicos induzido por neoplasias malignas³.

263 Estes resultados juntamente com esta pesquisa sugerem que a avaliação
264 da hemostasia deve ser incluída na rotina de avaliação de cães com câncer.
265 Também sugere-se que estudos adicionais são necessários para avaliar se

cães com hipercoagulabilidade apresentarão doença tromboembólica e se uma intervenção terapêutica com anticoagulante seria justificada.

268

269 **Conclusão**

Os resultados do presente estudo demonstraram que cadelas com carcinoma mamário apresentam evidências de risco trombótico caracterizado por alterações da coagulação e agregação plaquetária.

273

274 **REFERÊNCIAS**

1.MEIS, E.; LEVY, R. A. Câncer e trombose: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, n.53, p.183-193, 2006.

277

2.AKAY, O. M.; USTUNER, Z.; CANTURK, Z.; MUTLU, F. S.; GULBAS, Z. Laboratory investigation of hypercoagulability in cancer patients using rotation thrombelastography. *Medical Oncology*, v.26, p.358-364, 2009.

281

3.ANDREASEN, E. B.; TRANHOLM, M.; WIINBERG, B.; MARKUSSEN, B.; KRISTENSEN, A. T. Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.54, n.3, 2012.

286

4.KRISTENSEN, A. T.; WIINBERG, B.; JESSEN, L. R.; ANDREASEN, E.; JENSEN, A. L. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, p.140-147, 2008.

291

5.SAAVEDRA, P. V.; GARCÍA, L. A.; LÓPEZ, S. Z.; COUTO, G. Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *The Veterinary Journal*, v.180, p.78-83, 2011.

295

6.HOFFMAN, R.; HAIM, N.; BRENNER, B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood Reviews*, v.2, n.15, p.61-67, 2001.

298

7.JOHNSON, L. R.; LAPPIN, M. R.; BAKER, D. C. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n.13, p.338-345, 1999.

302

8.SOUSOU, T.; KHORANA, A. A. New insights into cancer-associated thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. n.29, p.316-320, 2009.

306

- 307 9.MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em pequenos animais*. São Paulo:Roca,
308 p.185-192, 2007.
- 309
- 310 10.OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.;
311 DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta*
312 *Scientiae Veterinariae*, v.31, p.105-110, 2003.
- 313
- 314 11.KOL, A.; BORJESSON, D. L. Application of thromboelastography/
315 thromboelastometry to veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39,
316 n.4, p.405-416, 2010.
- 317
- 318 12.GOOGS, R.; WIINBERG, B.; KJELGAARD-HANSEN, M.; CHAN, D.L. Serial
319 assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic
320 anaemia using thromboelastography. *The veterinary Journal*, v.191, p. 347-353,
321 2012.
- 322
- 323 13.OTTO, C.M.; RIESER, T.M.; BROOKS, M.B.; RUSSELL, M.W. Evidence of
324 hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American*
325 *Veterinary Medicine Association*, v.217, p1500–1504, 2000.
- 326
- 327 14.FALCO, S.; ZANATTA, R.; BRUNO, B.; MAURELLA, C.; SCALONE, A.;
328 TARDUCCI, A.; BORRELLI, A. Thromboelastometry used for evaluation of
329 blood coagulability in dogs with kidney diseases. *Acta veterynarian brno*, v.82,
330 p.209-214, 2013.
- 331
- 332 15.ZWICKER JI, FURIE BC, FURIE B. Cancer-associated thrombosis. *Critical*
333 *Review Oncology and Hematology*, v.62, n.2, p.126–36, 2007.
- 334
- 335 16.MCNIEL, E. A.; OGILVIE, G. K.; FETTMAN, M. J.; SALMAN, M. D. Platelet
336 hyperfunction dogs with malignancies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*,
337 v.11, n.3, p.178-182, 1997.
- 338
- 339 17.THOMAS, J.S.; ROGERS, K.S. Platelet aggregation and adenosine
340 triphosphate secretion in dogs with untreated multicentric lymphoma. *Jounal*
341 *Veterinary Internal Medicine*, v.13, p.319-322, 1999.
- 342
- 343 18.SILVA, L.L.; D'AMICO, E.A. Estudo comparativo entre agregação
344 plaquetária por turbimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia
345 antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. *Revista Brasileira de*
346 *Hematologia e Hemoterapia*. v.32, n.6, p. 463-468, 2010.
- 347
- 348 19. SUDO, T.; ITO, H.; OZEKI, Y.; KIMURA, Y. Estimation of anti-platelet drugs
349 on human platelet aggregation with a novel whole blood aggregometer by a
350 screen filtration pressure method. *British Journal of Pharmacology*, v.133, n.8,
351 p.396-404, 2001.
- 352
- 353 20.STOCKHAUS C, KOHN B, RUDOLPH R, BRUNNBERG L, GIGER U:
354 Correlation of haemostatic abnormalities with tumour stage and characteristics
355 in dogs with mammary carcinoma. *Jounal Small Animal Practice*, v.40, p.326-
356 331, 1999.

Normas da revista Journal of Veterinary Internal Medicine

Guidelines for preparation of manuscripts submitted to the *Journal of Veterinary Internal Medicine*

(Revised July 22, 2014)

A. Editorial Policy

The mission of the *Journal of Veterinary Internal Medicine* is to advance veterinary medical knowledge and improve the lives of animals by publication of authoritative scientific articles about animal diseases. The *Journal of Veterinary Internal Medicine (JVIM)*, the Official Publication of the American College of Veterinary Internal Medicine, provides an international forum for communication and discussion of the latest developments in large and small animal internal medicine.

The *JVIM* has an editorial policy of continuous quality improvement by raising the standards of evidence in articles published by the *JVIM*. The *JVIM* encourages submission of manuscripts describing studies that use the highest standards of Evidence Based Medicine. To raise standards of evidence in manuscripts published in *JVIM*, the following manuscript types and study designs will be prioritized for publication:

- Meta-analyses of common conditions

- Prospective and randomized clinical trials

- Prospective, case-control studies

- Epidemiology or population-based studies with robust statistical power

In reporting on studies, authors are strongly encouraged to consider the CONSORT guidelines for reporting of clinical trials. Additionally, for studies involving livestock species, authors should prepare reports using the REFLECT guidelines (see *J. Vet. Intern. Med.* 2010;24 (1)). Reviewers will be asked to consider these guidelines when reviewing manuscripts submitted to the Journal. The *JVIM* does not mandate that manuscripts satisfy all aspects of the CONSORT and REFLECT guidelines in order to be published in the Journal,

but these guidelines will be used to assess the suitability of manuscripts for publication in the Journal.

Beyond general quality and scientific rigor, important criteria for acceptance are originality and interest to the broader readership of the Journal. Thus, articles that are otherwise scientifically sound may be rejected because they are felt to lack breadth of appeal or are outside the interest area of the Journal. Manuscripts that fall into the following categories are unlikely to be accepted for publication unless there are exceptional reasons:

- Simple descriptive and observational studies with no specific question and no substantial discovery, especially where these deal with diseases that have been previously reported
- Single case reports unless they provide thoroughly documented and important mechanistic insights, illuminate a novel principle, or describe a newly recognized disease or important variation of a well-recognized disease
- Retrospective case series, particularly for common or well-described conditions, unless they provide important mechanistic insights, illuminate a novel principle, or challenge the conventional dogma
- Reports of new diagnostic or investigative tests or reagents without characterization of their utility in diagnosing or detecting the target disorder or application to specific questions
- Studies involving only healthy animals.

Preferred are studies that report results on animals with the target disorder, compare results in healthy animals with those of animals with the target disorder, or combine results with results of studies that examine clinically relevant variables

- Findings that are repetitive of previously published information and provide no further mechanistic insight
- Studies of non-mammalian or exotic species

The following manuscript topics will be considered:

- Pharmacokinetic studies.

Such studies will only be considered for publication when the clinical impact is clearly stated, and the target disease is relevant to the readership. Studies that include animals with the target disorder will be given preference.

- Animal models of animal disease (target disorder and species, i.e. dog models of dog disease).

2 Such studies will be considered for publication if the induced disease is directly relevant to the spontaneous disease.

- Animal models of animal disease (non-target species, e.g. rat model of dog disease).

Studies that describe induced disease in one species that models spontaneous disease in another species will only be considered if the study is clinically relevant to the target species.

- Animal models of human diseases.

The Journal does not publish experimentally-induced animal models of human disease, but naturally-occurring animal models of human disease will be considered.

- In vitro studies (i.e. cancer cell lines).

The Journal publishes results of in vitro studies only when the results have direct clinical application, preferably demonstrated by studies in the target species. In vitro studies of antimicrobial susceptibility will not be considered for publication in the Journal.

Consensus Statements:

Consensus statements must originate with and be approved by the ACVIM College Board of Regents (BOR). The Journal does not publish consensus statements from other groups.

Ethics:

Studies of animals including, but not restricted to, those describing induction of disease, administration of drugs or other substances, surgical interventions or clinical trials must be conducted in accordance with regulations governing the use of animals at the authors' institution. It is the responsibility of the authors to obtain approval by the appropriate regulatory group (e.g., Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee, Animal Ethics Committee) and report this approval in their manuscript. The design of prospective studies involving client-owned animals with spontaneous disease (clinical trials) should be approved by the appropriate regulatory group (e.g. Hospital Board) and the manuscript should include documentation of informed client consent.

It is incumbent upon the authors to ensure that care of animals meets standards required by the authors' institution.

The Journal reserves the right to decline to publish manuscripts in which approval by the appropriate regulatory group is not reported or when the Journal has concerns about the welfare or treatment of animals used in the study.

The Journal may request further information about care and use of animals including evidence of regulatory approval, client consent or compliance with local regulations.

Prior publication, multiple publication, and fragmentary publication:

Manuscripts will be considered for publication with the clear understanding that their contents have not been previously published (abstracts $\leq$ 250 words presented at scientific meetings are excepted) and have not been (and will not be) submitted or published elsewhere while acceptance by *JVIM* is under consideration. Abstracts published by the *JVIM* as part of the ACVIM Forum Proceedings are exempt from the 250 word limit.

The *JVIM* strongly discourages authors from fragmented reporting of aspects of a single investigation or clinical study. Authors submitting a manuscript that is one of a number of existing or planned manuscripts related to a single study must include a statement in the cover letter that so states, and justifies use of a fragmented approach. Related manuscripts, published or unpublished, should also be included with the submitted manuscript. The submitted manuscript itself must clearly explain and justify the fragmented approach and reveal the full extent of the investigation.

Companion manuscripts:

If authors are submitting 2 or more manuscripts dealing with aspects of the same study (sometimes called companion manuscripts) or manuscripts that describe different studies of the same group of animals, collection of cases, or experiment, then the Journal must be notified of the titles and submission number (if a manuscript has been submitted) of the relevant manuscripts as the time of submission of the second or subsequent manuscripts. Preferably, all manuscripts will be submitted at the same time, in which case the Journal should be informed of the titles of each of the manuscripts.

Historical controls:

The *JVIM* discourages submission of manuscripts describing studies in which formal comparison, including but not limited to statistical analysis, is made between a contemporaneous group of animals and historical controls (that is, information obtained by retrospective review of case records).

3. Copyright:

Publication in the *JVIM* is subject to the condition that the article (as a whole or in part) has not been published or submitted for publication elsewhere. In submitting the manuscript to the publisher, the author certifies that neither the author's contribution nor any text or figures procured and included by the author infringes upon the rights of a third party, and that the author alone is authorized to dispose of the existing right of utilization with regard to copyright. For the duration of the lawful copyright, the author grants the publisher, regardless of location the exclusive right of duplication and dissemination (right of publication) without restriction as to the amount or number of downloads and for all print and electronic editions in tangible or intangible form as well as the issuance of licenses to third parties nationally and abroad for the exercise of the ancillary rights granted. The publisher is authorized to make use of the utilization rights to which he is entitled; however, he is not obligated to do so.

Receipt of the appropriate license agreement as emailed from Wiley's Author Services System is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless this has been received by the Journals Wiley Production Editor. (Government employees in both the US and the UK must complete the form as explained in the license agreement.)

Correspondence to the *JVIM* is accepted on the understanding that the contributing author licenses the publisher to publish the letter as part of the *JVIM* or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the *JVIM* and its contents.

Authorship:

The editors will not attempt to resolve disputes among authors or potential authors of a manuscript that are related to authorship.

The *JVIM* follows the 2013 guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors "*Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals*" regarding authorship.

Authorship requires:

- Substantial contributions to: the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; and
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and
- Final approval of the version to be published; and
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

At manuscript submission you will be prompted to upload a completed Authorship Declaration form. The form is available under Instructions & Forms (upper right corner) at the *JVIM* website.

Scientific misconduct:

The Journal of Veterinary Internal Medicine considers the scientific integrity of articles it publishes of paramount importance. In general, the Journal follows the definitions of scientific misconduct provided by the World Association of Medical Editors (WAME) Recommendations on Publication Ethics Policies for Medical Journals. Misconduct includes, but is not limited to: falsification of data, plagiarism, improprieties of authorship, misappropriation of the ideas of others, violation of generally accepted research practices, material failure to comply with legislative and regulatory requirements affecting research, and inappropriate behavior in relation to misconduct.

If the Journal editors become aware of concerns of scientific misconduct in submitted or published manuscripts, we will contact the authors and conduct an

initial investigation of the matter. Authors should be aware that authorship of an article includes agreement that all authors be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The matter will be handled using Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines and practices. Initially, every effort will be made resolve the matter with the authors. If the editors believe there is *prima facie* evidence of scientific misconduct, they will refer the matter to the corresponding author's institution or appropriate authorities for investigation.

The editors reserve the right to request retraction of an article, publication of a correction, or other action intended to preserve the scientific integrity of the Journal. Additionally, the Journal reserves the right to decline to consider manuscripts for publication authored by individuals found to have committed scientific misconduct in the Journal or other scientific publications.

The Journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) through our publisher (Wiley-Blackwell).

Transparency and Conflict of interest:

Authors of research articles must disclose at the time of submission any financial arrangement they have with the company whose product features prominently in the submitted manuscript, or with a company making a competing product. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will not influence the editorial

4 decision, but if the article is accepted for publication, the editor may discuss with the author the manner in which such information is to be communicated to the reader.

By submission of the manuscript, all authors confirm that the manuscript is an honest, accurate, and transparent account of the study being reported; that no important aspects of the study have been omitted; and that any discrepancies from the study as planned (and, if relevant, registered) have been explained.

Off-label antimicrobial use:

Authors of research articles must disclose at the time of submission off-label antimicrobial use in the country in which the study was conducted. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will

not influence the editorial decision, but if the article is accepted for publication, the editor may discuss with the author the manner in which such information is to be communicated to the reader.

By submission of the manuscript, all authors confirm that the manuscript accurately discloses off-label antimicrobial use.

Manuscript review:

All manuscripts are reviewed by experts in the field who advise the editors of the manuscript's scientific quality. Decisions regarding publication are made by the Co-Editors-in-Chief acting on the advice of reviewers and Associate Editors. At the editor's discretion, particularly meritorious manuscripts that are of unusually high priority and significance will be considered for expedited publication. Authors will be notified by the Editorial Office upon scheduling of their manuscript as a rapid publication.

OnlineOpen:

Available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee (currently \$3,000) to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository or other free public server. For more information, please visit the OnlineOpen program.

B.1.1. Manuscript Preparation

Manuscripts should be prepared as described below. Manuscripts that do not follow the specified format will be returned for correction before being sent out for review.

1. Manuscripts must be double-spaced, using US (8½" x 11") page settings (A4 page settings not accepted), and leaving at least 1-inch margins.
2. Page numbers must be included in the upper right-hand corner of each page.
3. Manuscripts must be formatted with line numbers in the left hand margin.

4. Figures and graphs must conform to the *JVIM* guidelines (see B.1.4., B.1.5., B.1.8. and B.1.9.).

5. Manuscripts must be submitted in English using American spelling and must be grammatically correct. Authors whose native language is not English are advised to seek assistance in manuscript preparation from someone fluent in written English, or use Wiley professional services.

B. 1.2. Standard Paper

The length of a standard paper must not exceed 5000 words including text, references, tables, figure legends and footnotes.

Title page: The first page of the manuscript must include the following (in addition to this information being entered at the *JVIM* submission website):

- Title of the manuscript.

Manuscript titles should be indicative (i.e. stating the subject of the manuscript) rather than informative (i.e. stating the manuscript's main conclusion) and should be limited to 20 words or fewer than 150 characters (including spaces).

The editors may edit titles as necessary.

- Names of the authors with their institutions and affiliations.
- Short title (maximum 6 words) for use as a running head.
- Keywords (maximum 4 words) not already used in the manuscript title.
- List of abbreviations used in the manuscript.
- Name, address, and e-mail address of the corresponding author.

- 5 • Separate paragraphs for the following:

Where the work was done.

Whether the study was supported by a grant or otherwise.

Meeting, if any, at which the paper was presented.

Acknowledgments

Abstract: The abstract must not exceed 250 words.

The abstract must be included in the manuscript as well as uploaded to the submission website. They must be identical and must be constructed using the following subheadings:

Background – A brief explanation of why the study was performed.

Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.

Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g., research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g., disease status).

Methods – A statement of overall study design (e.g., randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.

Results – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.

Conclusions and clinical importance – A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

Introduction: The introduction should not exceed approximately 500 words.

The introduction is untitled. Please provide a clear statement of the objective and rationale of the study, and provide only pertinent references. A brief overview of the topic is appropriate in setting the context for the study. Do not review basic physiology, pathophysiology, medical principles, or aspects of the disease that were not studied. An extensive review of the subject will not be accepted.

Materials and Methods:

The materials and methods should be provided in sufficient detail that another investigator could replicate the study:

1. Study design should be clearly described using accepted terminology (e.g., randomized double-blind placebo controlled study, retrospective review of medical records).
2. Common methods or procedures need not be described in detail, and where possible citation should be made to techniques that have been reported elsewhere. A statement of animal care must be made (e.g., animals were cared for according to the principles outlined in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). A concise description of the statistical methods should be provided including analytical software and citation of sources for unusual

methods. Additional guidelines are included in the Statistical Guidelines for *The Journal of Veterinary Internal Medicine*.

Results:

State concisely, in logical sequence, the results of the study using the following guidelines:

1. Subheadings may be used for particular sections (e.g., clinical findings, radiographic findings)
2. Tables are a concise means of presenting large amounts of numerical data in a logical format. Do not reproduce the same data in both tables and figures.
3. Tables containing raw data for a number of variables for each individual animal are not appropriate. Such data should be provided, either in a table or in the text, using summary or descriptive statistics.
4. Tables should not contain only two rows with two or more columns or two columns with two or more rows (e.g., a table providing hematologic data for one group of animals). Such data should be reported in the text.
5. Do not editorialize or discuss the implication or importance of results in the "Results" section.

Discussion:

The discussion should explain the relevance and importance of the study. Excessive detail can obscure important findings.

- The first paragraph of the discussion should provide an overview of the results and a brief description of the importance of these results.
- The discussion must be concise. Focus on the novel and innovative aspects and discuss the results of your study in light of earlier studies. Do not discuss aspects of the topic that you did not study (e.g., treatment options if you did not study treatment).
- Address any limitations of your study so that the reader is aware of constraints to interpretation of your results.

Text:

In order to insure consistency in the *JVIM*, authors are requested to adhere to the following guidelines:

1. When referring to a drug, use the generic name approved by the US Food and Drug Administration or recognized as the US-adopted name. The trade name (if one exists), manufacturer's name, city and state abbreviation should be provided in an endnote the position of which is marked in the text by a superscripted

6 lower case letter. Begin superscripts with letter "a" and label endnotes (including references to abstracts) alphabetically in the order in which they appear in the text. For products not approved by the United States Food and Drug Administration (FDA), the final concentration of the active ingredient or ingredients, identity of excipients, and name and address (as an endnote) of the compounder or manufacturer must be provided in the text.

2. Laboratory values should be reported in conventional (US) units. Système Internationale (SI) units can be used in addition to conventional units.

3. With the exception of laboratory values as discussed above, all measurements should be expressed in metric units. Analyte concentrations should be expressed in conventional units (e.g., mg/dL, g/dL) but authors may also include Système International (SI) units (e.g., mmol/L, $\mu\text{mol/L}$). If confusion could result, include other measurement systems in parentheses.

4. The *JVIM* adheres to the principles specified in *Nomina Anatomica*, *Nomina Histologica*, *Nomina Embryologica*, *Nomina Anatomica Veterinaria* and *Nomina Anatomica Avium* where appropriate. The *JVIM* strictly follows the *American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors*, 9th edition.

5. When describing products or equipment, the generic name should be used in the text and the details of the product (brand name, manufacturer, city and state) should be provided in an endnote. The endnotes should be labelled with superscripted letters, beginning with "a."

B.1.3. References

References are cited in the text and details provided in a numbered list at the end of the manuscript.

Number references consecutively in the order in which they are first cited in text (or tables and legends), using Arabic numerals. References must be verified by the author against the original documents. Unpublished observations, personal

communications, submitted papers not yet accepted, and abstracts cannot appear in the reference section. Citations to abstracts should be made in the text using superscripted letters (see #1 under "Text" for details) with the reference details provided in an endnote. References with 5 or more authors may include the names of the first 3 authors followed by "et al."

Please see a recent issue of the *JVIM* for examples of reference format. A complete listing of formatting guidelines for references is provided online at the National Institutes of Health.

B.1.4. Tables

Place each table on a separate page, double-spaced. Number tables consecutively, as cited in text, and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Supply table legend with explanatory matter that will be used as footnote. For example - ELISA, enzyme-linked immunoabsorbant assay; HR, heart rate. Do not provide tables of values from individual animals. Tables can be included at the end of the article file, after References, or submitted as a separate file.

B.1.5. Legends for Illustrations and Tables

Legends should be double-spaced, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain clearly in the legends any symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. For photomicrographs, identify method of staining and magnification. Legends should be included at the end of the article file, after References.

B.1.6. Abbreviations

Spell out any term that will be abbreviated the first time it is used followed by the abbreviation in parentheses. Example: gestational diabetes mellitus (GDM). Use only the abbreviation from that point forward in the manuscript. Supply a list of abbreviations and definitions unique to the article at time of submission. The editor will decide at the time of editing which abbreviations will be included in an "abbreviation table" for the published article. The editor reserves the right to determine when, and how often, an abbreviation is used.

The following abbreviations do not need to be spelled out or included in an "abbreviation table."

CBC, IM, IV, SC, PO, CC, PCV, ACTH, ELISA, ECG, EKG, PQ interval, PR, QRS duration, QT interval, ST,

T wave, Pwave, aVR, aVL, aVF.

B.1.7. Numbers

Use North American convention of a decimal point, not a comma, for a decimal place.

Use a leading zero on values less than 1. Example: 0.3 instead of .37

Do not express numbers using excessive precision. Use the appropriate number of significant digits.

For further details concerning manuscript preparation consult the American Medical Association's *Manual for Authors & Editors: Editorial Style and Manuscript Preparation* and/or *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*.

B.1.8. Illustrations

For the electronic submission of your manuscript, the illustrations must be submitted as separate files. The system will merge the manuscript and figures together and create a PDF.

Submit artwork in digital format. Save line artwork (vector graphics) as Encapsulated PostScript (EPS) files and bitmap files (halftones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF), with a resolution of at least 300 dpi at final size. Do not send native file formats. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at Wiley Author Services.

Black-and-white illustrations, in the form of glossy prints, will be reproduced free of charge, but the editor reserves the right to establish a reasonable limit. Color illustrations may be published, but the editor reserves the right to decide if color is needed to convey meaning and will establish a reasonable limit.

The following instructions are provided to guide authors in the preparation of figures and graphs for publication in *JVIM*. Figures and graphs must conform to these guidelines in order for the manuscript to be considered for publication in *JVIM*. For preparation of graphs, the use of purpose-designed software is usually necessary. Graphs created by Microsoft Excel rarely meet the requirements set out below. Do not use color in graphs unless it is absolutely necessary (the editors will make the final assessment about the reproduction of color figures).

Sizing:

Authors should size graphs to 1 column width (8 cm) and half tone images to 2 column width (16 cm). The height of the image should be proportional to its width (it is unlikely that height would ever be more than 1.5 times width).

Legend:

The figure legend should stand alone and be explanatory of the graph or figure. The legend should include a statement of the number of animals, intervention, variables depicted, an explanation of the symbols (key) used in the graph including those used to identify groups of animals or variables, or statistical significance. Do not include figure legends in the graph. Do not include interpretation of results in the figure legend.

Photographs:

- Photomicrographs: Photomicrographs must be of good visual quality (focus, clarity, color) and must include a scale bar. Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained tissues will be published in black and white. Photomicrographs of tissues stained with other stains may be published in color, at the editor's discretion.
- Photographs of animals, organs, or gross lesions: Photographs of animals are rarely useful, but if used must be of excellent quality. Photographs of animals must be aesthetically pleasing. Photographs of animals that are in obvious pain or discomfort or undergoing experimental procedures should not be used. Line drawings are often preferable and a better means of depicting abnormalities or procedures. Photographs that are limited to lesions are preferred to those of the animal or whole organs. The photograph must be of excellent quality and the lesion must be readily apparent. Use of arrows or other means of identifying the lesion is recommended.

Graphs:

- Boxes: Do not include boxes around graphs.
- Graph type: Continuous data should be depicted as scatter plots or box plots. Bar graphs, either horizontal or vertical, should be reserved for depiction of frequency data (e.g., counts) and are not an appropriate means of depicting continuous data. Do not use lines connecting data points if doing so implies a temporal relationship between the connected points, when such a relationship

does not exist. Do not use the “spline” function to produced smoothing or interpolation of lines between data points.

- **Axes:** Include only those axes necessary for presentation and interpretation of the data in the graph. Usually, this means that graphs should have only left and bottom axes, and no top or right axes. There will be graphs in which more than one vertical axis is needed, for example when the graph includes 2 dependent variables of different units, but this is the only instance in which multiple vertical axes are required.
- **Grid lines:** Do not include grid lines (horizontal, vertical, or both) in graphs.
- **Data:** All graphs that include an estimate of central tendency (mean, median) must include an estimate of variance (standard deviation, range, or confidence intervals).
- **Symbols:** Symbols should be unequivocal when reproduced in black and white. Lines should be readily identified and discernible in black and white. In bar graphs in which there are multiple bars of different fill, the fill and pattern should be such that bars are readily identified in black and white. Shades of grey reproduce poorly and are not easily differentiated. Please use solid fill (black or white), with or without bold patterns (stripes, lines, cross hatch).

Font type, size, and color: Use Arial font in all graphs. Internal labels for axis labels, tick labels, symbols (e.g., *, †), and notations on the graph should be 8 point font (combination of capitals and lower case as necessary). 10 point capital letters (upper case) should be used for designating multiple images or graphs within a figure (i.e., A, B, C, D). These designations should be BOLD and placed in the UPPER LEFT corner of the individual image within the multiple-image figure.

B.1.9. Supporting Information (formerly known as Supplementary Material) and Video

The Journal, through Wiley-Blackwell, is able to host online approved supporting information that authors submit with their paper. Supporting information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the Journal.

Supporting information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supporting information published.

Supporting information may also be displayed on an author or institutional website. Such posting is not subject to the Journal's embargo date as specified in the Copyright Assignment or Exclusive License form. In such cases, it is the author's responsibility to ensure that the supplied URL for the supporting information remains valid for the lifetime of the article.

Neither the Journal nor Wiley-Blackwell provide technical support for the creation of supporting information. If technical support is required to output supporting information in a suitable format and size as outlined below, authors should seek the assistance of their local IT department.

All supporting information must be supplied with a legend stating what it is, what format it is, and where necessary how it was created.

Further details regarding the format of supporting materials is available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>

C.1.1. Other Submissions

The guidelines for letters to the editor, brief communications, case reports, and review articles as they relate to title page, illustrations, references, etc., are the same as those for the standard paper.

C.1.2. Letters

Letters must not exceed 1200 words in length, including references, supplemental material and authors' names and addresses.

The letters to the editor section provides a forum for issues in veterinary internal medicine. Letters can relate to any aspect of internal medicine, as well as provide an opportunity for the reader to respond to the contents of *JVIM*. The editors reserve the right to decline to publish letters that do not contribute to the discussion, make personal allegations against individuals, or are libelous.

Preliminary findings of new investigations will also be considered for publication in letter format.

Letters should be sent to:

Journal of Veterinary Internal Medicine, 1997 Wadsworth Boulevard, Lakewood, CO 80214-5293; Phone: 303-231-9933 or 800-245-9081 (US or Canada); Fax: 303-231-0880; E-mail: JVIM@ACVIM.org.

C.1.3. Brief Communications

Must not exceed 2500 words, excluding references which should be limited to 10, and should be clearly marked "Brief Communication."

The *JVIM* publishes brief communications. Brief communications will no longer be labeled as such in the Journal and will not be allocated a separate section in the hard copy of the Journal. However, the guidelines for formatting and length still apply.

This section does not necessarily contain conventional subdivisions but must be accompanied by a brief structured abstract, in the same form as specified for standard articles (see above), and essential references, not to exceed 10. This section is meant to accommodate reports of small completed investigations or new techniques.

9 Brief communications usually have the same priority for publication as standard manuscripts.

C.1.4 Case Reports

Case reports should not exceed 2500 words excluding references, which should be limited to 25, and including tables.

Case reports should not have an abstract but should have a title page. The accompanying letter must indicate why the case is reported (i.e., describe its unique features).

The *JVIM* contains a separate section for case reports. This section will accommodate case descriptions of newly recognized clinical entities, cases in which findings or clinical outcome are unique or unexpected, or cases in which new diagnostic methods or treatments have been used. In order to be considered for publication, case reports must clearly indicate the novel nature of the disease or condition being reported, how reporting the case will alter conventional diagnosis or treatment of the condition, or how reporting the case will advance fundamental understanding of the disease.

Authors should be aware that the acceptance rate for case reports submitted to the *JVIM* is low with many submissions rejected after editorial review.

Case reports include a detailed description of each animal in the report. The report should focus on the novel aspects of the case and not include a detailed description of routine clinical management. Avoid chronological descriptions of animal care and detailed descriptions of routine treatment.

The number of animals in a case report is usually 3 or fewer, and never exceeds 5. For case series including more than 5 animals, the report should be formatted as a standard article using the Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion format. Results for articles in the standard format should be reported as measures of central tendency and variance or range. Values for individual animals should not be reported in this format. Note that the *JVIM* does not publish tables with results from individual animals.

C.1.5. Review Articles

Review articles should not exceed 7500 words (excluding references).

The use of color illustrations, line drawings and figures in review articles is encouraged.

Abstracts of review articles are narrative and not structured as are abstracts for standard articles.

Review articles, which may be solicited by the editorial board or submitted unsolicited by the authors, are meant to provide the reader with an overview of the state of the art in a specialized area of veterinary internal medicine. They should be submitted by individuals who are actively working in the area, and not by those who have reviewed the literature as a prelude to beginning a project in the area. One of the authors must be a recognized expert in the field based on documented research activity and scientific publications. The review should be informative and of value to generalists as well as specialists.

D.1.1. Permissions

Permissions of author and publisher must be obtained for the use of previously published material (e.g., text, photographs, drawings) and must accompany the manuscript when it is submitted for publication.

E.1.1. Editing and Inclusion of Additional Material to Final Draft

The final draft of the manuscript will be edited by one of the Editors-in-Chief. The manuscript must be revised to incorporate all of the recommended editorial changes. Furthermore, no additional material, except where specifically requested by the Editor-in-Chief, may be added to the manuscript during the

final revision or galley proof stages. All material contained within the manuscript must have been subject to peer review. For this reason, inclusion of additional material (including data, figures, tables and text) is not permitted after review of the manuscript.

F.1.1. Submission

Manuscripts may be submitted only through the *JVIM* website.

Authors must submit cover letters, manuscripts, figures and authorship declaration as separate files. The system will create a PDF when merging the manuscript and figures into one file.

10 F.1.2. Submission Fee

A \$50.00 non-refundable fee (payable in US funds only) is required at the time of submission. The fee can be paid through the e-commerce feature of the manuscript submission website. Visa, MasterCard and American Express accepted.

We also accept check/money order (payable to the ACVIM and funds drawn on an American Bank) or university purchase order.

If not paying through the e-commerce feature payment information **MUST** be included in a cover letter submitted with the manuscript (as a separate file), or e-mailed to *JVIM@ACVIM.org* at the time of submission.

Manuscripts will not be processed unless the submission fee is paid. Payment guidelines are online.

You can contact *JVIM* through the ACVIM office:

American College of Veterinary Internal Medicine, 1997 Wadsworth Boulevard, Lakewood, CO 80214-5293, Toll free (US and Canada): 800-245-9081 Phone: 303-231-9933 Fax: 303-231-0880, *JVIM@ACVIM.org*.