

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“Análise do perfil hemostático e do risco tromboembólico em cães
submetidos ao tratamento com prednisona”**

FELIPE GAZZA ROMÃO

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“Análise do perfil hemostático e do risco tromboembólico em cães
submetidos ao tratamento com prednisona”**

FELIPE GAZZA ROMÃO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Kiomi Takahira

BOTUCATU – SP

2012

Nome do autor: Felipe Gazza Romão

Título: ANÁLISE DO PERFIL HEMOSTÁTICO E DO RISCO
TROMBOEMBÓLICO EM CÃES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM
PREDNISONA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Duarte Silva
Membro
Consultor científico
Hospital Veterinário Pompéia

Data da defesa: 29 de junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, António Carlos e Cláudia, por estarem, mesmo à distância, juntos comigo nos melhores e piores momentos.

À minha companheira, Luciene, pelo carinho e compreensão.

À minha orientadora, Regina, pela paciência e ensinamentos.

Aos residentes do Laboratório Clínico Veterinário e pós-graduandos, pela ajuda e companheirismo.

Aos meus amigos, pela torcida.

À FAPESP, pelo incentivo e apoio financeiro, sob a forma de bolsa e auxílio-pesquisa.

LISTA DETABELAS

Tabela 1: Valores do perfil hemostático no momento 0 (pré-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória).....	61
Tabela 2: Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 0 (pré-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória)	61
Tabela 3: Valores do perfil hemostático no momento 1 (pós-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória)	62
Tabela 4: Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 1 (pós-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória)	62
Tabela 5: Valores do perfil hemostático no momento 0 (pré-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora)	63
Tabela 6: Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 0 (pré-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora)	63
Tabela 7: Valores do perfil hemostático no momento 1 (pós-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora)	64
Tabela 8: Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 1 (pós-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora)	64
Tabela 9: Agregação plaquetária em porcentagem dos animais em porcentagem entre os diferentes momentos e grupos	65

ABREVIACOES

%- por cento,

ADP – adenosina difosfato,

ALT - alanina aminotransferase,

AT – antitrombina,

BID – a cada doze horas,

CHCM –concentração de hemoglobina corpuscular média,

COX – ciclooxigenase,

et al – e colaboradores,

FA – fosfatase alcalina,

FvW – fator de von Willebrand,

GGT – gama glutamiltransferase,

HAC – hiperadrenocorticismo,

IAP – inibidores dos ativadores de plasminogênio,

kg – kilograma,

mg – miligramas,

mL-mililitros,

PDF – produto de degradação da fibrina,

PRP – plasma rico em plaquetas,

RDW – red cell distribution width,

TEP – tromboembolismo pulmonar,

TP – tempo de protrombina,

TSMO – tempo de sangramento da mucosa oral,

TT – tempo de trombina,

TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada

μ L- microlitro,

VCM – volume corpuscular médio,

VPM – volume plaquetário médio,

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
CAPÍTULO 2 – Trabalho científico	
Normas para submissão do artigo	13
Resumo	27
Introdução.....	28
Materiais e métodos	29
Resultados e discussão.....	32
Conclusões.....	39
Referências	39
CAPÍTULO 3	
CONCLUSÕES GERAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	
1. Valores descritivos de todos os grupos.....	61

ROMÃO, F. G. **Análise do perfil hemostático e do risco tromboembólico em cães submetidos ao tratamento com prednisona.** Botucatu, 2012. 72p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os distúrbios trombóticos e tromboembólicos aparentemente são menos comuns em felinos e caninos do que em humanos. A trombose foi reconhecida clinicamente associada a algumas doenças, como o hiperadrenocorticismo (HAC). Vários fármacos podem alterar o equilíbrio hemostático; dentre elas a prednisona, corticosteroide amplamente utilizado na medicina veterinária principalmente por seus efeitos imunossupressivos e anti-inflamatórios. Além disso, sabe-se que o hipercortisolismo pode estimular a formação de trombos pelo aumento de fatores de coagulação e diminuição da fibrinólise. O objetivo do presente estudo, portanto, foi demonstrar o efeito da prednisona sobre o perfil hemostático. Para tanto, foram constituídos dois grupos experimentais, sendo o grupo I, composto de 10 cães hípidos que receberam a dose de 1,0 mg/kg/BID por 15 dias, e o grupo II, composto de 10 cães hípidos que receberam a dose de 2,0 mg/kg/BID por 15 dias. Houve diminuição significativa dos níveis de antitrombina em ambos os grupos, aumento da agregação plaquetária e diminuição do fator de von Willebrand no grupo II. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas em relação ao tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO), tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT), contagem plaquetária, e dos valores de fibrinogênio, fator VIII e produtos de degradação da fibrina (PDFs) em nenhum dos grupos. Pode-se concluir que a prednisona pode aumentar o risco tromboembólico especialmente por diminuição de fatores anticoagulantes, não importando a dose utilizada.

Palavras-chave: Plaquetas; Hemostasia; Prednisona; Tromboembolismo.

ROMÃO, F. G. **Analysis of the hemostatic profile and thromboembolic risk in dogs treated with prednisone.** Botucatu, 2012. 72p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Thrombotic and thromboembolic disorders apparently are less common in cats and dogs than in humans. Thrombosis was clinically recognized associated with some diseases, such as hyperadrenocorticism (HAC). Several drugs can change the hemostatic balance, such as the corticosteroid prednisone, widely used in veterinary medicine mainly by its immunosuppressive and anti-inflammatory effects. In addition, it is known that hypercortisolism can stimulate the thrombi formation by the increase of coagulation factors and reduced fibrinolysis. The aim of this study, therefore, was to demonstrate the effect of prednisone on haemostatic profile. For this purpose, two experimental groups were set up, the group I composed by 10 mixed dogs, which received a dose of 1,0 mg/kg/BID for 15 days, and group II, composed by 10 mixed dogs that received the dose of 2,0 mg/kg/BID for 15 days. There was a significant decrease on antithrombin levels in both groups, increase on platelet aggregation and decrease of von Willebrand factor activity on group II. No statistically significant changes were observed in relation to oral mucosal bleeding time (OMBT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), platelet count, plasmatic fibrinogen values, factor VIII activity and fibrin degradation products (FDPs) in both groups. It can be concluded that the prednisone can increase the thromboembolic risk, especially by the decrease of anticoagulant factors, regardless of the dosage.

Keywords: Platelets; Hemostasis; Prednisone; Thromboembolism.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Apesar de o risco tromboembólico ser mais comum em humanos, este tem sido mais associado ao hipercortisolismo em cães do que em seres humanos (BURNS et al., 1981). Ainda assim são raros os estudos prospectivos e controlados sobre o efeito dos corticosteroides sobre a hemostasia em cães. A ausência de uma investigação sistemática dos estados de hipercoagulabilidade pode mascarar a real importância do hipercortisolismo sobre o risco tromboembólico.

A maioria dos trabalhos analisou animais que apresentavam hiperadrenocorticismo (HAC), de modo que ainda não está claro se as alterações hemostáticas estão diretamente ligadas ao efeito direto dos corticoides ou às complicações decorrentes da elevação endógena observada em casos de HAC, incluindo aquelas provocadas pelo desequilíbrio metabólico ou pela ação dos mineralocorticoides.

A prednisona é um corticoide amplamente utilizado na rotina de clínicas e hospitais veterinários. Apesar deste fato, há poucos estudos que realizaram a administração exógena de prednisona avaliando protocolos mais prolongados de terapia de 15 dias, comparando os efeitos de doses anti-inflamatórias e imunossupressoras (ROSE et al., 2011).

As possíveis diferenças observadas no comportamento da antitrombina (AT) em seres humanos e cães têm implicações na indicação do uso da heparina como agente profilático e terapêutico nas complicações tromboembólicas em pacientes com HAC. A heparina age acelerando a atividade da AT e seu uso pode não ser efetivo se os níveis de AT estiverem diminuídos (GUIMARÃES, 2005).

Além disso, existem poucos trabalhos que estudam a ação específica do uso da prednisona sobre a função e morfologia das plaquetas, já que a maior parte dos estudos analisa os fatores de coagulação, os anticoagulantes, e o sistema fibrinolítico.

Desta forma, pretendemos avaliar o efeito da prednisona sobre o número e função das plaquetas, a coagulação e o sistema fibrinolítico em um estudo prospectivo e controlado de dois protocolos terapêuticos em cães saudáveis, isentando em grande parte o efeito mineralocorticoide e sua influência sobre outras complicações sistêmicas a fim de determinar o risco tromboembólico associado à corticoidoterapia.

REVISÃO DE LITERATURA

Os componentes do sistema hemostático incluem 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 culmina com a 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. 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 e estabilizando o coágulo. Desta forma, em condições normais, os mecanismos anticoagulantes prevalecem sobre os pró-coagulantes (VIEIRA et al., 2007). Desde a descoberta das plaquetas em 1881, existe uma série de estudos para a avaliação e entendimento da função plaquetária (MICHELSON, 1996). 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).

Em um estado fisiológico normal, as plaquetas circulam sem aderir ao endotélio vascular íntegro; havendo qualquer lesão vascular, ou ainda uma alteração no fluxo sanguíneo, ocorre ativação plaquetária, que promove um importante papel nas respostas benigna e patológica à lesão vascular e trombose (PACKHAM e MUSTARD, 1977; HARRISON, 2005). As plaquetas são as únicas células que expressam exclusivamente COX-1 em cães (NARITA et al., 2007; FRESNO et al., 2008); esta forma o tromboxano A₂, que por sua vez, induz a agregação plaquetária e vasoconstrição (LUNSFORD e MACKIN, 2007). Os corticosteroides, por inibirem tanto a via da inflamação da COX-1 quanto da COX-2, inibiriam estes mecanismos (CORTESE et al., 2007).

A trombose desenvolve-se em resposta a alterações nos mecanismos anticoagulantes do sistema hemostático normal. Os fatores que interagem e predisõem à formação de trombos incluem lesão endotelial, estase vascular e hipercoagulabilidade. Em pequenos animais, as principais causas de trombose são: lesão do endotélio vascular associada a infecções (dirofilariose, sepsis, 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-III secundária a glomerulopatia) (BURNS et al., 1981; FELDMAN e RASEDEE, 1986; LARUE e MURTAUGH, 1990; NICHOLS, 1997; BAINES et al., 2001; JACOBY et al., 2001; SCOTT-MONCRIEF et al., 2001; TESHIMA et al., 2008).

O hiperadrenocorticismo (HAC) e a administração de glicocorticoides exógenos têm sido associados à trombocitose (NIESSEN et al., 1995). Entretanto, a administração isolada de prednisona em cães saudáveis tem resultado em resultados inconsistentes, demonstrando que a relação causa-efeito ainda não está bem esclarecida (STOCKHAM e SCOTT, 2008).

Ainda não está claro se a trombocitose observada nos quadros de HAC pode contribuir para o risco tromboembólico assim como ocorre na trombocitemia essencial, que pode chegar a contagens de até 5.000.000/ μ L (BASS e SCHULTZE, 1998). Em estudo apresentado por Feldman e Rasedde (1986) com cães com hiperadrenocorticismo não houveram alterações significativas na contagem plaquetária.

O aumento considerável no número de plaquetas que ocorre nos primeiros dias pós-tratamento com prednisona em cães com trombocitopenia imunomediada ocorre pela diminuição da destruição plaquetária mediada pelo sistema imune (ROZANSKI et al., 2002; CORTESE et al., 2007). A ação imunossupressora da prednisona também é responsável pela melhora na agregação plaquetária em enfermidades associadas à formação de anticorpos anti-plaquetas (FRESNO et al., 2008).

Outro estudo, conduzido por Narita et al. (2007) em cães saudáveis, demonstrou que a administração conjunta de meloxicam e prednisolona não resultou em mudanças significativas em relação aos testes de função plaquetária ou a sinais clínicos evidentes, como petéquias e equimoses. Por outro lado, um estudo em suínos demonstrou um aumento na atividade plaquetária induzida pelo ADP 60 minutos após a administração do ACTH (POZZI et al., 2009).

A trombose está geralmente associada com uma ou mais das seguintes condições: lesão endotelial, alterações no fluxo sanguíneo e mudanças na coagulabilidade do sangue. Em cães, a trombose está relacionada a uma grande

variedade de condições patológicas, dentre as quais o hiperadrenocorticismo possui importante destaque (VAN WINKLE e BRUCE, 1993).

Distúrbios endócrinos possuem uma influência significativa no balanço hemostático. Vários resultados de testes de coagulação anormais foram descritos em pacientes com valores hormonais alterados. 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 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. Vários destes mecanismos antitrombóticos, incluindo a antitrombina, o sistema proteína C - proteína S - trombosmodulina, dentre outros, atuam em locais diferentes na cascata de coagulação para inibir o acúmulo de fibrina. A fibrina formada apesar de ações anticoagulantes é então degradada pelo sistema fibrinolítico. O plasminogênio é uma forma inativa da plasmina, a qual representa a principal enzima protease do sistema fibrinolítico plasmático, atuando na digestão da fibrina em produtos da degradação da fibrina (PDFs) (FRANCHINI et al., 2010).

Os principais ativadores fisiológicos de plasminogênio que convertem o plasminogênio em plasmina são o ativador do plasminogênio tecidual e o ativador do plasminogênio tipo-uroquinase, embora o primeiro seja prevalente sob condições fisiológicas. A regulação fisiológica da fibrinólise plasmática ocorre primariamente em dois níveis: inibidores dos ativadores de plasminogênio (IAP), principalmente o IAP-1, e alfa-2 antiplasmina, que inibem a plasmina (FRANCHINI et al., 2010).

O mecanismo hemostático é um sistema intrínseco de forças pró-coagulantes e anticoagulantes que interagem para a produção de um coágulo; o sistema fibrinolítico então opera para lisar o coágulo. Estes sistemas evoluíram 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 hipercortisolismo é uma condição que está associada à obesidade, hipertensão, resistência à insulina, além de aumento do risco cardiovascular e tromboembólico. O hiperarenocorticismo foi relacionado a um estado de hipercoagulabilidade e aumento da incidência de eventos tromboembólicos venosos (MANETTI et al., 2010; FLINT et al., 2011; GOGGS et al., 2012). É possível afirmar que as alterações no perfil hemostático em decorrência do hipercortisolismo ocorram por lesão vascular ou endotelial e acúmulo de gordura central, ocasionadas pelos efeitos colaterais dos corticoides, em especial a hipertensão e a resistência insulínica (BROTMAN et al., 2006). Tanto o hipercortisolismo endógeno (como a síndrome de Cushing) quanto o exógeno (administração de glicocorticoides) podem levar aos mesmos efeitos em diversos sistemas (SQUIZZATO et al., 2007). Embora nosso trabalho tenha estudado a ação da administração de apenas 15 dias da prednisona, um corticoide usado extensivamente na rotina da clínica de pequenos animais, os indivíduos utilizados em nosso estudo apresentaram sinais clássicos do hiperadrenocorticismo ao final do tratamento, como poliúria, polidipsia, polifagia, e ganho de peso.

Em um estudo realizado com crianças submetidas a protocolo quimioterápico para leucemia, comparando a administração da dexametasona e da prednisona com relação ao risco tromboembólico, o grupo tratado com a segunda apresentou maior índice de ocorrência de evento tromboembólico (10,4% *versus* 1,8%); porém, um dado interessante diz respeito à maior concentração de fator de von Willebrand em pacientes tratados no grupo com dexametasona (NOWAK-GÖTTI et al., 2003). Outro estudo realizado com indivíduos saudáveis que receberam a administração de cinco dias de dexametasona também não encontrou diferença estatística significativa entre antes e depois do tratamento com o corticoide na concentração do fator de von Willebrand (BROTMAN et al., 2006). Seria interessante a realização de um estudo comparando diferentes glicocorticoides e doses com relação ao seu efeito no perfil hemostático em cães saudáveis.

Pacientes com síndrome de Cushing apresentam maiores taxas de mortalidade quando comparados à população geral, muito em razão do aumento em até quatro vezes das complicações tromboembólicas em indivíduos acometidos por esta enfermidade (JACOBY et al., 2001; KASTELAN et al. 2009). Estudos *in vitro* demonstraram uma diminuição da atividade fibrinolítica induzida por corticosteroides, principalmente em decorrência da estimulação da síntese/secreção do inibidor da

ativação do plasminogênio-I (IAP-I) (BROTMAN et al., 2006; FRANCHINI et al., 2010; VAN DER PAS et al., 2012). A terapia com corticosteroides foi implicada como causa de trombose em humanos, e um estudo indicou que as concentrações locais de ativador de plasminogênio tecidual estão diminuídas em pacientes com prednisona; o papel dos esteroides na trombose pode, portanto, ocorrer por diminuição deste ativador, levando à diminuição das concentrações de plasmina, uma enzima que media a lise do coágulo (VAN WINKLE e BRUCE, 1993). Na verdade, os mecanismos pelos quais os glicocorticoides aumentam o risco trombótico não são ainda claramente definidos, mas é bem provável que o façam pela estimulação da transcrição genética mediada por receptores de corticoides (BROTMAN et al., 2006; VAN ZAANE et al., 2009).

Há vários relatos da ocorrência de trombose em cães com HAC (LARUE et al., 1990; NICHOLS, 1997; BOSWOOD et al., 2000; JACOBY et al., 2001; TESHIMA et al., 2008) e ao tratamento com glicocorticoides em humanos (KASTELAN et al., 2009).

O estado de hipercoagulabilidade associado ao hipercortisolismo tem sido atribuído a um aumento na atividade dos fatores de coagulação e uma diminuição da atividade fibrinolítica, levando a um risco maior de ocorrência de tromboembolismo (JACOBY et al., 2001). Elevações da concentração dos fatores de coagulação II, V, VII, IX, X e XII e do fibrinogênio e a diminuição das concentrações de antitrombina III e do complexo trombina-antitrombina foram observadas em cães e seres humanos com HAC (JACOBY et al., 2001; TESHIMA et al., 2008; ZAANE et al., 2009)

O aumento no fator VIII correlacionado ao aumento do cortisol relatado em pacientes humanos com síndrome de Cushing (KASTELAN et al., 2009) não foi observado em cães (FELDMAN e RASEDEE, 1986; JACOBY et al., 2001). Jacoby et al. (2001) também não detectaram elevações na concentração do fator IX. As possíveis complicações hepáticas associadas à elevação crônica do cortisol podem explicar a ausência de elevação de alguns fatores de coagulação. São descritas alterações, tais como hepatomegalia e degeneração vacuolar dos hepatócitos, com acúmulo de glicogênio e/ou lipídios, promovendo elevação dos níveis séricos alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT) (SANTOS et al., 2008).

A elevação dos fatores de coagulação pode representar tanto uma predisposição, quanto uma resposta a um estado trombótico (FELDMAN

eRASEDEE, 1986). O fator de Von Willebrand (FvW) e os Dímeros-D também se apresentaram elevados em seres humanos com HAC (ZAANE et al., 2009).

Um simples aumento nos fatores procoagulantes não parece ser uma explicação razoável para o estado de hipercoagulabilidade. Uma falha no sistema anticoagulante poderia contribuir para esta condição (JACOBY et al., 2001).

Estudos *in vitro* demonstraram que os corticosteroides podem reduzir a atividade fibrinolítica suprimindo a secreção da proteína ativadora do plasminogênio pelo endotélio e fígado, ou induzindo a liberação do inibidor de ativação do plasminogênio tipo I (PATRASSI et al., 1992).

Por outro lado, Kastelan et al. (2009) detectaram um aumento nos níveis da antitrombina em humanos com HAC, fato também observado em cães por FELDMAN e RASEDEE (1986), já que a diminuição dos níveis plasmáticos da AT ou da atividade dessa proteína pode predispor o indivíduo a formação de trombos (AMBRUSO et al., 1982).

O tromboembolismo pulmonar (TEP) é uma complicação comumente relacionada ao hiperadrenocorticismismo (BURNS et al., 1981; SMALL et al., 1983; LARUE et al., 1990; NICHOLS, 1997) entretanto, Feldman e Rasedee (1986) não observaram alterações clínicas compatíveis com esta condição. Entretanto, apesar dos relatos da associação entre a Síndrome de Cushing e um maior risco de TEP, existem poucas evidências do efeito da administração exógena de corticoides sobre os estados de coagulabilidade. A corticoterapia foi sugerida como causa de hipercoagulabilidade em cães com anemia hemolítica imunomediada (LARUE e MURTAUGH, 1990; DENNIS, 1991), embora SCOTT-MONCRIEF et al. (2001) não tenham observado diferença na incidência de coagulação intravascular disseminada entre cães tratados com ou sem prednisona. Entretanto, estes cães foram avaliados por um período máximo de sete dias de uso da prednisona e um tempo maior de terapia poderia ter causado alterações significativas.

As concentrações plasmáticas aumentadas de glicocorticoides (síndrome de Cushing) são acompanhadas por um aumento do catabolismo proteico e gliconeogênese (OLIVEIRA, 2004). O cortisol também aumenta os níveis de lipídios séricos e colesterol, fatores que estão associados com trombose no ser humano. A glomerulonefrite, causada na maioria das vezes pela hipertensão arterial sistêmica que ocorre em casos de HAC, pode explicar o aumento do risco tromboembólico pela perda de proteínas, em especial, a antitrombina-III (BURNS et al., 1981).

Devido à complexidade de eventos endócrinos e metabólicos, torna-se difícil avaliar o quanto as complicações associadas à elevação crônica do cortisol e a ação concomitante dos mineralocorticoides endógenos contribuem para o estado de hipercoagulabilidade observado nos casos de hipercortisolismo.

Alguns hormônios, como o estradiol e a progesterona, também têm sido associados a um maior risco tromboembólico em seres humanos (FARIAS et al., 2006). Os progestágenos formam um grupo de esteroides que apresentam capacidade de ligação com receptores de outros esteroides, como os estrogênios, androgênios, glicocorticoides e mineralocorticoides. Essa capacidade, bem como o perfil de afinidade por cada um desses receptores, pode resultar em riscos diferentes para a trombose, a depender do progestágeno associado ao estrogênio. Um exemplo dessa afirmação é um estudo experimental que comparou o efeito pró-coagulante em vasos sanguíneos tratados com diversos progestágenos isolados, mostrando maior expressão de receptores para trombina, quando foram usados progestagênios com maior atividade glicocorticoide (VIEIRA et al., 2007).

Diversos outros fármacos apresentam efeito sobre o sistema hemostático. A vincristina é outra droga usada no tratamento de trombocitopatias, pelo fato de estimular a trombocitopoiese, acelerar a fragmentação dos megacariócitos e diminuir a destruição das plaquetas; porém, outros autores demonstraram que após a administração de vincristina no tratamento de linfoma, houve falha na função plaquetária (ROZANSKI et al., 2002).

Em relação à avaliação da hemostasia primária, esta não se restringe à contagem plaquetária, mas inclui também provas de avaliação funcional como o tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) e as provas de agregação plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2008). O ADP (adenosina difosfato) é um importante agonista plaquetário, liberado quando as plaquetas sofrem ação do colágeno ou de outros agonistas como a trombina ou quando há lesão celular (PACKHAM e MUSTARD, 1977), que altera a morfologia celular e estimula a agregação plaquetária (JIN et al., 1998). O receptor de superfície para fibrinogênio é estimulado pela presença de ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidônico ou trombina (CATALFAMO et al., 1986) que podem ser utilizados na avaliação *in vitro* da capacidade funcional plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2008).

É sabido que a adição de ADP às plaquetas na presença de concentrações fisiológicas de Ca^{2+} , altera suas formas, induz mudanças conformacionais do

complexo da glicoproteína de membrana IIb-IIIa, e expõe o sítio receptor de fibrinogênio deste complexo. O processo permite a ligação do fibrinogênio ao seu receptor, levando à ligação de receptores de diferentes plaquetas, causando agregação (LANDOLFI et al., 1991; SOLOVIEV et al., 1999). Em nível intracelular, a ativação pelo ADP aumenta o pH do citosol pela troca de Na^+/K^+ , e aumento transiente das concentrações de Ca^{2+} livre pelo influxo deste íon através da membrana plasmática e mobilização de estoques internos e do inositol. Além disso, o ADP inibe a ação da adenilato ciclase ativada, embora isto por si só seja insuficiente para induzir a agregação plaquetária (SOLOVIEV et al., 1999). As proteínas e glicoproteínas atuam como receptores presentes na membrana interna e externa da plaqueta. As glicoproteínas estão envolvidas na ligação com o fVW, colágeno e fibrinogênio, importantes nos processos de adesão e agregação plaquetária (VENTURA, 2011).

A avaliação da hemostasia secundária pode ser efetuada pela mensuração do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) ou da atividade isolada dos fatores de coagulação (STOCKHAM e SCOTT, 2008).

Em uma revisão sistemática sobre os mecanismos envolvidos no estado de hipercoagulabilidade associados à síndrome de Cushing em humanos realizado por Zaane et al. (2009), todos os testes dos fatores de coagulação encontraram-se discretamente aumentados durante o excesso de glicocorticoides, porém diferenças estatísticas foram obtidas apenas para o fator VIII (FVIII), fator IX (FIX) e o fator de von Willebrand (FvW). Uma tendência de elevação dos níveis de dímeros-D também foi detectada. Os níveis do fator VIII, IX e do FvW apresentaram correlação com o estágio clínico do paciente. O encurtamento do TTPA foi observado na maioria dos estudos relevantes, ao passo que o TP, o TSMO e a agregação plaquetária foram os testes menos alterados (ZAANE et al., 2009).

Aparentemente a associação do FvW com o fator VIII não está envolvido na formação de trombose já que a infusão de FvW em cães com a doença de von Willebrand não levou à trombose, ao passo que animais com hemofilia A apresentaram o problema (NICHOLS et al., 1993).

A ocorrência de trombose associada à elevação endógena de cortisol pode ser o principal sinal clínico que leva o proprietário a buscar auxílio veterinário (JAFFE et al., 1999). O TEP é a forma de trombose mais relatada em animais em

estados de hipercoagulabilidade (BAINES et al., 2001; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001).

As complicações tromboembólicas são cerca de quatro vezes mais frequentes em pacientes humanos com HAC em relação à população em geral, contribuindo para o aumento da taxa de mortalidade desta doença (SMALL et al., 1983). O tromboembolismo pulmonar foi relatado em 1,9–2,5% dos pacientes humanos internados com síndrome de Cushing e apontado como causa mortis em 0–1,9% (ZAANE et al., 2009).

A natureza por vezes silenciosa ou inespecífica da trombose pode indicar que em muitos casos em que não há relato da ocorrência de TEP, este pode simplesmente não ter sido avaliado, ao invés de estar de fato ausente. Em outras situações, a observação de distrição respiratória acaba sendo atribuída ao estado de obesidade (BURNS et al., 1981), o qual pode ser observado nas elevações crônicas de cortisol.

Apesar do reconhecido estado de hipercoagulabilidade associado ao hipercortisolismo e da existência de protocolos profiláticos contra a trombose em pacientes com HAC (KASTELAN et al., 2009), a recomendação de instituição de tromboprolaxia ainda não é um consenso em medicina veterinária, especialmente pela dificuldade de avaliação do real risco tromboembólico.

Diante do exposto, os objetivos do nosso estudo são:

1. Avaliar os efeitos da administração de prednisona em duas doses sobre o perfil hemostático e o risco tromboembólico em cães.
2. Determinar a ação da prednisona sobre a contagem e função plaquetárias;
3. Avaliar a ação da prednisona sobre a concentração plasmática do cortisol, fibrinogênio, fator VIII, fator de von Willebrand (FvW), e TP e TTPA;
4. Avaliar o risco tromboembólico associado à administração de prednisona por meio da quantificação da antitrombina (AT) e produtos da degradação da fibrina (PDFs);
5. Determinar se os possíveis efeitos da prednisona sobre a hemostasia são ou não dose-dependentes.

Capítulo 2

NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO

O Artigo Científico será enviado para a revista “BMC Veterinary Research”.

Instructions for authors

Research articles

[Criteria](#) | [Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#). See '[About this journal](#)' for information about policies and the refereeing process. We also provide a collection of links to [useful tools](#) and resources for scientific authors on our page.

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on meta-analyses of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in '[About this journal](#)'.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *BMC Veterinary Research* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *BMC Veterinary Research* accepts only [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues

relating to our editorial policies in the '[About *BMC Veterinary Research*](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editorial team, Editorial Advisors, Section Editors and Associate Editors.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeXstylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to BMC Veterinary Research can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an [Availability of supporting data](#) section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Veterinary Research* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [Methods](#) (can also be placed after Background)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see '[About this journal](#)'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given

final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author.

Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *BMC Veterinary Research* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology**

Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the BMC Veterinary Research reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996,**13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of**

ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins* 1999,**43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *EurRespir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology

Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S;

Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience*.<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Veterinary Research* does not restrict the length and quantity of data included in an article, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional files. Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Veterinary Research* requires that all supplementary data are included as additional files rather than as a link to your own website. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission tool.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the article. They will be made available in exactly the same form as originally provided by the authors.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the three-letter file extension (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MOV (QuickTime)
 - MPG (MPEG)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.

2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Veterinary Research* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be numbered in the order in which they are referred to in the text. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Veterinary Research will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Veterinary Research* reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

**Análise do perfil hemostático e do risco tromboembólico em cães tratados com
prednisona**

Felipe Gazza Romão^{1*}, Elza Fernanda Campos¹, Claudio Roberto Scabelo Mattoso², Regina
Kiomi Takahira¹

¹Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista – UNESP. Botucatu, Brasil. fgazza_vet@hotmail.com, elzafernanda_vet@hotmail.com, takahira@fmvz.unesp.br

²Departamento de Medicina Veterinária, Univ. do Estado de Santa Catarina – UDESC. Lages, Brasil. crsmattoso@yahoo.com

* Autor para correspondência: fgazza_vet@hotmail.com

Resumo

Introdução

A trombose foi clinicamente reconhecida associada a algumas doenças, como o hiperadrenocorticismo. Várias drogas podem alterar o equilíbrio orgânico; dentre elas, a prednisona, um corticoide amplamente utilizado principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios ou imunossupressores. Além disso, sabe-se que o hipercortisolismo pode estimular a formação de trombos pelo aumento de fatores de coagulação e diminuição da fibrinólise. O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar o efeito da prednisona no perfil hemostático.

Resultados

Foram encontradas diminuição significativa da atividade da antitrombina e aumento dos níveis de cortisol sérico em ambos os grupos (doses anti-inflamatória e imunossupressora) e um aumento da agregação plaquetária no grupo II.

Conclusões

Pelos resultados obtidos em nosso estudo, podemos inferir que o hipercortisolismo pode aumentar o risco tromboembólico, especialmente por diminuição de fatores anticoagulantes (decrécimo dos níveis de antitrombina).

Palavras-chave

Plaquetas, Hemostasia, Prednisona, Tromboembolismo

INTRODUÇÃO

São raros os estudos prospectivos e controlados sobre o efeito dos corticosteroides sobre a hemostasia em cães. A maioria dos trabalhos analisou animais que apresentavam hiperadrenocorticismo (HAC), de modo que ainda não está claro se as alterações hemostáticas estão diretamente ligadas ao efeito direto dos corticoides ou às complicações decorrentes da elevação endógena observada em casos de HAC, incluindo aquelas provocadas pelo desequilíbrio metabólico ou pela ação dos mineralocorticoides.

A prednisona é um corticoide amplamente utilizado na rotina de clínicas e hospitais veterinários. Apesar deste fato, poucos estudos realizaram a administração exógena de prednisona com protocolos terapêuticos mais prolongados, comparando os efeitos de doses anti-inflamatórias e imunossupressoras sobre o perfil hemostático.

Por isso, avaliamos os efeitos da prednisona sobre a contagem e função plaquetária, o perfil de coagulação e sistema fibrinolítico em um estudo prospectivo e controlado de dois protocolos em cães saudáveis, desconsiderando principalmente os efeitos mineralocorticoides e sua influência em outras complicações sistêmicas, a fim de determinar o risco tromboembólico associado à corticoidoterapia.

Os objetivos do nosso estudo foram:

- Avaliar os efeitos da prednisona sobre o perfil hemostático e o risco tromboembólico em cães;
- Determinar a ação da prednisona na contagem e função plaquetárias;
- Avaliar a ação da prednisona nos níveis de cortisol sérico e fibrinogênio plasmático, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), além da atividade do fator VIII e concentração do fator de von Willebrand;

- Avaliar o risco tromboembólico associado à administração de prednisona por meio da mensuração dos níveis de antitrombina e produtos de degradação da fibrina (PDFs),
- Determinar os possíveis efeitos dose-dependentes da prednisona na hemostasia.

Materiais e métodos

Delineamento experimental

Foram utilizados 20 cães hípidos, machos e fêmeas, com idade entre 1 e 8 anos, sem raça definida, provenientes do canil da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu, ou oriundos de proprietários voluntários. Estes animais foram avaliados quanto ao estado de higidez através de avaliação clínica, hemograma, exames bioquímicos (ureia, creatinina, ALT, FA e GGT) e urinálise. Cadelas em estro, proestro, gestação ou lactação e animais obesos foram excluídos no estudo. Foram constituídos dois grupos: o grupo I, composto por 10 animais que receberam prednisona na dose anti-inflamatória (1,0 mg/kg/BID por via oral), durante 15 dias, e o grupo II, contendo 10 animais que receberam prednisona na dose de 2,0 mg/kg/BID por via oral, durante 15 dias. Os dois grupos foram submetidos a análises de hemograma, testes bioquímicos, perfil hemostático e urinálise. Estas avaliações foram realizadas no momento controle e após o término do tratamento dos dois grupos.

Coleta do sangue

A coleta de sangue para os exames laboratoriais foi realizada por venopunção da jugular, após tricotomia e antissepsia local, em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA para a realização do hemograma com contagem de plaquetas; em tubos contendo citrato de sódio a 3,2% para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) para a prova de agregação plaquetária e plasma para a determinação da concentração de fibrinogênio, fator VIII, FvW, AT e PDF's; e em

tubos sem anticoagulante para obtenção de soro para dosagem de cortisol. As colheitas de sangue foram sempre realizadas entre as 8h e 10h da manhã.

O PRP foi obtido em amostra mantida em temperatura ambiente e processado em até duas horas da colheita, e o plasma citratado foi obtido de amostras de sangue mantidas em banho de gelo e separado por centrifugação em até uma hora após a colheita, e posterior congelamento imediato em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer -80°C até o momento do processamento.

Hemograma

O hemograma foi realizado no contador automático de células Hemoscreen (Ebram Produtos Laboratoriais Ltda) e incluiu os seguintes parâmetros: hematimetria (contagem de hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM, RDW), leucometria global, contagem de plaquetas e VPM. A leitura de hematócrito foi realizada em capilar pelo método do microhematócrito e a determinação das proteínas plasmáticas totais por refratometria. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em esfregaço sanguíneo corado.

Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi realizada mediante adição de $50\mu\text{L}$ de ADP (ADP Reagent – Helena Laboratories®) em $400\mu\text{L}$ de PRP (padronizado para uma contagem de 100.000 a 300.000 plaquetas/ μL). A resposta das plaquetas frente ao agonista foi mensurada por turbidimetria em um agregômetro (Netlab 2000 - ZÊNITE®) e expresso em porcentagem de agregação.

Tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO)

O tempo de sangria da mucosa oral foi realizado conforme Marks, 2000 modificado. Com o animal em estação, o lábio superior foi evertido e uma incisão padronizada foi realizada de maneira vertical (perpendicular à margem do lábio) diretamente abaixo do dente canino maxilar com o auxílio de uma lanceta (Triplett®). O cronômetro foi disparado e o sangue absorvido com um papel filtro circular, sempre 1 a 2 mm abaixo da incisão. O cronômetro foi interrompido assim que o sangramento cessou.

Perfil Hemostático

A avaliação hemostática incluiu a determinação da atividade do fator VIII, fibrinogênio, TP, TTPA, TT (Helena Laboratories®), PDF's e AT (Siemens®), por meio do uso de kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante.

Determinação do Fator de von Willebrand

A dosagem do antígeno do FvW foi realizada pelo método de ELISA direto (teste semi quantitativo comparativo), com anticorpo anti-FvW canino (Sheep anti-canine VWF-Research Diagnostics Inc®), conforme a técnica preconizada pelo fabricante, em placas específicas (Nunc® - Immuno Plates) para leitura (ELISA Multiskan EX Original - Labsystems®) em ELISA.

Dosagem sérica de cortisol

A concentração sérica de cortisol foi obtida pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais para cortisol fase sólida (Coat – A Count, Siemens®) no laboratório Provet, Unidade Moema, São Paulo, Brasil.

Análise Estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada como um dos critérios para escolha do método analítico. Devido a presença de graus variados de assimetria, o teste de Wilcoxon foi usado para comparar a mediana de cada variável-resposta entre os grupos de estudo nos momentos 1 e 2. Para cada grupo de estudo, o teste de postos de sinais de Wilcoxon para amostras pareadas foi usado para realizar comparações entre momentos [2]. A análise estatística foi realizada com o procedimentos PROC NPAR1WAY (SAS Institute®) e PROC UNIVARIATE (SAS Institute®). Significância e tendência estatística foram definidas como $p < 0,05$ e $p < 0,10$, respectivamente.

Resultados e discussão

O aumento do cortisol obtido ao fim do tratamento com prednisona já era esperado, pois a dexametasona é o único corticoide que não possui reação cruzada com o cortisol endógeno no teste de radioimunoensaio para dosagem do cortisol sérico [3]. O grupo no qual foi utilizada a dose imunossupressora apresentou um aumento mais significativo do que o grupo com a dose anti-inflamatória. Os resultados da concentração sérica de cortisol estão apresentados na tabela 1, juntamente com as medianas e desvios-padrões do perfil hemostático.

Embora muitos estudos correlacionem o hipercortisolismo à trombocitose [4,5], não encontramos aumento significativo do número de plaquetas ao final do tratamento com a prednisona, dado também demonstrado por Klose et al., que estudaram cães com hiperadrenocorticismos [6]. A correlação entre aumento do número de plaquetas e hipercortisolismo é extremamente controversa, pois a maior parte dos estudos que afirmam demonstrar esta correlação utilizaram pacientes portadores de enfermidades imunomediadas, como a trombocitopenia imunomediada, e conseqüentemente, haveria aumento esperado do número de plaquetas após corticoidoterapia por diminuição da destruição das mesmas [7].

Encontramos prolongamento do TSMO após o tratamento com prednisona em ambos os grupos, mas sem diferença estatística significativa, muito provavelmente pela diminuição concorrente do FvW observada em nosso estudo, dados que corroboram os achados de Mackin et al., e Eberle e Mischke, quando ambos não encontraram alteração significativa do tempo de sangramento quando utilizaram a prednisona como parte de protocolo quimioterápico [8,9].

Em nosso estudo, encontramos diminuição significativa dos níveis de fator de von Willebrand entre o momento controle e após o término da administração da prednisona no grupo I (dose anti-inflamatória), dados que corroboram os achados de Giordano et al. [10], que encontraram diminuição dos níveis do antígeno do FvW após tratamento quimioterápico em crianças com leucemia aguda; porém, nossos resultados vão contra os achados de outros estudos com síndrome de Cushing em seres humanos, os quais apresentaram valores elevados de fator de von Willebrand quando comparados a indivíduos normais [11,12]. Outro estudo, conduzido por Ambrosi et al., não encontrou alteração dos níveis do fator de von Willebrand, quando comparados indivíduos normais e com síndrome de Cushing [13], assim como o estudo conduzido por Brotman et al., que também não demonstrou aumento do FvW após o tratamento por cinco dias com a dexametasona [14]. Vários relatos clínicos e experimentais correlacionaram o aumento do fator de von Willebrand com lesão e disfunção endotelial, especialmente em pacientes hipertensos em decorrência de hiperadrenocorticismos [15].

É importante ressaltar que a grande maioria dos estudos que encontrou aumento do FvW após o uso de corticoides utilizou indivíduos com distúrbios inflamatórios com envolvimento de lesão do endotélio vascular, o que poderia explicar os níveis aumentados deste parâmetro. Isto pode ser sugerido pela correlação entre os níveis do FvW e de proteína C reativa nestes pacientes; portanto, a diminuição dos níveis do FvW nestes indivíduos pode ser explicada pelo efeito anti-inflamatório da prednisona. Na verdade, acredita-se que o efeito agudo de

altas doses de glicocorticoides potencializa a rápida ativação da óxido nítrico-sintase endotelial, a qual inibe a secreção do FvW, enquanto a exposição crônica aos corticoides leva à disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo e resistência insulínica, todos estes fatores que aumentam a síntese e secreção do FvW [16]. O tempo de administração pode não ter sido suficiente para causar estas alterações, explicando a diminuição ao final do tratamento.

Encontramos em nosso experimento aumento significativo da agregação plaquetária apenas no grupo tratado com a dose imunossupressora da prednisona. Thong et al. não encontraram alteração significativa da agregação plaquetária em pacientes que receberam terapia com prednisona por dois dias [17], enquanto Shapiro et al. não demonstraram alteração na agregação plaquetária em pacientes tratados com protocolo quimioterápico contendo prednisona [18]. Entretanto, sabe-se que este protocolo incluiu a utilização da vincristina, a qual possui ação inibitória sobre a agregação plaquetária [19], sugerindo que um efeito antagônico entre os dois fármacos possa ter impedido a visualização do efeito pró-trombótico da prednisona. Outro estudo observou inibição da agregação plaquetária em ratos que receberam doses variadas de dexametasona por cinco dias [20].

A agregação plaquetária induzida por agonistas, como a adenosina difosfato (ADP), é um importante indicador da função plaquetária *in vivo*. O método turbidométrico, utilizado em nosso estudo, possui maior relevância clínica e maior facilidade de padronização do que o método por impedância elétrica. Outros agonistas podem ser utilizados, como a ristocetina e a epinefrina, mas foi constatado que as plaquetas de cães são muito menos responsivas a estas substâncias do que plaquetas de seres humanos; portanto, o ADP é a opção de escolha para realização do teste [21].

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) não apresentou diferença estatística significativa em nenhum grupo, fato que confirma os achados de outro estudo que comparou

este parâmetro em pacientes saudáveis e portadores de hiperadrenocorticismo doentes e em tratamento [6], mas vai contra os achados de Manetti et al. e van der Pas et al., ambos demonstrando diminuição deste parâmetro em pacientes com hipercortisolismo [12,22]. Isto pode ser explicado pelo aumento da atividade do fator VIII e do fibrinogênio, importantes componentes destas vias do sistema de coagulação [23]. Em cães, o TTPA é geralmente mais sensível às deficiências dos fatores VIII e IX, e pode estar prolongado quando a atividade destes fatores estiver na faixa de 60-75% [24]. É difícil afirmar que o aumento destes fatores pode causar diminuição do TTPA, já que este teste busca identificar deficiências dos componentes presentes nesta via de coagulação.

A terapia com a prednisona foi relacionada a aumentos da atividade do fator VIII em diversos estudos [4,5,11,12,14,22,25,26], fato que parece correlacionado ao nível do hipercortisolismo, voltando ao normal após o término do tratamento [27]. Foi constatado em nosso estudo elevação da atividade do fator VIII em ambos os grupos, porém, sem diferença significativa, corroborando os dados encontrados por Jacoby et al. e em humanos por outros autores [27,28]. O tempo de protrombina (TP) estava prolongado em pacientes com síndrome de Cushing, quando comparados a pacientes normais [11,15]. Nosso estudo não constatou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) dos valores de TP ao final do tratamento, em nenhum dos grupos, corroborando os achados de Klose et al. [6]; isto poderia eventualmente ser explicado pelo fato deste teste estar intimamente relacionado às concentrações de fibrinogênio e fatores VII, V e X (avalia as vias intrínseca e comum da coagulação) [23]; porém, a concentração do fibrinogênio não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos após a administração da prednisona. Os outros fatores de coagulação citados não foram dosados em nosso estudo, impossibilitando uma relação completa entre o TP e estes fatores.

O tempo de trombina (TT), que avalia a via comum da coagulação, e, portanto, é um teste indireto da concentração plasmática de fibrinogênio [23], não é um exame muito avaliado em

estudos envolvendo a hipercoagulabilidade e a administração de corticosteroides, provavelmente pelo fato de muitos destes estudos preferirem a dosagem do fibrinogênio para avaliação desta via. Encontramos diminuição do TT em ambos os grupos ao final do tratamento; porém, não houve diferença estatística (apenas tendência estatística no grupo I com $p < 0,1$), que pode ser explicada pelo fato dos níveis de fibrinogênio terem apresentado aumento neste mesmo grupo.

Os valores não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos níveis de fibrinogênio após o tratamento com o corticoide em relação ao momento controle, tanto com a dose anti-inflamatória quanto com a dose imunossupressora, fato também corroborado por Klose et al. [6]. Outros estudos confirmaram o aumento do fibrinogênio, sendo que a maioria dos trabalhos estudou o perfil hemostático em pacientes humanos com hiperadrenocorticismismo [11-14,22,27]; no entanto, Giordano et al. encontraram diminuição estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de fibrinogênio [10], confirmando os achados de outro estudo [29]. Estes trabalhos sugerem uma provável disfunção hepática causada pela ação da prednisona, ocasionando diminuição da síntese de fibrinogênio pelo fígado.

A antitrombina III (ATIII) é o principal inibidor plasmático dos fatores da serina protease. Sua determinação representa o único teste disponível capaz de avaliar os fatores inibitórios da coagulação. Cães saudáveis apresentam valores superiores a 80%; resultados inferiores a 50% estão associados a maior risco de trombose [30]. Os níveis da antitrombina III apresentaram diminuição significativa entre os momentos-controle e após o tratamento com o corticoide, o que está de acordo com os achados de outro estudo, onde encontraram queda da concentração de antitrombina em animais com hiperadrenocorticismismo quando comparados a indivíduos normais [27]. Kastelan et al., no entanto, encontraram níveis aumentados em pacientes acometidos pela síndrome de Cushing quando comparados a indivíduos sadios, o que provavelmente ocorreu como um mecanismo compensatório ao aumento da concentração e

atividade de fatores pró-coagulantes [4]. Por outro lado, Klose et al. não demonstraram diferença estatística significativa entre animais saudáveis, pacientes com hiperadrenocorticismos e doentes em tratamento [6].

Não houveram alterações significativas em relação aos níveis de PDFs na comparação entre os momentos pré e pós-tratamento, dados que confirmam os achados de um estudo que utilizou pacientes em protocolo quimioterápico contendo prednisona [25]. O estado de hipercoagulabilidade evidenciado pela diminuição dos níveis de antitrombina não parece ter ocasionado um quadro trombótico.

A hipercoagulabilidade não deve ser explicada apenas pelo aumento dos fatores pró-coagulantes, mas também por uma inibição do sistema fibrinolítico e diminuição da atividade da antitrombina [27]. É extremamente difícil afirmar sobre uma possível correlação entre o hipercortisolismo em cães e o tromboembolismo, já que os trabalhos que avaliam este efeito baseiam-se em grande parte das vezes em dados oriundos de estudos humanos. Há outros fatores envolvidos na possibilidade do aumento do risco de trombose do que apenas o aumento de fatores pró-coagulantes e diminuição de fatores fibrinolíticos, como a hipertensão arterial sistêmica, sinal mais proeminente em seres humanos que sofrem de hiperadrenocorticismos do que em cães portadores da mesma enfermidade. O tromboelastógrafo (TEG) é um método confiável para a definição do aumento do risco tromboembólico, especialmente por utilizar sangue total, incluindo desta forma a contribuição de componentes celulares sobre a hemostasia, quando comparado aos testes que utilizam o plasma citratado [6]. Entretanto, os testes utilizados no presente trabalho possuem vantagens por detalhar os fatores envolvidos no possível aumento do risco tromboembólico, fato que não pode ser estudado e detalhado pela utilização do TEG.

Em humanos, a hipercoagulabilidade foi associada ao hiperadrenocorticismos a partir de concorrente aumento do fator VIII, associação de aumento dos fatores VIII, V e da

protrombina, e aumento da atividade do fator de von Willebrand e dos fatores VIII, XII, XI e IX, além de hiperatividade plaquetária [6]. Em cães, estudos tentam correlacionar o tromboembolismo associado ao hiperadrenocorticismismo com o achado de aumento de fatores pró-coagulantes e diminuição de fatores fibrinolíticos[6,27]. Trabalhos que buscaram confirmar a correlação entre tromboembolismo e hipercortisolismo não avaliaram a possibilidade de processos mórbidos coexistentes [31,32], achados muito corriqueiros em humanos acometidos por hiperadrenocorticismismo, como por exemplo resistência insulínica e hipertensão arterial sistêmica [6].

O tratamento crônico com corticosteroides é um fator de risco conhecido para a ocorrência de trombose em cães, já que a administração de prednisona na dose de 1,0 mg/kg/dia por sete dias resultou em alterações tromboelastográficas em cães saudáveis. Embora seja impossível determinar se a administração de prednisona é a única causa, é razoável concluir que os corticoides provavelmente contribuem para o estado de hipercoagulabilidade [33]. Um estudo conduzido por Rose et al. também comprovou o estado de hipercoagulabilidade, tanto com a dose anti-inflamatória quanto com a imunossupressora, em animais tratados por duas semanas com prednisona, através de alterações demonstradas pela tromboelastografia [7].

A ausência de diferença estatística dos diversos parâmetros entre as duas doses utilizadas (anti-inflamatória e imunossupressora), observada por Rose et al. [7] e pelo presente trabalho sugerem não haver um efeito dose-dependente da prednisona sobre o sistema hemostático pelo período de duas semanas.

Conclusões

A administração da prednisona em cães aumenta o risco tromboembólico principalmente pela diminuição dos níveis de antitrombina em doses anti-inflamatória e imunossupressora. Não há evidências de atividade dose-dependente da prednisona sobre a hemostasia. O risco

tromboembólico associado ao hipercortisolismo é possivelmente um evento multifatorial, influenciado por condições sistêmicas, o que deve ser levado em consideração na corticoidoterapia.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter qualquer tipo de conflito de interesses.

Contribuições dos autores

FGR e RKT criaram e projetaram o estudo. FGR, EFC, CRSM e RKT realizaram o trabalho laboratorial. FGR, EFC e RKT participaram na coleta das amostras e trabalho de campo. FGR e RKT analisaram os dados. Todos os autores participaram na escrita do trabalho. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro na forma de bolsa e auxílio-pesquisa.

Referências

1. Burns MG, Kelly, AB, Hornof, WJ, Howerth, EW: **Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism.** *J Am Vet Med Assoc* 1981, **178**(Suppl4):388-393.
2. Pagano M, Gauvreau K: *Principles of Biostatistics*. California: Duxbury Press; 2000.

3. Mooney CT, Peterson ME. **Coleta, armazenamento e transporte de amostras.**In: *Manual de Endocrinologia Canina e Felina*. 3rd edition. Edited by Mooney CT, Peterson, ME. São Paulo: Roca; 2009:13-18.
4. Kastelan D, Dusek T, Kraljevic I, Polasek O, Giljevic Z, Solak M, Salek SZ, Jelcic J, Aaganovic I, Korsic M: **Hypercoagulability in Cushing's Syndrome: the role of specific haemostatic and fibrinolytic markers.***Endocrinol* 2009, **36**: 70-74.
5. Van Zaane B, Nur E, Squizzato A, Dekkers OM, Twickler MB, Fliers E, Gerdes VEA, Büller HR, Brandjes DPM: **Hypercoagulable state in Cushing's syndrome: A systematic review.***J Clin Endocrinol Metabol* 2009, **94**(Suppl 8):2743–2750.
6. Klose TC, Creevy KE, Brainard BM: **Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism.***J Vet Emerg Crit Care* 2011, **21**(Suppl 6): 625-632.
7. Rose LJ, Dunn ME, Allegret V, Bédard C: **Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs.** *Vet Clin Pathol* 2011, **40**(Suppl 4):426-434.
8. Mackin AJ, Allen DG, Johnstone IB: **Effects of vincristine and prednisone on platelet numbers and function in clinically normal dogs.***Am J Vet Res* 1995, **56**:100–108.
9. Eberle N, Mischke R: **Influence of a cyclic combination chemotherapeutic protocol on primary haemostasis in dogs suffering from malignant lymphoma.***Vet J* 2010, **183**:298-304.

10. Giordano P, Molinari AC, Del Vecchio GC, Saracco P, Russo G, Altomare M, Perutelli, P, Crescenzo N, Santoro N, Marchetti M, De Matta D, Falanga A: **Prospective study of hemostatic alterations in children with acute lymphoblastic leukemia.***Am J Hematol* 2010, **85**(Suppl 5):325-330.
11. Boscaro M, Sonino N, Scarda A, Barzon L, Fallo F, Sartori MT, Patrassi GM, Girolami A: **Anticoagulant prophylaxis markedly reduces thromboembolic complications in Cushing's Syndrome.***J ClinEndocrinolMetab*2002, **87**(Suppl 8):3662-3666.
12. Manetti L, Bogazzi F, Giovannetti C, Raffaelli V, Genovesi M, Pellegrini G, Ruocco L, Iannelli A, Martino E: **Changes in coagulation indexes and occurrence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: results from a prospective study before and after surgery.***Eur J Endocrinol*2010, **163**(Suppl 5):783-791.
13. Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, Passini E, Bottasso B, Federici A: **Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma.** *ExpClinEndocrinol Diabetes* 2000, **108**(Suppl 4):294-298.
14. Brotman DJ, Girod PJ, Posch A, Jani JT, Patel JV, Gupta M, Lip GYH, Reddy S, Kickler TS: **Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers.***Thromb Res* 2006, **118**(Suppl 2):247-252.
15. Miljic P, Miljic D, Cain JW, Korbonits M, Popovic V: **Pathogenesis of vascular complications in Cushing's syndrome.***Hormones* 2012, **11**(Suppl 1):21-30.

16. Van Zaane B, Nur E, Squizzato A, Gerdes VEA, Büller HR, Dekkers OM, Brandjes DPM: **Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors.** *J ThrombHaemost* 2010, **8**(Suppl 11):2483–2493.
17. Thong KL, Mant MJ, Grace MG: **Lack of effect of prednisone administration on bleeding time and platelet function of normal subjects.** *Br J Hematol* 1978, **38**(Suppl 3): 373-380.
18. Shapiro RS, Gerrard JM, Ramsay NK, Nesbit ME, Coccia PF, Stoddard SF, Plow EF, White JG, Krivit W: **Selective deficiency in collagen-induced platelet aggregation during L-asparaginase therapy.** *Am J PediatrHematolOncol* 1980, **2**(Suppl 3), 207-212.
19. Grau-Bassas ER, Kociba GJ, Couto GC: **Vincristine impairs platelet aggregation in dogs with lymphoma.** *J Vet Intern Med* 2000, **14**(Suppl 1):81-85.
20. Van Giezen JJ, Brakkee JG, Dreteler GH, Bouma BN, Jansen JW: **Dexamethasone affects platelet aggregation and fibrinolytic activity in rats at different doses which is reflected by their effect on arterial thrombosis.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994, **5**(Suppl 2):249-255.
21. Mischke R, Schulze U. **Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs.** *Vet J* 2004, **168**(Suppl 3):270-275.
22. Van der Pas R, De Bruin C, Leebeek FWG, De Maat MPM, Rijken DC, Pereira AM, Romijn JA, Neter-Maier RT, Hermus AR, Zelissen PMJ, De Jong FH, Van der Lely AJ, De

Herder WW, Lamberts SWJ, Hofland LJ, Feelders RA: **The hypercoagulable state in cushing's disease is associated with increased levels of procoagulant factors and impaired fibrinolysis, but is not reversible after short-term biochemical remission induced by medical therapy.***J Clin Endocrinol Metabol* 2012, **97**(Suppl 4):1303-1310.

23. Rizatti EG, Franco RF: **Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos.***Medicina*2001,**34**(Suppl1):238-247.

24. Prins M, Schellens CJMM, Van Leeuwen MW, Rothuizen J, Teske E: **Coagulation disorders in dogs with hepatic disease.***Vet J* 2010, **185**(Suppl 2): 163-168.

25. Pui C, Chesney CM, Weed J, Jackson CW: **Altered von Willebrand factor molecule in children with thrombosis following asparaginase-prednisone-vincristine therapy for leukemia.***J ClinOncol* 1985, **3**(Suppl 9):1266-1272.

26. Goggs R, Wiinberg B, Kjelgaard-Hansen M, Chan DL: **Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolyticanaemia using thromboelastography.***Vet J*2012, **191**(Suppl 3):347-353.

27. Jacoby RC, Owings JT, Ortega T, Gosselin R, Feldman EC: **Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing Syndrome.***Arch Surg*2001, **136**(Suppl 9):1003-1007.

28. Begbie M, Notley C, Tinlin S, Sawyer L, Lillicrap D: **The Factor VIII acute phase response requires the participation of NFkappaB and C/EBP.** *ThrombHaemost* 2000, **84**(Suppl 2):216-222.
29. Sunder-Plassmann G, Speiser W, Korninger C, Stain M, Bettelheim P, Pabinger-Fasching I, Lechner K: **Disseminated intravascular coagulation and decrease in fibrinogen levels induced by vincristine/prednisolone therapy of lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia.** *Ann Hematol* 1991, **62**(Suppl 5):169-173.
30. De Marco V, Winkel VM, Martorelli CR: **Estudo da hipercoagulabilidade sanguínea em 45 cães com hiperadrenocorticismo endógeno, por meio da avaliação da frequência de trombocitose, hiperfibrinogenemia e hipertensão arterial.** *Clin Vet* 2012, **96**:44-50.
31. Larue MJ, Murtaugh RJ: **Pulmonary thromboembolism in dogs: 47 cases.** *J Am Vet Med Assoc* 1990, **197**(Suppl 10):1368-1372.
32. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC: **Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995.** *J Vet Intern Med* 1999, **13**(Suppl 4):338-345.
33. O'Marra SK, Shaw SP, deLaforcade AM: **Investigating hypercoagulability during treatment for immune-mediated thrombocytopenia: a pilot study.** *J Vet Emerg Crit Care* 2012, **22**(Suppl 1): 126-130.

Tabela 1. Medianas e desvios-padrões do perfil hemostático nos momentos pré e pós-tratamento dos grupos I e II. FvW: Fator de von Willebrand; PDF: Produtos de degradação da fibrina; TP: Tempo de protrombina; TSMO: Tempo de sangramento da mucosa oral; TT: Tempo de trombina; TTPA: Tempo de tromboplastina parcial ativada.
*Diferença estatística ($p < 0,05$). ** Tendência estatística ($0,05 < p < 0,1$).

	Grupo I		Grupo II	
	M0	M1	M0	M1
Agregação (%)	73,00 (±11,84)	81,00 (±9,06)	64,50 (±25,90)	83,00* (±25,39)
Antitrombina (%)	92,30 (±12,50)	76,25* (±13,45)	125,25 (±22,54)	77,30* (±21,99)
Cortisol (µg/dL)	1,19 (±1,03)	3,28* (±2,79)	1,97 (±1,89)	14,97* (±14,02)
Fator VIII (%)	110,33 (±65,26)	161,35 (±109,79)	88,38(±97,10)	151,96** (±109,03)
Fibrinogênio (mg/dL)	234,52 (±92,60)	298,08 (±97,84)	234,52 (±105,50)	184,09** (±51,10)
FvW (%)	187,58 (±60,38)	111,14* (±53,24)	112,21 (±42,04)	79,88 (±71,20)
PDF (mg/dL)	0 (±0,84)	1,50 (±0,92)	0 (±1,05)	1,50 (±0,82)
Plaquetas (/µL)	228.000 (±82.026)	226.500 (±82.799)	294.500 (±121.875)	348.000 (±88.699)
TP (s)	11,80 (±1,87)	10,50 (±1,19)	9,90 (±1,30)	8,50 (±1,43)
TSMO (s)	74,50 (±21,15)	86,00 (±36,11)	80,00 (±27,11)	75,50 (±25,96)
TT (s)	14,75 (±3,26)	10,38** (±1,30)	11,30 (±1,83)	9,65 (±1,28)
TTPA (s)	18,00 (±2,24)	16,00 (±1,52)	14,00 (±1,67)	14,70 (±1,92)

Capítulo 3

CONCLUSÕES GERAIS

A administração da prednisona em cães aumenta o risco tromboembólico pela diminuição dos níveis de antitrombina em doses anti-inflamatória e imunossupressora, e aumento da agregação plaquetária apenas na dose imunossupressora. Não há evidências de atividade dose-dependente da prednisona sobre a hemostasia. O risco tromboembólico associado ao hipercortisolismo é possivelmente um evento multifatorial, influenciado por condições sistêmicas, o que deve ser levado em consideração na corticoidoterapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSI, B.; SARTORIO, A.; PIZZOCARO, A.; PASSINI, E.; BOTTASSO, B.; FEDERICI, A. Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.108, n.4, p.294-298, 2000.

AMBRUSO, D.R.; LEONARD, B.D.; BIES, R.D.; JACOBSON, L.; HATHAWAY, W.E.; REEVE, E.B. Antithrombin III deficiency: Decreased synthesis of a biochemically normal molecule. **Blood**,v.60, n.1, p.78-83,1982.

BAINES, E.A.; WATSON, P.J.; STIDWORTHY, M.F.; HERRTAGE, ME. Gross pulmonary thrombosis in a greyhound.**Journal of Small Animal Practice**,v.42, n.9, p.448-452, 2001.

BASS, M.C.; SCHULTZE, A.E. Essential thrombocytopenia in a dog: Case report and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association**,v.34, p.197-203, 1998.

BEGBIE, M.; NOTLEY, C.; TINLIN, S.; SAWYER, L.; LILLICRAP, D.The Factor VIII acute phase response requires the participation of NFkappaB and C/EBP. **Thrombosis and Haemostasis**, v.84, n.2, p.216-222, 2000.

BOSCARO, M.; SONINO, N.; SCARDA, A.; BARZON, L.; FALLO, F.; SARTORI, M.T.; PATRASSI, G.M.; GIROLAMI, A. Anticoagulant prophylaxis

markedly reduces thromboembolic complications in Cushing's Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.8, p.3662-3666, 2002.

BROTMAN, D.J.; GIROD, P.J.; POSCH, A.; JANI, J.T.; PATEL, J.V.; GUPTA, M.; LIP, G.Y.H.; REDDY, S.; KICKLER, T.S. Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. **Thrombosis Research**, v.118, n.2, p.247-252, 2006.

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.

CATALFAMO, J.L.; RAYMOND, S.L.; WHITE, J.G.; DODDS, W.J. Defective platelet-fibrinogen interaction in hereditary canine thrombopathia. **Blood**, v.67, n.6, p.1568-1577, 1986.

CORTESE, L.; PELAGALLI, A.; PIANTEDOSI, D.; MASTELLONE, V.; DI LORIA, A.; LOMBARDI, P.; CIARAMELLA, P.; AVALLONE, L. Effects of preoperative administration of meloxicam on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal**, v.170, n.1, p.138-140, 2005.

DE MARCO, V.; WINKEL, V.M.; MARTORELLI, C.R. Estudo da hipercoagulabilidade sanguínea em 45 cães com hiperadrenocorticismo endógeno, por meio da avaliação da frequência de trombocitose, hiperfibrinogenemia e hipertensão arterial. **Clínica Veterinária**, v.96, p.44-50, 2012.

DENNIS, J.S. The pathophysiologic sequelae of pulmonary thromboembolism. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.13, n.12, p.1811-1816, 1991.

EBERLE, N.; MISCHKE, R. Influence of a cyclic combination chemotherapeutic protocol on primary haemostasis in dogs suffering from malignant lymphoma. **The Veterinary Journal**, v.183,p.298-304, 2010.

FARIAS, M.; CRUZ, L.; CLAPAUCH, R.; SIQUEIRA, C. Efeitos da terapia estrogênica transdérmica isolada ou associada à progesterona micronizada nos fatores de coagulação em mulheres menopausadas com e sem sobrepeso. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**,v.50, n.3, p.505-514, 2006.

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

FLINT, S.K.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; KRUTH, S.A.; BERSENAS, A.M.; WOOD, D. Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on thromboelastography variables in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.10, p.1325-1332, 2011.

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.

FRESNO, L.; MOLL, J.; PEÑALBA, B.; ESPADA, Y.; ANDALUZ, A.; PRANDI, D.; GOPEGUI, R.R.; GARCÍA, F. The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumineantimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v.177, n.3, p.405-410, 2008.

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

GIORDANO, P.; MOLINARI, A.C.; DEL VECCHIO, G.C.; SARACCO, P.; RUSSO, G.; ALTOMARE, M.; PERUTELLI, P.; CRESCENZIO, N.; SANTORO, N.; MARCHETTI, M.; DE MATTA, D.; FALANGA, A. Prospective study of

hemostatic alterations in children with acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Hematology**, v.85, n.5, p.325-330, 2010.

GOGGS, 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, n.3, p.347-353, 2012.

GRAU-BASSAS, E.R.; KOCIBA, G.J.; COUTO, G.C. Vincristine impairs platelet aggregation in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, n.1, p.81-85, 2000.

GUIMARÃES, J.A. **Interação heparina-antitrombina: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado em biologia celular e molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2005.

HARRISON, P. Platelet function analysis. **Blood Reviews**, v.19, p.111-123, 2005.

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.

JAFFE, M.H.; GROOTERS, A.M.; PARTINGTON, B.P.; CAMUS, A.C.; HOSGOOD, G. Extensive venous thrombosis and hind-limb edema associated with adrenocortical carcinoma in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, n.4, p.306-310, 1999.

JOHNSON, L.R.; LAPPIN, M.R.; BAKER, D.C. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n.4, p.338-345, 1999.

KASTELAN, D.; DUSEK, T.; KRALJEVIC, I. Hypercoagulability in Cushing's Syndrome: the role of specific haemostatic and fibrinolytic markers. **Endocrinology**,v.36, p.70-74, 2009.

KLOSE, T.C.; CREEVY, K.E.; BRAINARD, B.M. Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism.**Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.21, n.6, p.625-632, 2011.

LANDOLFI, R.; DE CRISTOFARO, R.; DE CANDIA, E.; ROCCA, B.; BIZZI, B. Effect of fibrinogen concentration on the velocity of platelet aggregation. **Blood**, v.78, n.2, p.377-381, 1981.

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.

LUNSFORD, K.V.; MACKIN, A.J. Thromboembolic therapies in dogs and cats: An evidence-based approach. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**,v.37, n.3, p.579-609, 2007.

MACKIN, A.J.; ALLEN, D.G.; JOHNSTONE, I.B. Effects of vincristine and prednisone on platelet numbers and function in clinically normal dogs.**American Journal of Veterinary Research**,v.56, p.100–108, 1995.

MANETTI, L.; BOGAZZI, F.; GIOVANNETTI, C.; RAFFAELLI, V.; GENOVESI, M.; PELLEGRINI, G.; RUOCCO, L.; IANNELLI, A.; MARTINO, E. Changes in coagulation indexes and occurrence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: results from a prospective study before and after surgery. **European Journal of Endocrinology**, v.163, n.5, p.783-791, 2010.

MARKS, S.L.The Buccal Mucosal Bleeding Time.**Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, p.289-290, 2000.

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

MILJIC, P.; MILJIC, D.; CAIN, J.W.; KORBONITS, M.; POPOVIC, V. Pathogenesis of vascular complications in Cushing's syndrome. **Hormones**, v.11, n.1, p.21-30, 2012.

MISCHKE, R.; SCHULZE, U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. **The Veterinary Journal**, v.168, n.3, p.270-275, 2004.

MOONEY, C.T.; PETERSON, M.E. Coleta, armazenamento e transporte de amostras. In: _____. **Manual de Endocrinologia Canina e Felina**. 3.ed. Roca: São Paulo. 2009. p.13-18.

NARITA, T.; SATO, R.; MOTOISHI, K.; TANI, K.; NAITO, Y.; HARA, S. The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, n.4, p.353-363, 2007.

NICHOLS, R. Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**,v.27, n.2, p.309-320, 1997.

NICHOLS, T.C.; BELLINGER, D.A.; REDDICK, R.L.; SMITH, S.V.; KOCH, G.G.; DAVIS, K.; SIGMAN, J.; BRINKHOUS, K.M.; GRIGGS, T.R.; READ, M.S. The roles of von Willebrand factor and factor VIII in arterial thrombosis: studies in canine von Willebrand disease and hemophilia A. **Blood**,v.81, n.10, p.2644-2651, 1993.

NIESSEN, R.W.; PFAFFENDORF, B.A.; STURK, A.; LAMPING, R.J.; SCHAAP, M.C.; HACK, C.E.; PETERS, M. The influence of insulin, beta-estradiol, dexamethasone and thyroid hormone on the secretion of coagulant and

anticoagulant proteins by HepG2 cells. **Thrombosis and Hemostasis**, v.74, p.686-692.

NOWAK-GÖTTI, U.; AHLKE, E.; FLEISCHHACK, G.; SCHWABE, D.; SCHOBESS, R.; SCHUMANN, C.; JUNKER, R. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration. **Blood**, v.101, n.7, p.2529-2533, 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.

OLIVEIRA, S.T. Transtornos dos hormônios adrenais em cães. Rio Grande do Sul, 2004. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/transtornos_adrenal.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2009.

O'MARRA, S.K.; SHAW, S.P.; DELAFORCADE, A.M. Investigating hypercoagulability during treatment for immune-mediated thrombocytopenia: a pilot study. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.22, n.1, p.126-130, 2012.

PACKHAM, M.A.; MUSTARD, J.F. Clinical pharmacology of platelets. **Blood**, v.50, n.4, p.555-573, 1977.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Principles of Biostatistics**. Duxbury Press: California. 2000. 506p.

PATRASSI, G.M.; SARTORI, M.T.; VIERO, M.L.; SCARANO, L.; BOSCARO, M.; GIROLAMI, A. The fibrinolytic potential in patients with Cushing's disease: a clue to their hypercoagulable state. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v.3, p.789-793, 1992.

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.

PENG, J.; FRIESE, P.; GEORGE, J.N.; DALE, G.L.; BURSTEIN, S.A. Alteration of platelet function in dogs mediated by interleukin-6. **Blood**, v.83, n.2, p.398-403, 1994.

PETERSON, M.E. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.22, n.1, p.2-11, 2007.

PRINS, M.; SCHELLENS, C.J.M.M.; VAN LEEUWEN, M.W.; ROTHUIZEN, J.; TESKE, E. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. **The Veterinary Journal**, v.185, n.2, p.163-168, 2010.

PUI, C.; CHESNEY, C.M.; WEED, J.; JACKSON, C.W. Altered von Willebrand factor molecule in children with thrombosis following asparaginase-prednisone-vincristine therapy for leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.3, n.9, p.1266-1272, 1985.

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 (thrombocytopenia or thrombopathia). In: _____. **A guide to hematology in dogs and cats**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2005.

RIZATTI, E.G.; FRANCO, R.F. Investigação diagn stica dos distúrbios hemorr gicos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.34, n.1, p.238-247, 2001.

ROSE, L.J.; DUNN, M.E.; ALLEGRET, V.; BÉDARD, C. Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40, n.4, p.426-434, 2011.

ROZANSKI, E.A.; CALLAN, M.B.; HUGHES, D.; SANDERS, N.; GIGER, U. Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated thrombocytopenia in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, n.4, p.477-481, 2002.

SANTOS, W.G.; MONTEIRO, J.N.M.; OLIVEIRA, D.C.; BORLINI, D.C.; LOPES, B.F.; LANIS, A.B.; VESCOVI, L.A.; MACHADO, F.M.; COSTA, F.S. Ultrassonografia quantitativa do fígado em gatos tratados com prednisolona. In: 35º Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado. **Anais...** Gramado: Conbravet, 2008.

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.

SHAPIRO, R.S., GERRARD, J.M.; RAMSAY, N.K.; NESBIT, M.E.; COCCIA, P.F.; STODDARD, S.F.; PLOW, E.F.; WHITE, J.G.; KRIVIT, W. Selective deficiency in collagen-induced platelet aggregation during L-asparaginase therapy. **The American Journal of Pediatrics Hematology/Oncology**, v.2, n.3, p.207-212, 1980.

SMALL, M.; LOWE, G.D.O.; FORBES, C.D.; THOMSON, J.A. Thromboembolic complications in Cushing's Syndrome. **Clinical Endocrinology**. v.19, n.4, p.503-511, 1983.

SOLOVIEV, M.V.; OKAZAKI, Y.; HARASAKI, H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. **Journal of Surgical Research**, v.82, n.2, p.180-187, 1999.

SQUIZZATO, A.; GERDES, V.E.A.; AGENO, W.; BÜLLER, H.R. The coagulation system in endocrine disorders: a narrative review. **Internal and Emergency Medicine**, v.2, n.2, p.76-83, 2007.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Platelets. In: _____. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2.ed. Blackwell: Iowa, 2008. p.223-257.

SUNDER-PLOSSMANN, G.; SPEISER, W.; KORNINGER, C.; STAIN, M.; BETTELHEIM, P.; PABINGER-FASCHING, I.; LECHNER, K. Disseminated intravascular coagulation and decrease in fibrinogen levels induced by vincristine/prednisolone therapy of lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. **Annals of Hematology**, v.62, n.5, p.169-173, 1991.

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.

THONG, K.L.; MANT, M.J.; GRACE, M.G. Lack of effect of prednisone administration on bleeding time and platelet function of normal subjects. **British Journal of Hematology**, v.38, n.3, p.373-380, 1978.

VAN DER PAS, R.; DE BRUIN, C.; LEEBEEK, F.W.G.; DE MAAT, M.P.M.; RIJKEN, D.C.; PEREIRA, A.M.; ROMIJN, J.A.; NETEA-MAIER, R.T.; HERMUS, A.R.; ZELISSEN, P.M.J.; DE JONG, F.H.; VAN DER LELY, A.J.; DE HERDER, W.W.; LAMBERTS, S.W.J.; HOFLAND, L.J.; FEELDERS, R.A. The hypercoagulable state in cushing's disease is associated with increased levels of procoagulant factors and impaired fibrinolysis, but is not reversible after short-term biochemical remission Induced by medical therapy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.97, n.4, p.1303-1310, 2012.

VAN GIEZEN, J.J.; BRAKKEE, J.G.; DRETELER, G.H.; BOUMA, B.N.; JANSEN, J.W. Dexamethasone affects platelet aggregation and fibrinolytic activity in rats at different doses which is reflected by their effect on arterial

thrombosis. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis**, v.5, n.2, p.249-255, 1994.

VAN WINKLE, T.J.; BRUCE, E. Thrombosis of the portal vein in eleven dogs. **Veterinary Pathology**, v.30, n.1, p.28-35, 1993.

VAN ZAANE, B., NUR, E., SQUIZZATO, A.; DEKKERS, O.M.; TWICKLER, M.B.; FLIERS, E.; GERDES, V.E.A.; BÜLLER, H.R.; BRANDJES, D.P.M. Hypercoagulable state in Cushing's syndrome: A systematic review. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.94, n.8 ,p.2743–2750, 2009.

VAN ZAANE, B., NUR, E., SQUIZZATO, A.; GERDES, V.E.A.; BÜLLER, H.R.; DEKKERS, O.M.; BRANDJES, D.P.M. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.8, n.11, p.2483–2493, 2010.

VENTURA, F.V.C **Transtornos da hemostasia em cães azotêmicos**. 2011. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2011.

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.

WEKSLER, B.B.; GILLICK, M.; PINK, J. Effect of propranolol on platelet function. **Blood**, v.49, n.2, p.185-196, 1977.

ANEXOS

Anexo 1- Valores descritivos de todos os grupos

TABELA 1. Valores do perfil hemostático no momento 0 (pré-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória).TP: Tempo de protrombina; TTPA: Tempo de tromboplastina parcial ativada; TT: Tempo de trombina.

Animal	TP (s)	TTPA (s)	TT (s)	Fator VIII (%)	Fibrinogênio (mg/dL)	Antitrombina (%)
1	12,0	18,0	11,2	205,55	234,52	95,1
2	11,6	20,0	17,2	76,01	234,52	94,3
3	-	-	-	267,47	234,52	84,2
4	14,6	19,0	17,4	93,19	252,33	98,5
5	9,4	16,0	13,1	110,33	412,96	79,3
6	9,9	15,0	12,6	93,19	234,52	87,7
7	14,4	19,9	16,4	110,33	193,98	87,2
8	11,4	18,0	19,2	69,17	78,59	90,3
9	12,6	14,0	10,4	189,71	92,44	125,2
10	-	-	-	117,14	183,53	94,9

TABELA2. Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 0 (pré-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória).TSMO: Tempo de sangramento da mucosa oral; PDF: Produtos de degradação da fibrina; FvW: Fator de von Willebrand.

Animal	Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	TSMO (s)	Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	PDF (mg/dL)	FvW (%)
1	1,19	73	191.900	< 5	257,48
2	0,94	51	202.000	< 5	239,68
3	1,32	55	231.000	< 5	148,76
4	1,04	99	202.000	5 <x< 20	187,58
5	1,26	73	225.000	< 5	131,16
6	0,64	48	368.000	> 20	80,33
7	0,77	82	437.000	5 <x< 20	157,37
8	1,19	91	210.000	> 20	-
9	4,23	113	295.000	< 5	225,06
10	1,85	116	285.000	< 5	243,17

TABELA3. Valores do perfil hemostático no momento 1 (pós-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória).

Animal	TP (s)	TTPA (s)	TT (s)	Fator VIII (%)	Fibrinogênio (mg/dL)	Antitrombina (%)
1	8,0	17,9	9,4	55,69	151,29	72,0
2	11,1	15,2	12,1	88,38	412,96	75,9
3	10,5	18,0	11,4	93,19	328,21	59,7
4	11,3	19,0	9,7	-	-	70,4
5	11,5	18,0	10,4	60,55	158,19	83,3
6	11,2	15,0	9,6	83,93	298,08	78,8
7	9,7	16,0	10,3	47,59	219,16	71,3
8	-	-	-	93,19	328,21	83,5
9	9,2	16,0	13,3	363,28	129,01	76,6
10	9,11	15,2	10,4	93,19	298,08	111,0

TABELA4. Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 1 (pós-tratamento) do grupo I (dose anti-inflamatória).

Animal	Cortisol (µg/dL)	TSMO (s)	Plaquetas (/µL)	PDF (mg/dL)	FvW (%)
1	1,83	129	349.000	> 20	62,15
2	7,46	57	192.000	< 5	221,0
3	2,65	78	242.000	< 5	137,85
4	3,28	80	175.000	-	84,99
5	8,05	50	367.000	< 5	82,90
6	1,29	27	326.000	> 20	142,46
7	3,51	92	370.000	< 5	63,50
8	8,47	110	169.000	< 5	171,53
9	0,09	144	205.000	> 20	111,14
10	3,16	100	211.000	> 20	-

TABELA5. Valores do perfil hemostático no momento 0 (pré-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora).

Animal	TP (s)	TTPA (s)	TT (s)	Fator VIII (%)	Fibrinogênio (mg/dL)	Antitrombina (%)
11	-	-	-	243,28	183,53	148,6
12	11,0	15,0	12,5	69,17	102,95	158,4
13	10,4	18,7	14,0	83,93	234,52	90,4
14	8,9	14,0	11,8	205,55	298,08	103,9
15	10,2	14,0	9,4	243,98	365,52	132,2
16	9,9	13,0	11,3	407,24	365,52	122,2
17	8,5	13,0	13,1	117,14	83,96	92,2
18	9,0	13,0	9,7	88,38	183,53	128,3
19	9,3	14,0	10,5	98,43	365,52	132,0
20	12,7	14,0	8,5	267,47	234,52	112,9

TABELA6. Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 0 (pré-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora).

Animal	Cortisol (µg/dL)	TSMO (s)	Plaquetas (/µL)	PDF (mg/dL)	FvW (%)
11	3,25	93	438.000	5 <x< 20	105
12	1,76	80	320.000	> 20	100,19
13	0,31	45	370.000	> 20	117,79
14	0,58	135	174.225	> 20	85,10
15	3,64	85	190.000	< 5	219,35
16	3,09	80	515.000	5 <x< 20	78,12
17	2,17	50	269.000	> 20	133,48
18	1,26	70	466.000	> 20	112,21
19	1,73	82	201.000	< 5	-
20	6,82	44	265.125	< 5	141,12

Tabela 7. Valores do perfil hemostático no momento 1 (pós-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora).

Animal	TP (s)	TTPA (s)	TT (s)	Fator VIII (%)	Fibrinogênio (mg/dL)	Antitrombina (%)
11	8,9	16,0	8,9	93,19	174,19	73,7
12	7,5	17,0	9,9	132,82	83,96	66,1
13	7,5	18,0	12,0	76,01	234,52	83,0
14	8,3	16,0	10,0	243,98	100,09	84,3
15	10,5	14,0	9,6	151,96	205,77	77,1
16	7,5	14,0	8,9	141,89	234,52	77,5
17	7,0	12,0	9,7	459,89	158,19	71,0
18	8,7	13,0	9,6	163,16	205,77	69,5
19	10,3	13,0	8,7	151,96	174,19	142,8
20	11,0	15,0	12,5	151,96	193,98	79,3

Tabela 8. Valores do perfil hemostático e cortisol sérico no momento 1 (pós-tratamento) do grupo II (dose imunossupressora).

Animal	Cortisol (µg/dL)	TSMO (s)	Plaquetas (/µL)	PDF (mg/dL)	FvW (%)
11	45,18	110	408.000	> 20	50,04
12	13,92	79	388.850	> 20	59,09
13	0,24	50	366.000	> 20	79,88
14	0,72	107	129.000	> 20	43,64
15	22,19	75	264.000	> 20	83,13
16	16,02	75	392.000	5 <x< 20	136,26
17	13,68	79	330.000	5 <x< 20	-
18	19,77	135	257.550	5 <x< 20	141,99
19	2,99	72	261.000	> 20	269,53
20	30,41	70	383.000	> 20	71,04

Tabela 9. Agregação plaquetária em porcentagem dos animais em porcentagem entre os diferentes momentos e grupos. Para este teste, foram utilizados apenas 6 animais de cada grupo.

Animal	Grupo 1		Animal	Grupo 2	
	M0	M1		M0	M1
1	84	100	11	61	77
2	100	77	12	93	94
3	71	87	17	61	79
4	72	79	18	68	87
9	69	75	19	25	29
10	74	83	20	96	100