

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

AÇÃO DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL SOBRE O PERFIL
TROMBOELASTOMÉTRICO NO TRATAMENTO DE CÃES COM
HIPERADRENOCORTICISMO ACTH-DEPENDENTE

FELIPE GAZZA ROMÃO

BOTUCATU – SP

2020

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

AÇÃO DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL SOBRE O PERFIL
TROMBOELASTOMÉTRICO NO TRATAMENTO DE CÃES COM
HIPERADRENOCORTICISMO ACTH-DEPENDENTE

FELIPE GAZZA ROMÃO

Tese apresentada junto ao
programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária e Zootecnia
para obtenção do título de Doutor.

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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Romão, Felipe Gazza.

Ação do bissulfato de clopidogrel sobre o perfil tromboelastométrico no tratamento de cães com hiperadrenocorticismo ACTH-dependente / Felipe Gazza Romão. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Síndrome de Cushing. 3. Sangue - Distúrbios da coagulação. 4. Clopidogrel. 5. Plaquetas.

Palavras-chave: Agregação plaquetária; Hiper cortisolismo; Trilostano; Tromboelastometria.

Nome do autor: Felipe Gazza Romão

Título: Ação do bissulfato de clopidogrel sobre o perfil tromboelastométrico no tratamento de cães com hiperadrenocorticismo ACTH-dependente

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Gomes Lourenço

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP- Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal/SP

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Rodrigues Gomes

Hemovet Laboratório e Centro de Hemoterapia Veterinária

Data da defesa: 24 de julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

A confecção desta tese passou por uma série de percalços, que incluíram até uma pandemia. Assim, a ajuda de pessoas foi fundamental para que essa ideia pudesse ser transformada em realidade.

Gostaria de agradecer à minha esposa, Luciene, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, relacionados ou não ao período do doutorado. Te amo.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Claudia, que sempre tinham uma palavra de conforto e calma em todos os períodos de turbulência. Amo vocês.

À minha família, que tenho certeza que, mesmo à distância, torceram bastante pelo meu sucesso, desde sempre.

Ao Godines, por muitas vezes encostar e deitar nos meus pés, muito por comodidade, mas também pelo carinho.

A todos os meus professores, desde a época de colégio até os dias atuais (afinal, estamos sempre aprendendo), que fizeram com que eu me apaixonasse por essas profissões (médico veterinário e professor).

À minha orientadora de mestrado e doutorado, professora Regina, pela parceria de sempre, apoiando as ideias relacionadas à endocrinologia, tentando associar à área na qual é uma sumidade, a hemostasia.

Aos meus professores da clínica, dois dos quais presentes em minha banca (professora Malu e professor Henrique), pelos ensinamentos de sempre e muitas conversas amigas.

Aos meus colegas de pós-graduação, Bruna, Sylvia, Daniele, Pedrita, Tati e Victor, que foram fundamentais para a realização deste projeto, sempre com palavras de incentivo e ajuda nos momentos mais cruciais.

Finalmente, às médicas veterinárias e parceiras Viviani de Marco e Priscila Assis Lopes, que tornaram possível a realização e conclusão deste estudo. Também à FAPESP, pelo auxílio-pesquisa financeiro (16767-2/2018).

Falta espaço para citar todos. Cada página aqui escrita leva lágrimas, sorrisos e suor, que jamais serão esquecidos. A minha gratidão será eterna.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

TRABALHO CIENTÍFICO 1

Table 1. Breed distribution of 19 dogs diagnosed with hyperadrenocorticism	32
Table 2. Comparison of hematological parameters between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	33
Table 3. Comparison of biochemical parameters between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	34
Table 4. Comparison of ROTEM evaluation (INTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	35
Table 5. Comparison of ROTEM evaluation (EXTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	36
Table 6. Comparison of ROTEM evaluation (FIBTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	37
Table 7. Comparison of platelet aggregation, antithrombin, fibrinogen, D-dimer, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)	38

TRABALHO CIENTÍFICO 2

Table 1. Breed distribution of 11 dogs diagnosed with hyperadrenocorticism	57
--	----

Table 2. Comparison of hematological and hemostatic parameters between control group, G1 (n=6) and G2 (n=5) on two moments (M0 and M1)	58
--	----

Table 3. Comparison of ROTEM parameters between control group, G1 (n=6) and G2 (n=5) on two moments (M0 and M1)	59
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais parâmetros observados no gráfico da tromboelastometria rotacional (ROTEM). (CROCHEMORE et al., 2017)	7
FIGURA 2. Gráfico obtido na tromboelastometria rotacional (ROTEM), avaliando EXTEM, INTEM e FIBTEM, de animal com HAC, com perfil característico de estado de hipercoagulabilidade. (Arquivo pessoal)	62
FIGURA 3. Gráfico obtido na agregometria com sangue total, de animal com HAC ACTH-dependente, com perfil característico de estado de hiperfunção plaquetária. (Arquivo pessoal)	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: Ácido acetilsalicílico
ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico
ADP: Adenosina difosfato
ALT: Alanina-aminotransferase
COX: Cicloxigenase
CT: Tempo de coagulação
dL: decilitro
DM: Diabetes mellitus
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA: Fosfatase alcalina
HAC: Hiperadrenocorticismo
MCF: Firmeza máxima do coágulo
mg: miligramas
mL: mililitro
µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
PAI: Inibidor do ativador de fibrinogênio
PDF: Produtos de degradação da fibrina
ROTEM: Tromboelastometria rotacional
SID: *Semel in die*
TEG: Tromboelastografia
TEM: Tromboelastometria
TP: Tempo de protrombina
tPA: Ativador do plasminogênio tecidual
TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativada
UPC: Relação proteína:creatinina urinária
VO: Via oral

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Hemostasia e tromboelastometria	4
2.2 Hiperadrenocorticismo e hipercoagulabilidade	7
3. OBJETIVOS	12
4. HIPÓTESE	12
CAPÍTULO 2	
5. Trabalho Científico 1	13
CAPÍTULO 3	
6. Trabalho Científico 2	39
7. DISCUSSÃO GERAL	60
8. CONCLUSÕES GERAIS	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	74
Anexo 1 – Atestado do Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA	76
Anexo 2 – Termo de consentimento fornecido aos tutores para participação no projeto	77

RESUMO

Felipe Gazza Romão – **Ação do bissulfato de clopidogrel sobre o perfil tromboelastométrico no tratamento de cães com hiperadrenocorticismismo ACTH-dependente.** Botucatu, 2020, 87p, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP.

Diversas condições patogênicas podem levar a um estado de hipercoagulabilidade, quando pode haver a formação de trombos e/ou coagulação intravascular disseminada. O método mais indicado para detecção tanto da hipocoagulabilidade quanto hipercoagulabilidade é a tromboelastometria. O hiperadrenocorticismismo pode levar a um estado de hipercoagulabilidade por aumentar a atividade de fatores de coagulação, como o fibrinogênio, além de diminuir a ação de anticoagulantes endógenos, como a antitrombina. O objetivo deste trabalho foi verificar se o bissulfato de clopidogrel, agente antiplaquetário, seria capaz de diminuir o estado de hipercoagulabilidade em animais diagnosticados com hiperadrenocorticismismo; secundariamente, observamos também os principais fatores relacionados à hipercoagulabilidade em casos de HAC hipófise-dependente. Para tanto, foi realizado um estudo clínico prospectivo e randomizado em que os cães tiveram seu perfil hematológico, bioquímico e hemostático caracterizado no momento do diagnóstico, e após instituição dos protocolos terapêuticos (trilostano com ou sem clopidogrel) e normalização dos níveis de cortisol. Os resultados observados demonstraram que o tratamento com clopidogrel (2 mg/kg/SID) não demonstrou eficácia em reduzir o estado de hipercoagulabilidade, e os animais, mesmo após melhora dos sinais clínicos, permaneceram em risco trombótico, pelo menos pela avaliação tromboelastométrica.

Palavras-chave: hipercortisolismo; tromboelastometria; agregação plaquetária; trilostano.

ABSTRACT

Felipe Gazza Romão – **Evaluation of clopidogrel bisulfate on thromboelastometric profile in the treatment of dogs with hiperadrenocorticism ACTH-dependent hyperadrenocorticism.** Botucatu, 2020, 87p, School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University – UNESP.

Several pathogenic conditions can lead to a state of hypercoagulability, in which can occur thrombi formation and/or disseminated intravascular coagulation. The more appropriate method for detection of either hypocoagulability or hypercoagulability is thromboelastometry. It is an in vitro test that integrates cell components and soluble of hemostatic process, in order to result in a general assessment of hemostasis. The hyperadrenocorticism can lead to a hypercoagulability state due to increased activity of coagulation factors and fibrinogen concentration, in addition to decreased antithrombin activity, specially by glomerulonephritis and proteinuria. The aim of this study is to evaluate the clopidogrel bisulfate capability of attenuating the hypercoagulability state in dogs diagnosed with hyperadrenocorticism. For this purpose, a prospective and randomized clinical trial, in which patients will be characterized regarding their hemostatic profile on the admission date, and after therapy institution and subsequent normalization of cortisol levels. The results showed that treatment with clopidogrel (2 mg/kg/SID) did not demonstrate efficacy in reducing the state of hypercoagulability, and the animals, even after improvement of clinical signs, remained at thrombotic risk, at least by thromboelastometric evaluation.

Keywords: hypercortisolism; thromboelastometry; platelet aggregation; trilostane.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O sistema hemostático é a primeira linha de defesa contra traumas, e deve estar em perfeito equilíbrio a fim de evitar quadros de hemorragia ou hipercoagulabilidade. É um sistema muito bem regulado, que deve estar apto a estabilizar o fluxo livre de sangue e de seus constituintes ao mesmo tempo em que preserva a integridade vascular (ISIDORI et al., 2015).

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 (CROCHEMORE et al., 2017). 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 de coagulação (VIEIRA et al., 2007).

A trombose desenvolve-se em resposta a alterações nos mecanismos anticoagulantes do sistema hemostático normal. Os fatores que interagem e predispõem 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, sepse, endocardite bacteriana) ou por deposição de complexos imunes; injúria ao endocárdio e estase sanguínea resultante de cardiopatias (miocardiopatia hipertrófica felina); trombocitopatias (diabetes mellitus); e distúrbios associados à hipercoagulabilidade ou hipofibrinólise (hiperadrenocorticismo, neoplasias ou deficiência de antitrombina secundária a glomerulopatia) (TESHIMA et al., 2008).

A tromboelastometria (TEM) é um exame in vitro que integra os componentes celulares e solúveis do processo hemostático a fim de resultar em uma avaliação geral da hemostasia. O teste é baseado na capacidade de detectar e registrar alterações nas propriedades viscoelásticas do sangue no momento da coagulação. A técnica foi validada para utilização em diversas

espécies veterinárias, incluindo o cão. É utilizada cada vez mais na medicina veterinária para identificação e tratamento de animais predispostos a quadros tromboembólicos (KOL et al., 2013).

O hiperadrenocorticismismo (HAC), conhecido também como síndrome de Cushing, é uma endocrinopatia relativamente comum em cães, caracterizada pela secreção crônica excessiva de glicocorticoides (WOOLCOCK; BUGBEE; CREEVY, 2016). Uma complicação potencialmente fatal do HAC em cães é a trombose e consequente tromboembolismo, arterial ou venoso, com ênfase em leitos pulmonares (JACOBY et al., 2001; KOL et al., 2013).

A atividade plaquetária adequada é necessária para manter a hemostasia normal. A hipercoagulabilidade por hiperatividade plaquetária é um importante fator para o desenvolvimento de doença tromboembólica, fato que pode ocorrer em pacientes com hiperadrenocorticismismo. A aferição seriada da função plaquetária é fundamental para alterações relacionadas ao início ou modificação de terapia antiagregação plaquetária (BLOIS et al., 2015).

O clopidogrel tem como mecanismo de ação a inibição irreversível do receptor plaquetário P2Y₁₂ da adenosina difosfato (ADP) (SAATI et al., 2018). Na maioria dos cães, a função plaquetária é inibida três horas depois da administração de clopidogrel e permanece assim durante 24 horas após a primeira dose, conforme verificado pela agregação plaquetária. A dose de 1 mg/kg diária de bissulfato de clopidogrel foi avaliada em cães normais, a qual suprimiu de forma efetiva a atividade plaquetária (THAMES et al., 2017).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é verificar a real eficácia do bissulfato de clopidogrel como agente antiplaquetário, a fim de prevenir a ocorrência de eventos associados ao tromboembolismo pulmonar em cães acometidos pelo hiperadrenocorticismismo hipófise-dependente, por se tratar de consequência muitas vezes fatal e de evolução aguda. Além disso, observamos também os principais fatores possíveis relacionados à hipercoagulabilidade em casos de hiperadrenocorticismismo hipófise-dependente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemostasia e Tromboelastometria

A hemostasia é um processo complexo e dinâmico que ocorre em duas fases distintas, porém sobrepostas. A hemostasia primária envolve a adesão de

plaquetas ao endotélio vascular lesado, o que acarreta a formação de um tampão plaquetário. A hemostasia secundária envolve a conversão enzimática dos fatores de coagulação a fim de estabilizar o tampão plaquetário e formar o coágulo de fibrina. Esta fase tradicionalmente é descrita como um modelo em cascata com ativação de fatores de coagulação dentro de vias intrínsecas e extrínsecas para formar e depositar fibrina para estabilização do tampão plaquetário primário. Em indivíduos saudáveis, a fibrinólise balanceia a via de coagulação e degrada o coágulo (SONG; DROBATZ; SILVERSTEIN, 2016). Os produtos de degradação da fibrina (PDFs) e dímero-D são formados a partir da fibrinólise, sendo o aumento desses componentes, especialmente o de dímero-D, relacionado com a fibrinólise de coágulos formados em quantidade exacerbada (WITEK et al., 2016).

De forma mais aprofundada, a hemostasia é um mecanismo complexo que consiste em trombose, antitrombose, fibrinólise e antifibrinólise. Durante a formação do trombo, o fibrinogênio é polimerizado em fibrina pela trombina. A fibrina insolúvel sofre reações cruzadas pela ação do fator XIIIa, o que fornece estabilidade ao coágulo. Após cicatrização da superfície endotelial, o coágulo sofre então lise da fibrina, em um processo denominado fibrinólise, pela plasmina, a qual é gerada a partir do plasminogênio principalmente pela ação do ativador de plasminogênio tecidual (tPA). A fim de manter o balanço hemostático, a fibrinólise normalmente é inibida por proteases séricas, como o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI)-1, PAI-2 e α 2-antiplasmina (SIGRIST; JUD SCHEFER; KUTTER, 2018)

A hipercoagulabilidade é de difícil identificação por meio da utilização dos testes hemostáticos convencionais, como o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), os quais são mais adequados para a detecção de estados de hipocoagulabilidade (PARK et al., 2013). Como a trombose pode ocorrer devido a qualquer combinação de aumento de atividade de fatores pró-coagulantes, diminuição da atividade endógena anticoagulante, decréscimo da fibrinólise, estase sanguínea ou dano vascular endotelial, esses testes provavelmente não preverão o risco geral de trombose (DENGATE et al., 2016).

A tromboelastometria rotacional (ROTEM), é um teste validado em cães que pode ser utilizado para avaliação das propriedades viscoelásticas do

coágulo e permite a detecção de pacientes que estejam em estado de hipercoagulabilidade, hipocoagulabilidade ou normais (PARK et al., 2013; BARTHELÉMY et al., 2017; TURNER; KUTTER; SIGRIST, 2019).

A tromboelastometria (TEM) foi validada para utilização em diversas espécies de interesse veterinário, incluindo o cão, para identificação e tratamento de animais predispostos a quadros tromboembólicos (FALCO et al., 2013; KOL et al., 2013). A análise de determinados parâmetros permite uma avaliação geral de todo o processo de coagulação. O tempo de coagulação (CT) afere o tempo desde a colocação da amostra de sangue no aparelho até o início da formação da fibrina. O tempo de formação de coágulo (CFT) é uma aferição da velocidade de formação do coágulo, até a resistência específica dele. O ângulo alfa (α) representa a velocidade de formação e ligação cruzada da fibrina. A firmeza máxima do coágulo (MCF) representa a resistência final do coágulo. A amplitude (A) mede a largura do traçado do ROTEM em seu ponto mais tardio, e é observada em função da resistência e elasticidade do coágulo. A percentagem da lise do coágulo em 30 e 60 minutos após a MCF é uma medida da fibrinólise (CROCHEMORE et al., 2017; LECHNER et al., 2019). Na tromboelastometria rotacional (ROTEM), o estado de hipercoagulabilidade é caracterizado por uma diminuição dos valores de CT e/ou CFT (o que implica em aceleração na formação do coágulo), assim como aumento no ângulo α e/ou firmeza máxima do coágulo (associados ao aumento da força do coágulo) (MÜLLER et al., 2014). Na figura 1, observam-se os principais parâmetros avaliados no gráfico obtido pelo ROTEM.

A tromboelastometria rotacional pode ser utilizada para avaliar as propriedades viscoelásticas da formação do trombo em amostras de sangue total, fato que fornece informações sobre a função hemostática geral, desde o início da coagulação até a hemostasia terciária (FALCO et al., 2013; BARTHELÉMY et al., 2017; TURNER; KUTTER; SIGRIST, 2019). Além disso, é possível avaliar indiretamente a contribuição das plaquetas sobre a formação do coágulo, pela subtração do MCF do FIBTEM a partir do MCF do EXTEM (TURNER; KUTTER; SIGRIST, 2019). Basicamente, é um teste que fornece detalhes também sobre a velocidade da formação, resistência e lise do coágulo (KELLEY et al., 2015; REUTELER et al., 2017). O perfil do gráfico obtido

consegue definir a condição hemostática do paciente como normal, hipercoagulável ou hipocoagulável (BARTHELEMY et al., 2017).

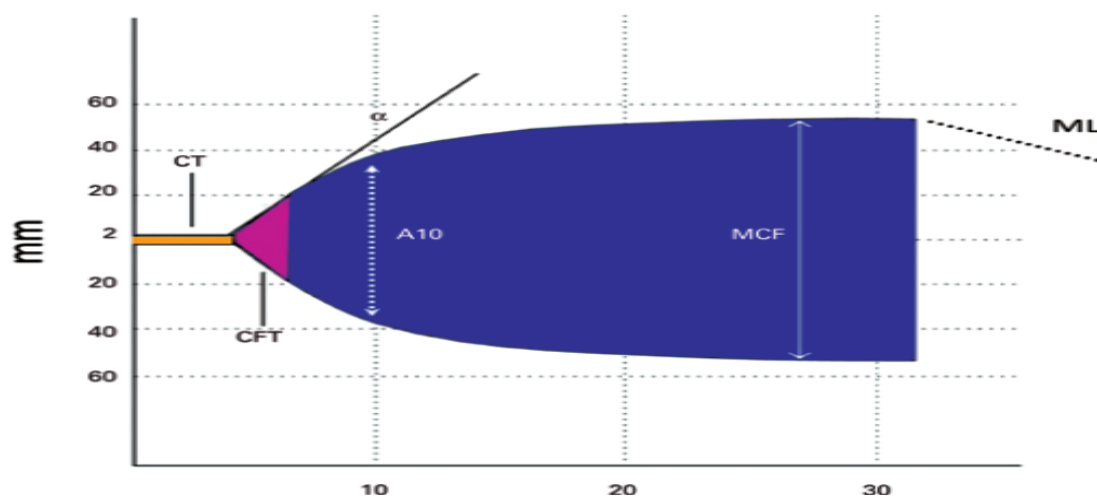


FIGURA 1. Principais parâmetros observados no gráfico da tromboelastometria rotacional (ROTEM). (CROCHEMORE et al., 2017).

2.2 Hiperadrenocorticism e hipercoagulabilidade

O hiperadrenocorticism, ou síndrome de Cushing, é um termo genérico que se refere à constelação de anormalidades clínicas e químicas que resultam da exposição crônica a concentrações excessivas de glicocorticoides. O hiperadrenocorticism é uma endocrinopatia comum (PELÁEZ et al., 2008; TESHIMA et al., 2008; KLOSE; CREEVY; BRAINARD, 2011; CAROTENUTO et al., 2019). O HAC pode ocorrer em animais com ou sem raça definida, embora existam determinadas raças predispostas, como o Poodle, Teckel, Terriers e Beagle de pequeno porte, e o Pastor alemão, Labrador retriever e os Boxers de grande porte (CAROTENUTO et al., 2019).

O hiperadrenocorticism pode ser espontâneo, associado à secreção exagerada de ACTH pela hipófise ou por carcinomas secretores de ACTH, classificado como ACTH-dependente, ou associado à doença primária da glândula adrenal, denominado atualmente como hiperadrenocorticism ACTH-independente (TIROSH et al., 2017). Pode também ser classificado como iatrogênico, que ocorre pela administração excessiva ou prolongada de glicocorticoides pelo médico veterinário ou tutor. Cerca de 80-85% dos casos de hiperadrenocorticism espontâneo canino são de origem hipofisária

(KOOISTRA; GALAC, 2010; KOL et al., 2013). Isto pode ocorrer devido à existência de adenoma na pars distalis (70% dos casos) e, em menor prevalência, adenomas da pars intermedia (cerca de 30%) e hiperplasia das células corticotróficas (NELSON, 2006). Já o HAC adreno-dependente, ou ACTH-independente, corresponde cerca de 15 a 20% dos casos e está relacionado a neoplasias adrenocorticais, normalmente unilaterais, as quais levam diretamente ao excesso de produção de glicocorticoides (PETERSON, 2007).

O hiperadrenocorticismo espontâneo acomete principalmente cães de meia idade a idosos, embora já tenha sido relatado em cães de até seis meses de idade. Os cães com HAC adreno-dependente tendem a ser mais velhos no momento do diagnóstico, entre 11 e 12 anos de idade (PETERSON, 2007; CAROTENUTO et al., 2019).

O diagnóstico do HAC canino é baseado nas informações obtidas pela anamnese completa, no conjunto de sinais clínicos observados, nas alterações de exame físico e de exames de triagem, como hemograma, painel bioquímico sérico, urinálise e, se possível, ultrassonografia abdominal (RAMSEY; RISTIC, 2007). Após, a suspeita deve ser confirmada pelos testes endócrinos específicos, como o teste de supressão por baixa dose de dexametasona (BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019).

As alterações comumente observadas nos exames hematológicos e bioquímicos incluem o aumento da atividade sérica da FA e da ALT, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia. A creatinina e a ureia podem apresentar valores normais ou abaixo do valor de referência, pois os glicocorticoides estimulam a diurese (BENNAIM et al., 2019). Em 85% dos casos de HAC canino, o paciente apresenta densidade urinária baixa entre os valores de 1,007 (faixa hipostenúrica) (CAPEN; MARTIN, 1975) a 1,020. Outras alterações que podem ser observadas incluem proteinúria e glicosúria (BENNAIM et al., 2019).

O hipercortisolismo relacionado ao hiperadrenocorticismo está associado à hipercoagulabilidade em decorrência, segundo grande número de autores, de um estado pró-trombótico principalmente relacionado ao aumento da atividade do fator VIII e do fator de von Willebrand (COELHO et al., 2014). Também há indícios de aumento da atividade de outros fatores pró-coagulantes, diminuição

dos níveis plasmáticos de antitrombina, e aumento da concentração de fibrinogênio (JACOBY et al., 2001; KOL et al., 2013). Em seres humanos, estudos apontaram a via intrínseca como a mais afetada pelos efeitos do hipercortisolismo, conforme demonstrado pela diminuição do TTPa (tempo de tromboplastina parcial ativada) e valores normais de TP (tempo de protrombina), em pacientes com síndrome de Cushing. A incidência e o risco exatos destes eventos tromboembólicos em cães acometidos pela síndrome de Cushing ainda não foram definidos, e a patogenia deste processo ainda é compreendida de forma incompleta. Sabe-se, porém, que animais tratados com trilostano, um bloqueador enzimático da síntese de esteroides, permanecem em estado de hipercoagulabilidade mesmo após terapia com este medicamento (PARK et al., 2013).

A HAC está associada a disfunção de diversos órgãos e tecidos (NICHOLS, 1997). Como resultante dessas alterações, ocorre o estado de hipercoagulabilidade. A partir disso, fica notório que múltiplos fatores devam estar associados ao risco de formação de trombos. Uma doença frequentemente associada ao HAC é a diabetes mellitus (DM), e quando ocorrem de forma concomitante diminuem em 14 meses a sobrevida dos cães acometidos (MICELI; PIGNATARO; CASTILLO, 2017). A hiperglicemia, oriunda da DM, afeta o sistema hemostático por meio do aumento da expressão do fator inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1 [molécula inibidora da fibrinólise]) pelas células endoteliais. A atividade elevada de PAI-1 é vista tanto em cães com DM, quanto naqueles com HAC não associada a DM (WONG; KOCH; BEHLING-KELLY, 2017).

A hipercortisolemia de origem endógena ou exógena pode levar a um aumento da agregação das plaquetas (ROMÃO et al., 2013), o que aumenta o risco trombótico. A DM, que pode correr em associação, por si só é capaz de induzir uma hiperatividade plaquetária por aumento da agregação, alteração das moléculas de adesão e lesão vascular; assunto amplamente explorado na medicina humana na DM do tipo 2 (GAIZ et al., 2017).

Além do aumento da atividade plaquetária, a hipercortisolemia pode resultar em trombocitose, provavelmente por estímulo medular e diminuição do sequestro esplênico (PARK et al., 2013). A trombocitose, portanto, é um achado comum em cães com HAC; mas de forma geral a magnitude é considerada leve

a moderada (entre 500.000 a 800.000 plaquetas/ μ L) (WOOLCOCK et al., 2017). No trabalho de Smith, Smith e Brainard (2014), a mediana da contagem de plaquetas em 47 cães com HAC foi de 511.000 e valores máximo e mínimo variaram entre 140.000 a 1.082.000 plaquetas/ μ L. Os casos de tromboembolismo com trombocitose estão associados a um ou mais fatores de risco: uso de glicocorticoide, HAC, hipertensão, cardiopatia, neoplasia, anemia hemolítica imunomediada e perda de proteínas por enteropatia e nefropatia. Assim, ainda é difícil concluir qual a real contribuição de uma alta contagem de plaquetas para formação de trombos frente a doenças que causam alterações hemostáticas tão complexas (NEEL; SNYDER; GRINDEM, 2012).

A hipertensão arterial presente no HAC tem como possíveis mecanismos de origem a maior sensibilidade às catecolaminas, secreção de renina, a redução das prostaglandinas vasodilatadoras e o aumento da secreção de alguns mineralocorticoides (NICHOLS, 1997). Em estudo recente, a hipertensão esteve presente em 80% dos cães diagnosticados (VIDAL et al., 2018). Como consequência, o quadro hipertensivo crônico pode progredir para retinopatias, insuficiência de tricúspide e insuficiência cardíaca congestiva, glomerulopatias e o tromboembolismo pulmonar. Mesmo com tratamento adequado, a pressão arterial pode levar meses para se normalizar (NICHOLS, 1997). Cães com HAC apresentam aumento da relação proteína: creatinina urinária e albuminúria mesmo sem cistite (LIEN; HSIANG; HUANG, 2010). Essa lesão glomerular, por sua vez, pode levar à perda de um dos principais anticoagulantes naturais, a antitrombina; fato que contribuiria para o estado de hipercoagulabilidade. A atividade de antitrombina em cães HAC não tratados é menor que em cães saudáveis, além de uma quantidade bastante superior de complexo trombina-antitrombina, que indica um aumento na geração de trombina pelo organismo (JACOBY et al., 2001).

O hipercortisolismo crônico, que é o ponto fundamental dos casos de hiperadrenocorticism, assim como glicocorticoides utilizados em terapias, levam a anormalidades hemostáticas pelo aumento da incidência do tromboembolismo venoso e arterial, e aceleração do desenvolvimento de aterosclerose, especialmente em seres humanos (ROSE; DUNN; BÉDARD., 2013). O estado de hipercoagulabilidade pode levar ao aumento de incidência dos episódios tromboembólicos. Um estudo em seres humanos demonstrou

significativa maior morbidade e mortalidade em um grupo de pacientes com síndrome de Cushing que não recebia nenhum tipo de terapia profilática anti-tromboembólica comparado a indivíduos que foram submetidos à terapia profilática com warfarina ou heparina (BOSCARO et al., 2002; WITEK et al., 2016).

O estado de hipercoagulabilidade é caracterizado no gráfico do ROTEM por diminuição dos valores de CT e CFT (o que denota aceleração da formação do coágulo), assim como aumento do ângulo- α e MA, o que está associado ao aumento da força do coágulo. Essas alterações podem ser observadas em pacientes com HAC, principalmente relacionadas às anormalidades do ângulo- α (ROSE; DUNN; BÉDARD, 2013). Além disso, o aumento dos valores de amplitude máxima (MA) foi documentado em cães que estavam recebendo corticoidoterapia, além de condições inflamatórias, neoplásicas e degenerativas (KOL et al., 2013). O aumento de MA também foi documentado em pacientes caninos com HAC tratados para a doença (KLOSE; CREEVY; BRAINARD, 2011; KOL et al., 2013).

Um dos fármacos mais comumente utilizado para o tratamento de animais a fim de prevenir complicações tromboembólicas foi o ácido acetilsalicílico (AAS), que inibe a ciclooxigenase (COX) das plaquetas e diminui a produção do tromboxano por elas. Porém, estudos afirmaram que o AAS não diminui a agregação plaquetária em cães; além disso, seus efeitos colaterais (alterações gastrointestinais e renais) devem ser levados em consideração. Por estas razões, o clopidogrel passou a ser utilizado como agente antiagregação plaquetária, por ser mais seguro e resultar em inibição mais confiável da agregação plaquetária (BRAINARD et al., 2010).

O clopidogrel é uma pró-droga que necessita de metabolismo hepático para formar um metabólito que bloqueia irreversivelmente o receptor plaquetário P2Y₁₂ e inibe agregação plaquetária. Em seres humanos, as enzimas do sistema citocromo P450 são responsáveis pelo metabolismo do clopidogrel; todavia, ainda não se sabe ao certo qual a enzima é particularmente responsável pelo metabolismo em cães. Na maioria dos cães, a agregometria detecta inibição da função plaquetária dentro de três horas após a administração do clopidogrel, ação que permanece inibida durante 24 horas após a dose inicial (THAMES et al., 2017).

3. OBJETIVOS

Verificar se o bissulfato de clopidogrel é capaz de diminuir o estado de hipercoagulabilidade em animais diagnosticados com hiperadrenocorticismos.

3.1 Objetivos específicos

- Determinar o perfil hematológico, bioquímico e hemostático de pacientes com hiperadrenocorticismos ACTH-dependente.
- Determinar quais são os principais fatores que levam ao estado de hipercoagulabilidade no hiperadrenocorticismos canino.

4. HIPÓTESE

O uso de clopidogrel em cães com HAC ACTH-dependente reduz o estado de hipercoagulabilidade quando comparados aos cães não tratados, ou tratados isoladamente com o trilostano.

CAPÍTULO 2

5. TRABALHO CIENTÍFICO 1

DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY

<https://www.elsevier.com/journals/domestic-animal-endocrinology/0739-7240/guide-for-authors>

1 HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND HEMOSTATIC PROFILE
2 IN DOGS WITH ACTH-DEPENDENT HYPERADRENOCORTICISM

3 F.G. Romão^a; B. dos Santos^a; S.E.V. Mora^a; D.S. Gonçalves^a; V. de Marco^b; P.A.
4 Lopes^b; R.K. Takahira^a

5 *a Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal
6 Science, UNESP, Botucatu/SP, s/n, Postal code 237, Brazil*

7 *Felipe Gazza Romão: fgazza_vet@hotmail.com – +55 14 991957000*

8 *Bruna dos Santos: brunasantos.vet@hotmail.com - +55 14 991185692*

9 *Silvia Eugenia Vargas Mora: sevm201@gmail.com - +506 88210704*

10 *Daniele Silvano Gonçalves: daniellesilvano@gmail.com - +55 31 91693370*

11 *Regina Kiomi Takahira: regina.takahira@unesp.br - + 55 14 997797556*

12 *b Naya Especialidades Veterinárias, São Paulo/SP, Zip code 04608-003, Brazil*

13 *Viviani de Marco: vivianidemarco@gmail.com - +55 11 999104224*

14 *Priscila Assis Lopes: priaslop@hotmail.com - +55 11 960661377*

15

16 **Corresponding author: Felipe Gazza Romão – fgazza_vet@hotmail.com**

17

18

19

20

21 **ABSTRACT**

22 Hyperadrenocorticism (HAC) is an endocrine disease that leads to several clinical
23 and laboratorial alterations. Despite its low morbidity, HAC is associated with
24 multisystemic complications, such as thromboembolism. The aim of this study
25 was to evaluate hematological, biochemical and hemostatic alterations related
26 with ACTH-dependent HAC and its correlation with thromboembolic disease. For
27 this purpose, a prospective, observational study was conducted, where we
28 compared a group of 19 dogs diagnosed with ACTH-dependent HAC with a 30-
29 dog control group. The variables included blood count, biochemical (urea,
30 creatinine, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl
31 transferase, cholesterol, triglycerides, glycemia, urinary protein: creatinine [UPC]
32 ratio) and hemostatic (antithrombin, fibrinogen, dimer-D, PT, aPTT,
33 thromboelastometry and platelet aggregation) parameters. Results showed
34 typical changes associated with HAC, such as thrombocytosis, hyperlipidemia,
35 increased liver enzymes and UPC; and a higher tendency for thrombotic risk,
36 suggested by alterations in thromboelastometry, decreased prothrombin time,
37 activated partial thromboplastin time, and increased fibrinogen levels. Animals
38 with HAC have a higher risk of hypercoagulability due to several mechanisms
39 and predisposing factors.

40 Keywords: Thrombocytosis; Dyslipidemia; Fibrinogen; Antithrombin;
41 Hypercoagulability.

42

43 **1. INTRODUCTION**

44 Hyperadrenocorticism (HAC) is a relatively common endocrinopathy in
45 dogs, characterized by excessive chronic secretion of glucocorticoids [1,2,3,4,5].

46 It is classified as ACTH-dependent and ACTH-independent HAC. The first one
47 associated with exaggerated secretion of ACTH by the pituitary gland or ACTH-
48 secreting carcinomas, and the second with primary adrenal gland disease [6].

49 HAC can occur in both pure and mixed-breed dogs. However, some studies
50 have established a higher incidence in Poodles, Dachshunds, Beagles, German
51 shepherds, Labrador retrievers and Boxers. Middle-aged to elderly dogs are the
52 most affected, although there are reported cases of six-month-old dogs [1,3].

53 The presumptive diagnosis of canine HAC, consists of clinical signs,
54 physical exam and screening tests (blood count, serum biochemical panel,
55 urinalysis and abdominal ultrasound). Specific endocrine tests, such as the low-
56 dose dexamethasone suppression test, are essential to confirm the diagnosis [7].

57 As a potentially fatal complication, HAC can generate arterial and venous
58 thrombi [8,9]. The occurrence of thromboembolic disease in dogs with HAC—
59 associated with 17.3% of their deaths—was approximately three times higher
60 when compared to healthy dogs [10]. Some studies associate this
61 hypercoagulable state with an increased activity of procoagulant factors (factor
62 VIII, von Willebrand factor, fibrinogen, among others), and decreased plasma
63 levels of antithrombin [11]. In addition, other reports have demonstrated a
64 correlation between hypercortisolism and increased platelet aggregation and
65 thrombocytosis [12,13].

66 Hypercoagulability is difficult to predict by means of conventional hemostatic
67 tests (prothrombin time [PT] and activated partial thromboplastin time [aPTT]), as
68 they are more suitable for detecting hypocoagulable states [14]. Thrombosis can
69 occur by multiple mechanisms: increased activity of procoagulant factors,
70 decreased endogenous anticoagulant activity, decreased fibrinolysis, blood

71 stasis or endothelial vascular damage, which make these tests harder to predict
72 thrombotic risk [15]. Thromboelastometry (TEM) is a validated test in veterinary
73 medicine that detects hypercoagulable states [14,16] and evaluates hemostatic
74 treatments [11].

75 We hypothesized that dogs with HAC are at higher risk of thrombosis.
76 Thus, the objective of this study was to evaluate hematological, biochemical and
77 hemostatic findings in dogs with ACTH-dependent HAC and compare them to a
78 healthy control group, in order to identify thrombotic risk and possible related
79 mechanisms.

80

81 **2. MATERIALS AND METHODS**

82 *2.1 Experimental design*

83 This study was approved by the Ethics Committee on The Use of Animals
84 (protocol no 0163/2018) and a free and informed consent was signed by the
85 patient's owners. We selected 19 client-owned dogs (10 females, 9 males [Table
86 1]) diagnosed with ACTH-dependent HAC (by low-dose dexamethasone
87 suppression test and endogenous ACTH concentration), from the endocrinology
88 service of two veterinary clinics (Naya Especialidades Veterinárias, São
89 Paulo/SP, and Endocardiovet, Bauru/SP). The median age for this group was 11
90 years (range 6-15 years). Animals with comorbidities not related to ACTH-
91 dependent HAC were excluded

92 For the control group, we included 30 healthy dogs (12 males and 18
93 females), between the ages of 1 and 9 years (median, 3 years), without morbid
94 antecedents in the past 30 d. With previous clinical evaluation, all animals were

95 submitted to the same laboratory analysis (blood count, biochemical and
96 hemostatic profile).

97

98 *2.2 Blood collection*

99 Blood was collected from the external jugular vein using a EDTA K3
100 anticoagulant 7.5% tube for blood count and a dry tube for biochemical analysis.
101 For hemostatic evaluation, blood was collected in a 3.2% sodium citrate tube at
102 single moment. Two citrated tubes (3.2% sodium citrate) of 1.8 mL of blood were
103 collected. After collection, samples destined for TEM and platelet aggregation
104 were submitted to analysis within 40 minutes. The poor platelet plasma (PPP)
105 used for the tests of prothrombin time (TP), activated partial thromboplastin time
106 (aPTT), antithrombin, fibrinogen and D-dimer were immediately frozen and stored
107 in liquid nitrogen (-196 °C) until analysis.

108

109 *2.3 Laboratorial Analysis*

110 *2.3.1 Hemostasis*

111 *2.3.1.1 Thromboelastometry (TEM)*

112 Analyses was performed in whole blood within 30-40 minutes after sampling
113 and according to the manufacturer's instructions. Three channels were used
114 simultaneously for measuring INTEM, EXTEM and FIBTEM, each one requiring
115 300 µL of citrated blood. The blood was recalcified with 20 µL of calcium chloride
116 0.2 M (STAR-TEM®), and coagulation was initiated by adding tissue factor
117 (EXTEM®) and ellagic acid (INTEM®). For FIBTEM® analysis, blood was mixed
118 with 20 µL of EXTEM reagent and 20 µL of cytochalasin D solution [17].
119 Tracings were run at 37°C for 60 minutes.

120 2.3.1.2 Platelet aggregation

121 Whole blood platelet aggregation was performed in an electric impedance
122 aggregometer (Chrono - Log WBA® - Model 592^a Dual Channel). The sample
123 was kept at room temperature for 30 minutes before analysis. Aggregation was
124 performed according to the protocol using ADP as an agonist [18].

125

126 2.3.1.3 PT and aPTT

127 For PT and aPTT analysis, the proceeding was performed by a
128 coagulometer CloTimer (Clot®), according to the guidelines of each commercial
129 kit [19].

130

131 2.3.1.4 Antithrombin, fibrinogen and D-dimer

132 Antithrombin, fibrinogen and D-dimer plasma concentrations were
133 determined by an automated Sysmex CA-600 (Siemens Healthcare
134 Diagnostics®) device, according to the guidelines of each commercial kit
135 (Berichrom® Antithrombin III, Dade® Fibrinogen and Innovance® D Dimer,
136 respectively).

137

138 2.3.2 Blood count

139 Blood count was performed by hematological analyzers (flow cytometry and
140 impedance). Cell morphology and differential leukocyte count were performed in
141 100 cells together with the evaluation of the morphology of erythrocytes and
142 platelets in blood smears stained by rapid Panoptic (Laborclin®).

143

144

145 2.3.3 Serum biochemistry and urinary protein: creatinine ratio

146 Biochemical tests and urinary protein: creatinine ratio were processed in
147 an automated biochemistry device (Roche® - Cobas Mira Plus) using commercial
148 kits (Bioclin® and Labtest®). Biochemical analyses included alanine-
149 aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl
150 transferase (GGT), urea, creatinine, total protein, albumin, cholesterol,
151 triglycerides and glucose.

152

153 2.3.4 Low dose dexamethasone suppression test

154 Diagnosis of HAC was confirmed by the low-dose dexamethasone
155 suppression test, in which serum cortisol concentration (baseline, 4h and 8h post-
156 dexamethasone) was obtained by radioimmunoassay method, using commercial
157 kits (Coat - A Count, Siemens®). The collection was performed according to a
158 predetermined protocol [7]. Animals with baseline cortisol levels of $> 4.0 \mu\text{g/dL}$,
159 and post dexamethasone (4 and 8 h) levels of $> 0.9 \mu\text{g/dL}$, were considered
160 positive.

161

162 2.3.5 Statistical analysis

163 Data were analyzed using the commercial program GraphPad Prism
164 version 5.01 (GraphPad Software, Inc®/ La Jolla, CA). Estimation of the sample
165 size (n) was calculated at an 80% statistical power. Normality of data was
166 assessed by the test of Shapiro-Wilk and variables were compared by Student's
167 t-test. All data were expressed as a mean ($\pm$ SD). Statistical significance was
168 established at $p < 0.05$ for all values.

169

170 3. RESULTS AND DISCUSSION

171 Regarding hematological evaluation, our study showed a significant
172 difference only for the platelet count (Table 2) when we compared both groups.
173 We observed mild to moderate thrombocytosis in 7/19 dogs (36.85%), probably
174 due to bone marrow stimulation and/or decreased splenic sequestration [14].
175 Other studies reported an increase in 75-80% of the cases [20,21]; however, their
176 reference interval was lower than the one used for this study (160-430 / μ L x 200-
177 500 / μ L). Constant exposure to hypercortisolemia gives rise to multisystemic
178 disorders that can be reflected in routine laboratory tests [22]. Erythrocytosis,
179 thrombocytosis and stress leukogram constitute the most frequent hematological
180 changes [23,24], although we only observed thrombocytosis as a consistent
181 change.

182 Hypercortisolemia can also stimulate ALP's cortisol-induced isoenzyme
183 and vacuolar hepatopathy [23], leading to a significant increase in ALP and ALT
184 activity, respectively (Table 3). Even though this does not occur with GGT, studies
185 have shown an association between increased serum activity and glucocorticoid
186 treatment; probably due to a stimulus of hepatocytes' microsomal system [25,26].
187 In HAC, increment of GGT tends to be less common and severe than ALP [27].
188 Still our study showed a similar frequency between them; 11/16 (68.75%) patients
189 had an increase in GGT and 12/18 (66.66%) patients in ALP. In fact, some
190 animals presented high levels of GGT with normal activity of ALP, possibly related
191 with the presence of cholestasis in the bile canaliculus. Hyperlipidemia caused
192 by cortisol stimulus for lipolysis, and hyperglycemia, produced by insulin
193 resistance and hepatic neoglucogenesis, were also common findings [23,24]. It
194 is important to note that some animals were not submitted to all examinations,

195 which explains the lower total number of animals evaluated in relation to the
196 levels of GGT and ALP.

197 Some authors characterized thromboembolic mechanisms according to
198 the triad of Virchow, which includes endothelial dysfunction, hypercoagulability
199 and stasis [28]. We confirmed the presence of hypercoagulability in dogs with
200 HAC, mainly represented by a decrease in CT (EXTEM and FIBTEM assays) and
201 CFT parameters (FIBTEM assay), and an increase of MCF in the INTEM, EXTEM
202 and FIBTEM pathways (Tables 4, 5 and 6). These alterations suggest a faster
203 formation of fibrin polymer and a more resistant clot. So far, none of these
204 patients has develop a clinical thromboembolic event. In addition, we observed
205 decreased values of PT and aPTT compared to control group, which may also
206 suggest a state of hypercoagulability due to the increase of several factors of the
207 intrinsic and extrinsic pathways in cases of HAC [29].

208 Our study also detected increased fibrinogen levels in all animals with HAC
209 (Table 7), what could indicate a pro-inflammatory condition caused by
210 hypercortisolism, that in conjunction with the ML's increase, suggested a
211 fibrinolytic disorder [28]. The FIBTEM assay qualitatively evaluates fibrinogen by
212 the action of cytochalasin D, which irreversibly inhibits platelet function [30], and
213 justifies the importance of fibrinogen in hemostasis. Fibrinogen binds to GPIIb-
214 IIIa platelet receptors enabling cross-linking of adjacent activated platelets [31].
215 We observed higher platelet aggregation in dogs with HAC (Table 7), probably
216 due to hyperfibrinogenemia, which alters plasma viscosity, erythrocyte
217 aggregation and vascular reactivity, and impairs endothelial cell layer integrity by
218 binding to its endothelial cell membrane receptors and activating signalling
219 mechanisms [32]. However, results of TEM tracing were incompatible with this

220 finding, since the parameters used to evaluate platelet aggregation, (CFT and
221 alpha angle of INTEM and EXTEM assays) were normal. This also could be
222 explained by a ROTEM's lack of sensitivity to assess antiplatelet effects.

223 Animals with HAC presented hyperglycemia, hypercholesterolemia,
224 hypertriglyceridemia, and high urinary protein: creatinine ratio (UPC) (Table 3),
225 alterations that could predispose to thromboembolism and that should be
226 corrected by the clinician. Obesity, dyslipidemia, insulin resistance and
227 proteinuria are considered inflammatory conditions that result in increased
228 thrombotic risk [20,28].

229 Several researchers recognize hyperlipidemia as one of the principal
230 causes of atherosclerosis, and the consequent formation of thrombi. In HAC,
231 studies have proposed increase of LDL cholesterol--associated with cholestasis
232 and cellular liver disease—as the main mechanism for hypercholesterolemia
233 [33,34]. The prevalence of hyperlipidemia is still undefined, ranging from 50-80%
234 between authors [27]. For our study, we omitted the quantification of cholesterol
235 lipoproteins so LDL levels were unverified; yet, we observed a lower prevalence
236 than expected. Only 7/19 animals (36.84%) showed hypercholesterolemia and
237 6/19 (31.58%) presented hypertriglyceridemia, leading us to the presumption that
238 hyperlipidemia is an irrelevant factor for thrombotic risk in canine HAC.

239 Literature reports proteinuria (UPC > 1,0) as a common finding in HAC and
240 a probable cause of antithrombin (important anticoagulant factor) renal loss, but
241 its origin is still on debate. Some authors suggest glomerular damage as the main
242 cause of proteinuria directly caused by the immunosuppressive effects of
243 hypercortisolemia, and systemic arterial hypertension and increased glomerular
244 permeability [35,36], while other studies propose a glomerular or tubular origin

245 linked to the presence of high molecular weight proteins on proximal tubule [37].
246 Most of our patients (14/19; 73.7%) presented proteinuria, though, with higher
247 levels of antithrombin than the control group (Table 7). Since our study lacks
248 specific markers and blood pressure the origin of proteinuria remains
249 unsupported. Though, we believe that renal loss of antithrombin might be
250 proportionally related with the severity of proteinuria, and that increased levels of
251 antithrombin were caused by a compensatory mechanism for hypercoagulability
252 secondary to inflammatory diseases and increased procoagulant factors [20,28].

253 Some authors have associated hypercortisolism with increased
254 plasminogen activator inhibitor (PAI) levels, resulting in decreased fibrinolysis
255 [38], yet, our study showed no significant difference in D-dimer values and ML
256 parameter of INTEM and EXTEM assays. As seen in other studies that reported
257 normal fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome [28] and healthy
258 humans undergoing high-dose dexamethasone therapy [39].

259 The D-dimer concentration is influenced by several physiological and
260 pathological conditions, such as pregnancy, chronic inflammatory conditions and
261 neoplasms; normal levels suggest absence of clinical thrombotic event [31]. For
262 this reason, D-dimer should be interpreted in conjunction with TEM and imaging
263 exams. None of the animals included in our study developed a thrombotic clinical
264 event, and animals with comorbidities such as neoplasms, chronic kidney
265 disease, among others, were excluded.

266 Future studies evaluating inflammation-related factors and its correlation
267 with our study results will contribute not only to comprehend physiological
268 mechanisms of hypercoagulability, but also to determine the patients' stage.

269

270 CONCLUSIONS

271 Canine ACTH-dependent hyperadrenocorticism is associated with a state
272 of hypercoagulability characterized by thromboelastometric changes. This state
273 is caused by hyperfibrinogenemia in association with thrombocytosis,
274 dyslipidemias, hyperglycemia, and proteinuria.

275

276 ACKNOWLEDGMENTS

277 This research received grant from FAPESP (Fundação de Amparo à
278 Pesquisa do Estado de São Paulo) [grant number 2018/16767-2], a funding
279 agency in public sectors.

280

281 Conflicts of interest: There are no conflicts of interest for any of the authors.

282

283 REFERENCES

284 [1] Carotenuto G, Malerba E, Dolfini C, Brugnoli F, Giannuzzi P, Semprini G,
285 Tosolini P, Fracassi F. Cushing's syndrome—an epidemiological study based on
286 a canine population of 21,281 dogs. *Open Vet J.* 2019;9(1):27-32.

287

288 [2] Klose TC, Creevy KE, Brainard BM. Evaluation of coagulation status in dogs
289 with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *J Vet Emerg Crit Care.*
290 2011;21(6):625-632.

291

292 [3] O'Neill DG, Scudder C, Faire JM, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC,
293 Brodbelt DC. Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs

294 attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *J Small*
295 *Anim Pract.* 2016;57(7):365-373.

296

297 [4] Teshima T, Hara Y, Taoda T, Koyama H, Takahashi K, Nezu Y, Harada Y,
298 Yogo T, Nishida K, Osamura RY, Teramoto A, Tagawa M. Cushing's disease
299 complicated with thrombosis in a dog. *J Vet Med Sci.* 2008;70(5):487-491.

300

301 [5] Woolcock AD, Bugbee AC, Creevy KE. Evaluation of baseline cortisol
302 concentration to monitor efficacy of twice-daily administration of trilostane to dogs
303 with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 22 cases (2008-2012). *J Am Vet*
304 *Med Assoc.* 2016;248(7):814-821.

305

306 [6] Tirosh A, Lodish M, Lyssikatos C, Belyavskaya E, Feelders RA, Stratakis CA.
307 Coagulation profile in patients with different etiologies for Cushing syndrome: a
308 prospective observational study. *Horm Metab Res.* 2017;49(5):365-371.

309

310 [7] Bennaïm M, Shiel RE, Forde C, Mooney CT. Evaluation of individual low-dose
311 dexamethasone suppression test patterns in naturally occurring
312 hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med.* 2018;32:967–977.

313

314 [8] Respass M, O'Toole TE, Taeymans O, Rogers CL, Johnston A, Webster CRL.
315 Portal vein thrombosis in 33 dogs: 1998–2011. *J Vet Intern Med.* 2012;26(2):230-
316 237.

317

- 318 [9] Williams TP, Shaw S, Porter A, Berkwitt L. Aortic thrombosis in dogs. *J Vet*
319 *Emerg Crit Care*. 2017; 27(1):9-22.
- 320
- 321 [10] Hoffman JM, Lourenço BN, Promislow DEL, Creevy KE. Canine
322 hyperadrenocorticism associations with signalment, selected comorbidities and
323 mortality within North American veterinary teaching hospitals. *J Small Anim Pract*.
324 2017;59(11):681-690.
- 325
- 326 [11] Kol A, Nelson RW, Gosselin RC, Borjesson DL. Characterization of
327 thromboelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. *Vet J*.
328 2013;197(3):675-681.
- 329
- 330 [12] Romão FG, Campos EF, Mattoso CR, Takahira RK. Hemostatic profile and
331 thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized
332 controlled trial. *BMC Vet Res*. 2013;9:268.
- 333
- 334 [13] Woolcock AD, Keenan A, Cheung C, Christian JA, Moore GE.
335 Thrombocytosis in 715 Dogs (2011–2015). *J Vet Intern Med*. 2017;31(6):1691-
336 1699.
- 337
- 338 [14] Park FM, Blois SL, Abrams-Ogg AC, Wood RD, Allen DG, Nykamp SG,
339 Downie A. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in
340 dogs. *J Vet Intern Med*. 2013;27(5):1136-1142.
- 341

342 [15] Dengate AL, Morel-Kopp MC, Beatty JA, Barrs V, Braddock JA, Churcher
343 RK, Wilson BJ, Ward CM. Differentiation between dogs with thrombosis and
344 normal dogs using the overall hemostasis potential assay. *J Vet Emerg Crit Care*.
345 2016;26(3):446-452.

346

347 [16] Turner JS, Kutter APN, Sigrist NE. Correlation of rotational
348 thromboelastometry (ROTEM) parameters with platelet count and their ability to
349 predict thrombocytopenia in dogs. *Res Vet Sci*. 2019;126:45–50.

350

351 [17] Jud Schefer R, Heimgartner L, Stirn M, Sigrist NE. Determination of
352 reference intervals for single vial rotational thromboelastometry (ROTEM)
353 parameters and correlation with plasmatic coagulation times in 49 clinically
354 healthy dogs. *Res Vet Sci*. 2020;129:129-136.

355

356 [18] Serebruany V, McKenzie M, Meister A, Fuzaylov S, Gurbel P, Atar D, Gattis
357 W, O'Connor C. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of
358 platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT Trial). *Eur J*
359 *Heart Fail*. 2002;4(4):461-467.

360

361 [19] Lopes STA, Emanuelli MP, Schmidt C, Raiser AG, Mazzanti A, Alves AS.
362 Reference ranges of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin
363 time (aPTT) in dogs. *Ciênc rural*. 2005;35(2):381-384.

364

365 [20] Pace SL, Creevy KE, Krimer PM, Brainard BM. Assessment of coagulation
366 and potential biochemical markers for hypercoagulability in canine
367 hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med.* 2013;27:1113–1120.

368

369 [21] Rose L, Dunn ME, Bédard C. Effect of canine hyperadrenocorticism on
370 coagulation parameters. *J Vet Intern Med.* 2012;27(1):207-211.

371

372 [22] Nichols R. Complications and concurrent disease associates with canine
373 hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1997;27(2):309-320.

374

375 [23] Bennaim M, Centola S, Ramsey I, Seth M. Clinical and Clinicopathological
376 Features in dogs with uncomplicated spontaneous hyperadrenocorticism
377 diagnosed in primary care practice (2013-2014). *J Am Anim Hosp Assoc.*
378 2019;55(4):178-186.

379

380 [24] Bennaim M, Shiel RE, Mooney CT. Diagnosis of spontaneous
381 hyperadrenocorticism in dogs. Part 1: pathophysiology, aetiology, clinical and
382 clinicopathological features. *Vet J.* 2019;252.

383

384 [25] Solter PF, Hoffmann WE, Chambers MD, Schaeffer DJ, Kuhlenschmidt MS.
385 Hepatic total 3 alpha-hydroxy bile acids concentration and enzyme activities in
386 prednisone-treated dogs. *Am J Vet Res.* 1994;55(8):1086-1092.

387

- 388 [26] Abdou OA, Kelany WM, Torad FA, Yehia SG. Ultrasonographic, morphologic
389 and biochemical alterations in experimentally induced steroid hepatopathy in
390 dogs. *Global Vet.* 2013;11:123-130.
391
- 392 [27] Gilor C, Graves TK. Interpretation of laboratory test for canine Cushing's
393 syndrome. *Top Companion Anim Med.* 2011;26(2):98-108.
394
- 395 [28] Coelho MCA, Santos CV, Vieira Neto L, Gadelha MR. Adverse effects of
396 glucocorticoids: coagulopathy. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(4):M11-211.
397
- 398 [29] Song J, Drobatz KJ, Silverstein DC. Retrospective evaluation of shortened
399 prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of
400 hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006–2011). *J Vet Emerg Crit Care.*
401 2016;26(3):398-405.
402
- 403 [30] Barthélemy A, Magnin M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard
404 M, Goy-Thollot I. Hemorrhagic, hemostatic, and thromboelastometric disorders in
405 35 dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis: a prospective study. *J Vet Intern*
406 *Med.* 2017;31(1):69-80.
407
- 408 [31] Witek P, Zieliński G, Szamotulska K, Witek J, Kamiński G. Cushing's
409 disease: Fibrinogen and D-dimer levels fail to normalise despite early
410 postoperative remission — a prospective, controlled study. *Endokrynol Pol.*
411 2016;67(3):283-291.
412

- 413 [32] Lominadze D, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM. Mechanisms of fibrinogen-
414 induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. *Acta Physiol.*
415 2010;198(1):1-13.
416
- 417 [33] Barrie J, Watson TDG, Stear MJ, Nash AS. Plasma cholesterol and
418 lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and
419 endocrine disease. *J Small Anim Pract.* 1993;34:507–512
420
- 421 [34] Hess RS, Kass PH, Van Winkle TJ. Association between diabetes mellitus,
422 hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in Dogs. *J Vet*
423 *Intern Med.* 2003;17(4):489-494.
424
- 425 [35] Smets PMY, Lefebvre HP, Kooistra HS, Meyer E, Croubels S, Maddens BEJ,
426 Vandenabeele S, Saunders JH, Daminet S. Hypercortisolism affects glomerular
427 and tubular function in dogs. *Vet J.* 2012;192(3):532-534.
428
- 429 [36] Cavalcante CZ, Kogika MM, Bacic A, Santoro ML, Miyashiro SI, Sault JP,
430 Oyafuso MK, Simões DMN. Avaliação da albuminúria e da eletroforese de
431 proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a
432 pressão arterial sistêmica. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(11):1357-1363.
433
- 434 [37] Caragelasco DS, Kogika MM, Martorelli CR, Kanayama KK, Simões DMN.
435 Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent
436 hyperadrenocorticism during therapy with trilostano. *Pesq Vet Bras*
437 2017;37(7):734-740.

438

439 [38] Flint SK, Abrams-Ogg ACG, Kruth SA; Bersenas AM, Wood RD.
440 Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on
441 thromboelastography variables in healthy dogs. *Am J Vet Res.*
442 2011;72(10):1325-1332.

443

444 [39] Chakrabarti R, Fearnley GR, Hocking ED. Effect of corticosteroid therapy on
445 fibrinolysis in patients with inflammatory and non-inflammatory conditions. *Br*
446 *Med J.* 1964;29:534–537.

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463 **TABLES**

464 Table 1. Breed distribution of 19 dogs diagnosed with hyperadrenocorticism

Breed	Number of cases	Percentage (%)
Yorkshire terrier	3/19	15.79
Mongrel	3/19	15.79
French bulldog	2/19	10.52
Lhasa apso	2/19	10.52
Dachshunds	2/19	10.52
Beagle	1/19	5.26
Bichon frisé	1/19	5.26
Fox terrier	1/19	5.26
Maltese	1/19	5.26
Poodle	1/19	5.26
Pug	1/19	5.26
West highland white terrier	1/19	5.26

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

Table 2. Comparison of hematological parameters between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)

	CONTROL (±SD)	HAC (±SD)	p
Red cells (x10 ⁶ /μL)	6.954 (±0.84)	6.842 (±1.17)	0.7057
Hemoglobin (g/dL)	15.92 (±1.68)	15.73 (±2.69)	0.7658
Hematocrit (%)	47.7 (±4.50)	45.47 (±7.60)	0.2119
VCM (fL)	68.76 (±4.11)	67.19 (±5.24)	0.2631
CHCM (%)	33.32 (±0.85)	34.36 (±3.43)	0.6453
Platelets (x10 ³ /μL)	233.7 (±48.88)	400.0 (±147.20)	<0.0001*
Leucocytes (x10 ³ /μL)	11.14 (±3.07)	9.43 (±4.55)	0.1229

* Statistical difference (p<0.05)

HAC: hyperadrenocorticism

Table 3. Comparison of biochemical parameters between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)

	CONTROL (±SD)	HAC (±SD)	p
Urea (mg/dL)	36.63 (±11.28)	48.24 (±31.50)	0,0733
Creatinine (mg/dL)	0.9 (±0.21)	0.95 (±0.51)	0,6410
ALT (IU/L)	44.33 (±19.45)	247.20 (±531.20)	0,0409*
ALP (IU/L)	61.8 (±61.3)	1315.0 (±3261.0)	0.0395*
GGT (IU/L)	3.82 (±1.72)	57.15 (±138.2)	0.0383*
TP (g/dL)	6.78 (±0.85)	7.19 (±0.88)	0,1209
Albumin (g/dL)	3.59 (±0.49)	3.30 (±0.53)	0.0674
Globulin (g/dL)	3.19 (±0.66)	3.90 (±0.84)	0.0027*
Glycose (mg/dL)	85.3 (±10.1)	112.0 (±39.44)	0,0010*
Cholesterol (mg/dL)	217.5 (±86.18)	303.3 (±104.1)	0.0030*
Triglycerides (mg/dL)	96.17 (±83.99)	179.2 (±176.4)	0.0311*
UPC	-	2.56 (±2.21)	

* Statistical difference (p<0.05)

HAC: hyperadrenocorticism

Table 4. Comparison of ROTEM evaluation (INTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)

INTEM	Control (±SD)	HAC (±SD)	p
CT (s)	125.6 (±33.8)	119.7 (±35.7)	0.5729
CFT (s)	190.7 (±67.3)	165.2 (±89.2)	0.2689
α angle (°)	58.6 (±8.6)	63.8 (±11.9)	0.0892
MCF (mm)	54.0 (±9.1)	61.5 (±10.0)	0.0102*
ML (%)	10.6 (±16.3)	7.3 (±12.7)	0.4626

* Statistical difference (p<0.05)

HAC: hyperadrenocorticism

Table 5. Comparison of ROTEM evaluation (EXTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)

EXTEM	Control (±SD)	HAC (±SD)	p
CT (s)	59.0 (±27.7)	37.4 (±24.5)	0.0084*
CFT (s)	217.5 (±94.5)	197.7 (±116.2)	0.5241
α angle (°)	56.6 (±10.6)	59.7 (±12.9)	0.3747
MCF (mm)	54.9 (±9.9)	63.3 (±10.0)	0.0061*
ML (%)	4.2 (±9.1)	1.3 (±3.3)	0.1879

* Statistical difference (p<0.05)

HAC: hyperadrenocorticism

Table 6. Comparison of ROTEM evaluation (FIBTEM®) between healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (n=19)

FIBTEM	Control (± SD)	HAC (± SD)	P
CT (s)	59.2 (±40.0)	33.1 (±15.0)	0.0094*
CFT (s)	-	-	-
α angle (°)	62.9 (±5.5)	72.6 (±5.4)	0.0042*
MCF (mm)	9.6 (±3.2)	18.0 (±13.1)	0.0021*
ML (%)	9.1 (±7.4)	2.4 (±5.0)	0.0012*

* Statistical difference (p<0.05)

HAC: hyperadrenocorticism

574 Table 7. Comparison of platelet aggregation, antithrombin, fibrinogen, D-dimer,
 575 prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) between
 576 healthy individuals (n=30) and dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism
 577 (n=19)

	CONTROL (±SD)	HAC (±SD)	P
Platelet aggregation (Ohms)	7.56 (±3.14)	11.68 (±5.41)	0.0064*
Antithrombin (%)	118.1 (±8.9)	141.8 (±26.3)	<0.0001*
Fibrinogen (mg/dL)	190.6 (±66.9)	392.8 (±118.5)	<0.0001*
D-dimer (µg/mL)	0.8 (±1.0)	0.7 (±0.5)	0.5563
PT (s)	8.52 (±1.42)	7.38 (±0.63)	0.0038*
aPTT (s)	14.81 (±3.08)	11.33 (±2.95)	0.0003*

578 * Statistical difference (p<0.05)

579 HAC: hyperadrenocorticism

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

CAPÍTULO 3

6. TRABALHO CIENTÍFICO 2

DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY

<https://www.elsevier.com/journals/domestic-animal-endocrinology/0739-7240/guide-for-authors>

CLOPIDOGREL BISULFATE AS AN ADJUVANT THERAPY OF
DOGS WITH ACTH-DEPENDENT HYPERADRENOCORTICISM

F.G. Romão^a; B. dos Santos^a; S.E.V. Mora^a; D.S. Gonçalves^a; V. de Marco^b; P.A. Lopes^b; R.K. Takahira^a

a Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu/SP, s/n, Postal code 237, Brazil

Felipe Gazza Romão: fgazza_vet@hotmail.com – +55 14 991957000

Bruna dos Santos: brunasantos.vet@hotmail.com - +55 14 991185692

Silvia Eugenia Vargas Mora: sevm201@gmail.com - +506 88210704

Daniele Silvano Gonçalves: daniellesilvano@gmail.com - +55 31 91693370

Regina Kiomi Takahira: regina.takahira@unesp.br - + 55 14 997797556

b Naya Especialidades Veterinárias, São Paulo/SP, Zip code 04608-003, Brazil

Viviani de Marco: vivianidemarco@gmail.com - +55 11 999104224

Priscila Assis Lopes: priaslop@hotmail.com - +55 11 960661377

Corresponding author: Felipe Gazza Romão – fgazza_vet@hotmail.com

28 **ABSTRACT**

29 Hyperadrenocorticism (HAC) can lead to a state of hypercoagulability supposedly
30 by increasing activity of procoagulant factors and decreasing that of
31 anticoagulants and fibrinolysis. For the past few years, clinicians have
32 implemented antiplatelet agents, such as clopidogrel bisulfate, as an empiric
33 treatment for preventing thromboembolic events. Thus, the objective of this
34 prospective and observational study was to evaluate the effectiveness of
35 clopidogrel for decreasing thromboembolic risk was able to decrease the state of
36 hypercoagulability in ACTH-dependent canine HAC. Eleven dogs were randomly
37 selected to receive trilostane alone (G1) or trilostane plus clopidogrel therapy
38 (G2). Both groups were submitted to the same evaluations before and after
39 treatment: total cell blood count, cholesterol and triglycerides concentration, and
40 a hemostatic profile that included thromboelastometry, platelet aggregation,
41 activated partial thromboplastin time (aPTT), antithrombin, fibrinogen and D
42 dimer levels. We confirmed the presence of typical alterations, such as
43 thrombocytosis and hyperlipidemia, and a higher tendency for thrombotic risk—
44 supported by changes in thromboelastometry, decreased aPTT, and increased
45 fibrinogen levels. Comparisons between treatments showed no statistical
46 evidences of improvement for hypercoagulable state.

47 Keywords: Thrombocytosis; Platelets; Fibrinogen; Antithrombin;
48 Hypercoagulability; Antiplatelet.

49

50 **1. INTRODUCTION**

51 The hemostatic system is composed by platelets, blood vessels, von
52 Willebrand factor, coagulation factors, anticoagulants and fibrinolytic

53 components. Mechanisms involved with its functioning, must sustain a perfect
54 balance to ensure correct blood flow and vascular integrity [1]. The activation of
55 coagulation factors results in fibrin-platelet plug, that remains restricted to the site
56 of injury under normal physiological conditions. Natural anticoagulants (mainly
57 represented by antithrombin, and proteins C and S) act by degrading coagulation
58 factors and avoiding a disseminated coagulation process [2].

59 Disruptions of normal hemostatic mechanisms, such as endothelial injury
60 (caused by infections or deposition of immunocomplexes), vascular stasis (e.g.
61 heart disease, endocardium damage), hypercoagulability and hypofibrinolysis
62 (e.g., hyperadrenocorticism), constitute the principal causes of thrombosis in
63 dogs [3].

64 Hypercoagulability is difficult to identify by conventional hemostatic tests
65 [4], such as prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time
66 (aPTT). Since thrombosis occur due to any combination of increased activity of
67 procoagulant factors, decreased activity of endogenous anticoagulants,
68 decreased fibrinolysis, blood stasis, or endothelial vascular damage, these tests
69 are unlikely to predict the overall thrombotic risk [5].

70 Thromboelastometry (TEM) is a validated test in dogs that allows the
71 detection of patients in a state of hypercoagulability [4], characterized by
72 decreased values of CT and/or CFT, and an increase of the α angle and/or
73 maximum clot firmness [6,7].

74 Hyperadrenocorticism (HAC) is a relatively common endocrine disease in
75 dogs, caused by an excessive chronic secretion of glucocorticoids [8]. A
76 potentially fatal complication of HAC is arterial and venous thromboembolism,
77 supposedly triggered by an increased activity of pro-coagulant factors and

78 fibrinogen concentration [9]. The pathogenesis of this process and its exact
79 incidence is still undefined. Animals treated with trilostane (an enzymatic blocker
80 of esteroidal synthesis), remain in a state of hypercoagulability even after therapy
81 and normalization of cortisol levels [4].

82 Clopidogrel bisulfate is an antiplatelet agent that irreversibly inhibits the
83 P2Y₁₂ platelet receptor, consequently blocking the action of adenosine
84 diphosphate (ADP) [10]. The aim of this study was to evaluate if clopidogrel
85 treatment was able improve hypercoagulable state in animals diagnosed with
86 ACTH-dependent HAC.

87

88 **2. MATERIALS AND METHODS**

89 **2.1 Experimental design**

90 This study was approved by the Ethics Committee on The Use of Animals
91 (protocol no 0163/2018) and a free and informed consent was assigned by the
92 patient's owners. We selected 11 client-owned dogs (7 females, 4 males [Table
93 1]) diagnosed with ACTH-dependent HAC (by low-dose dexamethasone
94 suppression test and endogenous ACTH concentration), from the endocrinology
95 service of two veterinary clinics (Naya Especialidades Veterinárias, São
96 Paulo/SP, and Endocardiovet, Bauru/SP). Animals with comorbidities unrelated
97 to HAC were excluded. Animals were submitted to clinical evaluation and
98 laboratory tests, such as cell blood count, biochemical tests and hemostatic
99 profile parameters (aPTT, antithrombin, fibrinogen, D-dimer, ROTEM and platelet
100 aggregation), and separated into two groups according to the protocol treatment,
101 G1 (trilostane [0.5-1.5 mg/kg/BID PO]), and G2 (trilostane [0.5-1.5 mg/kg/BID PO]
102 plus clopidogrel [2 mg/kg/SID PO]). Both groups were evaluated at the time of

103 diagnosis (M0, by the dexamethasone suppression test and endogenous ACTH)
104 and after normalization of ACTH-stimulated cortisol concentrations (2-6 µg/dL)
105 (M1). The ACTH stimulation tests were performed in all groups at the first re-
106 evaluation, between 4 and 6 hours after the administration of trilostane. This
107 range of post-ACTH cortisol concentrations were considered indicative of proper
108 disease control, in addition to remission of clinical signs.

109 For the control group, we included 30 healthy dogs (12 males and 18
110 females), between the ages of 1 and 9 years (median, 3 years), without morbid
111 antecedents in the past 30 d. With previous clinical evaluation, all animals were
112 submitted to the same laboratory analysis (blood count, biochemical and
113 hemostatic profile).

114

115 *2.2 Blood collection*

116 Blood was collected from the external jugular vein using a EDTA K3
117 anticoagulant 7.5% tube for blood count and a dry tube for biochemical analysis.
118 For hemostatic evaluation, blood was collected into two 3.2% sodium citrate
119 tubes of 1.8 mL at single moment. After collection, samples destined for TEM and
120 platelet aggregation were submitted to analysis within 40 minutes. The poor
121 platelet plasma (PPP) used for the tests of activated partial thromboplastin time
122 (aPTT), antithrombin, fibrinogen and D-dimer were immediately frozen and stored
123 in liquid nitrogen (-196 °C) until analysis.

124

125 *2.3 Laboratorial Analysis*

126 *2.3.1 Hemostasis*

127 *2.3.1.1 Thromboelastometry (TEM)*

Analyses was performed in whole blood within 30-40 minutes after sampling and according to the manufacturer's instructions. Three channels were used simultaneously for measuring INTEM, EXTEM and FIBTEM, each one requiring 300 μ L of citrated blood. The blood was recalcified with 20 μ L of calcium chloride 0.2 M (STAR-TEM®), and coagulation was initiated by adding tissue factor (EXTEM®) and ellagic acid (INTEM®). For FIBTEM® analysis, blood was mixed with 20 μ L of EXTEM reagent and 20 μ L of cytochalasin D solution [11]. Tracings were run at 37°C for 60 minutes.

136

2.3.1.2 Platelet aggregation

Whole blood platelet aggregation was performed in an electric impedance aggregometer (Chrono - Log WBA® - Model 592^a Dual Channel). The sample was kept at room temperature for 30 minutes before analysis. Aggregation was performed according to the protocol using ADP as an agonist [12].

142

2.3.1.3 aPTT

For aPTT analysis, the proceeding was performed by a coagulometer CloTimer (Clot®), according to the guidelines of each commercial kit [13].

146

2.3.1.4 Antithrombin, fibrinogen and D-dimer

Antithrombin, fibrinogen and D-dimer plasma concentrations were determined by an automated Sysmex CA-600 (Siemens Healthcare Diagnostics®) device, according to the guidelines of each commercial kit (Berichrom® Antithrombin III, Dade® Fibrinogen and Innovance® D Dimer, respectively).

153 2.3.2 *Cell blood count*

154 Cell blood count was performed by hematological analyzers (flow cytometry
155 and impedance). Cell morphology and differential leukocyte counts were
156 performed in 100 cells in blood smears stained by Diff-Quick stain (Laborclin®).

157

158 2.3.3 *Serum biochemistry*

159 Cholesterol and triglycerides were measured in an automated
160 biochemistry device (Roche® - Cobas Mira Plus) using commercial kits
161 (Bioclin®).

162

163 2.3.4 *Low dose dexamethasone suppression test*

164 Diagnosis of HAC was confirmed by the low-dose dexamethasone
165 suppression test, in which serum cortisol concentration (baseline, 4h and 8h post-
166 dexamethasone) was obtained by radioimmunoassay method, using commercial
167 kits (Coat - A Count, Siemens®). The collection was performed according to a
168 predetermined protocol [14]. Animals with baseline cortisol levels of > 4.0 µg/dL,
169 and post dexamethasone (4 and 8 h) levels of > 0.9 µg/dL, were considered
170 positive.

171

172 2.3.5 *Statistical analysis*

173 Statistical analysis was performed by statistical software (SAS Studio, Inc).
174 Estimation of the sample size (n) was calculated at an 80% statistical power. The
175 data were analyzed for normality by observing the sample distribution in quantile-
176 quantile graphs and examination of the residuals were performed. A general
177 linear mixed model including time and group as fixed effects, and dog as a

random effect, was used to determine if the parameters of interest changed over time or between groups. Repeated measures made over time on the same animal were accounted for by fitting different autocorrelation structures. Posthoc tests were performed when the global testing indicated differences between groups or time points, and were adjusted by Tukey's method. Level of significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Regarding hematological evaluation, our study showed a significant difference only for the platelet count in M0 (Table 2). We observed mild to moderate thrombocytosis, probably due to bone marrow stimulation and/or decreased destruction effects of cortisol [4,15]. Constant exposure to hypercortisolemia gives rise to multisystemic disorders that result in alterations of routine laboratory tests [16]. Results showed no statistical difference between M0 and M1 for both groups (G1 and G2). This was expected since previous studies with healthy dogs have shown no significant changes in hematocrit or platelet counts after clopidogrel administration [17]; hematological alterations in patients with HAC have also remained after normalization of cortisol levels [4,9,18].

Thromboembolic mechanisms were characterized by some authors according to the triad of Virchow, which includes endothelial dysfunction, hypercoagulability and stasis [2]. We confirmed the presence of hypercoagulability in dogs with HAC, mainly represented by a decrease in CT (EXTEM assay) and CFT parameters (FIBTEM assay), and an increase of α angle and MCF in the FIBTEM pathway (Table 3). These alterations suggest a

203 faster formation of fibrin polymer and a more resistant clot. So far, none of these
204 patients has developed a clinical thromboembolic event.

205 We also observed a decreased aPTT when compared to the control group.
206 Although this parameter lacks significance for diagnosing hypercoagulability;
207 some studies have shown a relationship between shortened aPTT with clinical
208 manifestations of thrombosis [19]. The aPTT values returned to normal after
209 regularizing cortisol levels in both groups. Some authors have proposed factor
210 VIII as the main procoagulant factor undergoing changes in cases of
211 hypercortisolism [1]. Therefore, although we omitted the quantification of this
212 factor, we can assume that resolution of hypercortisolism may have led to a
213 regularization of factor VIII, and hence of aPTT.

214 Treatment with trilostane, whether or not associated with clopidogrel,
215 presented no signs of improvement for thromboelastometric alterations (Table 3).
216 Another study showed how thromboelastography (TEG) tracings remained
217 unaltered after clopidogrel treatment in healthy dogs [20]; this could be explained
218 by a ROTEM's lack of sensitivity to assess antiplatelet effects, as proposed in
219 previous studies that evaluated hemostatic effects of NSAIDs [21]. Treatment
220 with trilostane alone, has also proven to be ineffective in stabilizing TEG tracings
221 [9]; which suggests a persistent glucocorticoid systemic effect, or even individual
222 sensitivity, as suggested by another study [22].

223 We also detected increased fibrinogen levels (Table 3), that in conjunction
224 with the ML's increase, suggest a secondary fibrinolysis [2]. The FIBTEM assay
225 qualitatively evaluates fibrinogen by the action of cytochalasin D, which
226 irreversibly inhibits platelet function [23], and justifies the importance of fibrinogen
227 in hemostasis, by enabling cross-linking of adjacent activated platelets [18]. Our

228 study observed higher platelet aggregation in dogs with HAC when compared to
229 control group (Table 3), probably due to hyperfibrinogenemia, which alters
230 plasma viscosity, erythrocyte aggregation, vascular reactivity, and also impairs
231 endothelial cell layer integrity by binding to its endothelial cell membrane
232 receptors and activating signalling mechanisms [24].

233 Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation underwent
234 significant reduction after trilostane and clopidogrel treatment (table 2), which can
235 be explained by the mechanism of action of clopidogrel, which involves
236 irreversible inhibition of platelet receptor P2Y₁₂ of adenosine diphosphate (ADP)
237 [10]. It is important to note that some of the animals presented an absent
238 response to ADP, probably due to variations of the P2Y₁₂ receptor, that
239 diminishes its activity. Similar responses were seen in humans with
240 polymorphisms of this receptor [10,20]. These individual characteristics and the
241 fact that the receptor serves as clopidogrel's site of action; led us to the
242 presumption that polymorphism of ADP receptors can interfere in clopidogrel
243 treatment as well, explaining the lack of response seen in some of the animals.

244 This study revealed different sensitivity for platelet aggregation and
245 thromboelastometry methods in assessing antiplatelet effects of clopidogrel
246 treatment. We observed a platelet hypofunction in ADP-induced aggregation after
247 clopidogrel therapy, though, incompatible with thromboelastometric changes.
248 Other researchers suggest that thrombin formation during conventional ROTEM
249 procedure causes significant platelet activation via thrombin formation, masking
250 any in vivo platelet inhibition by less potent platelet activators [21].

251 Hemostatic profile (antithrombin, fibrinogen and D-dimers) showed no
252 significant differences in neither of the groups (G1 and G2) nor moments (M0 and

253 M1) (table 2). Human patients showed higher fibrinogen and D-dimer levels at
254 six-month remission period for Cushing's syndrome, even though their cortisol
255 levels were normalized [18]. This reinforces the idea of a persistent
256 hypercoagulable tendency in dogs and the need for an effective long-term
257 anticoagulant therapy and evaluation.

258 Animals with HAC presented hypercholesterolemia and
259 hypertriglyceridemia, alterations that could predispose to thromboembolism and
260 that should be corrected by the clinician, since obesity, dyslipidemia, insulin
261 resistance and proteinuria are considered inflammatory conditions that result in
262 increased thrombotic risk [2,25]. Several researchers recognize hyperlipidemia
263 as one of the principal causes of atherosclerosis, and consequent formation of
264 thrombi. In HAC, studies have proposed increase of LDL cholesterol (associated
265 with cholestasis and cellular liver disease) as the main cause for
266 hypercholesterolemia [26,27]. Treatment with trilostane improved cholesterol
267 levels as described in previous studies [28,29]. Decrease of cortisol levels
268 produces a higher activation of lipoprotein-lipase and lower activation of hormone
269 sensitive lipase.

270 For all that said, we can infer that hypercoagulable tendency remains even
271 after normalization of cortisol levels and prophylactic clopidogrel treatment,
272 consistent with other studies; this corroborates the findings of other studies in
273 dogs and humans, what could be justified by an important role of a persistent
274 endothelial dysfunction or abdominal obesity in human beings in the persistence
275 of the hypercoagulable state [4,30,31]. Our study corroborated the need of an
276 effective anticoagulant therapy and monitoring in dogs with ACTH-dependent
277 HAC.

278 Further studies are needed to evaluate other anticoagulants treatments,
279 such as rivaroxaban, which was already suggested by some authors in cases of
280 possible venous thromboembolism [32]. Herbal medicines, such as compounds
281 of *ginkgo biloba*, could also be evaluated in view of their antiplatelet effects in
282 humans [33].

283

284 CONCLUSIONS

285 Clopidogrel bisulfate in association with trilostane treatment showed
286 inefficacy in improving hypercoagulable laboratorial alterations associated with
287 ACTH-dependent canine HAC, at least on thromboelastometric evaluation,
288 although apparently it has decreased platelet aggregation.

289

290 ACKNOWLEDGMENTS

291 This research received grant from FAPESP (Fundação de Amparo à
292 Pesquisa do Estado de São Paulo) [grant number 2018/16767-2], a funding
293 agency in public sectors.

294

295 Conflicts of interest: There are no conflicts of interest for any of the authors.

296

297 REFERENCES

298 [1] Isidori AM, Minnetti M, Sbardella E, Graziadio C, Grossman AB. Mechanisms
299 in Endocrinology: The spectrum of haemostatic abnormalities in glucocorticoid
300 excess and defect. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(3):R101-113.

301

- 302 [2] Coelho MCA, Santos CV, Vieira Neto L, Gadelha MR. Adverse effects of
303 glucocorticoids: coagulopathy. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(4):M11-211.
304
- 305 [3] Teshima T, Hara Y, Taoda T, Koyama H, Takahashi K, Nezu Y, Harada Y,
306 Yogo T, Nishida K, Osamura RY, Teramoto A, Tagawa M. Cushing's disease
307 complicated with thrombosis in a dog. *J Vet Med Sci*. 2008;70(5):487-491.
308
- 309 [4] Park FM, Blois SL, Abrams-Ogg AC, Wood RD, Allen DG, Nykamp SG,
310 Downie A. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in
311 dogs. *J Vet Intern Med*. 2013;27(5):1136-1142.
312
- 313 [5] Dengate AL, Morel-Kopp MC, Beatty JA, Barrs V, Braddock JA, Churcher RK,
314 Wilson BJ, Ward CM. Differentiation between dogs with thrombosis and normal
315 dogs using the overall hemostasis potential assay. *J Vet Emerg Crit Care*.
316 2016;26(3):446-452.
317
- 318 [6] Müller MC, Meijers JCM, Vroom MB, Juffermans NP. Utility of
319 thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a
320 systematic review. *Crit Care*. 2014;18(1):R30.
321
- 322 [7] Gonçalves DS, Geraldes SS, Duarte RCF, Carvalho MG, Guimarães-
323 Okamoto PTC, Takahira RK. Thrombin generation and thromboelastometry tests
324 in dogs with chronic kidney disease. *Pesq Vet Bras*. 2020;40(2).
325

326 [8] Woolcock AD, Bugbee AC, Creevy KE. Evaluation of baseline cortisol
327 concentration to monitor efficacy of twice-daily administration of trilostane to dogs
328 with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 22 cases (2008-2012). *J Am Vet*
329 *Med Assoc.* 2016;248(7):814-821.

330

331 [9] Kol A, Nelson RW, Gosselin RC, Borjesson DL. Characterization of
332 thromboelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. *Vet J*
333 2013;197(3):675-681.

334

335 [10] Saati S, Abrams-Ogg ACG, Blois SL, Wood RD. Comparison of multiplate,
336 platelet function Analyzer-200, and plateletworks in healthy dogs treated with
337 aspirin and clopidogrel. *J Vet Intern Med.* 2018;32(1):111-118.

338

339 [11] Jud Schefer R, Heimgartner L, Stirn M, Sigrist NE. Determination of
340 reference intervals for single vial rotational thromboelastometry (ROTEM)
341 parameters and correlation with plasmatic coagulation times in 49 clinically
342 healthy dogs. *Res Vet Sci.* 2020;129:129-136.

343

344 [12] Serebruany V, McKenzie M, Meister A, Fuzaylov S, Gurbel P, Atar D, Gattis
345 W, O'Connor C. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of
346 platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT Trial). *Eur J*
347 *Heart Fail.* 2002;4(4):461-467.

348

- 349 [13] Lopes STA, Emanuelli MP, Schmidt C, Raiser AG, Mazzanti A, Alves AS.
350 Reference ranges of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin
351 time (aPTT) in dogs. *Ciênc rural*. 2005;35(2):381-384.
352
- 353 [14] Bennaim M, Shiel RE, Forde C, Mooney CT. Evaluation of individual low-
354 dose dexamethasone suppression test patterns in naturally occurring
355 hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med*. 2018;32:967–977.
356
- 357 [15] Romão FG, Campos EF, Mattoso CR, Takahira RK. Hemostatic profile and
358 thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized
359 controlled trial. *BMC Vet Res*. 2013;9:268.
360
- 361 [16] Nichols R. Complications and concurrent disease associates with canine
362 hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1997;27(2):309-320.
363
- 364 [17] Whittemore JC, Mooney AP, Price JM, Thomason J. Clinical,
365 clinicopathologic, and gastrointestinal changes from administration of clopidogrel,
366 prednisone, or combination in healthy dogs: A double-blind randomized trial. *J*
367 *Vet Intern Med*. 2019;33(6):2618-2627.
368
- 369 [18] Witek P, Zieliński G, Szamotulska K, Witek J, Kamiński G. Cushing's
370 disease: Fibrinogen and D-dimer levels fail to normalise despite early
371 postoperative remission — a prospective, controlled study. *Endokrynol Pol*.
372 2016;67(3):283-291.
373

374 [19] Song J, Drobatz KJ, Silverstein DC. Retrospective evaluation of shortened
375 prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of
376 hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006–2011). *J Vet Emerg Crit Care*.
377 2016;26(3):398-405.

378

379 [20] Brainard BM, Kleine SA, Papich MG, Budsberg SC. Pharmacodynamic and
380 pharmacokinetic evaluation of clopidogrel and the carboxylic acid metabolite SR
381 26334 in healthy dogs. *Am J Vet Res*. 2010;71(7):822-830

382

383 [21] Zanuzzo FS, Teixeira-Neto FJ, Thomazini CM, Takahira RK, Conner B, Diniz
384 MJ. Effects of dipyrrone, meloxicam, or the combination on hemostasis in
385 conscious dogs. *J Vet Emerg Crit Care*. 2015;25(4):512-520.

386

387 [22] Boretti FS, Holzthüm J, Reusch CE, Sieber-Ruckstuhl NS. Lack of
388 association between clinical signs and laboratory parameters in dogs with
389 hyperadrenocorticism before and during trilostane treatment. *Schweiz Arch*
390 *Tierheilkd*. 2016;158(9):631-638.

391

392 [23] Barthélemy A, Magnin M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard
393 M, Goy-Thollot I. Hemorrhagic, hemostatic, and thromboelastometric disorders in
394 35 dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis: a prospective study. *J Vet Intern*
395 *Med*. 2017;31(1):69-80.

396

397 [24] Lominadze D, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM. Mechanisms of fibrinogen-
398 induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. *Acta Physiol.*
399 2010;198(1):1-13.

400

401 [25] Pace SL, Creevy KE, Krimer PM, Brainard BM. Assessment of coagulation
402 and potential biochemical markers for hypercoagulability in canine
403 hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med.* 2013;27:1113–1120.

404

405 [26] Barrie J, Watson TDG, Stear MJ, Nash AS. Plasma cholesterol and
406 lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender and
407 endocrine disease. *J Small Anim Pract.* 1993;34:507–512

408

409 [27] Hess RS, Kass PH, Van Winkle TJ. Association between diabetes mellitus,
410 hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in Dogs. *J Vet*
411 *Intern Med.* 2003;17(4):489-494.

412

413 [28] Lemetayer J, Blois S. Update on the use of trilostane in dogs. *Can Vet J.*
414 2018;59:397–407

415

416 [29] Martins FSM, Carvalho GLC, Jesus L, Pöppel AG, González FHD.
417 Epidemiological, clinical, and laboratory aspects in a case series of canine
418 hyperadrenocorticism: 115 cases (2010-2014). *Pesq Vet Bras.* 2019;39(11):900-
419 908.

420

421 [30] Manetti L, Bogazzi F, Giovannetti C, Raffaelli V, Genovesi M, Pellegrini G,
422 Ruocco L, Iannelli A, Martino E. Changes in coagulation indexes and occurrence
423 of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: Results from
424 a prospective study before and after surgery. *Eur J Endocrinol*. 2010;163:783–
425 791.

426

427 [31] van der Pas R, de Bruin C, Leebeek FW, de Maat MPM, Rijken DC, Pereira
428 AM, Romijn AJ, Netea-Maier RT, Hermus AR, Zelissen PMJ, de Jong FH, van
429 der Lely AJ, de Herder WW, Lamberts SWJ, Hofland LJ, Feelders RA. The
430 hypercoagulable state in Cushing's disease is associated with increased levels
431 of procoagulant factors and impaired fibrinolysis, but is not reversible after short-
432 term biochemical remission induced by medical therapy. *J Clin Endocrinol Metab*.
433 2012;97:1303–1310.

434

435 [32] Goggs R, Blais MC, Brainard BM, Chan DL, deLaforcade AM, Rozanski E,
436 Sharp CR. American College of Veterinary Emergency and Critical Care
437 (ACVECC) consensus on the rational use of Antithrombotics in veterinary critical
438 care (CURATIVE) guidelines: Small animal. *J Vet Emerg Crit Care*. 2019;29:12–
439 36.

440

441 [33] Cui J, Hu L, Shi W, Cui G, Zhang X, Zhang Q. Design, Synthesis and Anti-
442 Platelet Aggregation Activity Study of Ginkgolide-1,2,3-triazole Derivatives.
443 *Molecules*. 2019;24(11).

444

445

446

447 **TABLES**

448 Table 1. Breed distribution of 11 dogs diagnosed with hyperadrenocorticism

Breed	Number of cases	Percentage (%)
Yorkshire terrier	2/11	18.18
Mongrel	1/11	9.09
French bulldog	1/11	9.09
Lhasa apso	1/11	9.09
Dachshund	1/11	9.09
Beagle	1/11	9.09
Bichon frisé	1/11	9.09
Fox terrier	1/11	9.09
Pug	1/11	9.09
West highland white terrier	1/11	9.09

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

Table 2. Comparison [mean $\pm$ SD] of hematological and hemostatic parameters between control group (n=30), G1 (n=6) and G2 (n=5) on two moments (M0 and M1)

	G1M0	G1M1	G2M0	G2M1	Control
Platelet aggregation (Ohms)	10.1 ($\pm$ 5.7)	10.3 ($\pm$ 3.8)	8.8 ($\pm$ 5.5)	3.1 ($\pm$ 6.3)	7.6 ($\pm$ 3.1)
Platelet count ($10^3/\mu\text{L}$)	423.7* ($\pm$ 164.6)	380.5 ($\pm$ 84.3)	360.6* ($\pm$ 124.4)	449.6 ($\pm$ 170.4)	233.7 ($\pm$ 48.9)
Cholesterol (mg/dL)	260.7 ($\pm$ 30.2)	200.7 ($\pm$ 54.9)	283.6 ($\pm$ 94.9)	233.0 ($\pm$ 136.8)	217.5 ($\pm$ 86.2)
Triglycerides (mg/dL)	277.7* ($\pm$ 278.1)	205.5 ($\pm$ 164.2)	105.2 ($\pm$ 49.1)	97.4 ($\pm$ 48.4)	96.2 ($\pm$ 84.0)
Antithrombin (%)	137.6 ($\pm$ 11.1)	145.5 ($\pm$ 13.4)	134.7 ($\pm$ 19.6)	148.4 ($\pm$ 28.8)	126.9 ($\pm$ 48.9)
Fibrinogen (mg/dL)	461.7* ($\pm$ 123.8)	355.7 ($\pm$ 125.0)	328.0* ($\pm$ 95.4)	297.8 ($\pm$ 33.9)	188.9 ($\pm$ 66.3)
D Dimer	0.8 ($\pm$ 0.7)	0.7 ($\pm$ 0.6)	0.6 ($\pm$ 0.5)	0.6 ($\pm$ 0.4)	0.8 ($\pm$ 1.0)
aPTT (s)	10.0* ($\pm$ 1.3)	15.2 ($\pm$ 5.1)	10.3* ($\pm$ 2.7)	12.4 ($\pm$ 2.1)	14.81 ($\pm$ 3.81)

* Indicates a significant difference to the control group (P < 0.05)

Table 3. Comparison [mean $\pm$ SD] of ROTEM parameters between control group (n=30), G1 (n=6) and G2 (n=5) on two moments (M0 and M1)

	G1M0	G1M1	G2M0	G2M1	Control
INTEM					
CT (s)	103.5 ($\pm$ 27.4)	83.3 ($\pm$ 32.8)	99.4 ($\pm$ 27.5)	98.0 ($\pm$ 18.8)	125.6 ($\pm$ 33.8)
CFT (s)	187.8 ($\pm$ 87.3)	141.0 ($\pm$ 68.6)	154.6 ($\pm$ 27.0)	140.4 ($\pm$ 78.1)	190.7 ($\pm$ 67.3)
α angle ($^{\circ}$)	62.0 ($\pm$ 13.0)	67.0 ($\pm$ 10.0)	65.0 ($\pm$ 3.7)	63.4 ($\pm$ 63.4)	58.6 ($\pm$ 8.6)
MCF (mm)	62.5 ($\pm$ 9.5)	63.3 ($\pm$ 5.2)	58.2 ($\pm$ 6.9)	57.6 ($\pm$ 7.4)	54.0 ($\pm$ 9.1)
ML (%)	2.7 ($\pm$ 4.3)	0.2 ($\pm$ 0.4)	4.2 ($\pm$ 8.3)	9.4 ($\pm$ 8.7)	10.6 ($\pm$ 16.3)
EXTEM					
CT (s)	45.0 ($\pm$ 31.1)	28.3 ($\pm$ 13.8)	24.6* ($\pm$ 9.7)	39.8 ($\pm$ 14.9)	59.0 ($\pm$ 27.7)
CFT (s)	200.5 ($\pm$ 84.3)	157.2 ($\pm$ 78.3)	202.0 ($\pm$ 13.3)	160.2 ($\pm$ 84.8)	217.5 ($\pm$ 94.5)
α angle ($^{\circ}$)	61.0 ($\pm$ 8.5)	63.8 ($\pm$ 10.9)	55.4 ($\pm$ 4.4)	63.2 ($\pm$ 12.3)	56.6 ($\pm$ 10.6)
MCF (mm)	64.3 ($\pm$ 9.0)	65.0 ($\pm$ 7.0)	60.4 ($\pm$ 6.0)	58.2 ($\pm$ 9.1)	54.9 ($\pm$ 9.9)
ML (%)	0.0 ($\pm$ 0.0)	0.0 ($\pm$ 0.0)	0.2 ($\pm$ 0.4)	2.0 ($\pm$ 3.1)	4.2 ($\pm$ 9.1)
FIBTEM					
CT (s)	34.8 ($\pm$ 9.6)	29.2 ($\pm$ 9.7)	21.4 ($\pm$ 7.8)	43.8 ($\pm$ 18.2)	59.2 ($\pm$ 40.0)
CFT (s)	-	-	-	-	-
α angle ($^{\circ}$)	73.5* ($\pm$ 0.7)	74.7 ($\pm$ 3.5)	65.5 ($\pm$ 2.1)	63.3 ($\pm$ 2.3)	62.9 ($\pm$ 5.5)
MCF (mm)	24.8* ($\pm$ 19.0)	14.5 ($\pm$ 3.4)	12.0 ($\pm$ 3.2)	11.0 ($\pm$ 3.0)	9.6 ($\pm$ 3.2)
ML (%)	0.5* ($\pm$ 0.5)	2.8 ($\pm$ 3.7)	0.4* ($\pm$ 0.9)	3.6 ($\pm$ 3.8)	9.1 ($\pm$ 7.4)

* Indicates a significant difference to the control group ($P < 0.05$).

7. DISCUSSÃO GERAL

Não existem trabalhos na literatura que realizaram estudo tão completo, com tantos parâmetros hematológicos, bioquímicos e hemostáticos, relacionados à comparação de cães saudáveis e com hiperadrenocorticismismo hipófise-dependente, e que avaliem a ação do bissulfato de clopidogrel como agente antiagregação plaquetária nestes pacientes.

Dentro da avaliação hematológica, quando comparados animais do grupo controle e cães com HAC ACTH-dependente, houve diferença estatística na contagem plaquetária, provavelmente em decorrência de estímulo medular e diminuição da remoção ou destruição, já que outros estudos sugerem essas ações decorrentes do hipercortisolismo endógeno ou exógeno (PARK et al., 2013; ROMÃO et al., 2013). Outros trabalhos reportaram trombocitose em 75-80% dos casos (LOPES et al., 2005; PACE et al., 2013); porém, o intervalo de referência utilizado foi menor em comparação ao do presente estudo ($160-430 \times 10^3/\mu\text{L}$). A exposição constante à hipercortisolemia produz efeitos multissistêmicos que ocasionam diferentes alterações nos exames laboratoriais de rotina (ROSE; DUNN; BÉDARD, 2013). Dentro das alterações hematológicas mais frequentes, observam-se a eritrocitose e trombocitose, além do leucograma de estresse (NICHOLS, 1997; BENNAIM et al., 2019), o qual não foi observado em nenhum dos animais.

O tratamento com trilostano, associado ou não ao clopidogrel, não ocasionou diferenças entre M0 e M1 em ambos os grupos (G1 e G2), tendo em vista que a administração de clopidogrel em cães sadios não resultou em mudanças no hematócrito ou contagem plaquetária em outro estudo (WHITTEMORE et al., 2019) e que seres humanos e cães com HAC, mesmo após tratamento e normalização dos níveis de cortisol, permaneceram com diversas alterações hematológicas (KOL et al., 2013; PARK et al., 2013; WITEK et al., 2016). Nem o trilostano e tampouco o clopidogrel atuam diretamente sobre a produção, destruição ou consumo de plaquetas.

Na bioquímica sérica, uma das alterações mais comuns é o incremento de FA e ALT, consequências do aumento da isoenzima induzida pelo cortisol e da hepatopatia vacuolar secundários ao hipercortisolismo, respectivamente (BENNAIM et al., 2019). Embora essa indução não ocorra na GGT, estudos mostraram um incremento de sua atividade hepática e sérica em cães tratados

com glicocorticoides, provavelmente pelo estímulo do sistema microsomal dos hepatócitos (SOLTER et al., 1994; BENNAIM; SHIEL; MOONEY, 2019). No HAC, o incremento de GGT é menos frequente e severo em comparação à FA (ABDOU et al., 2013). No entanto, os dados analisados mostraram que mais de dois terços dos cães apresentaram aumento da atividade sérica de GGT e de FA. Inclusive, alguns animais tiveram aumento de GGT com níveis normais de FA, possivelmente associada à presença de colestase nos canalículos biliares.

Os mecanismos envolvidos em complicações tromboembólicas nos casos de hipercortisolismo, tanto endógeno como exógeno, estão agrupados na tríade de Virchow, que consiste em disfunção endotelial, hipercoagulabilidade e estase. O estado de hipercoagulabilidade foi demonstrado no traçado da TEM dos cães com HAC em nosso estudo e representado pela diminuição de CT e CFT, aumento do MCF, assim como distúrbios na fibrinólise, demonstrados eventualmente pela diminuição dos índices de LM, bem como no aumento do fibrinogênio (GILOR; GRAVES, 2011). Todavia, nenhum dos pacientes apresentou qualquer evento clínico trombótico. Além disso, foram observados em nosso estudo valores menores de TP e TTPa comparados ao grupo controle, o que pode também sugerir um estado de hipercoagulabilidade devido ao aumento de diversos fatores das vias intrínseca e extrínseca em casos de HAC (SONG; DROBATZ; SILVERSTEIN, 2016). Os animais tratados apresentaram normalização do TTPa, o que pode ser explicado pela diminuição gradativa dos níveis do fator VIII após normalização dos níveis de glicocorticoides. É afirmado por determinados autores que o fator VIII é um dos principais fatores pró-coagulantes que sofre alteração em casos de hipercortisolismo (ISIDORI et al., 2015), embora não possamos comprovar categoricamente essa informação em nosso estudo, já que não quantificamos este fator.

Não foram observadas alterações tromboelastométricas nos cães tratados após normalização dos níveis de cortisol pós-ACTH, apesar da hipofunção plaquetária observada após tratamento com trilostano associado ao clopidogrel. Em outro estudo, o clopidogrel não alterou as características dos traçados da tromboelastografia em cães saudáveis (BRAINARD et al., 2010), o que pode ser explicado pela menor sensibilidade da TEM para detecção de quadros de hipofunção plaquetária (ZANUZZO et al., 2015). Outro estudo também não detectou alterações na tromboelastografia após tratamento com trilostano e

remissão dos sinais clínicos em animais com hiperadrenocorticismo (KOL et al., 2013), o que poderia sugerir um possível efeito prolongado sistêmico dos glicocorticoides, ou até mesmo sensibilidade individual dos pacientes, conforme sugerido por outro estudo (BORETTI et al., 2016).

Os animais com HAC apresentaram redução do CT, CFT e da LM no FIBTEM, e aumento do MCF no INTEM, EXTEM e FIBTEM (figura 2), demonstrando formação mais rápida do polímero de fibrina, e um coágulo mais firme. O FIBTEM permite a avaliação qualitativa do fibrinogênio pela atuação da citocalasina D, que inibe irreversivelmente a função plaquetária (COELHO et al., 2015), tendo permitido verificar a importância do papel do fibrinogênio na condição de hipercoagulação dos pacientes com hiperadrenocorticismo. Tal evidência foi confirmada em nosso estudo pela hiperfibrinogenemia observada nos animais com HAC ACTH-dependente, em decorrência do processo inflamatório sistêmico.

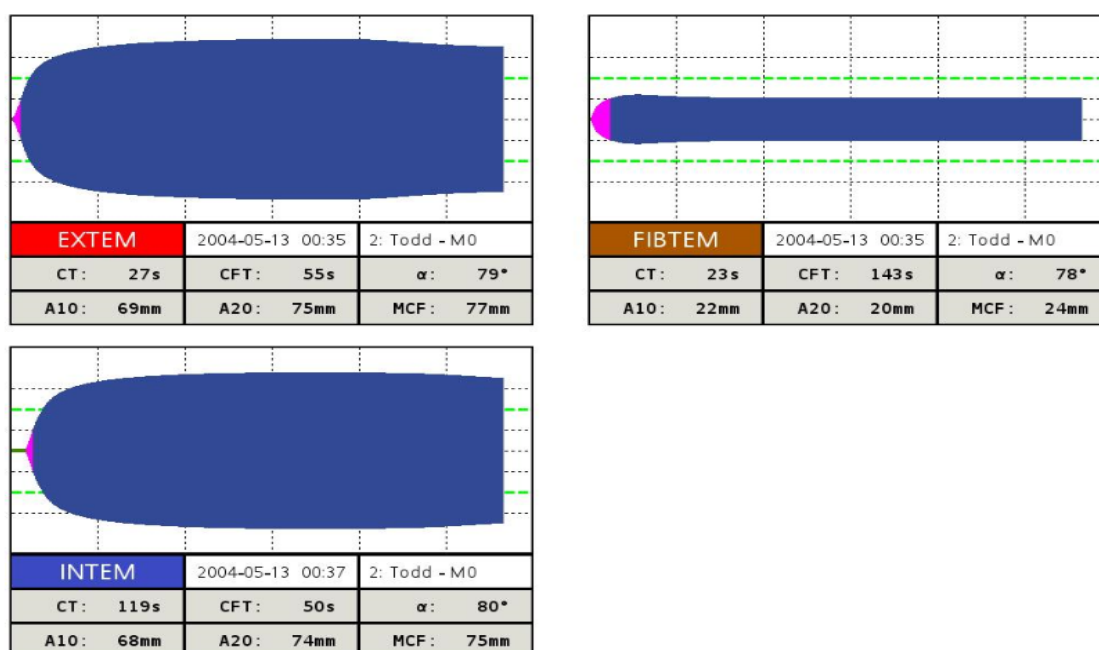


FIGURA 2. Gráfico obtido na tromboelastometria rotacional (ROTEM), avaliando EXTEM, INTEM e FIBTEM, de animal com HAC, com perfil característico de estado de hipercoagulabilidade. (Arquivo pessoal).

A maioria dos cães com hiperadrenocorticismo (11/19; 57.9%) apresentaram maior agregação plaquetária (figura 3), o que pode ser

consequência também da hiperfibrinogenemia, já que o fibrinogênio possui importante papel sobre a agregação plaquetária pela ligação aos receptores GPIIb-IIIa e estímulo à ligação cruzada entre plaquetas ativadas adjacentes, além de alterar a viscosidade plasmática e agregação eritrocitária e reatividade vascular, o que leva a distúrbios na integridade da camada celular endotelial (LOMINADZE et al., 2010; SONG; DROBATZ; SILVERSTEIN, 2016); todavia, não houve diferença estatística na avaliação indireta da agregação plaquetária pela análise do CFT e ângulo alfa no INTEN e EXTEM, o que também poderia ser explicado por uma falta de sensibilidade do ROTEM para avaliação da hipofunção plaquetária, conforme proposto em estudos anteriores que observaram os efeitos hemostáticos de AINEs, como a dipirona e meloxicam (ZANUZZO et al., 2015).

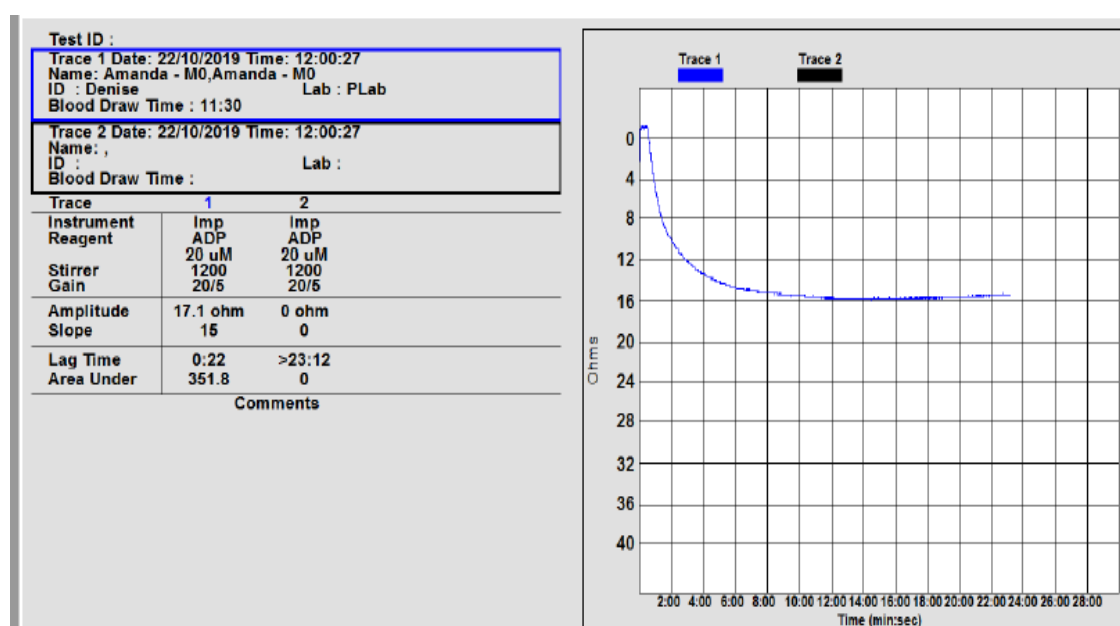


FIGURA 3. Gráfico obtido na agregometria com sangue total, de animal com HAC ACTH-dependente, com perfil característico de estado de hiperfunção plaquetária. (Arquivo pessoal).

A agregação plaquetária induzida pelo ADP sofreu redução significativa após o tratamento com trilostano e clopidogrel em nosso estudo, o que pode ser explicado pelo mecanismo de ação do clopidogrel, que envolve a inibição irreversível do receptor plaquetário P2Y₁₂ da adenosina difosfato (ADP) (SAATI et al., 2018; THOMASON et al., 2020). É importante salientar que alguns animais

apresentaram resposta ausente da agregação plaquetária induzida pelo ADP antes e após o tratamento; alguns autores citam que alguns cães podem ter variações do receptor P2Y₁₂, local de atuação do clopidogrel, e atividade ausente ou menor, semelhante a respostas relatadas em seres humanos com polimorfismos neste receptor (BRAINARD et al., 2010; SAATI et al., 2018). A variação individual nos resultados indica que o clopidogrel terá efeitos variados em diferentes animais, talvez por conta de polimorfismos nos receptores do ADP.

Os animais com HAC apresentaram hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, além de maior relação proteína: creatinina urinária (RPC), fatores que devem ser vistos com atenção e corrigidos pelo clínico a fim de diminuir a tendência à hipercoagulabilidade. Além do importante papel da hiperfibrinogenemia, a obesidade, dislipidemia, resistência insulínica e proteinúria estão relacionadas ao aumento do risco tromboembólico, por serem consideradas condições inflamatórias em pacientes com hiperadrenocorticismismo (LOPES et al., 2005; GILOR; GRAVES, 2011).

Foi observada também hiperlipidemia, consequente do estímulo do cortisol à lipólise, e hiperglicemia causada pelo aumento da resistência insulínica e neoglicogênese hepática (NICHOLS, 1997; BENNAIM et al., 2019). A hiperlipidemia é reconhecida como um dos principais fatores de risco de aterosclerose, condição que predispõe a formação de trombos e que é associada com diversas endocrinopatias, embora considerada incomum em cães (BOYNOSKY; STOKKING, 2014). Acredita-se que o principal mecanismo se deva ao incremento do colesterol LDL, alteração que tem sido associada com o HAC e que pode estar relacionada à presença de colestase e hepatopatia celular (WITEK et al., 2016; BARTHÉLEMY et al., 2017). A prevalência da hiperlipidemia tem sido pouco reportada e difere entre vários autores, oscilando entre 50-80% dos casos (ABDOU et al., 2013).

Os valores de relação proteína:creatinina urinária relatados em pacientes com hiperadrenocorticismismo, embora elevados, sugerem, segundo um estudo, uma combinação de lesões tubular e glomerular, que ocorrem pela presença de proteínas de alto peso molecular e pela hipertensão arterial sistêmica com consequente aumento da permeabilidade glomerular, respectivamente (SMETS et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2013; CARAGELASCO et al., 2017). No entanto, não podemos afirmar categoricamente que a proteinúria ocorre

exclusivamente pela ação do hipercortisolismo, e se ela tem origem glomerular ou tubular, uma vez que nenhum marcador específico foi avaliado para isso e a pressão arterial sistêmica de todos os cães com HEC não foi aferida.

Nosso estudo detectou aumento dos níveis de fibrinogênio em todos os animais do grupo com hiperadrenocorticismismo (19/19), o que pode ser explicado pelos diversos eventos inflamatórios que ocorrem em decorrência do hipercortisolismo, e aumento dos níveis de antitrombina na maioria deles (14/19), o que pode ser explicado como um mecanismo compensatório para a hipercoagulabilidade secundário aos distúrbios inflamatórios e aumento de fatores pró-coagulantes, conforme já observado em outros estudos (KOL et al., 2013; PACE et al., 2013; PARK et al., 2013; COELHO et al. 2015).

Embora alguns estudos sugiram que o hipercortisolismo esteja associado à diminuição da fibrinólise, provavelmente por aumento dos níveis de inibidor de ativador de plasminogênio (PAI) (FLINT; ABRAMS-OGG; KRUTH 2011), não houve diferença na avaliação do dímero-D nem na LM no ROTEM quando aplicado INTEM e EXTEM. Outros autores afirmam que não houve alterações da fibrinólise em pacientes com síndrome de Cushing (GILOR; GRAVES, 2011) ou em seres humanos saudáveis submetidos à terapia com alta dose de dexametasona, embora considerem o tempo de tratamento curto para que causasse determinadas alterações (CHAKRABARTI; FEARNEY; HOCKING, 1964).

A concentração de dímero-D pode sofrer grande variação de acordo com diversas condições fisiológicas e patológicas, como gestação, condições inflamatórias crônicas e neoplasias; níveis normais sugerem ausência de evento trombótico clínico (SONG; DROBATZ; SILVERSTEIN, 2016); portanto, a avaliação deve ser realizada em conjunto com a TEM e exames de imagem. Nenhum animal incluído no grupo de pacientes com HAC apresentou qualquer evento clínico trombótico, e não foram incluídos animais que possuísem comorbidades.

A terapia com trilostano, com ou sem clopidogrel, não levou à normalização das alterações relacionadas aos parâmetros perfil hemostático (antitrombina, fibrinogênio e dímero-D) quando comparados ambos os momentos de avaliação (M0 e M1) em ambos os grupos. Os níveis de fibrinogênio e dímero-D, conforme previamente observado em pacientes

humanos tratados e acompanhados após seis meses de remissão da síndrome de Cushing, se mantiveram em níveis inclusive mais altos do que os observados antes do tratamento, mesmo após normalização dos níveis de cortisol (WITEK et al., 2016), fato que corrobora a necessidade de acompanhamento dos cães com HAC a longo prazo com relação à terapia anticoagulante, e pode estar relacionado a um efeito prolongado sistêmico dos glicocorticoides, com possível disfunção endotelial permanente. Os níveis de antitrombina também não retornaram a níveis normais em outro estudo, mesmo após terapia com trilostano (PARK et al., 2013).

Por todas essas características, é possível inferir que o estado de hipercoagulabilidade permaneceu mesmo após normalização do cortisol pós-terapia em ambos os grupos, pelo menos pela avaliação tromboelastométrica, o que corrobora os achados de outros estudos, em cães e seres humanos, que sugerem que ocorra uma disfunção endotelial persistente que justifique essas alterações, ou que a obesidade abdominal, que sabidamente possui um papel fundamental especialmente em seres humanos, desempenhe um papel importante na persistência do estado de hipercoagulabilidade (MANETTI et al., 2010; VAN DER PAS et al., 2012; PARK et al., 2013). Portanto, é fundamental a utilização e monitoramento de terapia antitrombótica em cães com HAC-ACTH dependente.

Outros estudos devem ser realizados sobre a utilização de anticoagulantes, como o rivaroxaban, como agentes profiláticos de eventos trombóticos em casos de hiperadrenocorticismos ACTH-dependente, considerando que outros autores já sugeriram a utilização do rivaroxaban em detrimento do clopidogrel em casos de possível tromboembolismo venoso (GOGGS et al., 2019). Fitoterápicos, como compostos do *ginkgo biloba*, também poderiam ser avaliados, tendo em vista seus efeitos antiplaquetários em seres humanos (CUI et al., 2019).

8. CONCLUSÕES GERAIS

O hiperadrenocorticismos ACTH-dependente está associado a um estado de hipercoagulabilidade caracterizado por alterações tromboelastométricas. Este estado é ocasionado por hiperfibrinogenemia, em associação com trombocitose, aumento da atividade plaquetária, dislipidemia, hiperglicemia e proteinúria. A

adição do bissulfato de clopidogrel ao tratamento não diminuiu o risco trombótico e manteve os cães com HAC ACTH-dependente em estado de hipercoagulabilidade, pelo menos pela avaliação tromboelastométrica, nas condições deste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, O.A.; KELANY, W.M.; TORAD, F.A.; YEHA, S.G. Ultrasonographic, morphologic and biochemical alterations in experimentally induced steroid hepatopathy in dogs. **Global Veterinaria**, v.11, p.123-130, 2013.

BARTHELÉMY, A.; MAGNIN, M.; POUZOT-NEVORET, C.; BONNET-GARIN, J.M.; HUGONNARD, M.; GOY-THOLLOT, I. Hemorrhagic, hemostatic, and thromboelastometric disorders in 35 dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis: a prospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.31, n.1, p.69-80, 2017.

BENNAIM, M.; SHIEL, R.E.; MOONEY, C.T. Diagnosis of spontaneous hyperadrenocorticism in dogs. Part 1: Pathophysiology, aetiology, clinical and clinicopathological features. **Veterinary Journal**, p.252, 2019.

BENNAIM, M.; CENTOLA, S.; RAMSEY, I.; SETH, M. Clinical and Clinicopathological Features in Dogs with Uncomplicated Spontaneous Hyperadrenocorticism Diagnosed in Primary Care Practice (2013-2014). **Journal of American Animal Hospital Association**, v.55, n.4, p.78-186, 2019.

BLOIS, S.L.; LANG, S.T.; WOOD, R.D.; MONTEITH, G. Biologic variability and correlation of platelet function testing in healthy dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v.44, n.4, p.503-510, 2015.

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 and Metabolism**, v.87, n.8, p.3662-3666, 2002.

BOYNOSKY, N.A.; STOKKING, L. Atherosclerosis associated with vasculopathic lesions in a golden retriever with hypercholesterolemia. **Canadian Veterinary Journal**, v.55, n.5, p.484-488, 2014.

BRAINARD, B.M.; KLEINE, S.A.; PAPICH, M.G.; BUDSBERG, S.C. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of clopidogrel and the carboxylic acid metabolite SR 26334 in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, n.7, p.822-830, 2010.

CAPEN, C.C.; MARTIN, S.L. Animal model: hyperadrenocorticism (Cushing's-like syndrome and disease in dogs). **The American Journal of Pathology**, v.81, n.2, p.459-462, 1975.

CARAGELASCO, D.S.; KOGIKA, M.M.; MARTORELLI, C.R.; KANAYAMA, K.K.; SIMÕES, D.M.N. Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.7, p.734-740, 2017.

CAROTENUTO, G.; MALERBA, E.; DOLFINI, C.; BRUGNOLI, F.; GIANNUZZI, P.; SEMPRINI, G.; TOSOLINI, P.; FRACASSI, F. Cushing's syndrome—an epidemiological study based on a canine population of 21,281 dogs. **Open Veterinary Journal**, v.9, n.1, 27-32, 2019.

CAVALCANTE, C.Z.; KOGIKA, M.M.; BACIC, A.; SANTORO, M.L.; MIYASHIRO, S.I.; SAULT, J.P.; OYAFUSO, M.K.; SIMÕES, D.M.N. Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.11, p.1357-1363, 2013.

CHAKRABARTI, R.; FEARNLEY, G.R.; HOCKING, E.D. Effect of corticosteroid therapy on fibrinolysis in patients with inflammatory and non-inflammatory conditions. **British Medical Journal**, v.29, p.534-537, 1964.

COELHO, M.C.A.; VIEIRA NETO, L.; KASUKI, L.; WILDEMBERG, L.E.; dos Santos, C.V.; CASTRO, G.; GOUVÊA, G.; VELOSO, O.C.G.; GADELHA, T.; GADELHA, M.R. Rotation thromboelastometry and the hypercoagulable state in Cushing's syndrome. **Clinical Endocrinology**, v.81, n.5, p.657-664, 2014.

COELHO, M.C.A.; SANTOS, C.V.; VIEIRA NETO, L.; GADELHA, M.R. Adverse effects of glucocorticoids: coagulopathy. **European Journal of Endocrinology**, v.173, n.4, p.M11-211, 2015.

CROCHEMORE, T.; PIZA, F.M.T.; RODRIGUES, R.R.; GUERRA, J.C.C.; FERRAZ, L.J.R.; CORRÊA, T.D. A nova era da tromboelastometria. **Einstein**, v.15, n.3, p.380-385, 2017.

CUI, J.; HU, L.; SHI, W.; CUI, G.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Design, Synthesis and Anti-Platelet Aggregation Activity Study of Ginkgolide-1,2,3-triazole Derivatives. **Molecules**, v.24, n.11, 2019.

DENGATE, A.L.; MOREL-KOPP, M.; BEATTY, J.A.; BARRS, V.; BRADDOCK, J.A.; CHURCHER, R.K.; WILSON, B.J.; WARD, C.M. Differentiation between dogs with thrombosis and normal dogs using the overall hemostasis potential assay. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.26, n.3, p.446-452, 2016.

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

GAIZ, A.; MOSAWY, S.; COLSON, N.; SINGH, I. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.94, p.679-686, 2017.

GILOR, C.; GRAVES, T.K. Interpretation of laboratory test for canine Cushing's syndrome. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.26, n.2, p.98-108, 2011.

GOGGS, R.; BLAIS, M.C.; BRAINARD, B.M.; CHAN, D.L.; DELAFORCADE, A.M.; ROZANSKI, E.; SHARP, C.R. American College of Veterinary Emergency and Critical Care (ACVECC) consensus on the rational use of Antithrombotics in veterinary critical care (CURATIVE) guidelines: Small animal. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.29, p.12–36, 2019.

ISIDORI, A.M.; MINNETTI, M.; SBARDELLA, E.; GRAZIADIO, C.; GROSSMAN, A.B. The spectrum of haemostatic abnormalities in glucocorticoid excess and defect. **European Journal of Endocrinology**, v.173, n.3; p.R101-113, 2015.

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.

KELLEY, D.; LESTER, C.; SHAW, S.; de LAFORCADE, A.; WEBSTER, C.R.L. Thromboelastographic evaluation of dogs with acute liver disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.29, n.4, p.1053-1062, 2015.

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.

KOOISTRA, H.S.; GALAC, S. Recent advances in the diagnosis of Cushing's syndrome in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, n.2, p.259-267, 2010.

KOL, A.; NELSON, R.W.; GOSSELIN, R.C.; BORJESSON, D.L. Characterization of thromboelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. **Veterinary Journal**, v.197, n3, p.675-681, 2013.

LECHNER, R.; HELM, M.; MÜLLER, M.; WILLE, T.; RIESNER, H.J.; FRIEMERT, B. In-vitro study of species-specific coagulation differences in animals and

humans using rotational thromboelastometry (ROTEM). **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v.165, n.5, p.356-359, 2019.

LIEN, Y.H., HSIANG, T.Y., HUANG, H.P. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary-and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.1, p.61, 2010.

LOMINADZE, D.; DEAN, W.L.; TYAGI, S.C.; ROBERTS, A.M. Mechanisms of fibrinogen-induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. **Acta Physiologica**, v.198, n.1, p.1-13, 2010.

LOPES, S.T.A.; EMANUELLI, M.P.; SCHMIDT, C.; RAISER, A.G.; MAZZANTI, A.; ALVES, A.S. Reference ranges of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) in dogs. **Ciênc Rural**, v.35, n.2, p.381-384, 2005.

MICELI, D.D., PIGNATARO, O.P., CASTILLO, V.A. Concurrent hyperadrenocorticism and diabetes mellitus in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.115, p.425-431, 2017.

MÜLLER, M.C.; MEIJERS, J.C.M.; VROOM, M.B.; JUFFERMANS, N.P. Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a systematic review. **Critical Care**, v.18, n.1, p.R30, 2014.

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

NELSON, R.W. Distúrbios da glândula adrenal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3.ed, cap.53, p.745-764, 2006.

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

PACE, S.L.; CREEVY, K.E.; KRIMER, P.M.; BRAINARD, B.M. Assessment of Coagulation and Potential Biochemical Markers for Hypercoagulability in Canine Hyperadrenocorticism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.1113–1120, 2013.

PARK, F.M.; BLOIS, S.L.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; WOOD, R.D.; ALLEN, D.G.; NYKAMP, S.G.; DOWNIE, A. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n.5, p.1136-1142, 2013.

PELÁEZ, M.J.; BOUVY, B.M.; DUPRÉ, G.P. Laparoscopic adrenalectomy for treatment of unilateral adrenocortical carcinomas: technique, complications, and results in seven dogs. **Veterinary Surgery**, v.37, n.5, p.444-453, 2008.

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

RAMSEY, I.; RISTIC, J. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. In: **Practice**, v.29, n.8, p.446-454, 2007.

REUTELER, A.; AXIAK-FLAMMER, S.; HOWARD, J.; ADAMIK, K. Comparison of the effects of a balanced crystalloid-based and a saline-based tetrastarch solution on canine whole blood coagulation and platelet function. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.27, n.1, p.23-34, 2017.

ROMÃO, F.G.; CAMPOS, E.F.; MATTOSO, C.R.S.; TAKAHIRA, R.K. Hemostatic profile and thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized controlled trial. **BMC Veterinary Research**, v.9, p.268, 2013.

ROSE, L.; DUNN, M.E.; BÉDARD, C. Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n.1, p.207-211, 2013.

SAATI, S.; ABRAMS-OGG; A.C.G.; BLOIS, S.L.; WOOD, R.D. Comparison of multiplate, platelet function Analyzer-200, and plateletworks in healthy dogs treated with aspirin and clopidogrel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.32, n.1, p.111-118, 2018.

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

SMETS, P.M.Y.; LEFEBVRE, H.P.; KOOISTRA, H.S.; MEYER, E. CROUBELS, S.; MADDENS, B.E.J.; VANDENABEELE, S.; SAUNDERS, J.H.; DAMINET, S. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. **Veterinary Journal**, v.192, n.3, p.532-534, 2012.

SMITH, J.R., SMITH, K.F., BRAINARD, B.M. Platelet parameters from an automated hematology analyzer in dogs with inflammatory clinical diseases. **Veterinary Journal**, v.201, n.3, p.406-411, 2014.

SOLTER PF; HOFFMANN, W.E.; CHAMBERS, M.D.; SCHAEFFER, D.J.; KUHLENSCHMIDT, M.S. Hepatic total 3 alpha-hydroxy bile acids concentration and enzyme activities in prednisone-treated dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.8, p.1086-1092, 1994.

SONG, J.; DROBATZ, K.J.; SILVERSTEIN, D.C. Retrospective evaluation of shortened prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006-2011). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.26, n.3, p.398-405, 2016.

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.

THAMES, B.E.; LOVVORN, J.; PAPICH, M.G.; WILLS, R.; ARCHER, T.; MACKIN, A.; THOMASON, J. The effects of clopidogrel and omeprazole on platelet function in normal dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.40, n.2, p.130-139, 2017.

TIROSH, A.; LODISH, M.; LYSSIKATOS, C.; BELYAVSKAYA, E.; FEELDERS, R.A.; STRATAKIS, C.A. Coagulation profile in patients with different etiologies for Cushing syndrome: a prospective observational study. **Hormone and Metabolic Research**, v.49, n.5, p.365-371, 2017.

TURNER, J.S.; KUTTER, A.P.N.; SIGRIST, N.E. Correlation of rotational thromboelastometry (ROTEM) parameters with platelet count and their ability to predict thrombocytopenia in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.126, p.45-50, 2019.

UDDÉN, J., ERIKSSON, P., HOFFSTEDT, J. Glucocorticoid-regulated adipose tissue secretion of PAI-1, but not IL-6, TNF α or leptin in vivo. **Hormone and Metabolic Research**, v.34, n.11/12, p.698-702, 2002.

VAN DER PAS, R.; DE BRUIN, C.; LEEBEEK, F.W.; DE MAAT, M.P.M.; RIJKEN, D.C.; PEREIRA, A.M.; ROMJIN, A.J.; 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.; FEELDERSET, 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. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.97, p.1303–1310, 2012.

VIDAL, P.N.; MICELLI, D.D.; ARIAS, E.S.; D'ANNA, E.; GARCÍA, J.D.; CASTILLO, V.A. Decrease of nitric oxide and increase in diastolic blood pressure are two events that affect renal function in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism. **Open Veterinary Journal**, v.8, n.1, p.86-95, 2018.

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.

WHITTEMORE, J.C.; MOONEY, A.P.; PRICE, J.M.; THOMASON, J. Clinical, clinicopathologic, and gastrointestinal changes from administration of clopidogrel, prednisone, or combination in healthy dogs: A double-blind randomized trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.33, n.6, p.2618-2627, 2019.

WITEK, P.; ZIELINSKI, G.; SZAMOTULSKA, K.; WITEK, J.; KAMINSKI, G. Cushing's disease: Fibrinogen and D-dimer levels fail to normalise despite early postoperative remission — a prospective, controlled study. **Endokrynologia Polska**, v.67, n.3, p.283-291, 2016.

WOOLCOCK, A.D.; BUGBEE, A.C.; CREEVY K.E. Evaluation of baseline cortisol concentration to monitor efficacy of twice-daily administration of trilostane to dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 22 cases (2008-2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.248, n.7, p.814-821, 2016.

WOOLCOCK, A.D.; KEENAN, A.; CHEUNG, C.; CHRISTIAN, J.A.; MOORE, G.E. Thrombocytosis in 715 Dogs (2011–2015). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.31, n.6, p.1691-1699, 2017.

WONG, C.J., KOCH, M.; BEHLING-KELLY, E.L. Development of a plasminogen activator inhibitor (PAI-1) assay and comparison of plasma PAI-1 activity in hyperlipidemic/dyslipidemic dogs with either hyperadrenocorticism or diabetes mellitus, and healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v.111, p.1-8, 2017.

ZANUZZO, F.S.; TEIXEIRA-NETO, F.J.; THOMAZINI, C.M.; TAKAHIRA, R.K.; CONNER, B. DINIZ, M.J. Effects of dipyrone, meloxicam, or the combination on hemostasis in conscious dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.25, n.4, p.512-520, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Atestado do Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Avaliação do bissulfato de clopidogrel como agente antiagregação plaquetária em cães com hiperadrenocorticismismo" **Protocolo CEUA 0163/2018**, a ser conduzido por Felipe Gazza Romão, responsável/orientador Regina Kiomi Takahira, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	03/09/2018 a 01/03/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	CANINA / CANIS LUPUS FAMILIARIS /
Raça	Não há critérios de exclusão
Nº de animais machos	12
Nº de animais fêmeas	12
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	10
Peso médio de animais fêmeas	10
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	6 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Animais oriundos da rotina de clínicas

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

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2175 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Anexo 2 – Termo de consentimento fornecido aos tutores para participação no projeto



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



DECLARAÇÃO

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

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

NOME E ASSINATURA DO DOCENTE RESPONSÁVEL:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação do bissulfato de clopidogrel como agente antiagregação plaquetária em cães com hiperadrenocorticismos", de responsabilidade de Felipe Gazza Romão.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica: será realizada a coleta de 10ml de sangue, por meio da veia jugular, para análise da cascata de coagulação por meio do tromboelastograma. Serão necessárias duas coletas em dois momentos diferentes: no início do tratamento com trilostano e clopidogrel e após 90 dias. É importante salientar que serão dois grupos: um tratado com trilostano e clopidogrel, e outro apenas com trilostano.

Nome do animal ou Número de animais de produção: _____

NOME DO
RESPONSÁVEL: _____

RG: _____ Data: ____/____/____

Assinatura: _____

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