



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE NA COAGULAÇÃO: UTILIZAÇÃO DA  
TROMBOELASTOMETRIA NO CÃO

VIRGÍNIA ANTUNES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias  
Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

ORIENTADORA

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

2014

Lisboa





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE NA COAGULAÇÃO: UTILIZAÇÃO DA  
TROMBOELASTOMETRIA NO CÃO

VIRGÍNIA ANTUNES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias  
Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

ORIENTADORA

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva  
Moreira

2014  
Lisboa



*When it comes to dreams one may falter but the only way to fail is to abandon them.*

*Dracula*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais por me terem apoiado estes anos todos e terem permitido a realização do meu sonho. Os meus irmãos por me terem ajudado com os meus problemas de informática e pelo apoio.

A Doutora Anabela Sousa Silva Moreira por ter aceite ser minha orientadora, pela correcção desta dissertação e pelos conselhos.

A Doutora Isabelle Goy-Thollot por me ter proposto este tema, a Dra Marie Forterre e a toda a equipa do SIAMU.

Dr. Telmo Nunes pela ajuda com a parte estatística e apresentação de resultados.

Aos meus tios por me terem recebido em casa no meu primeiro ano. Um bem-haja particular a minha tia por me ter ajudado a realizar o meu sonho.

A minha avó Judite. Bem disse que me ia ver formada.

Os meus avós Lena e Francisco.

A Susana, mais que uma amiga, uma verdadeira irmã. Por me ter apoiado estes anos todos, por me ter ajudado a ultrapassar as dificuldades e pela ajuda na correcção desta dissertação.

A Catarina e a Carolina, vizinhas de quarto, pelos momentos partilhados.

A Dídía, Daniela C, Daniela M, Patrícia, Sofia e Teresa, pelas tardes de boa disposição nos trabalhos de grupo.

Os meus bichinhos, e particularmente aos que adoptei durante estes anos de formação: Gaia, Flicka, Happy e Wii-Wii e que me ajudaram a ultrapassar os meus momentos de dificuldade e solidão. Aos que partiram cedo demais, Rourou, Mimi, Bibi, Bouli e Flicka.

## **Avaliação da influência da idade na coagulação: utilização da tromboelastometria**

### **RESUMO**

A coagulação, fenómeno complexo, apresenta actualmente dois modelos: o modelo da cascata, utilizado sobretudo para entender os diferentes passos da coagulação e para os testes da coagulação clássicos, e o “*cell-based model*”, teoria mais recente na qual se reconhecem interacções entre as células e a preponderância da via intrínseca.

A tromboelastometria, metodologia desenvolvida por Hartert, mede as interacções entre os factores da coagulação, os inibidores e componentes celulares durante as fases da coagulação e a lise. Ao contrário dos testes clássicos, a tromboelastometria fornece informações sobre a cinética da coagulação: tempo de coagulação, formação do coágulo, estabilidade e lise do coágulo sendo os resultados obtidos por esta técnica mais relevantes para o modelo “*cell-based model*”.

Neste estudo, o ROTEM® (rotational thromboelastometry) foi utilizado para obtenção de valores de referência, de forma a estabelecer normas para avaliação dos estados hipo, normo ou hipercoaguláveis no cão.

A comparação entre dois grupos de Beagles, um constituído por cães de jovens (entre 1 e 3 anos) e o outro por cães mais idosos (entre os 10 e 12 anos) teve por objectivo avaliar a influência da idade na coagulação. A idade e a inflamação estão relacionadas e ambas levam a alterações quantitativas de plaquetas, fibrinogénio e factores da coagulação circulantes. A correlação entre essas alterações e os parâmetros tromboelastométricos permite avaliar essas modificações. Os resultados obtidos ( $p < 0,05$ ) evidenciaram um estado hipercoagulável no grupo de Beagles mais idosos muito provavelmente devido as alterações associadas a idade.

**Palavras-chaves:** tromboelastometria, coagulação, inflamação, idade, cão

# **Evaluation of the influence of age in coagulation: use of thromboelastometry in the dog**

## **ABSTRACT**

Coagulation, a complex phenomenon, present nowadays two models: the cascade model, mainly used to comprehend coagulation's different steps and for classic tests of coagulation and the cell-based model, the most recent theory with which one can distinguish interactions between cells and the preponderance of the intrinsic pathway.

Thromboelastometry, invented by Hartert, measures the interactions between the coagulation's factors, the inhibitors and the cellular components during the coagulation's phases and the lysis.

Contrary to classic tests, thromboelastometry provides data on the kinetics of coagulation : the time of coagulation, the formation of the clot, the stability and the lysis of the clot being, this technique closer to the cell-based model.

In this study, the ROTEM® (rotational thromboelastometry) has been used to obtain reference values in order to establish standards for the evaluation of different states in dogs: hypercoagulation, hypocoagulation and normal coagulation.

A group was composed of older dogs (between 10 and 12 years old) and the other was composed of young dogs (between 1 and 3 years old) in order to evaluate the influence of age in coagulation.

Inflammation and age are linked, which cause changes in the thrombocyte's quantity, the fibrinogen and the circulating factors of coagulation.

The correlation between these changes and thromboelastometric parameters allows the assessment of these modifications. The obtained values ( $p < 0.05$ ) proved that there is a hypercoagulation state in the older Beagles, probably due to alterations caused by age.

**Keywords:** thromboelastometry, coagulation, inflammation, age, dog

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....	3
ÍNDICE DE TABELAS .....	4
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
I. Introdução .....	6
II. A hemostase.....	7
1. Hemostase primária .....	7
1.1. Componentes necessários à hemostase: .....	7
1.2. Mecanismo da hemostase primária .....	9
2. Hemostase secundária ou coagulação.....	10
2.1. Via intrínseca (ou via de contacto).....	11
2.1.1. Factor XII (Factor de Hageman) .....	11
2.1.2. Factor XI.....	11
2.1.3. Precalicroína (Factor de Fletcher).....	12
2.1.4. Cininogénio de alto peso molecular .....	12
2.1.5. Factor IX (Factor de Christmas ou factor anti-hemofílico B) .....	12
2.1.6. Factor VIII (factor anti-hemofílico A).....	12
2.2. Via extrínseca.....	13
2.2.1. Factor III (Factor tissular ou tromboplastina).....	13
2.2.2. Factor VII (proconvertina) .....	13
2.3. Via comum .....	14
2.3.1. Factor X.....	14
2.3.2. Factor V .....	14
2.3.3. Protrombina (Factor II).....	14
2.3.4. Trombina .....	15
2.3.5. Fibrinogénio (Factor I) .....	15
2.3.6. Fibrina.....	15
2.3.7. Factor XIII (Factor estabilizador da fibrina) .....	15
2.4. Mecanismo da hemostase secundária.....	16
3. Hipótese “ <i>cell based model</i> ” .....	17
4. Inibidores da coagulação .....	17
4.1. Inibidores da coagulação endógenos.....	17
4.1.1. Inibidor da Via do Factor Tissular.....	17
4.1.2. Antitrombina III (AT).....	18
4.1.3. A via da Proteína C.....	19
4.1.4. Outros inibidores .....	20
4.2. Inibidores exógenos da coagulação.....	20
4.2.1. Injectáveis.....	20
4.2.2. Orais .....	21
5. Fibrinólise .....	21
5.1. Plasminogénio .....	22
5.1.1. Activador tissular do plasminogénio .....	22
5.1.2. Activador uroquinase do plasminogénio .....	22
5.2. Plasmina .....	23
5.3. Inibidores da fibrinólise .....	23
5.3.1. Inibidor do activador do plasminogénio 1 .....	23
5.3.2. $\alpha$ 2-antiplasmina .....	23

5.3.3.	Inibidor da fibrinólise activado pela trombina .....	23
6.	Influência da idade e da inflamação na coagulação.....	24
6.1.	Idade .....	24
6.2.	Inflamação .....	25
6.3.	Idade e inflamação .....	27
7.	Avaliação dos parâmetros da coagulação .....	29
7.1.	Avaliação da hemostase primária.....	29
7.1.1.	Tempo de hemorragia.....	29
7.1.2.	Contagem e morfologia plaquetária .....	29
7.2.	Avaliação da hemostase secundária .....	29
7.2.1.	Tempo de protrombina .....	29
7.2.2.	Tempo parcial de tromboplastina activada.....	29
7.3.	Avaliação da fibrinólise .....	30
8.	Avaliação da hemostase através da tromboelastometria.....	30
8.1.	Princípios gerais da técnica e funcionamento .....	31
8.2.	Temogramas .....	32
8.3.	Interesse da tromboelastometria, vantagens e limitações.....	34
8.4.	Obtenção de valores de referência .....	35
III.	Trabalho Experimental .....	37
1.	Objectivos.....	37
2.	Material e Métodos.....	37
2.1.	Animais utilizados.....	37
2.2.	Colheita e processamento de amostras.....	38
2.3.	Equipamento para análise do hemograma e tempos de coagulação.....	39
2.4.	Equipamento e análise tromboelastométrica.....	39
2.5.	Análise estatística .....	40
3.	Resultados .....	40
3.1.	Hemograma .....	40
3.2.	Tempo de protrombina e de trombina parcialmente activada .....	41
3.3.	Temogramas .....	41
3.4.	Parâmetros elastométricos da amostra populacional de referência .....	42
3.5.	Parâmetros tromboelastométricos do Grupo Beagles jovens.....	42
3.6.	Parâmetros tromboelastométricos do Grupo B idosos .....	43
3.7.	Comparação dos valores de referência aos valores obtidos para os 2 grupos de Beagles .....	44
3.8.	Comparação dos parâmetros tromboelastométricos entre os grupos de Beagles .....	45
4.	Discussão.....	47
4.1.	Parâmetros elastométricos da amostra populacional de referência.....	47
4.2.	Comparação dos valores de referência aos valores obtidos para os 2 grupos de Beagles .....	48
4.3.	Comparação dos parâmetros tromboelastométricos entre os grupos de Beagles .....	49
5.	Conclusão.....	52
IV.	Bibliografia.....	53
	Anexo 1: Proteínas hemostáticas, cofactores e inibidores.....	60
	Anexo 2: Raças dos Cães para obtenção dos valores de referência .....	62
	Anexo 3: Detalhe dos diferentes valores obtidos para os diferentes parâmetros nos cães para obtenção dos valores de referência.....	63
	Anexo 4: Detalhe dos diferentes valores obtidos para os diferentes parâmetros nos dois grupos de Beagles.....	65
	Anexo 5: RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....	68

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Corte transversal mostrando as diferentes camadas do endotélio	7
Figura 2: Função hemostática do endotélio	8
Figura 3: Diagrama representando as vias de activação das plaquetas	10
Figura 4: Formação dos complexos tenase e protrombinase	14
Figura 5: Cascata da coagulação	16
Figura 6: Inibição do complexo FT-FVIIa e do FXa pela ligação do TFPI	18
Figura 7: Factores inibidos pelo complexo antitrombina (AT)-heparina (H)	18
Figura 8: Activadores e inibidores da fibrinolise	22
Figura 9: Representação esquemática da actividade dos mediadores da inflamação	27
Figura 10: Diagrama dos diferentes resultados dos testes de PT e aPTT	30
Figura 11: Visão global do ROTEM® delta	31
Figura 12: Funcionamento do ROTEM®	32
Figura 13: Temograma tipo obtido com o ROTEM®	32
Figura 14: Temogramas do tipo extem, intem e fibtem (adaptado de <a href="http://ROTEM@.de/">http://ROTEM@.de/</a> )	34
Figura 15: Preparação da máquina para análise. Screenshot	39
Figura 16: Temograma grupo CR - Extem	41
Figura 17: Temograma grupo CR - Intem	41
Figura 18: Temograma grupo CR - Fibtem	41
Figura 19: Temograma grupo BJ - Extem	42
Figura 20: Temograma grupo BJ - Intem	42
Figura 21: Temograma grupo BJ - Fibtem	42
Figura 22: Temograma grupo BI - Extem	42
Figura 23: Temograma grupo BI - Intem	42
Figura 24: Temograma grupo BI - Fibtem	42
Figura 25: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Extem.	44
Figura 26: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Intem	44
Figura 27: Comparação entre grupos para o valor CFT na análise Extem.	45
Figura 28: Comparação entre grupos para o valor CFT na análise Intem	45
Figura 29: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Fibtem	45

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: valores médios do hemograma .....	40
Tabela 2: Valores de pt e aptt para os diferentes grupos de cães .....	41
Tabela 3: Intervalos de referência obtidos para os diferentes parâmetros.....	42
Tabela 4: Média e desvio padrão obtidos para os diferentes parâmetros do extem para os BJ	43
Tabela 5: Média e desvio padrão obtidos para os diferentes parâmetros do intem para os BJ	43
Tabela 6: média e desvio padrão obtidos para os diferentes parâmetros do fibtem para os BJ	43
Tabela 7: valores obtidos para os diferentes parâmetros do extem para os BI.....	43
Tabela 8: valores obtidos para os diferentes parâmetros do intem para os BI .....	44
Tabela 9: valores obtidos para os diferentes parâmetros do fibtem para os BI.....	44
Tabela 10: Valores de p obtidos para os diferentes parametros da comparação entre BJ e BI	46
Tabela 11: Proteínas hemostáticas, cofactores e inibidores .....	60
Tabela 12: valores obtidos para os diferentes parâmetros do Extem nos cães para obtenção dos valores de referência.....	63
Tabela 13: valores obtidos para os diferentes parâmetros do Intem nos cães para obtenção dos valores de referência.....	63
Tabela 14: valores obtidos para os diferentes parâmetros do Extem nos cães para obtenção dos valores de referência.....	64
Tabela 15 - Valores obtidos para os diferentes parâmetros do extem para os BJ .....	65
Tabela 16 - Valores obtidos para os diferentes parâmetros do intem para os BJ .....	65
Tabela 17 - Valores obtidos para os diferentes parâmetros do fibtem para os BJ.....	66
Tabela 18 - valores obtidos para os diferentes parâmetros do Extem para os BI.....	66
Tabela 19 - valores obtidos para os diferentes parâmetros do intem para os BI.....	67
Tabela 20 - valores obtidos para os diferentes parâmetros do fibtem para os BI.....	67

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

$\alpha$ 2-AP:  $\alpha$ 2 antiplasmina

ADP: adenosina difosfato

aPTT: activated partial thromboplastin time – tempo parcial de tromboplastina activada

AT: antithrombin – antitrombina

BJ: Beagles jovens

BI: Beagles idosos

C1-INH: C1 esterase inhibitor – inibidor da C<sub>1</sub> esterase

CFT: clotting formation time – tempo de formação do coágulo

CT: clotting time – tempo de coagulação

EPCR: endothelial protein C receptor - receptor endotelial da proteína C

FT: factor tissular, FIII ou tromboplastina

GPIb, IIb, IIIa, VI: glicoproteínas Ib, IIb, IIIa e VI

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

MCF: maximum clot firmness – firmeza máxima do coágulo

ML: maximum lysis – lise máxima

MP: micropartícula

PAF: platelet activating factor – factor de activação plaquetário

PAI-1: platelet activation inhibitor 1 – Inibidor do activador do plasminogénio

PDF: produtos de degradação da fibrina e do fibrinogénio

PT: prothrombin time – tempo de protrombina

ROTEM®: rotationnal thromboelastometry – tromboelastometria rotativa

TAFI: thrombin activated fibrinolysis inhibitor – inibidor da fibrinólise activado pela trombina

TFPI: tissue factor pathway inhibitor – inibidor do factor tissular

TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha - factor de necrose tumoral  $\alpha$

tPA: tissue plasminogen activator – activador do plasminogénio tissular

uPA: urokinase plasminogen activator – activador uroquinase do plasminogénio

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I. Introdução

A hemostase é um mecanismo protector essencial dependente de um balanço entre actividade pro-coagulante e anticoagulante. Aquando de uma lesão, a actividade pro-coagulante domina levando ao restabelecimento da integridade vascular. No entanto, os mecanismos anticoagulantes modulam a actividade pro-coagulante impedindo uma excessiva coagulação, prejudicial ao organismo.

A compreensão desses mecanismos é complexa. A medicina, quer na sua vertente humana quer na vertente veterinária, sempre se interessou em perceber este fenómeno e as interacções entre os diferentes intervenientes. O modelo da cascata, utilizado hoje principalmente para perceber melhor os diferentes passos e os resultados dos testes de coagulação deu lugar, nos anos 90, a um novo modelo conhecido como o *cell-based model* (Smith, 2009) no qual se reconhece as interacções entre os diferentes factores e o envolvimento de elementos celulares. Numerosos factores influenciam a hemostase como por exemplo a inflamação e a idade. Existem evidências de uma interacção complexa entre a inflamação e a hemostase influenciando-se mutuamente, mas igualmente de uma correlação entre a idade e a inflamação e da influência da idade sobre a resposta imunitária. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do envelhecimento na coagulação na espécie canina.

A identificação de alterações na coagulação pela contagem plaquetária, tempo de protrombina (PT), tempo parcial de tromboplastina activada (aPTT), actividade da antitrombina (AT) e produtos de degradação da fibrina e fibrinogénio (PDF) como os D-dímeros. Individualmente, esses testes são úteis na avaliação de cada via, intrínseca e extrínseca, na deficiência em anticoagulantes ou ainda na trombocitopenia. No entanto, não podem prever o risco real de hemorragia ou trombose porque não têm em conta todos os elementos envolvidos no processo da coagulação.

A tromboelastometria, permite visualizar as diferentes fases da coagulação privilegiando uma via em detrimento da outra sendo, no entanto, capaz de incorporar todos os elementos que participam nela. Utilizada há vários anos em medicina humana, começa agora a ser utilizada em medicina veterinária, sobretudo em centros universitários e hospitalares.

Este estudo incide sobre os efeitos da idade na coagulação. Por comparação dos valores obtidos em duas amostras de cães de raça Beagle, espera-se verificar a existência de diferenças significativas entre os perfis da coagulação.

## II. A hemostase

### 1. Hemostase primária

Na sequência de uma lesão vascular ocorre uma interacção entre o vaso, as plaquetas e as proteínas da coagulação. A hemostase primária, fenómeno auto amplificado mas localizado, apresenta duas fases:

- a fase vascular, que consiste na contracção do vaso, primeiro de forma passiva devido à elasticidade da parede e depois de forma activa devido à ligação das plaquetas ao sub-endotélio. Essa reacção leva à libertação de serotonina e adrenalina que contribuem para a manutenção da vasoconstrição e consequente diminuição do fluxo sanguíneo ;
- a fase plaquetária, durante o qual as plaquetas aderem ao endotélio lesado.

#### 1.1.Componentes necessários à hemostase:

##### a) A parede vascular

A parede vascular possui três camadas sendo do lúmen para a periferia: íntima, média e adventícia. As camadas média e adventícia apresentam, respectivamente, fibras musculares e fibroblastos (Figura 1)

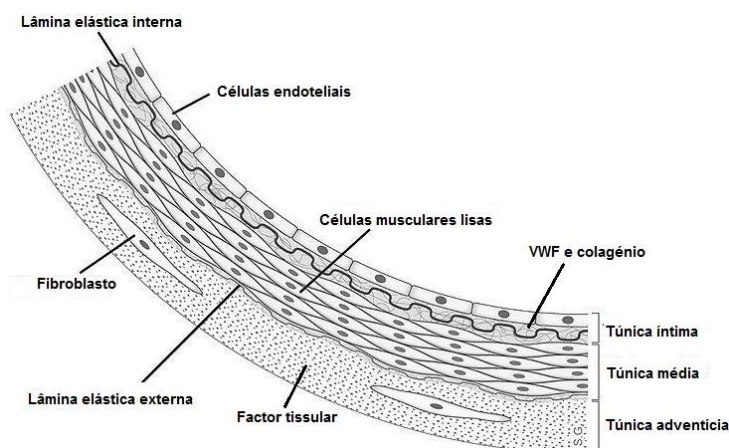


Figura 1: Corte transversal mostrando as diferentes camadas do endotélio

(adaptado de McMichael, 2012)

#### ❖ Propriedades anti-trombóticas do endotélio

A íntima é constituída pelo endotélio, que não permite a adesão plaquetária por ter uma carga negativa responsável pela repulsão electrostática (Batty & Graham Smith, 2010), e pelo subendotélio, onde estão situadas as substâncias pró-agregantes como o colagénio, e activadoras da coagulação como o factor de vonWillebrand. As propriedades anti-agregantes

do endotélio devem-se à produção de factores como a prostaciclina  $I_2$  na camada íntima do endotélio (Kelton & Blajchman, 1980) e o monóxido azoto (Durante et al., 1994). Apresenta igualmente propriedades anticoagulantes pela produção do inibidor do factor tissular (TFPI - *tissue factor pathway inhibitor*) (Broze & Girard, 2012) e sulfato de heparina (glicosaminoglicanos expressos à superfície das células endoteliais) (Figura 2). O endotélio apresenta ainda a função fibrinolítica assegurada pela produção do activador do plasminogénio tissular (tPA).

❖ Propriedades pró-trombóticas do endotélio

As células endoteliais armazenam o factor de von Willebrand nos grânulos chamados corpos de Weibel-Palade. As células endoteliais expressam receptores para a trombina, que uma vez ligada, desencadeia uma série de eventos pró-coagulantes e pró-inflamatórios. Sinais intracelulares levam à desgranulação dos corpos de Weibel-Palade com conseqüente libertação do factor de von Willebrand e P-selectina, responsáveis pela adesão de neutrófilos ao trombo. A activação da fosfolipase  $A_2$  leva a produção do factor de activação plaquetário (PAF - *platelet activating factor*). As principais células produtoras de interleucina 1 (IL-1), citocina pró-inflamatória com papel no desencadeamento da cascata da coagulação, são os monócitos e os macrófagos assim como as células endoteliais (Smith, 2010).

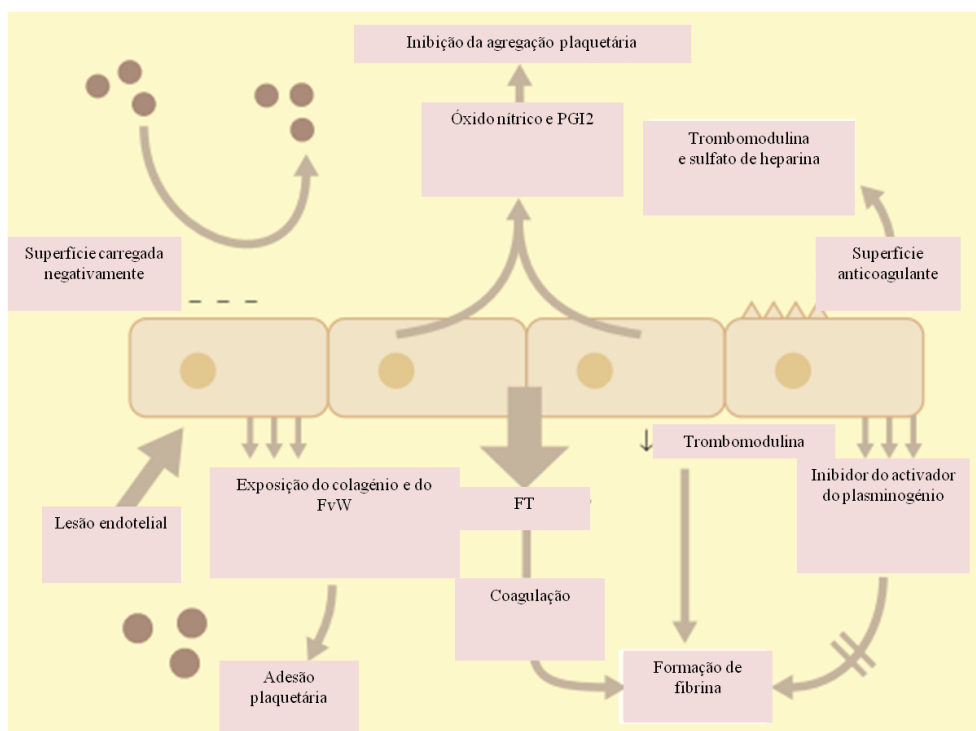


Figura 2: Função hemostática do endotélio

(adaptado de Allford & Machin, 2007)

### b) Factor de von Willebrand

O factor de von Willebrand sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos, encontra-se na camada sub-endotelial. Necessário para a adesão plaquetária, funciona como transportador do factor VIII na circulação sanguínea, impedindo que seja inativado pela proteína C e/ou factor X activado (Mc Connell, 2000).

### c) Plaquetas

As plaquetas são produzidas a partir dos megacariócitos na medula óssea e o seu valor varia entre 200000 e 500000/ $\mu$ L no cão (Smith, 2010). A função hemostática deve-se ao poder de adesão e agregação das plaquetas ao sub-endotélio exposto. Apresentam numerosos grânulos, do qual se destaca o grânulo  $\alpha$ , principal local de armazenamento de factores responsáveis pela hemostase, como o fibrinogénio e factor de von Willebrand, ou ainda de fibrinolíticos como o plasminogénio (Batty & Graham Smith, 2010). A membrana apresenta vários receptores, como a glicoproteína Ib (GPIb), que permite a ligação da plaqueta ao sub-endotélio vascular, sendo essa reacção facilitada pelo factor von Willebrand (Minors, 2007), a glicoproteína VI (GPVI) que se liga ao colagénio e ainda o complexo glicoproteico IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) que, na presença de cálcio, promove a fixação do fibrinogénio plasmático às plaquetas, passo indispensável a agregação plaquetária (Smith, 2010).

## 1.2.Mecanismo da hemostase primária

Quando um vaso é lesado, ocorre uma vasoconstrição e o tecido sub-endotelial fica exposto possibilitando a adesão das plaquetas ao colagénio. A adesão plaquetária, bem como a diminuição da produção de prostaglandina  $I_2$  pelas células endoteliais lesadas desencadeiam uma série de eventos designados por activação plaquetária (Figura 3). Em consequência, é libertado o cálcio que estava retido no retículo endoplasmático rugoso o que vai estimular, de forma indirecta, a conversão do ácido araquidónico, derivado dos fosfolípidos membranários, em tromboxano  $A_2$ , potente agente pro-agregante e vasoconstrictor. A ligação da GPIb plaquetária ao colagénio leva a exposição do complexo GPIIb/IIIa que fixa o fibrinogénio e o factor de von Willebrand. A plaqueta torna-se activa e passa de discóide para esférica com pseudópodes. A agregação plaquetária é facilitada pelo fibrinogénio ligado ao complexo GPIIb/IIIa levando à formação de pontes entre as plaquetas (Minors, 2007). A agregação e recrutamento de mais plaquetas são, ainda, conseguidos através da libertação do conteúdo dos seus grânulos (ADP e serotonina) em consequência da alteração da sua forma. Os fosfolípidos do folheto interno da plaqueta são exteriorizados, em resposta a estímulos agonistas como a trombina e o colagénio, levando a obtenção de uma superfície pró-coagulante (Mc Connell,

2000). Entre estes fosfolípidos encontra-se a fosfatidilserina, principal local de adesão dos factores V e VII bem como dos factores dependentes da vitamina K (Zwaal & Schroit, 1997). O papel preponderante da membrana na propagação das reacções proteolíticas pela ligação dos factores à sua superfície é evidenciado pelo síndrome de Scott, anomalia genética muito rara em humanos. Nesses doentes, a exteriorização dos fosfolípidos é reduzida assim como a capacidade de dar origem as micropartículas. A trombina, que não é produzida em quantidade suficiente para assegurar uma hemostase normal leva a que, em caso de traumatismo, a hemorragia se torne particularmente difícil de controlar (Zwaal, Comfurius, & Bevers, 2004).

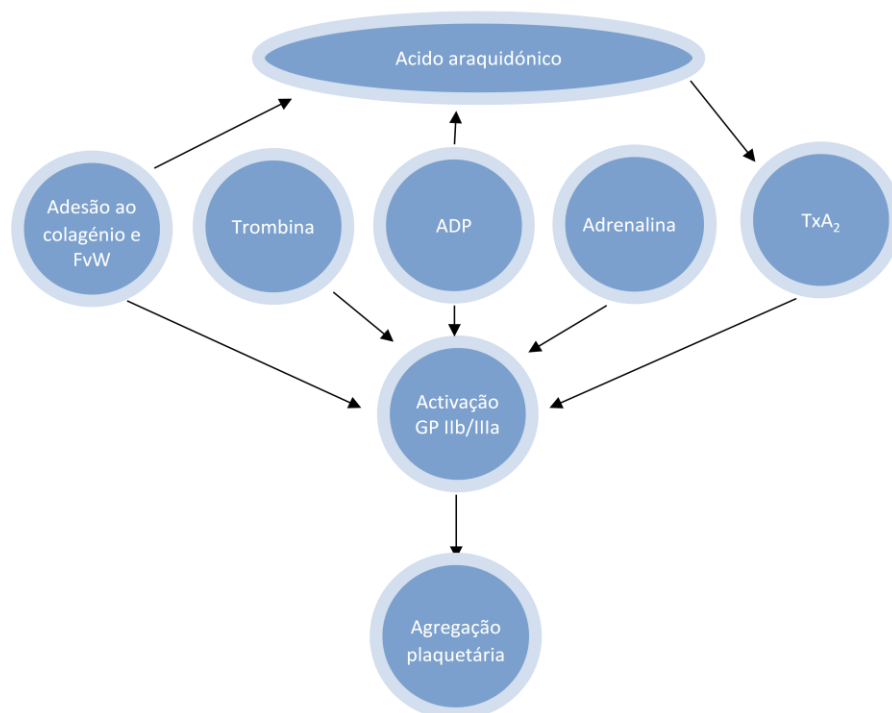


Figura 3: Diagrama representando as vias de activação das plaquetas

(adaptado de [www.neurology.org/](http://www.neurology.org/))

## 2. Hemostase secundária ou coagulação

A hemostase secundária surge na sequência das interações entre plaquetas e parede vascular e leva, aquando da activação dos factores de coagulação, à formação de um coágulo de fibrina insolúvel.

A via da cascata divide a coagulação em três vias distintas: intrínseca, extrínseca e comum. A primeira iniciada pelo contacto enquanto a segunda é activada pela interacção do factor tissular com o factor VII. Uma vez activado o factor X, as vias intrínseca e extrínseca convergem para uma via comum.

## 2.1. Via intrínseca (ou via de contacto)

Activada pelo contacto, todos os factores necessários a esta fase estão presentes no sangue. Apesar da importância comprovada em procedimentos *in vitro*, gradualmente foi sendo questionada a sua relevância *in vivo* tendo já sido demonstrado que deficiências nos três factores implicados, XII, precalicreína e cininogénio de alto peso molecular, não estão associadas a problemas hemorrágicos (Smith, 2009). Ainda assim esta parece ser uma via determinante nos testes para avaliação da coagulação desenvolvidos em laboratório. Por exemplo, no teste do tempo de tromboplastina parcialmente activada (aPTT) uma superfície, carregada negativamente, é utilizada para activar estes factores, activação que ocorre, igualmente, sempre que o sangue é removido de um vaso e é a razão pela qual o sangue coagula numa seringa ou num tubo, na ausência de anticoagulantes (McMichael, 2012). No entanto, por se tratar de uma via que não é dependente do cálcio, esta reacção pode ocorrer num tubo com citrato ou EDTA (quelantes do cálcio). O factor XII parece ter o papel central nesta via pois é capaz de iniciar a via intrínseca pela conversão do factor XI em factor XIa (Stavrou & Schmaier, 2010). As superfícies carregadas negativamente, como o sub-endotélio, funcionam como elementos activadores quando da ligação do factor de coagulação. *In vivo*, os factores de contacto parecem ser mais importantes na iniciação da inflamação e fibrinólise (Mc Connell, 2000).

### 2.1.1. Factor XII (Factor de Hageman)

Produzido no fígado, o factor XII activa-se (XIIa) em contacto com o colagénio e com a maior parte das superfícies negativas (vidro por exemplo). A precalicreína, o cininogénio e o factor XI são os primeiros substratos do factor XIIa. O inibidor da C<sub>1</sub> esterase (C1-INH) é o principal inibidor do factor XIIa (Stavrou & Schmaier, 2010).

### 2.1.2. Factor XI

O factor XI é sintetizado no fígado, formando um complexo com o cininogénio, passo necessário para a ligação do factor à superfície negativa. Participa, em conjunto com o factor XII, na activação do factor IX. Pode ser activado pelos factores XIIa e XIa, e de forma mais eficiente, pela trombina em reacções dependentes do cálcio. Consoante a sua localização, os inibidores podem ser a  $\alpha_1$  antitripsina, da qual está protegido quando ligado a uma plaqueta, o C<sub>1</sub>-INH, a  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP) e a antitrombina (AT) (Smith, 2010).

### 2.1.3. Precalicroína (Factor de Fletcher)

A precalicroína circula no sangue, essencialmente, associada ao complexo factor XII-cinínogénio. Expressa por vários tecidos, a sua conversão em calicroína, pelo factor XIIa, ocorre numa superfície carregada negativamente na presença de cinínogénio. A calicroína é inibida pelo C1-INH, pela  $\alpha$ 2-macroglobulina e quando ligada ao cinínogénio, pelo complexo heparina-antitrombina (Smith, 2010).

### 2.1.4. Cinínogénio de alto peso molecular

O cinínogénio de alto peso molecular é uma proteína com várias funções, nem todas relacionadas com a coagulação (inibição do péptido natriurético atrial, por exemplo). As células endoteliais e as plaquetas possuem cinínogénio e expressam receptores para o mesmo, na sua superfície. A activação plaquetária leva, simultaneamente, ao aumento da sua concentração e dos seus numerosos receptores.

O cinínogénio intervém na coagulação permitindo a fixação do factor XI e precalicroína ao factor XIIa, levando à activação dos mesmos (XIIa e calicroína) (Smith, 2010).

### 2.1.5. Factor IX (Factor de Christmas ou factor anti-hemofílico B)

O factor IX, presente em pequena quantidade no sangue, é sintetizado pelo fígado e é dependente da vitamina K. Activado na presença do factor XIIa e de cálcio, o factor IXa activa por sua vez o factor X, com a ajuda do factor VIIIa, de fosfolípidos e cálcio. No caso de deficiência da via intrínseca, o complexo factor tisular-VIIa pode igualmente activar o factor IX. A ausência deste está na origem da hemofilia B, rara em animais não-humanos. O factor IX é inibido pelo complexo antitrombina-sulfato de heparina (Smith, 2010).

### 2.1.6. Factor VIII (factor anti-hemofílico A)

O factor VIII circula associado ao factor de von Willebrand na forma de um complexo glicoproteico. Activado (VIIIa) pela trombina, dissocia-se do factor de von Willebrand, acelerando a activação do factor X pela formação do complexo tenase factor IX-factor VIIIa (Figura 4). É responsável pela hemofilia A, deficiência hereditária da coagulação, doença genética frequente em medicina veterinária (Smith, 2010).

## 2.2. Via extrínseca

### 2.2.1. Factor III (Factor tissular ou tromboplastina)

A tromboplastina ou factor tissular (FT) necessário à via extrínseca é normalmente encontrado no espaço extravascular, nos fibroblastos da camada adventícia. Em caso de lesão do endotélio, este fica exposto levando ao desencadeamento da cascata de coagulação. Após estimulação por endotoxinas, proteína C reactiva ou ainda por citocinas inflamatórias como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), certas células do espaço intravascular formam pequenas vesículas que se soltam dando origem a micropartículas circulantes (Esmon, 2004; Mezzano, Matus, Sáez, Pereira, & Panes, 2008). A maior parte das micropartículas circulantes são de origem plaquetária mas podem igualmente provir dos eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e células endoteliais (Cimmino, Golino, & Badimon, 2011). Dado a composição da membrana, a micropartícula apresenta fosfatidilserina e outras proteínas membranárias que lhe conferem propriedades pró-coagulantes. As plaquetas, assim como os leucócitos, em resposta a vários estímulos, são capazes de gerar uma grande quantidade de micropartículas com FT, dado a presença do mesmo na superfície dessas células. É o chamado *blood borne tissue factor* que contribui para a hemostase e formação de um trombo. Estudos sobre o FT revelaram no entanto que os megacariócitos, na origem das plaquetas, não exprimem o ARNm para este factor, sendo proveniente da transferência dos monócitos para as plaquetas (Key, 2005). Os monócitos, quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, são capazes de expressar o FT (Butenas, Orfeo, & Mann, 2008). A hipótese das micropartículas surgiu com os trabalhos de Giesen et al, (1999), que revelaram a presença de FT num trombo formado a partir de sangue total numa superfície de vidro coberta por colagénio, ou seja, sem FT. O aparecimento deste factor em menos de cinco minutos levou os investigadores a concluir que seria proveniente do sangue (*blood-borne tissue factor*). Posteriormente foi formulada a hipótese de que a iniciação do trombo seria devida ao factor presente na parede vascular exposta enquanto a amplificação estaria a cargo do factor circulante (Stepanian & de Prost, 2006). Em 2008, Butenas e colaboradores concluíram que o FT circulante existe sob duas formas: uma forma solúvel e uma associada às micropartículas, que neste caso se apresenta numa forma encriptada e que só se torna disponível após ligação às plaquetas (Mezzano et al., 2008; Cimmino, Golino, & Badimon, 2011).

### 2.2.2. Factor VII (proconvertina)

O factor VII, sintetizado pelo fígado, é o único factor cuja forma activa circula no sangue (1% do total circulante) (Smith, 2009). É parcialmente activado pela fixação a fragmentos

membranários, que aparecem a seguir a uma lesão (Smith, 2010). Associado ao FT, forma um complexo capaz de induzir a sua própria activação aumentando assim a actividade enzimática para os dois substratos, os factores IX e X (Stepanian & de Prost, 2006).

## 2.3. Via comum

### 2.3.1. Factor X

O factor X pode ser activado (Xa) pelo complexo FT-FVIIa, na via extrínseca, ou pelo complexo formado pelos factores IXa e VIIIa, na via intrínseca. O factor Xa e o factor Va, formam o complexo protrombinase (Figura 4). É fortemente inibido pelo complexo antitrombina-sulfato de heparina e pelo inibidor da via do factor tissular (TFPI - *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) (Smith, 2010) descrito abaixo.

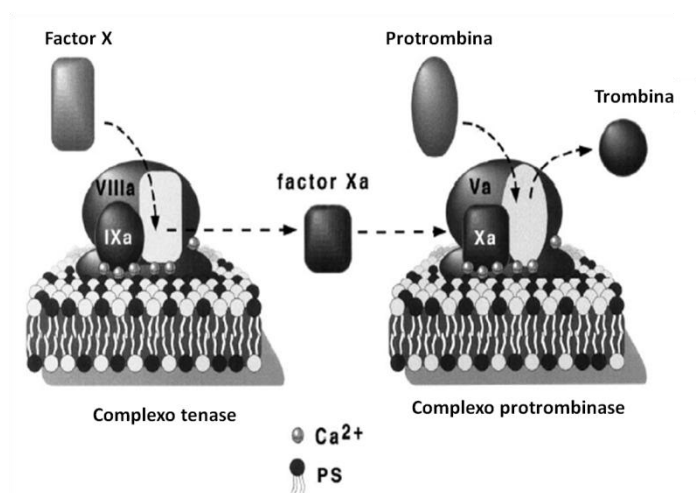


Figura 4: Formação dos complexos tenase e protrombinase  
(adaptado de Zwaal et al., 2004)

### 2.3.2. Factor V

O factor V circula no sangue e actua como cofactor, levando à amplificação das reacções nas quais está implicado, acelerando a conversão da protrombina em trombina pelo FXa. A proteólise do factor V activado (Va) pela proteína C activada resulta na incapacidade de fixar a protrombina e conseqüente perda da função do complexo protrombinase (Smith, 2010).

### 2.3.3. Protrombina (Factor II)

A síntese da protrombina pelo fígado bem como a sua libertação na corrente sanguínea são dependentes da vitamina K. A conversão da protrombina em trombina (por vezes chamada de factor IIa) é realizada pelos factores Xa, Va e fosfolípidos, que formam o complexo protrombinase (Figura 4), na presença de cálcio (Smith, 2010).

#### 2.3.4. Trombina

A trombina (forma activada do factor II – IIa) possui um papel central na coagulação, sendo responsável por (Esmon, 2004):

- i) converter o fibrinogénio em fibrina;
- ii) activar a via da proteína C;
- iii) activar o inibidor da fibrinólise activado pela trombina (TAFI);
- iv) autoamplificar a sua produção via factor XI e posterior formação do complexo protrombinase;
- v) activar o factor XIII e os cofactores V e VIII;
- vi) activar as plaquetas e os neutrófilos para que esses libertem, por exemplo, citocinas;
- vii) facilitar a exposição da superfície negativa da membrana fosfolipídica através da exposição do colagénio que lhe está associado.

A trombina é inibida pelas antitrombinas III e VI sendo esta última um produto de degradação da fibrina e fibrinogénio (PDF) e pelas globulinas  $\alpha_1$ -antitripsina e  $\alpha_2$ -macroglobulina. A heparina exerce a sua actividade anticoagulante inibindo a acção da trombina sobre o fibrinogénio (Smith, 2010).

#### 2.3.5. Fibrinogénio (Factor I)

O fibrinogénio é a proteína da coagulação mais abundante no sangue. É sintetizado no fígado. A polimerização dos monómeros leva a obtenção de um polímero de alto peso molecular, a fibrina (Smith, 2010).

#### 2.3.6. Fibrina

A clivagem do fibrinogénio, pela trombina, dá origem a monómeros de fibrina. A polimerização das cadeias por ligações fracas é reforçada pela acção do factor XIIIa que cria ligações covalentes (Smith, 2010).

#### 2.3.7. Factor XIII (Factor estabilizador da fibrina)

O factor XIII é sintetizado pelo fígado e monócitos. Cerca de metade circula livremente no plasma estando, a outra metade, contida nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas. É activado (XIIIa) pela trombina, sendo a sua taxa de activação aumentada com a presença da fibrina polimerizada (cofactor), o que pressupõe a necessidade de uma certa quantidade de fibrina inicialmente. Converte os monómeros solúveis em polímeros insolúveis formando ligações peptídicas fortes entre os fragmentos de fibrina. Esta actividade é dependente do cálcio e muito importante para a obtenção de um coágulo forte e estável. A reticulação (*crosslinking*) da

fibrina ao colagénio promove, pela formação de ligações covalentes, a adesão do coágulo à parede do vaso (Smith, 2010).

#### 2.4. Mecanismo da hemostase secundária

A via extrínseca é iniciada quando o FT entra em contacto com os factores VII ou VIIa levando à formação do complexo FT-FVIIa. Uma vez formado, o complexo converte os factores IX e X nas suas formas activas.

A via intrínseca inicia-se pela ligação do factor XII a uma superfície carregada negativamente, o que leva ao aumento da sua concentração localmente e à sua auto-activação. O factor XIIa activa a precalicreína (calicreína) e o factor XI (XIa). O factor IXa, quer pela via intrínseca quer pela extrínseca, forma, em associação com o factor VIIIa, o cálcio e os fosfolípidos, o complexo tenase responsável pela activação do factor X (Xa). A via comum inicia-se com a formação do complexo protrombinase que consiste na ligação do factor Xa ao factor Va, ao cálcio e a uma membrana fosfolípida. O complexo leva então à conversão da protrombina em trombina, a qual converte o fibrinogénio em fibrina. A fibrina é estabilizada pela acção do factor XIIIa (Smith, 2010; Norris, 2003) levando a formação de um coágulo estável (Figura 5).

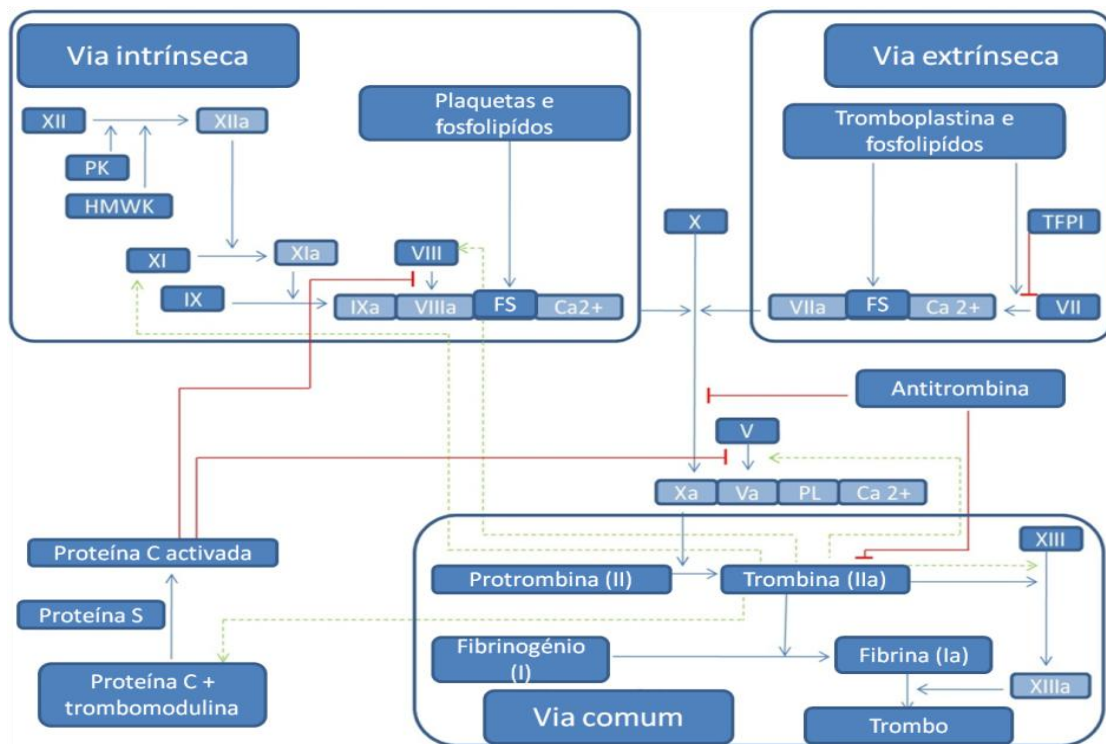


Figura 5: Cascata da coagulação

(adaptado de: [http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ\\_regeneration/cardiovascular-tissue-engineering-based-on-fibrin-gel-scaffolds](http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ_regeneration/cardiovascular-tissue-engineering-based-on-fibrin-gel-scaffolds)).

### **3. Hipótese “*cell based model*”**

Desde as publicações de Davie e Mac Farlane (1964), sobre o modelo de cascata e a independência das duas vias, e na qual a via de contacto ou via intrínseca tinha o papel preponderante na formação da trombina, vários estudos vieram contrariar essa hipótese pela descoberta de interações entre elas. Assim, em 2001, Hoffman e colaboradores propuseram o modelo conhecido hoje como “*cell-based model*” da coagulação, no qual a via extrínseca passou a ser a via principal na formação de trombina. Este modelo reconhece interações entre as células, que possuem receptores específicos para os factores, permitindo a concentração dos mesmos nos locais de lesão. As células envolvidas são os eritrócitos, as plaquetas, os leucócitos (granulócitos, monócitos e linfócitos) e as células endoteliais. O modelo apresenta três fases: iniciação, amplificação e propagação. A fase de iniciação corresponde à exposição do FT (Stavrou & Schmaier, 2010) e consequente formação do complexo FT-FVIIa, que leva à obtenção de uma pequena quantidade de trombina. Na fase de amplificação, a trombina criada previamente liga-se ao GPIb, receptor presente na superfície das plaquetas. Essa ligação leva a activação, com exteriorização, dos fosfolípidos e desgranulação das plaquetas de forma a recrutar mais plaquetas para o local da lesão (Batty & Graham Smith, 2010). A trombina gerada na fase de iniciação leva à clivagem do factor XI em XIa, activação do factor V e libera o factor VIII do factor de von Willebrand (Smith, 2009). A fase de propagação, que decorre na superfície das plaquetas, corresponde a formação da maior parte da trombina (McMichael, 2012). A importância da via de amplificação é sublinhada pelo facto das deficiências em factores VIII (hemofilia A), IX (hemofilia B) e XI levarem a alterações hemorrágicas.

### **4. Inibidores da coagulação**

#### **4.1. Inibidores da coagulação endógenos**

##### **4.1.1. Inibidor da Via do Factor Tissular**

O inibidor da via do factor tissular (TFPI -*Tissue Factor Pathway Inhibitor*), produzido e expresso à superfície das células endoteliais, é o inibidor do complexo FT-FVIIa e do factor Xa. Os megacariócitos, monócitos, fibroblastos pulmonares e as células sinoviais produzem uma pequena quantidade de TFPI (Maroney & Mast, 2012). A ligação do TFPI (Figura 6) ao factor Xa é reversível e dependente do cálcio, enquanto que a ligação ao complexo TF-VIIa é irreversível, requerendo cálcio e factor Xa (Broze & Girard, 2012). O TFPI não pára a coagulação mas limita a criação dos factores IXa e Xa pelo complexo FT-FVIIa (McMichael, 2012).

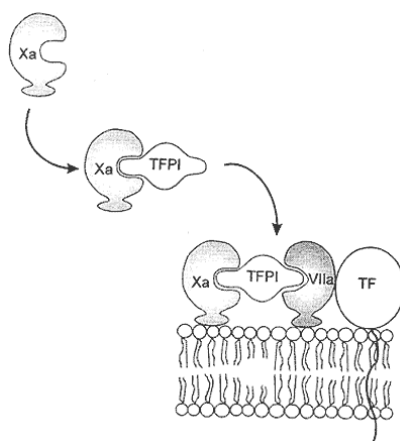


Figura 6: Inibição do complexo FT-FVIIa e do FXa pela ligação do TFPI

(adaptado de: <http://www.besancon-cardio.org/>)

#### 4.1.2. Antitrombina III

A antitrombina III (AT-III) é provavelmente o inibidor mais importante *in vivo* (Batty & Graham Smith, 2010). Inibe os factores IIa, IXa, Xa, XIa e XIIa através da formação de um complexo covalente. A acção da AT-III é dependente da presença de sulfato de heparina, cofactor também responsável pelo aumento da velocidade de formação desses complexos. O sulfato de heparina é uma molécula presente naturalmente na superfície das células endoteliais limitando a acção da antitrombina a essa localização (Batty & Graham Smith, 2010). Quando ligada à fibrina, a trombina está protegida da acção inibitória da antitrombina e da heparina, no entanto o mesmo não acontece quando há uma ligação covalente (AT-H) entre as duas moléculas (Figura 7). O complexo trombina-antitrombina-heparina, não é inerte, promovendo a conversão da superfície dos coágulos em superfícies anticoagulantes provocando a inibição da trombina presente no meio (Smith et al, 2008).

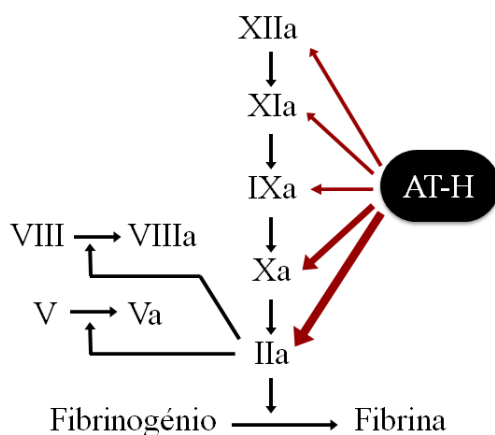


Figura 7: Factores inibidos pelo complexo antitrombina (AT)-heparina (H)

(adaptado de: [Http://www.besancon-cardio.org/](http://www.besancon-cardio.org/))

#### 4.1.3. A via da Proteína C

A função da via da proteína C é inactivar os factores VIIIa e Va, apresentando quatro componentes: a proteína C, a trombomodulina, a proteína S e o receptor endotelial da proteína C.

##### a) Proteína C

A proteína C é uma protease sérica dependente da vitamina K. A activação da via da proteína C requer a presença de trombina. As células endoteliais possuem, na sua superfície, receptores chamados trombomodulinas que permitem a ligação da trombina, que perde assim a sua actividade pró-coagulante (transformação do fibrinogénio em fibrina e activação do factor V). Esse complexo, trombina-trombomodulina, torna-se então um potente activador da proteína C (Esmon, 2000). A activação da proteína C pode ser fortemente aumentada pela sua ligação a um receptor transmembranário expresso pelo endotélio, o receptor endotelial da proteína C (EPCR – *endothelial protein C receptor*) (Batty & Graham Smith, 2010). No entanto, enquanto permanecer ligada ao EPCR, a proteína C activada não é eficaz como inibidor. Para isso, tem que se dissociar do EPCR e ligar-se à proteína S (Esmon, 2000; Norris, 2003). O complexo assim formado é responsável pela inibição dos factores Va e VIIIa diminuindo assim a formação de trombina (Smith, 2010). As citocinas pró-inflamatórias levam à diminuição dos receptores de trombomodulina e consequente diminuição da activação da proteína C. Além disso, em medicina humana, os processos inflamatórios graves, como a septicémia, podem induzir uma resistência à proteína C (Bauer & Moritz, 2012).

A proteína C activada aumenta a fibrinólise e representa ainda um papel importante na protecção das células por ser anti-apoptótica e ter propriedades anti-inflamatórias (Batty & Graham Smith, 2010). A proteína C é igualmente sujeita à acção de inibidores incluindo o inibidor da proteína C, a  $\alpha$ -1 antitripsina e a  $\alpha$ 2- macroglobulina (Esmon, 2000).

##### b) Trombomodulina

A trombomodulina é um receptor membranário que regula a actividade da proteína C pela trombina. A proteína C é activada após o aparecimento de uma pequena quantidade de trombina. A trombomodulina fixa a trombina levando à perda das capacidades pró-coagulantes desta. O complexo passa a ter a capacidade de activar a proteína C (Smith, 2010). A expressão da trombomodulina é diminuída pelos mediadores inflamatórios e activação dos neutrófilos (Esmon, 2004).

### c) Proteína S

A proteína S age como cofactor da proteína C aumentando assim a velocidade de degradação dos factores Va e VIIIa. O complexo proteína C – proteína S inicia a fibrinólise (Smith, 2010).

#### 4.1.4. Outros inibidores

O inibidor da C1 esterase inibe a calicreína e os factores XIa e XIIa.

A  $\alpha_1$ -antitripsina, inibe além da tripsina, a plasmina e os factores Xa e XIa.

A  $\alpha_2$ -macroglobulina é inibidor de várias proteases das quais se destacam a calicreína, a trombina e plasmina (Smith, 2010).

## 4.2. Inibidores exógenos da coagulação

### 4.2.1. Injectáveis

#### a. Heparina não fracionada

A heparina fixa-se à antitrombina, modificando a sua conformação e aumentando a velocidade de inactivação das enzimas da coagulação. A heparina leva a libertação de TFPI o que contribui igualmente para o seu efeito anticoagulante (Broze & Girard, 2012). Para a mesma concentração, o efeito anticoagulante varia em função do indivíduo e da ligação a outras proteínas para além da antitrombina.

Administrada por via subcutânea ou intravenosa, em bolus ou perfusão contínua, a monitorização do seu efeito é realizada pelo controlo do tempo de tromboplastina parcialmente activada (aPTT) (Ramsey, 2011).

#### b. Heparina de baixa massa molecular

A heparina de baixo peso molecular é composta por várias cadeias moleculares, umas com acção na trombina e outras no factor Xa. A proporção entre as diferentes cadeias condiciona a sua actividade anti-trombina e anti-factor Xa. Ao contrário da heparina não fragmentada, a libertação pelas plaquetas do factor anti-heparina não influencia a sua eficácia. O seu tempo de semi-vida é independente da dose administrada e duas vezes superior ao da heparina não fracionada. A dose administrada deverá ser calculada em função do peso e adaptada à função renal (acumulação em caso de doença renal).

O principal risco nos tratamentos com heparina é o de hemorragia, embora seja menos significativo quando usada a heparina de baixa massa molecular. Nestes casos o sulfato de protrombina funciona como antídoto neutralizando as cadeias mais pesadas. A actividade da

heparina não fracionada é totalmente inibida enquanto a da heparina de baixo peso molecular, só vê a sua actividade anti-trombina inibida.

#### 4.2.2. Orais

##### a. Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico inibe as ciclooxigenase (COX) impedindo assim a produção de prostaglandinas e tromboxanos, o que resulta na diminuição da agregação plaquetária (Ramsey, 2011).

##### b. Clopidogrel

O clopidogrel impede a ligação do ADP aos respectivos locais de ligação nas plaquetas, prevenindo assim a activação do receptor glicoproteico IIb/IIIa necessário à agregação plaquetária. Em medicina veterinária, é sobretudo utilizado nos gatos com cardiomiopatia hipertrófica de forma a prevenir eventos trombóticos (Ramsey, 2011).

## 5. Fibrinólise

A fibrinólise, terceiro tempo da hemostase, permite a dissolução do coágulo, sob acção de uma enzima proteolítica, a plasmina. Este fenómeno apresenta numerosos inibidores ( $\alpha_2$ -antiplasmina, inibidor do activador do plasminogénio e inibidor da fibrinólise activado pela trombina) dos quais certos necessitam de fibrina como cofactor (Figura 8). A fibrinólise limita-se ao local da lesão. Qualquer plasmina que escape do local da lesão é imediatamente inibida pelas antiplasminas. A fibrinólise ocorre entre 60 e 72h após a formação do coágulo.

Este processo ocorre em duas fases:

- formação de plasmina por activação do precursor inactivo, o plasminogénio;
- degradação da fibrina

Embora o primeiro objectivo da fibrinólise seja a remoção do coágulo, vários componentes deste sistema estão igualmente envolvidos na reparação do tecido lesado (Mc Connell, 2000).

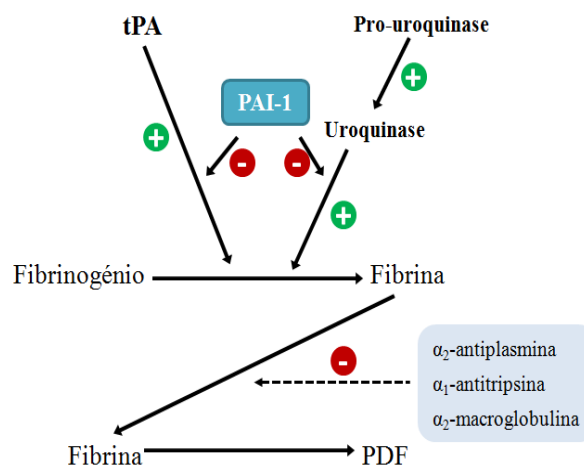


Figura 8: Activadores e inibidores da fibrinólise

Adaptado de: Forterre, 2013

### 5.1. Plasminogénio

O plasminogénio é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado e que circula no sangue. Nos mamíferos, existem dois activadores do plasminogénio: o activador tissular do plasminogénio e activador uroquinase do plasminogénio.

#### 5.1.1. Activador tissular do plasminogénio

O activador tissular do plasminogénio (tPA) é produzido pelas células endoteliais em resposta a estímulos químicos, como por exemplo a bradicinina, histamina, adrenalina, trombina e factor de activação plaquetário (PAF) (McMichael, 2012). Uma pequena porção circula livremente no plasma, estando a maior parte ligada ao seu inibidor (inibidor do activador do plasminogénio). Ambos são rapidamente removidos da circulação pela ligação aos receptores das células endoteliais e hepáticas. A actividade enzimática do tPA é fraca na ausência de fibrina (Mc Connell, 2000).

#### 5.1.2. Activador uroquinase do plasminogénio

O activador uroquinase do plasminogénio (uPA) é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais do rim, fibroblastos e células endoteliais (McMichael, 2012). É secretada na forma de uma única cadeia molecular (pro-uroquinase) e clivada pela plasmina ou caliceína na sua forma activa (Batty & Graham Smith, 2010).

O tPA parece ser o maior activador de plasminogénio nos vasos enquanto o uPA parece ser o activador principal a nível extravascular (Mc Connell, 2000).

## 5.2. Plasmina

A plasmina hidrolisa numerosas proteínas como os factores V e VIII, o fibrinogénio e a fibrina. Ao contrário do plasminogénio, a plasmina, em condições fisiológicas, está ausente do plasma pois as antiplasminas circulantes (AT,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina e  $\alpha_2$ -antiplasmina) inactivam-na. A degradação da fibrina polimerizada origina os produtos da degradação da fibrina (PDF), dos quais se destaca os D-dímeros, provenientes da degradação das ligações cruzadas entre as moléculas de fibrina. A presença de D-dímeros significa que a fibrina polimerizada foi sujeita a reticulação (Mc Connell, 2000).

## 5.3. Inibidores da fibrinólise

A actividade do sistema plasminogénio/plasmina pode ser controlada pelos níveis de plasmina, pela  $\alpha_2$ -antiplasmina, pelos níveis de activação do plasminogénio, pelo inibidor do activador do plasminogénio e indirectamente pelo inibidor da fibrinólise activado pela trombina. A proteólise do fibrinogénio e da fibrina, como já foi referido, leva à produção de produtos de degradação da fibrina (Mc Connell, 2000).

### 5.3.1. Inibidor do activador do plasminogénio 1

O inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1) é o maior inibidor dos activadores de plasminogénio tPA e uPA. Produzido por várias células como megacariócitos, células endoteliais e hepatócitos, é também encontrado nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas (Batty & Graham Smith, 2010). Apresenta-se em excesso no plasma relativamente à quantidade presente de tPA, protegendo assim o coágulo em formação de uma fibrinólise prematura. Quando da formação de um trombo, o tPA, que apresenta uma afinidade muito forte para a fibrina, fixa-se preferencialmente a esta (Craen, Declerck, & Gils, 2012).

### 5.3.2. $\alpha_2$ -antiplasmina

A  $\alpha_2$ -anti-plasmina ( $\alpha_2$ -AP) é o maior inibidor da plasmina mas pode igualmente ligar-se ao plasminogénio, interferindo com a sua activação. A plasmina quando ligada à fibrina está protegida deste inibidor (Mc Connell, 2000).

### 5.3.3. Inibidor da fibrinólise activado pela trombina

O inibidor da fibrinólise activado pela trombina (TAFI) é uma proteína sintetizada no fígado e libertada como zimogénio. A activação pela trombina e pela plasmina é lenta sendo fortemente acelerada pelo complexo trombina-trombomodulina. Ainda não foi identificado nenhum inibidor do TAFI (Smith, 2010).

## 6. Influência da idade e da inflamação na coagulação

### 6.1. Idade

A idade avançada está associada a um estado pró-trombótico, em parte pela activação da hemostase pelas citocinas inflamatórias. Mari et al, (1995) observaram que os idosos com idades avançadas (mais de 100 anos) apresentavam níveis aumentados de fibrinogénio, factores de coagulação VII e VIII e D-dímeros. Foi igualmente observado, no mesmo estudo, uma correlação positiva entre as concentrações elevadas de factores X e IX sugerindo fenómenos associados. É provável que ambos sejam resultados do aumento da actividade enzimática do complexo FT-FVIIa. O aumento na expressão e disponibilidade do FT, possivelmente devido a modificações associadas ao envelhecimento das quais se pode destacar os ateromas, aumenta a expressão do factor VII (Stepanian et al, 2006). A expressão do FT pode ser induzida por uma grande variedade de agonistas como endotoxinas, citocinas, linfócitos activados e factores de crescimento (Kirchhofer & Nemerson, 1996).

As razões pelas quais a inflamação e a coagulação se encontram activadas nos indivíduos idosos não estão totalmente estabelecidas e parecem ser multifactoriais. Os estudos orientam-se para a hipótese do stress oxidativo estar na origem de um estado pró-inflamatório (Chung et al, 2006). A idade está associada ao aumento das prostaglandinas pró-inflamatórias como a ciclooxigenase e lipooxigenase assim como ao declínio do sistema anti-oxidante levando a uma alteração no equilíbrio redox, o que activa a transcrição do factor NF- $\kappa$ B, que permite melhorar a expressão do FT na superfície dos monócitos (Levi & van der Poll, 2005) e conduz ao aumento dos mediadores inflamatórios (TNF e IL-6) (Kale & Yende, 2011). As citocinas desempenham um papel crítico na resposta inflamatória pela activação de neutrófilos que, por sua vez, libertam mediadores inflamatórios como a elastase e radicais livres, capazes de levar a microlesões do endotélio (El Assar, Ângulo, & Rodríguez-Mañas, 2013).

Num estudo de 2007, Goy-Thollot et al demonstraram que um aumento do cortisol basal nos animais mais velhos está ligado à secreção alterada das glândulas supra renais. Uma das hipóteses é a diminuição da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário ao *feed-back* negativo exercido pelos glucocorticóides nos indivíduos mais velhos. No Homem como nos cães, a actividade basal do eixo hipotálamo-hipofisário é controlada por dois tipos de receptores: os receptores dos mineralocorticóides situados predominantemente no hipocampo e os receptores dos glucocorticóides, localizados na hipófise e hipocampo. Vários autores demonstraram que com a idade esses receptores tendem a desaparecer (Pereira, 2003; Miller & O'Callaghan, 2003), levando à estimulação do eixo com o conseqüente aumento dos níveis

basais de cortisol. O excesso de cortisol, quer secundário a uma produção endógena excessiva quer a uma administração, podem ser responsáveis por um perfil hipercoagulável (Rose et al, 2011; van der Pas, Leebeek, Hofland, de Herder & Feelders, 2013). O aumento da concentração plasmática de cortisol pode estar potencialmente associada à formação de trombos pelo aumento dos factores pró-coagulantes (II, V, VII, IX, X, XII) e fibrinogénio assim como uma diminuição da antitrombina (Gosselin & Feldman, 2001). No entanto, não existe um consenso e os resultados contradizem-se nos vários estudos (Klose et al., 2011; Rose et al, 2011). Uma das explicações pode ser o uso dos testes de coagulação tradicionais (contagem plaquetária, PT, aPTT, D-dímeros) que não são sensíveis para a detecção de um estado hipercoagulável. Outra é a falta de estudo longitudinal sobre mudanças nos factores de coagulação em pacientes com hiperadrenocorticismo que desenvolvem tromboembolias.

## **6.2. Inflamação**

Em resposta a uma agressão, (infecciosa ou traumática) desenvolve-se um foco inflamatório constituído por células e citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, TNF e IL-6 (Gruys, Toussaint, Niewold, & Koopmans, 2005). A acção das citocinas no fígado resulta no aumento da expressão das proteínas da fase aguda das quais se destaca a proteína C-reativa (PRC), considerada como marcador da resposta inflamatória (Dupuy et al., 2003). A IL-6 parece ser a principal responsável pela síntese da CRP no fígado (Weinhold et al., 1997). No entanto, a acção da IL-6 necessita a presença de IL-1 e glucocorticóides (Dupuy et al., 2003). O aumento de CRP reflecte a presença e intensidade da inflamação pois as suas concentrações aumentam rapidamente durante a inflamação e decrescem também de forma rápida após o seu término. Não se conhece nenhum sistema inibidor. A curta duração de acção das citocinas e a ausência de estimulação é responsável pela diminuição da síntese (Gruys et al., 2005). Em medicina humana é muito utilizada como marcador da inflamação e para monitorização de doença e terapêutica (Dupuy et al., 2003).

No cão, é a proteína de fase aguda da inflamação mais importante (Nakamura et al., 2008). No entanto, o seu doseamento, por rotina, não é efectuado. O aumento na expressão do FT na superfície das células endoteliais, monócitos e macrófagos, parece ser induzido pelas citocinas TNF e IL-1 (Esmon, 2004). A CRP estimula, quanto a ela, a síntese de FT, nos locais de inflamação e lesão tecidual, pelos monócitos. O complexo FT-FVIIa activa a superfície das células os receptores activados por proteases, o que leva ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF) (Smith, 2010).

O factor de activação plaquetária, produzido pelo sistema imunológico, conduz à agregação e desgranulação das plaquetas sanguíneas. Durante a primeira fase da resposta aguda, a CRP

inibe a agregação plaquetária pela sua ligação ao factor de activação plaquetária. A inibição das fosfolipases resulta na inibição da libertação de ácido araquidónico, bloqueando nessa fase a produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo, leucotrienos e tromboxanos (Vigo, 1985).

A via antitrombina-heparina pode regular a resposta inflamatória pela modulação das respostas celulares. Assim a antitrombina ligada às células endoteliais aumenta a formação de prostaciclina. Em certos casos de inflamação, essa via pode estar deprimida (Natali Bauer, Mensinger, Daube, Failing, & Moritz, 2012). A diminuição das moléculas como a heparina na circulação deve-se a libertação de produtos pelos neutrófilos activados e citocinas inflamatórias. Em caso de sépsis ou inflamação aguda, a actividade da antitrombina é diminuída e a pequena quantidade presente é rapidamente utilizada e até inactivada por proteólise. A diminuição da quantidade de inibidores presentes leva a um aumento da estabilidade das enzimas da coagulação e favorece em consequência, a coagulação intravascular (Esmon, 2004).

A via da proteína C aparece como particularmente sensível à supressão pela resposta inflamatória (Esmon, 2004). A trombomodulina e a transcrição do gene para o receptor C das células endoteliais é inibido pela IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e endotoxinas. Esta supressão limita a activação de proteína C, o que promove a formação de trombos (Natali Bauer et al., 2012).

Os neutrófilos sintetizam uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios, incluindo os leucotrienos, prostaglandinas e citocinas, sendo a maior parte destes envolvidos na resposta imunitária inata. Nos locais de inflamação, a libertação desses mediadores (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) amplifica o processo inflamatório (Wright, Moots, Bucknall & Edwards, 2010).

A acção sistémica das citocinas resulta numa activação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, com consequente aumento da produção de ACTH e logo de cortisol pelo córtex da adrenal (Dupuy et al., 2003). Os glucocorticóides agem, directamente ou em sinergia com a IL-1 e IL-6, no aumento da produção de proteínas da fase aguda pelo fígado mas inibem a expressão dos genes codificando para as citocinas e diminuem assim a libertação pelos macrófagos e monócitos (Gruys et al., 2005). As citocinas induzem a síntese de corticóides e em consequência, de cortisol endógeno responsável pelo *feed-back* negativo (Weinhold et al., 1997) (Figura 9). Nos casos de estimulação crónica, a resposta é inferior à observada nos casos de inflamação aguda. Este fenómeno pode ter a sua origem na insuficiência de mediadores, um tempo de regeneração insuficiente ou ainda a incapacidade do fígado em responder a um estímulo prolongado (Freund, Orjalo, Desprez, & Campisi, 2010; Gruys et al., 2005).

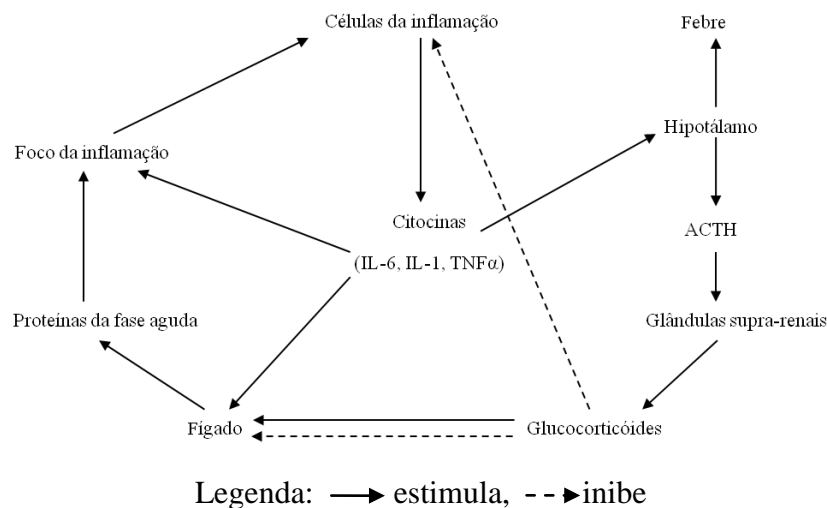


Figura 9: Representação esquemática da actividade dos mediadores da inflamação  
(adaptado de Gillet, 2002)

### 6.3. Idade e inflamação

O estado inflamatório crónico que se encontra associado à idade, designado *inflamm-aging*, está relacionado com o envelhecimento do sistema imunitário (imunosenescência). Sabe-se que há acumulação de células T senescentes e um aumento das citocinas pró-inflamatórias circulantes (IL-4, 6 e 10), no entanto, a razão por que tal acontece não foi ainda totalmente esclarecida (Lang et al, 2011).

A imunosenescência é definida como um complexo multifactorial de alterações que predis põem a infecções, neoplasias e doenças auto-imunes (Aw, Silva & Palmer, 2007). Está descrita em medicina veterinária, no cão, no gato e no cavalo (Day, 2010). O *inflamm-aging* parece ser secundário à passagem de uma resposta de tipo celular (Th1) para uma resposta de tipo humoral (Th2) e à acumulação de células T senescentes devido, provavelmente, à estimulação crónica do sistema imunitário (Vallejo, Weyand, & Goronzy, 2004). No Homem, essa estimulação contínua parece ser provocada pelo citomegalovírus (Almanzar et al, 2005; Schmaltz et al, 2005). A imunosenescência parece ser causada pelo fim do *pool* de células T *naïves* pois tal como as outras células somáticas, apresentam uma capacidade proliferativa limitada, alcançando por isso um estado de célula T senescente (Lang et al, 2011). A célula senescente apresenta uma paragem, estável e irreversível, da divisão mitótica. As citocinas produzidas por essas células senescentes, como a IL-6, são potentes activadores da imunidade inata, levando à libertação de agentes oxidantes, responsáveis por danos tecidulares (Freund et al., 2010).

A activação da imunidade inata parece ser responsável pelo perfil pró-inflamatório, chamado *inflamm-aging* (Salminen et al., 2008; Lang et al, 2011) associado a níveis circulantes

crônicos aumentados de marcadores inflamatórios como a IL-6, TNF- $\alpha$ , antagonista dos receptores da IL-1 e CRP.

Os níveis de IL-6 estão aumentados em indivíduos idosos, independentemente do estado de saúde. Os níveis podem estar 2 a 4 vezes aumentados relativamente a indivíduos jovens (Kale & Yende, 2011). No cão, alterações similares são observadas como a alteração das células T (Day, 2010).

Embora a correlação entre inflamação e envelhecimento esteja demonstrada, é difícil estabelecer qual a causa. Esta dificuldade deve-se à natureza difusa da inflamação crônica e à necessidade de estudos de longa duração.

Estudos em medicina humana destacam a síndrome, conhecida como a síndrome da fragilidade (*frailty syndrome*) (Franceschi et al, 2000), que se caracteriza, em indivíduos idosos, por uma perda de peso, fraqueza muscular, cansaço, declínio da actividade, marcha lenta e instável (Fried et al, 2001). Walston et al., (2002) demonstraram uma associação entre o aumento dos marcadores da inflamação e factores pró-coagulantes (CRP, FVIII e fibrinogénio) e a síndrome de fragilidade, quer na ausência quer na presença de doenças crónicas diagnosticadas.

No entanto, estudos sobre a influência da idade nas concentrações de CRP, em cães saudáveis, não demonstraram a existência de variações significativas nas concentrações. Num estudo, no qual foram utilizados animais saudáveis com idade inferior a 13 anos, não se verificou quaisquer alterações nas concentrações da CRP, mantendo-se esta, dentro dos valores normais (Gillet, 2002). Outro estudo, sobre a influência do stress e do tipo de vida dos animais, revelou que os animais mantidos em ambiente controlado, ou seja com menor estimulação do sistema imunitário, apresentavam concentrações significativamente inferiores de CRP, sugerindo que a estimulação do sistema imunitário leva a valores mais elevados (Gillet, 2002).

Os glucocorticóides modulam a resposta da fase aguda, estimulando a produção de proteínas em sinergia com IL-1, IL-6 e factores de crescimento. No entanto, inibem a síntese e libertação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e monócitos, permitindo, assim, um limite na toxicidade das interleucinas (Gruys et al., 2005). As citocinas geram um mecanismo de retro-alimentação negativa pela estimulação da síntese de corticóides. Os glucocorticóides e os factores de crescimento regulam a produção de CRP, ao modularem a libertação de citocinas e a resposta do fígado (Gillet, 2002).

## **7. Avaliação dos parâmetros da coagulação**

### **7.1. Avaliação da hemostase primária**

#### **7.1.1. Tempo de hemorragia**

Após realização de uma pequena incisão na mucosa bucal conta-se o tempo até que a hemorragia cessa. No cão os valores normais situam-se entre os 2 e os 5 minutos, se o tempo for superior a 6 minutos indica um défice da hemostase primária.

Aumentos do tempo de hemorragia são observados, por exemplo, em caso de doença de vonWillebrand e trombocitopénia (Mc Connell, 2000).

#### **7.1.2. Contagem e morfologia plaquetária**

As plaquetas normais aparecem ao microscópio com um diâmetro de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , anucleadas e ovais. Os valores de referência para a contagem plaquetária, no cão, estão compreendidos entre 200 000 e 500 000/ $\mu\text{L}$  (Smith, 2010).

### **7.2. Avaliação da hemostase secundária**

#### **7.2.1. Tempo de protrombina**

O tempo de protrombina (PT) detecta as anomalias da coagulação nas vias extrínseca e comum. A formação do coágulo é artificialmente iniciada pela presença do FT, obtido em tecido cerebral, cálcio e fosfolípidos pró-coagulantes, proporcionando assim a carga negativa encontrada *in vivo*. O PT é sensível ao défice dos factores VII, X, V, II e fibrinogénio. Um aumento do PT pode estar associado a uma intoxicação por dicumarínicos, insuficiência hepática ou coagulação intravascular disseminada (Figura 10). A deficiência em factor VII leva ao aumento do PT sem que os outros testes de coagulação apresentem alterações (Tvedten, 2012).

#### **7.2.2. Tempo parcial de tromboplastina activada**

O tempo parcial de tromboplastina activada (aPTT) explora a via intrínseca (factores de contacto e factores hemofílicos A e B) e a via comum (FV, X, II e fibrinogénio). O coágulo é artificialmente iniciado pela adição de fosfolípidos (cefalina), uma superfície activadora como o ácido elágico, sílica ou caulino e cálcio em excesso. As principais anomalias que levam a um aumento do aPTT são os défices da via endógena (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II, precalicreína e cininogénio) (Tvedten, 2012) (Figura 10).

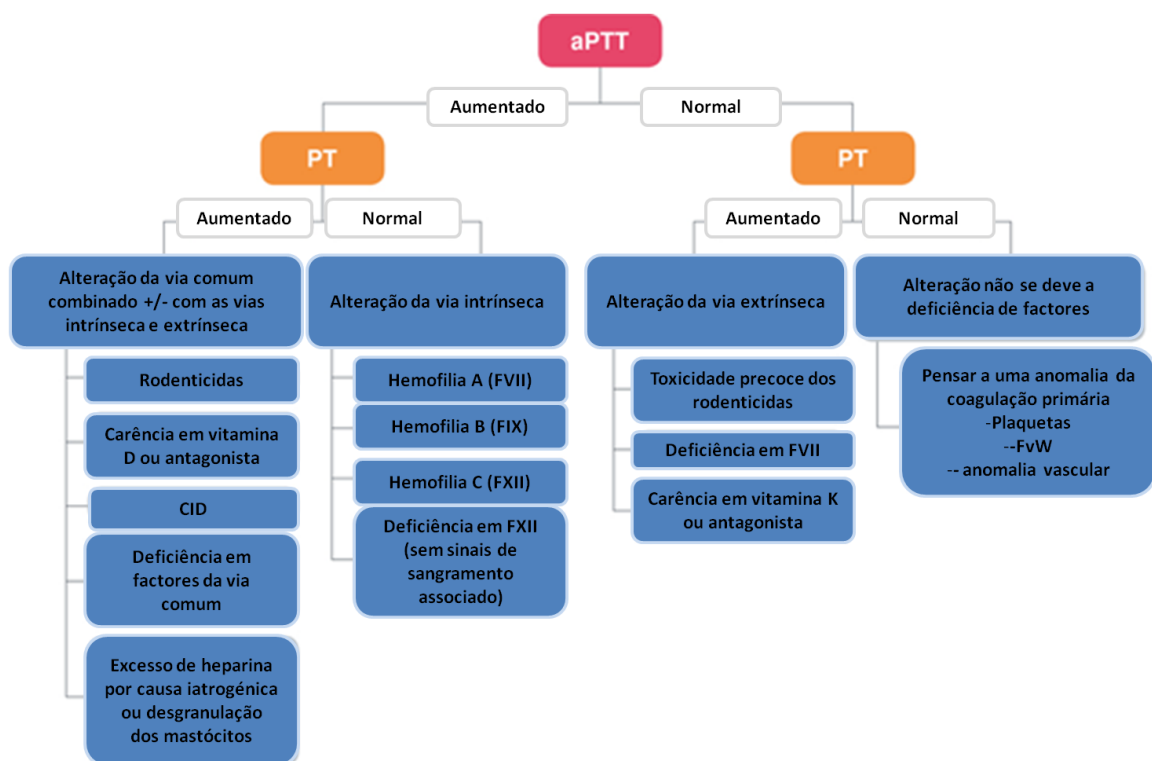


Figura 10: Diagrama dos diferentes resultados dos testes de PT e aPTT

(adaptado de: [http://www.idexx.fr/html/fr\\_fr/corporate/home.html](http://www.idexx.fr/html/fr_fr/corporate/home.html)).

### 7.3. Avaliação da fibrinólise

Os produtos de degradação da fibrina resultam, como referido, da acção proteolítica da plasmina sobre o fibrinogénio e sobre os polímeros de fibrina, resultando na obtenção de fragmentos. O mais caracterizado é o D-dímero sendo reconhecido como o mais específico marcador para a trombose e fibrinólise fisiológica, é utilizado para pesquisa de eventos tromboembólicos. A determinação simultânea dos níveis de produtos de degradação da fibrina e do fibrinogénio e D-dímero permite avaliar o grau de activação da coagulação (Tvedten, 2012).

## 8. Avaliação da hemostase através da tromboelastometria

A tromboelastografia, desenvolvida por Hartert em 1948, permite uma avaliação global da hemostase através da análise das interacções entre os diferentes factores, inibidores e componentes celulares durante as fases da coagulação e posterior lise (Goggs & Winberg, 2012; Kol & Borjesson, 2010). A técnica, realizada em sangue total, permite avaliar as alterações de viscosidade durante a formação do coágulo

Nos anos 80, apareceram no mercado equipamentos portáteis e mais fiáveis: o TEG® (*thromboelastography*) e o ROTEM® (*rotational thromboelastometry*) (Figura 11). Ambos os

equipamentos apresentam o mesmo princípio de base, obtendo-se gráficos que no ROTEM<sup>®</sup>, tomam o nome de temograma. Embora a técnica seja similar, os resultados obtidos não podem ser comparados directamente pois apresentam diferenças nomeadamente o programa de tratamento dos dados, os volumes das amostras ou ainda os reagentes (McMichael et al., 2014).

Como no presente trabalho foi utilizado o ROTEM<sup>®</sup>, só este equipamento será sumariamente descrito.



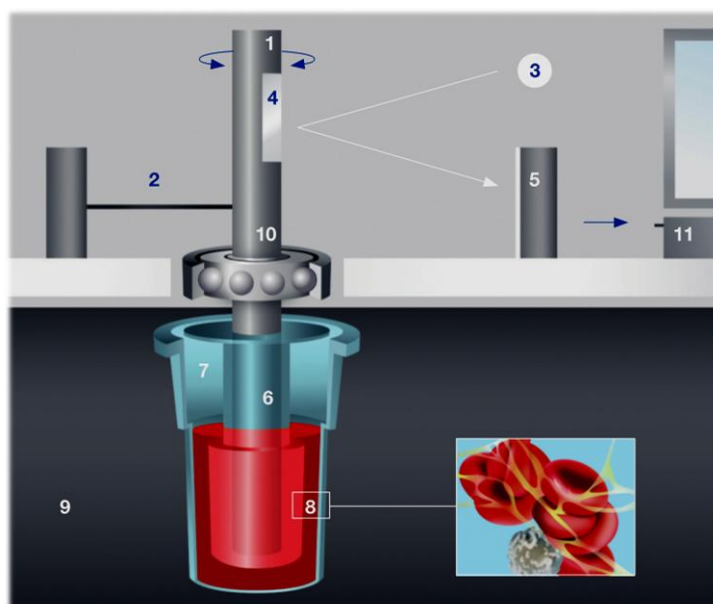
Figura 11: Visão global do ROTEM<sup>®</sup> delta

(Adaptado de: <http://ROTEM®.de/>).

### **8.1.Princípios gerais da técnica e funcionamento**

O princípio básico da técnica baseia-se no facto de que o sangue ao coagular passa por vários níveis de viscosidade, que se traduzem na firmeza do coágulo. A representação da medida da firmeza do coágulo ao longo do tempo permite, através da análise dos seus componentes gráficos, a avaliação integrada da hemostase.

O procedimento analítico é simples e consiste na colocação da amostra de sangue num copo, cujo suporte (9, Figura 12) é acoplado ao instrumento de modo que o pino cilíndrico (eixo oscilatório e haste de medição, 1 e 6, Figura 12) seja imerso no copo. O pino entra em movimento rotacional para a direita e para a esquerda com um ângulo de 4.75° (PROVETS). À medida que o sangue coagula (8, Figura 12), a firmeza do coágulo aumenta restringido os movimentos do pino. Uma firmeza do coágulo de 0mm de amplitude no gráfico corresponde a um eixo de rotação livre enquanto uma firmeza de 100mmde amplitude no gráfico (teórico) representa um bloqueio completo do eixo. Um sistema de detecção óptico (5, Figura 12) caracteriza a amplitude desses movimentos que, após integração (11, Figura 12), são traduzidos em temogramas.



- |                     |   |
|---------------------|---|
| 1. Eixo oscilatório | 7. Cuvete com a amostra                           |
| 2. Mola             | 8. Filamentos de fibrina e agregados plaquetários |
| 3. Feixe luminoso   | 9. Suporte para cuvette                           |
| 4. Espelho          | 10. Rolamento de esferas                          |
| 5. Detector         | 11. Unidade para tratamento de dados              |
| 6. Haste de medição |   |

Figura 12: Funcionamento do ROTEM®

(adaptado de <http://ROTEM®.de/>).

## 8.2. Temogramas

O temograma (figura 13) é uma representação gráfica da análise tromboelastométrica de uma amostra sanguínea, após detecção e integração dos dados. Nela estão representados os diferentes parâmetros da análise que, após interpretação, podem indicar, de uma forma mais realista, o perfil da hemostase do indivíduo.

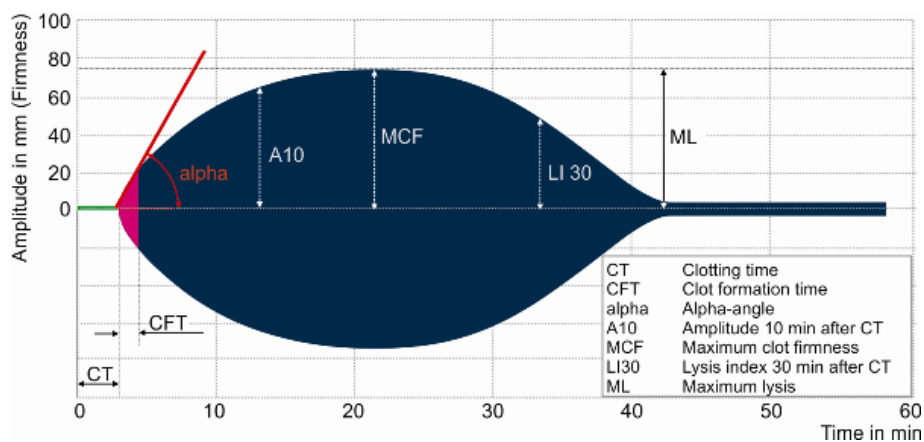


Figura 13: Temograma tipo obtido com o ROTEM®

(adaptado de <http://rotem®.de/>).

Os parâmetros da análise tromboelastométrica são:

- **Tempo de coagulação** (CT - *clotting time*): é o tempo, expresso em segundos, desde o início da análise até que seja atingida uma amplitude de 2 mm no temograma. Corresponde ao aparecimento dos primeiros filamentos de fibrina. Este parâmetro é análogo ao tempo de coagulação do teste clássico. No entanto, ao contrário do teste clássico, é necessária uma maior formação de fibrina para se obter um certo grau de firmeza.

- **Tempo de formação do coágulo** (CFT - *clotting formation time*): é o tempo, expresso em segundos, entre a amplitude de 2 mm até a obtenção de uma amplitude de 20 mm. Corresponde a formação de um coágulo estável com fibrina e plaquetas activadas. É influenciado pela quantidade de plaquetas e pela quantidade de fibrina assim como pela sua capacidade de polimerização.

- **Ângulo alfa**: é o ângulo formado entre a linha mediana do temograma e a tangente da curva da coagulação, passando pelo ponto de 2 mm. Corresponde à velocidade de formação do coágulo. Um ângulo reduzido indica um estado hipocoagulável.

- **Firmeza máxima do coágulo** (MCF, *Maximum Clot Firmness*): corresponde ao índice de firmeza do coágulo e em consequência, à sua qualidade. Este parâmetro corresponde à amplitude máxima atingida antes da dissolução do coágulo por fibrinólise e diminuição da firmeza. Um valor baixo indica um coágulo com um fraco grau de firmeza e consequentemente um risco de hemorragia. O contrário pode indicar um estado hipercoagulável.

- **Valor A (x) mm**: é um índice de firmeza do coágulo. Esse valor corresponde a uma amplitude observada no tempo “x” após CT, por exemplo, A10 é a amplitude registada 10 minutos após o início da formação do coágulo.

- **LI 30**: é um índice de fibrinólise observado 30 minutos após CT. Corresponde à relação entre a amplitude e a firmeza máxima do coágulo. Os parâmetros LI45 e LI60 descrevem as firmezas 45 e 60 minutos após CT. Nos indivíduos saudáveis, é quase impossível observar uma fibrinólise devido à grande concentração em inibidores. Os valores anormais de LI30 (inferiores aos valores de referência) indicam muitas vezes uma hiperfibrinólise.

- **Lise máxima** (ML: *Maximum Lysis*): descreve o grau de fibrinólise em relação ao grau de firmeza máxima atingida pelo coágulo durante a medição. Assim um valor de 5% significa que a MCF diminuiu 5% durante o período considerado. É expresso em percentagem do MCF.

O recurso a activadores além de poder encurtar o tempo de leitura (parâmetros de estabilidade obtidos em 15 minutos e os primeiros sinais de lise em 30 minutos), permite privilegiar uma via em detrimento de outra. A análise em modo EXTEM permite explorar a via extrínseca

pela adição de tromboplastina tissular. O INTEM permite, graças a adição de um factor de contacto, o ácido elágico, a activação da via intrínseca. No modo FIBTEM, as plaquetas encontram-se bloqueadas pela citocalasina D e o coágulo só irá depender da formação e polimerização do fibrinogénio. O uso de activadores é igualmente importante para minimizar as possíveis variações durante a análise (de Laforcade, Goggs, & Wiinberg, 2014).

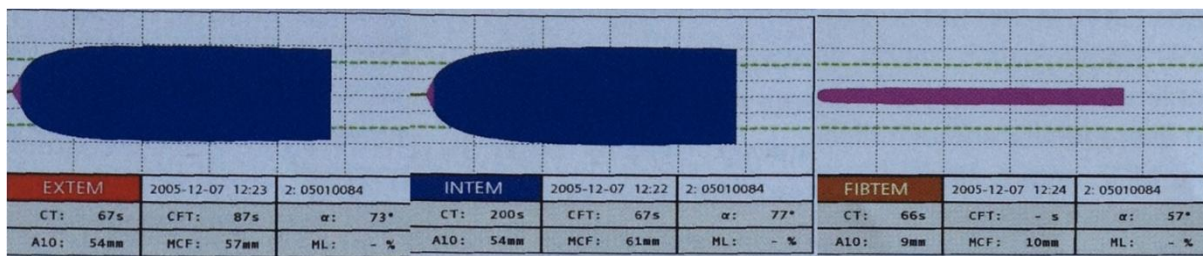


Figura 14: temogramas do tipo extem, intem e fibtem (adaptado de <http://ROTEM®.de/>)

### 8.3. Interesse da tromboelastometria, vantagens e limitações

Actualmente, em muitos casos, a detecção de um estado hipo ou hipercoagulável passa pela utilização dos testes clássicos de PT e aPTT, medição da concentração em fibrinogénio e plaquetas. No entanto, existe uma correlação muito fraca entre os valores obtidos e o real risco de hemorragia. Em medicina humana, assim como em medicina veterinária, o aumento do interesse e utilização da técnica tromboelastométrica prende-se com a obtenção de melhores valores preditivos de eventos trombóticos ou hemorrágicos comparados com os métodos clássicos.

Em medicina humana, a tromboelastometria (TEM) é sobretudo utilizada nos casos de transplantes hepáticos e cirurgias cardíacas, permitindo seguir as anomalias da coagulação e assim adaptar a quantidade de produtos sanguíneos transfundidos. É também utilizada para verificar a eficácia de certos tratamentos como, por exemplo, a administração de heparina ou ainda nos casos de sépsis (Ostrowski, Sørensen, Larsen, & Johansson, 2011; Sankarankutty, Nascimento, Teodoro da Luz, & Rizoli, 2012).

Embora o uso da tromboelastometria já tenha sido aprovada em cães, gatos e cavalos (McMichael & Smith, 2011; PROVETS), as discrepâncias obtidas nos vários estudos, muitas vezes, devido as diferentes metodologias utilizadas, assim como a ausência de registos (por exemplo contagem plaquetária, concentração em fibrinogénio e hemograma) dificultam a interpretação e comparação dos valores. Para minimizar essas diferenças, foi criado o "Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization" cujos trabalhos culminaram na publicação de diretrizes "Evidence based guidelines on TEG®/ROTEM® assays in veterinary medicine".

Como observado para a maior parte dos testes para avaliação da hemostase, vários estudos sobre a utilização do ROTEM® e do TEG® mostraram a influência de certos parâmetros, como o tipo de colheita e o tempo de armazenamento do sangue, sobre os valores obtidos (Goggs & Wiinberg, 2012). Para diminuir o mais possível a influência da colheita, esta deve ser o mais atraumática possível, sendo a veia jugular aconselhada e deverá ser definido um tempo entre a colheita e a análise, sendo aconselhado um intervalo de 30 minutos (Flatland, Koenigshof, Rozanski, Goggs, & Wiinberg, 2014).

A técnica de tromboelastografia era anteriormente utilizada com sangue sem aditivos. No entanto, nem sempre é possível efectuar a análise imediatamente após a colheita sendo por isso, atualmente utilizado, sangue citratado, o que implica a recalcificação antes da análise. O factor XII (activação pelo contacto) não é dependente do cálcio o que significa que a criação de trombina é afectada pela quantidade de factor XIIa que se formou durante o tempo de armazenamento.

A interpretação é também dificultada pela ausência de estudos que acompanhem a evolução destes parâmetros ao longo do tempo, e que confirmem, se existe de facto uma correlação entre o traçado que indique hipercoagulabilidade e o risco verdadeiro de trombose no animal. Estudos demonstraram que se pode recorrer a tromboelastometria para monitorização de tratamentos com heparina. No entanto, a interpretação do traçado, deverá ter em conta a dose e o tipo de heparina utilizada (Kol & Borjesson, 2010).

Poucos estudos comparam o TEG® e o ROTEM®. Os dados disponíveis atualmente indicam similaridades do parâmetro MA no TEG® e do MCF no ROTEM® com a contagem plaquetária (Sankarankutty et al., 2012). No entanto, não é possível comparar directamente os dados entre eles. Análises em pacientes sujeitos à cuidados intensivos sugerem que os dois métodos não são equivalentes e que as diferenças se devem à utilização de diferentes activadores (Sankarankutty et al., 2012).

Oswald et al., (2010) estabeleceram uma correlação entre os valores obtidos na análise da coagulação convencional e os diferentes parâmetros do ROTEM®, concluindo que existe uma correlação entre o valor de aPTT e o CT no INTEM mas nenhuma correlação foi estabelecida entre PT e o CT no EXTEM. As concentrações do factor XIII, fibrinogénio e plaquetas mostram no entanto uma forte correlação com o MCF. A contagem plaquetária mostrou uma correlação com o CFT.

#### **8.4.Obtenção de valores de referência**

A noção geral de valores de referência surgiu pela primeira vez em 1969, num estudo em que Grasbeck e Saris compararam os valores obtidos para o hemograma, de amostras obtidas

numa população saudável e outras amostras colhidas em pacientes com várias doenças (Greffé et al., 2009).

A obtenção de valores de referência para um determinado parâmetro prende-se com a necessidade de escolher uma amostra, representativa da população e com base em critérios de selecção previamente definidos.

Idealmente, seriam necessários pelo menos 120 indivíduos já que é o número mínimo para o qual se pode estabelecer, com um intervalo de confiança de 90%, os limites de referência com um método não paramétrico (Greffé et al., 2009). No entanto, muitas vezes, a obtenção de um grande número de amostras pode revelar-se difícil por falta de indivíduos ou mesmo de meios financeiros. Nesses casos, é necessário averiguar a normalidade ou não dos valores. Para descartar a incerteza nos limites decorrentes da pequena amostra, só poderá ser calculado um intervalo de confiança de 90%. A avaliação da presença de *outliers* torna-se particularmente importante porque a presença de um único valor aberrante tem um efeito significativo nos limites estimados. Quando possível, esses valores deverão ser eliminados e, idealmente, deverá ser colhida uma nova amostra. De maneira a poder reduzir as variações, as recolhas de amostras, quer para os indivíduos saudáveis com vista à obtenção dos valores de referência como para os indivíduos em estudo, deverão ser efectuadas de forma padronizada assim como a sua análise (ASVCP, 2005).

Embora a tromboelastometria seja uma técnica vantajosa em relação aos outros testes e utilizada há já muitos anos em medicina humana, a sua utilização em medicina veterinária é recente, não existindo ainda valores de referência para o seu uso. Hanel et al. (2014) aconselham a criação de valores de referência para cada estudo.

### **III. Trabalho Experimental**

O presente trabalho insere-se num projecto destinado a avaliar a influência da idade na inflamação, hemostase e funcionamento das glândulas supra-renais e suas potenciais consequências na resposta as infecções e particularmente na sépsis. Este projecto é desenvolvido na VetAgroSup (antiga École Nationale Vétérinaire), de Lyon sob coordenação da Professora Doutora Jeanne-Marie Bonnet-Garin e da Doutora Isabelle Goy-Thollot.

#### **1. Objectivos**

O objectivo específico deste estudo é avaliar a influência da idade na coagulação, comparando os perfis de coagulação de duas amostras de cães Beagles de idades diferentes, já que, como foi referido, a idade parece ter uma influência na coagulação sendo de esperar a observação de diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos de Beagles.

A utilização de técnicas de tromboelastometria (ROTEM®), recentes em medicina veterinária, torna no entanto necessário a análise de perfis de cães saudáveis de várias idades, a fim de obter valores de referência, sendo este um objectivo, ainda que acessório, importante na interpretação de resultados.

#### **2. Material e Métodos**

Este estudo teve a aprovação da comissão de ética da VetAgroSup e foi realizado segundo as boas práticas clínicas.

##### **2.1. Animais utilizados**

Os animais incluídos no estudo provêm de duas populações distintas:

- Cães pertencentes a estudantes ou funcionários (grupo CR), utilizados para estabelecer os valores de referência ( $n=37$ ) com idades entre 1 e 11 anos, sendo a média de 3,32 ( $\pm 0,36$ ) anos. O grupo é constituído por 15 machos (dos quais 9 inteiros) e 22 fêmeas (das quais 15 inteiras), todos saudáveis e sem tratamento a decorrer (Anexo 2 para as raças e frequências);
- Cães de raça Beagle, existentes na instituição para fins experimentais.

Estes últimos foram incluídos em dois grupos de estudo diferentes, consoante a sua idade:

- Grupo de Beagles Novos (BJ), com idades entre os 1 e 3 anos (média de 2,5  $\pm$  0,53), constituída por 5 machos e 5 fêmeas, num total de 10 animais, todos inteiros e sem tratamento a decorrer;

- Grupo de Beagles Idosos (BI), com idades entre 11 e 13 anos (média de  $11,7 \pm 0,82$  anos), constituída por 9 machos e 1 fêmea, num total de 10 animais, todos inteiros e sem tratamento a decorrer.

Os critérios de exclusão dos indivíduos da amostragem foram:

- Animais com sinais de doença aguda ou crónica
- Animais com antecedentes médicos ou cirúrgicos recentes.
- Ao exame clínico:
  - Auscultação cardíaca anormal: frequência superior a 130 batimentos por minuto, sopros, alterações do ritmo;
  - Dispneia. Auscultação respiratória: ruídos respiratórios anormais;
  - Temperatura rectal superior a  $39^{\circ}\text{C}$ ;
  - Coloração anormal das mucosas;
  - Tempo de repleção capilar superior a 2 segundos

Todos os animais incluídos foram, posteriormente, submetidos a uma avaliação do hemograma e dos parâmetros bioquímicos assim como a uma avaliação dos tempos de coagulação (PT e aPTT) para despistar eventuais alterações subclínicas.

## **2.2. Colheita e processamento de amostras**

A colheita de sangue foi efectuada num local calmo para limitar o stress. O tempo de espera foi sempre o mais curto possível. Para ambos os grupos de Beagles, as recolhas foram efectuadas numa sala junto aos canis.

Com base nas diretrizes (PROVETS), o sangue foi colhido na veia jugular, com seringas de 5mL de marca Terumo<sup>®</sup> e agulhas de 23G (25 x 0,6 mm).

O sangue foi colocado nos diferentes tubos sempre pela seguinte ordem:

- Tubo seco preenchido com 1mL, para análises bioquímicas;
- Tubo contendo EDTA preenchido com 1mL de sangue e homogeneizado, para hemograma;
- Tubo com citrato de sódio 3,2%, preenchido com 1,8mL de sangue e homogeneizado, para avaliação dos parâmetros da coagulação.

Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente até análise. Cada amostra foi submetida a uma análise EXTEM, INTEM e FIBTEM.

### 2.3. Equipamento para análise do hemograma e tempos de coagulação

Para obtenção do hemograma, foi utilizado o analisador automático XT-2000iV<sup>®</sup>, da Sysmex. Os tempos de coagulação, PT e aPTT, foram obtidos com recurso ao CoagDX<sup>®</sup>, da IDEXX, sendo utilizadas as placas (*cartridge*) para sangue citratado (Citrate aPTT e Citrate PT).

### 2.4. Equipamento e análise tromboelastométrica

Para análise dos perfis de coagulação foi utilizado equipamento para tromboelastometria ROTEM<sup>®</sup> (modelo delta, da Tem Innovations GmbH).

O equipamento dispõe de um display-guia para realização da análise (Figura 15), que é semi-automática: os *pins* são colocados no eixo, os copos são instalados no suporte, os reagentes são colocados nos respectivos recipientes, tal como a amostra de sangue a analisar. Uma vez o suporte fixado à máquina, o eixo mergulha no sangue e a análise inicia-se.

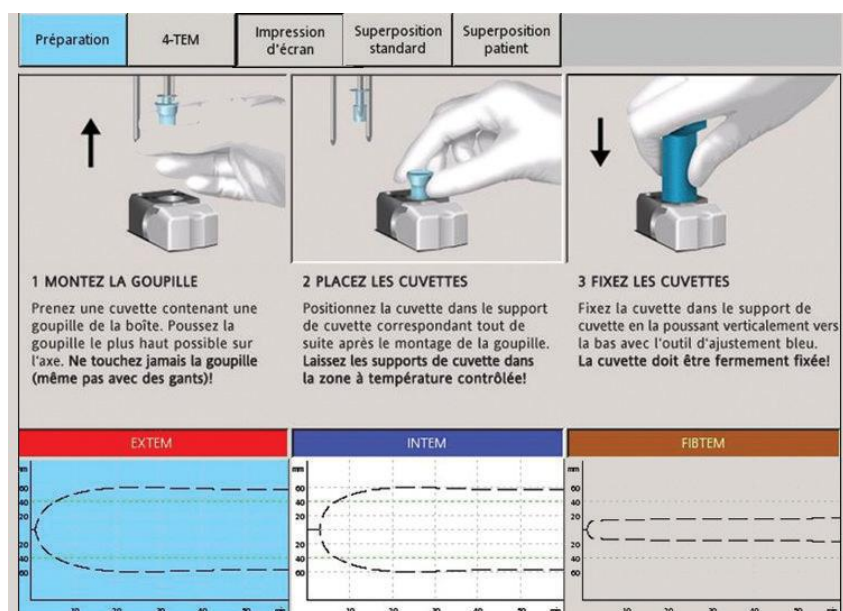


Figura 15: preparação da máquina para análise. Screenshot

(adaptado de: <http://rotem.de/>).

Foram realizadas análises tromboelastométricas em modo EXTEM, INTEM e FIBTEM para cada amostra. A análise foi dada por terminada quando o valor de Li60 foi obtido, o que representou perto de uma hora para cada análise.

Os reagentes utilizados foram:

EXTEM – Factor tissular;

INTEM – o ácido elágico;

FIBTEM – factor tissular associado a citocalasina D.

No final foi obtido um temograma para cada modo de análise e para cada amostra. Posteriormente foram analisados estatisticamente os parâmetros tromboelastométricos CT, A10, CFT, MCF, ângulo  $\alpha$ , Li 45 e Li 60, de cada um dos modos EXTEM, INTEM e FIBTEM.

## 2.5. Análise estatística

Os parâmetros elastométricos e outras variáveis consideradas relevantes foram analisados com auxílio do programa R. As comparações foram feitas com base na utilização do teste t - Student para amostras não emparelhadas após verificação da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). O nível de significância foi fixado a  $p \leq 0,05$ . Quando as séries não seguiram uma distribuição normal ou que as variâncias não eram homogêneas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

## 3. Resultados

### 3.1. Hemograma

. O cães do grupo CR apresentam todos os valores (hematócrito contagens plaquetária e eritrocitária dentro dos intervalos de referência (Tabela 1).

TABELA 1: VALORES MÉDIOS DO HEMOGRAMA

	Contagem Eritrocitária ( $10^{12}/L$ )	Hematócrito (L/L)	Contagem Plaquetária ( $10^9/L$ )
Valores de Referência	5.4-8*	0.35-0.55*	200-500**
Grupo CR	7,13±0,41	0,48 ±0,03	256,5± 56
Grupo BJ	7,5±0,57	0,48±0,03	408,7±21,73
Grupo BI	6,3±0,36	0,42±0,02	459,2±52,40

\* Mc Connell, 2000

\*\*Smith, 2010

No grupos dos Beagles alguns indivíduos apresentam valores fora dos limites de referência e da comparação BJ – BI conclui-se que o grupo BI apresenta valores de hematócrito ligeiramente inferior comparado com o BJ assim como uma contagem eritrocitária, sendo essas diferenças significativas para ambos os parâmetros ( $p < 0,05$ ).

No caso da contagem plaquetária, embora certos animais do grupo BI apresentassem contagens plaquetárias acima do valor limite superior, a diferença observada entre o grupo BJ e o grupo BI não é significativa ( $p > 0,05$ ).

### 3.2. Tempo de protrombina e de trombina parcialmente activada

O PT e o aPTT foram determinados para todas as amostras. Os valores de referência, para amostras em citrato, são para o PT 12-17 segundos e para o aPTT 71-102 segundos (valores de referência fornecidos pelo fabricante do aparelho de medição para ambos os parâmetros). As diferenças observadas entre os testes de PT para os dois grupos de Beagles são significativas ( $p < 0.05$ ) mas não o são para o teste de aPTT ( $p > 0.05$ ).

Os valores obtidos encontravam-se todos dentro dos valores de referência (tabela 2).

TABELA 2: VALORES DE PT E APTT PARA OS DIFERENTES GRUPOS DE CÃES

	Teste	Nº	Mínimo	Máximo	Média (SD)
Grupo CR	Cit-PT (seg)	37	12	17	14,65 ( $\pm 1,3$ )
	Cit-aPTT (seg)	37	73	96	83,81 ( $\pm 6,2$ )
Grupo BJ	Cit-PT (seg)	10	12	15	14,4 ( $\pm 1,3$ )
	Cit-aPTT (seg)	10	76	90	83,9 ( $\pm 4,7$ )
Grupo BI	Cit-PT (seg)	10	12	12	12 ( $\pm 0$ )
	Cit-aPTT (seg)	10	82	94	87,9 ( $\pm 3,8$ )

### 3.3. Temogramas

Todas as amostras analisadas originaram um temograma.

Os temogramas obtidos para os cães do grupo de referência (exemplificados pelas Figuras 16, 17 e 18) e para os do grupo BJ (exemplificados pelas Figuras 19, 20 e 21) são similares.

Os traçados obtidos nas amostras dos animais do grupo BI (exemplificados nas Figuras 22, 23 e 24), estão particularmente modificados, apresentando-se mais largos, relativamente ao grupo de referência e ao grupo BJ. A observação desses temogramas permite prever que os valores dos parâmetros analisados irão diferir entre os diversos grupos.

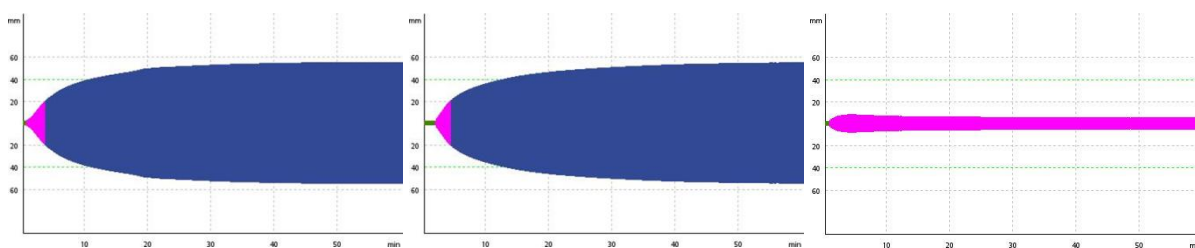


Figura 16: temograma grupo CR – Extem      Figura 17: temograma grupo CR - Intem      Figura 18: temograma grupo CR - Fibtem

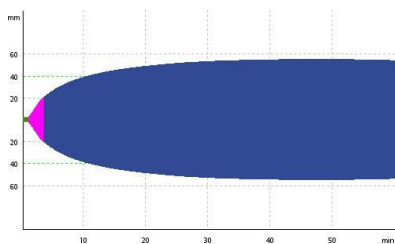


Figura 19: tomograma grupo BJ –  
Extem

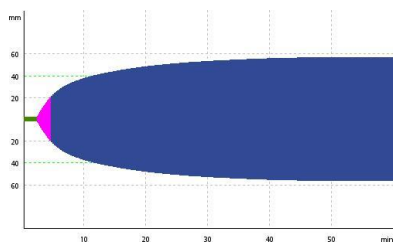


Figura 20: tomograma grupo BJ -  
Intem

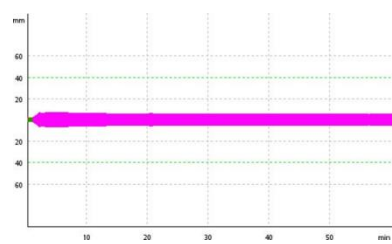


Figura 21: tomograma grupo BJ -  
Fibtem

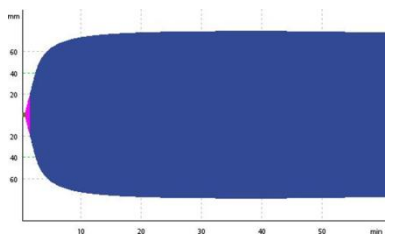


Figura 22: tomograma grupo BI –  
Extem

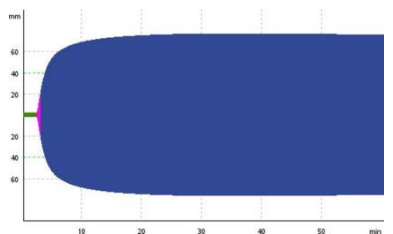


Figura 23: tomograma grupo BI -  
Intem

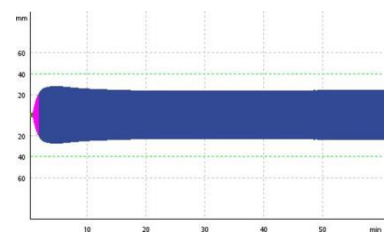


Figura 24: tomograma grupo BI -  
Fibtem

### 3.4. Parâmetros elastométricos da amostra populacional de referência

Os valores de referência para os vários parâmetros e modos de análise foram obtidos nos animais incluídos no grupo CR. Os intervalos obtidos para os diferentes parâmetros deste grupo são apresentados na Tabela 3 (Anexo 3 com dados detalhados). Foram estabelecidos com um intervalo de confiança de 90%.

TABELA 3: INTERVALOS DE REFERÊNCIA OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS

	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
<b>Extem</b>	21,2 - 82,7	29-52,8	79,6-243,6	43,5-65,4	48,8-73,5	92,6-104,6	79,7-109,6
<b>Intem</b>	73,7-220,1	31,1-54,6	35,5-214,6	44,4-65,9	54,8-80,4	99,2-100,6	92-103,7
<b>Fibtem</b>	17,3-88,9	1,5-12,1	SV	1,9-14,2	SV	59,7-101	54,5-102,7

SV: sem valor

### 3.5. Parâmetros tromboelastométricos do Grupo Beagles jovens

Os resultados obtidos na análise dos parâmetros tromboelastométricos deste grupo encontram-se coligidas nas tabelas situadas no Anexo 4 (Tabela 15,16 e 17).

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam, para cada parâmetro, as médias e respectivos desvios padrão.

**TABELA 4: MÉDIA E DESVIO PADRÃO OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM PARA OS BJ**

EXTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10	10	10	10	10	10
Média	47,9	55,3	94,7	65,3	71,3	96,6	92,1
Desvio padrão	8,397	4,762	15,464	4,523	3,199	7,820	10,115

**TABELA 5: MÉDIA E DESVIO PADRÃO OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO INTEM PARA OS BJ**

INTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10	10	10	10	10	10
Média	169,5	52,7	73,9	65,2	75,2	99,9	96,8
Desvio padrão	27,945	6,183	18,711	3,327	3,425	0,316	1,317

**TABELA 6: MÉDIA E DESVIO PADRÃO OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO FIBTEM PARA OS BJ**

FIBTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10		10		10	10
Média	39,5	10,6	SV	12,1	SV	78,7	78,7
Desvio padrão	9,835	2,989	SV	3,178	SV	9,546	10,552

SV: sem valor

### 3.6. Parâmetros tromboelastométricos do Grupo B idosos

Os resultados obtidos na análise dos parâmetros tromboelastométricos deste grupo encontram-se coligidas nas tabelas situadas no Anexo 4 (Tabela 18, 19 e 20).

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam, para cada parâmetro, as médias e respectivos desvios padrão.

**TABELA 7: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM PARA OS BI**

EXTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10	10	10	10	10	10
Média	34,3	67,7	64,3	74,8	78,1	99,9	98,3
Desvio padrão	2,312	4,27	11,963	3,084	2,47	0,316	0,675

**TABELA 8: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO INTEM PARA OS BI**

INTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10	10	10	10	10	10
Média	177,2	65,2	50,8	72,8	79,6	99,9	98,7
Desvio padrão	42,394	4,131	11,272	2,530	2,459	0,316	0,949

**TABELA 9: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO FIBTEM PARA OS BI**

FIBTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
n	10	10	8	10	10	10	10
Média	34,7	23,9	75,5	25,5	79,9	86,6	86,9
Desvio padrão	3,683	8,117	20,8	7,821	2,88	5,441	6,707

### 3.7. Comparação dos valores de referência aos valores obtidos para os 2 grupos de Beagles

A comparação entre os diferentes grupos, para os parâmetros relativos a firmeza (MCF) e tempo de formação do coágulo (CFT) mostram, como os temogramas obtidos deixavam prever, que o grupo BI apresenta valores fora dos intervalos estabelecidos neste estudo. No entanto, ao contrário do esperado, o grupo BJ apresenta igualmente valores fora dos intervalos. O ênfase foi aqui dado aos valores representativos da firmeza (Figuras 25, 26 e 29) e da velocidade de formação do coágulo (Figuras 27 e 28), determinantes do tipo de perfil (hipo, normo ou hipercoagulável).

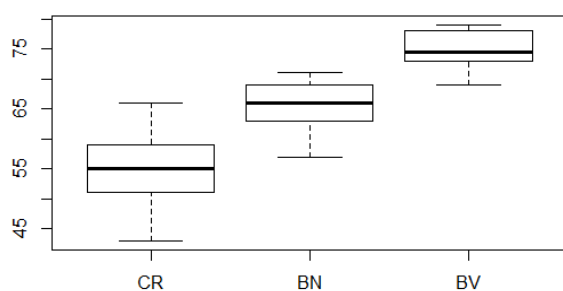


Figura 25: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Extem.

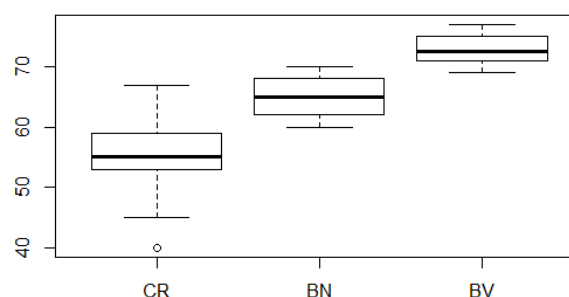


Figura 26: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Intem.

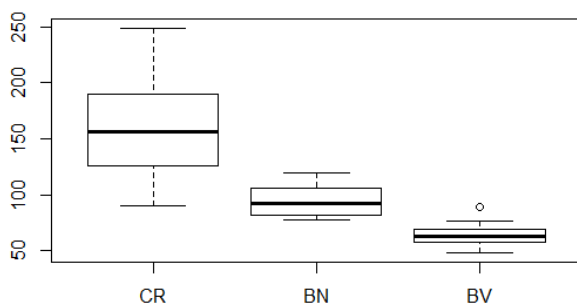


Figura 27: Comparação entre grupos para o valor CFT na análise Extrem

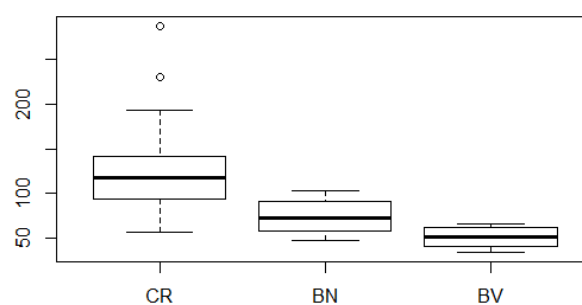


Figura 28: Comparação entre grupos para o valor CFT na análise Intem

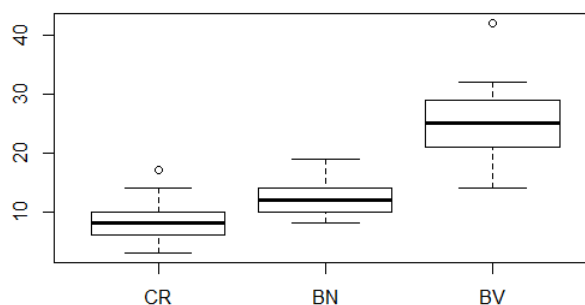


Figura 29: Comparação entre grupos para o valor MCF na análise Fibtem.

### 3.8. Comparação dos parâmetros tromboelastométricos entre os grupos de Beagles

Para todos os parâmetros, excepto para o tempo CT na análise Intem e Fibtem (Tabela 10), existe uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos. O parâmetro que avalia o tempo do início da medida até ao aparecimento de fibrina (CT) encontra-se significativamente diminuído no caso dos BI comparativamente aos BJ ( $34,3 \pm 2,3$  segundos *versus*  $47,9 \pm 8,9$  segundos) na análise Extrem. Os valores de CT para os BI, encontram-se ao contrário, aumentados na avaliação Intem comparativamente aos valores para os BJ ( $177,2 \pm 43,4$  *versus*  $169,5 \pm 27,9$ ) possivelmente devido à dispersão dos dados. Os valores de CFT encontram-se significativamente ( $p < 0,05$ ) encurtados nos BI comparativamente aos BJ quer no Extrem ( $64,3 \pm 11,9$  segundos *versus*  $94,7 \pm 15,5$  segundos) quer no Intem ( $50,8 \pm 11,3$  segundos *versus*  $73,9 \pm 18,7$  segundos). Os valores MCF, que avaliam a firmeza do coágulo, encontram-se significativamente ( $p < 0,05$ ) aumentados para os BI comparativamente aos BJ quer para a análise Extrem ( $74,8 \pm 3,1$  mm *versus*  $65,3 \pm 4,5$  mm) quer para a Intem ( $72,8 \pm 2,5$  mm *versus*  $65,2 \pm 3,3$  mm) e para a análise Fibtem ( $25,5 \pm 7,8$  mm *versus*  $12,1 \pm 3,2$  mm).

**TABELA 10: VALORES DE P OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARAMETROS DA COMPARAÇÃO ENTRE BJ E BI**

	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60</b> (%)
<b>Extem</b>	<b>0, 00029</b>	<b>9.09x10<sup>-6</sup></b>	<b>0.00013</b>	<b>5.095x10<sup>-5</sup></b>	<b>5,73x10<sup>-5</sup></b>	0,234	<b>0,0098</b>
<b>Intem</b>	0,638	<b>7.42x10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0045</b>	<b>2.464x10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0044</b>	1	<b>0,0018</b>
<b>Fibtem</b>	0,11	<b>0,00029</b>	SV	<b>0,00042</b>	SV	<b>0,039</b>	0,055

SV: sem valor

## 4. Discussão

### 4.1. Parâmetros elastométricos da amostra populacional de referência

De acordo com as normas propostas pelo ASVCP (2005) a amostra ideal de forma a estabelecer valores de referência com um intervalo de confiança de 90%, é constituída por 120 indivíduos. O número de cães incluídos neste estudo (37) está abaixo do valor ideal, no entanto, tal como em medicina humana, é aceite um número menor de forma a poder obter uma referência para a interpretação dos dados (Bauer, Eralp, & Moritz, 2009).

Embora vários estudos sobre o TEG® e o ROTEM® tenham sido publicados, poucos dizem respeito à obtenção de valores de referência em animais saudáveis. A maior parte deles estabelecem os próprios valores de referência com recurso a uma amostra de cães saudáveis, como aconselhado pelo PROVETS. Essa recomendação advém do facto de vários factores influenciarem os resultados e ser necessário para cada grupo de trabalho estabelecer o seu protocolo (Hanel et al., 2014). Assim, a primeira etapa deste estudo foi determinar valores de referência para o uso do ROTEM®. Foram analisadas as amostras de 37 cães, representando uma população heterogénea em idades, sexos e raças (Anexo 2) e constituída por indivíduos saudáveis, sem doença de base aparente, baseado no exame médico objectivo e avaliação laboratorial de hemograma e tempos de coagulação.

Neste estudo não foi tido em conta o sexo dos animais na criação dos valores de referência nem na comparação entre Beagles. Embora Roeloffzen e colaboradores, (2010) tenham demonstrado uma diferença significativa entre homens e mulheres, Bauer e colaboradores, (2009) num estudo no Cão com recurso ao TEG® não encontraram alterações significativas entre machos e fêmeas.

O grupo CR apresenta uma idade média de 3,32 ( $\pm$  0,36) anos podendo ser considerado demasiado jovem quando tomado como referência para o grupo BI. Em alternativa poderiam ter sido criados grupos de referência distintos cuja média de idades se aproximasse mais da idade média de cada um dos grupos em estudo. No entanto, considerada a dimensão inicial da amostra, tal divisão não é, neste caso, razoável. Acresce ainda o facto de os conceitos “jovem” e “idoso”, quando aplicados ao cão, estarem fortemente associados à raça.

O estudo de Wiinberg e colaboradores, (2005) demonstrou a importância da escolha de um tempo definido entre a colheita e o processamento. A comparação dos dados obtidos 30 min e 120 min depois da colheita mostrou uma diferença significativa com uma tendência para a obtenção de um perfil hipercoagulável aos 120 min. No nosso estudo, um tempo de 30 min entre a colheita e o início da análise, como aconselhado por Flatland e colaboradores (2014), foi respeitado de forma a permitir a estabilização do sangue. A influência da temperatura

ambiente nos resultados é desprezível quando a temperatura é superior a 20°C (McMichael et al., 2014)

#### **4.2. Comparação dos valores de referência aos valores obtidos para os 2 grupos de Beagles**

A comparação dos valores para o grupo CR obtidos neste estudo ao grupo BI revela que, para muitos dos parâmetros, estes indivíduos se encontram fora dos intervalos. Relativamente ao CFT, o grupo BI está aquém do limite inferior, na análise Extem mas não na análise Intem. No entanto, ambos os intervalos apresentam uma grande amplitude e sabe-se que o valor de CFT é o mais variável (Hanel et al., 2014). O recurso a uma amostra de cães saudáveis de maior dimensão poderia permitir reduzir a amplitude observada e obter assim um intervalo mais preciso. Os valores indicativos da firmeza do coágulo (A10, MCF e ângulo  $\alpha$ ) encontram-se acima do intervalo quer na análise Extem, quer na Intem ou Fibtem, sendo o aumento desses valores sinal de hipercoagulabilidade (Hanel et al., 2014). Em ambas as análises, Extem e Fibtem, o FT é responsável pela activação da coagulação. No entanto, no Fibtem as plaquetas encontram-se bloqueadas levando a que a comparação entre as duas análises dê uma indicação da contribuição das mesmas na formação do coágulo. Em medicina humana, um valor muito elevado no MCF (superior a 25 mm), na análise Fibtem, significa uma concentração em fibrinogénio elevada e pode estar associado a uma coagulação normal no Extem ou Intem mesmo que haja trombocitopenia (Calatzis, Spannagl, & Vorweg, 2011). Embora o valor de fibrinogénio não tenha sido medido, a obtenção de valores para os parâmetros CFT e para o ângulo  $\alpha$  na análise Fibtem assim como a análise do valor MCF para os BI, leva a que seja expectável um aumento desse parâmetro nesse grupo. Num estudo com recurso ao TEG®, Wiinberg e colaboradores, (2009) demonstraram que os cães com perfis hipercoaguláveis apresentavam um aumento significativo do fibrinogénio relativamente aos cães com traçados considerados normais. Wagg e colaboradores (2009) demonstraram igualmente essa correlação positiva entre o valor de MA e a concentração em fibrinogénio com obtenção de um traçado hipercoagulável em cães admitidos na unidade de cuidados intensivos.

Ao contrário do que seria esperado, 5 cães do grupo BJ apresentam, para as análises Extem e Intem, valores de A10 e MCF acima dos valores de referência. No Homem, foi recentemente demonstrado que estes mesmos parâmetros estão aumentados em recém-nascidos, podendo a alteração ser, em parte, justificada pelo aumento do número total de plaquetas (Oswald et al, 2010). Os BJ cuja média de idades é inferior à do grupo CR, apresentam igualmente um

aumento significativo do número total de plaquetas ( $408,7 \pm 21,73 \times 10^9/L$  versus  $256,5 \pm 56 \times 10^9/L$ ).

### **4.3. Comparação dos parâmetros tromboelastométricos entre os grupos de Beagles**

A comparação entre os dois grupos de Beagles revela um perfil hipercoagulável, com aumento do MCF e diminuição do CT e CFT, no grupo dos BI, embora os valores de PT e aPTT estejam dentro dos valores de referência. Estudos demonstraram que um valor muito baixo de CFT associado a um aumento dos parâmetros de firmeza (A10 e MCF) é indicativo de um estado hipercoagulável (Calatzis et al., 2011; PROVETS). O valor de CFT é influenciado pelo número de plaquetas, pela quantidade de fibrina e pela sua capacidade de polimerização. Embora certos BI apresentem contagens plaquetárias acima dos valores limites, a diferença observada entre jovens e idosos não é significativa. Kol & Borjesson, (2010) mostraram que embora exista uma correlação entre a concentração plaquetária e o K e MA no TEG® (correspondente ao CFT e MCF respectivamente no ROTEM®), esta não é válida quando se está perante uma trombocitose. Esta conclusão corrobora a teoria de que embora a trombocitopénia possa levar a hemorragia, a trombocitose não está associada a perfis de hipercoagulabilidade.

O estudo de Wiinberg e colaboradores, (2008) agrupou cães com coagulação intravascular disseminada com recurso ao Haemoscope TEG®, em perfil hipo, normo ou hipercoagulável baseado no valor de MA. Os cães com perfil hipercoagulável apresentavam diferenças estatísticas significativas com aumento do número de plaquetas, fibrinogénio e plasminogénio, indicando que o valor de MA depende em parte desses factores.

Noutro estudo em cães apresentando várias doenças e todos com suspeitas de alterações da hemostase, Wiinberg e colaboradores, (2009) mostraram que os cães com sinais de hemorragias e um perfil hipocoagulável apresentam uma contagem plaquetária menor, um PT aumentado e um aumento do D-dímero comparado com cães com perfis normocoaguláveis.

Em medicina humana, uma correlação foi estabelecida, com recurso ao ROTEM, entre o fibrinogénio, o ângulo  $\alpha$  e o MCF quer no Extem quer no Intem (Nielsen, Cohen & Cohen, 2005; Peyvandi, 2009). Essa correlação já foi igualmente estabelecida em medicina veterinária (Smith et al, 2012).

Uma explicação para o aumento desses parâmetros encontra a sua explicação na idade dos animais, pois os animais idosos apresentam valores de fibrinogénio mais elevados (Kol & Borjesson, 2010). Em medicina humana, Ostrowski e colaboradores (2011), num estudo realizado em pacientes da unidade de traumatologia, demonstraram que os pacientes com os

perfis hipercoaguláveis eram mais idosos e possuíam contagens plaquetárias, níveis de fibrinogénio e FXIII aumentados relativamente a pacientes mais jovens. Nenhum desses pacientes apresentava, no entanto, aumento do aPTT. Noutra estudo, com recurso ao TEG®, Roeloffzen e colaboradores, (2010) compararam dois grupos, um com idade inferior a 50 anos e outro com idade superior a 50 anos e observaram um aumento do MA nesse segundo grupo, variável associada a concentração em fibrinogénio e sua reticulação.

A correlação entre o aumento observado nos parâmetros da firmeza nas análises Extem e Intem é explicada pelo facto dessas variáveis representarem as fases de amplificação e propagação da coagulação, reacções que ocorrem na superfície das plaquetas, independentemente do activador responsável pelo início da formação de trombina. Esses valores são por isso, igualmente, influenciados pela concentração plaquetária (Smith et al, 2012).

A comparação entre o Extem e Intem mostra que os parâmetros relativos ao tempo (CT e CFT) estão diminuídos para os BI excepto para o CT no Intem. A concentração plasmática em factor VII está fortemente correlacionada com o CT. Sendo no Extem a activação da coagulação a carga do FT a velocidade de criação da trombina depende da concentração em complexos FT-FVII formados (Smith et al, 2012). Uma das possíveis explicações é o aumento do factor VII observado nos idosos (Mari et al, 1995), como parte do *inflamm-aging* (Salminen et al., 2008; Day, 2010). A concentração em factor IX esta fortemente correlacionada com o CT da análise Intem. No entanto, os outros factores intervenientes na via intrínseca (XII, VIII e XI) não parecem apresentar correlação com o CT (Smith et al, 2012).

Na ausência de plaquetas, os eritrócitos são capazes de contribuir a formação de trombina pela exposição dos fosfolípidos pró-coagulantes. Vários estudos, em humanos demonstraram que a diminuição do hematócrito esta associado a um estado hipercoagulável e o aumento a um estado hipocoagulável (Kol & Borjesson, 2010). Iselin e colaboradores, (2001) demonstraram que uma redução isolada do hematócrito sem modificação da concentração plaquetária e da concentração em factores acelera a coagulação e leva a formação de um coágulo mais firme.

O efeito da concentração em eritrócitos foi igualmente demonstrado no rato e no cão (Wiinberg & Kristensen, 2010). Neste estudo, para os grupos de Beagles, a contagem eritrocitária e o hematócrito estão dentro dos valores de referência. Embora os BI apresentem um hematócrito ligeiramente inferior comparado com o dos BJ assim como uma contagem eritrocitária inferior, o real impacto da diminuição do hematócrito na coagulação ainda está por esclarecer. Certos autores consideram a observação de um perfil hipercoagulável, no caso da diminuição do hematócrito, como um artefacto. Uma possível explicação é o facto da

massa em eritrócitos ser um diluente para o plasma, que contém os factores de coagulação (Smith, Mcmichael, Gilor, Galligan, & Hoh, 2012).

Embora ainda não se conheça para este estudo, os valores de cortisol basal e após estimulação, é de esperar que os valores basais estejam aumentados nos BI (Goy-Thollot et al, 2007).

Vários estudos demonstraram que o excesso de glucocorticoides, quer nos pacientes idosos quer nos pacientes que apresentem a síndrome de Cushing, modifica a coagulação assim como os parâmetros fibrinolíticos (Gosselin & Feldman, 2001; Klose et al., 2011; van der Pas et al, 2013). A hipótese de um estado hipercoagulável nesses pacientes é apoiada pela observação de níveis aumentados em factores VIII, IX e von Willebrand (Gosselin & Feldman, 2001). O teste de aPTT revela um tempo inferior aos valores de referência e a criação de trombina é fortemente melhorada. Nos pacientes apresentando a síndrome de Cushing, os níveis dos factores VIII, IX e von Willebrand tendem a voltar ao normal quando o tratamento resulta (Van Zaane et al., 2009).

## 5. Conclusão

Este estudo permitiu obter os valores de referência para o cão para utilização do ROTEM®, quer para sua aplicação directa quer para posterior utilização no centro hospitalar (SIAMU). No entanto, de forma a obter intervalos mais rigorosos, será necessário analisar os perfis de mais cães saudáveis.

A aplicação dos valores de referência obtidos assim como a comparação entre os grupos de Beagles, revelou um perfil hipercoagulável nos cães mais idosos. Embora várias explicações sejam plausíveis, a origem do perfil hipercoagulável não foi aqui explorado, uma vez que seria necessária a análise dos valores de citocinas, do CRP, do fibrinogénio e dos valores de cortisol.

Embora diversos estudos tenham evidenciado o estado de hipercoagulação (anemia hemolítica imuno-mediada, insuficiência cardíaca congestiva, neoplasia, hiperadrenocorticism, nefropatia e enteropatia com perda de proteína, coagulação intravascular disseminada e sépsis) ou hipocoagulação (coagulação intravascular disseminada, doença hepática, trombocitopenia, intoxicação por substâncias anti-vitamina K e administração de anti-inflamatório não esteróides) com recurso a tromboelastometria, os estudos sobre a utilização do ROTEM® são ainda escassos em medicina veterinária.

Mais estudos são necessários para caracterizar os eventuais efeitos da concentração em fibrinogénio e da concentração em plaquetas sobre os traçados e determinar assim a sensibilidade, especificidade e valor preditivo para a sobrevivência do paciente.

#### IV. Bibliografia

- Allford, S. L., & Machin, S. J. (2007). Haemostasis. *Surgery*, 25(241-244).
- Almanzar, G., Schwaiger, B., Jenewein, B., Keller, M., Herndler-brandstetter, D., Wu, R., Scho, D. & Grubeck-loebenstein, B., (2005). Long-term Cytomegalovirus infection leads to a significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which maybe the basis for a imbalance in the cytokine production profile in ederly persons. *Journal of virology*, 79, 3675-3683
- Anceriz, Nadia (2008). Le rôle des protéines S100 dans la migration des neutrophiles au site inflammatoire, *Université Laval*. Acedido em Jan. 23, 2014, diponível em <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/25364/ch01.html#d0e697>
- ASVCP. (2005). ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species and other related topics: SCOPE (pp. 1–33).
- Aw, D., Silva, A., & Palmer, D. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*, 120, 435-446. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x
- Batty, P., & Graham Smith, J. (2010). Haemostasis. *Surgery*, 530–535. doi:10.1016/j.mpsur.2010.08.008
- Bauer, N., Eralp, O., & Moritz, a. (2009). Establishment of Reference Intervals for Caolin-Activated Thromboelastography in Dogs Including an Assessment of the Effects of Sex and Anticoagulant Use. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(5), 641–648. doi:10.1177/104063870902100508
- Bauer, N., Mensinger, S., Daube, G., Failing, K., & Moritz, A. (2012). A moderate aseptic local inflammation does not induce a significant systemic inflammatory response. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 321–30. doi:10.1016/j.rvsc.2011.06.010
- Bauer, N., & Moritz, A. (2012). Coagulation response in dogs with and without systemic inflammatory response syndrome – Preliminary results. *Research in Veterinary Science*. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.029
- Broze, G. J., & Girard, T. J. (2012). Tissue Factor Pathway Inhibitor: Structure-Function. *Front Bioscience*, (11), 262–280.
- Butenas, S., Orfeo, T., & Mann, K. G. (2008). Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thrombosis Research*, 122 Suppl., 42–46.
- Calatzis, A., Spannagl, M., & Vorweg, M. (2011). Traitement ciblé de troubles hémostatiques aigus avec l' analyse ROTEM ®.
- Cimmino, G., Golino, P., & Badimon, J. J. (2011). Pathophysiological role of blood-borne tissue factor: should the old paradigm be revisited? *Internal and Emergency Medicine*, 6(1), 29–34. doi:10.1007/s11739-010-0423-4

- Craen, B. Van De, Declerck, P. J., & Gils, A. (2012). The Biochemistry , Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis Research*, 130(4), 576–585. doi:10.1016/j.thromres.2012.06.023
- Day, M. J. (2010). Ageing, immunosenescence and inflammageing in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 142 Suppl , S60–9. doi:10.1016/j.jcpa.2009.10.011
- De Laforcade, A., Goggs, R., & Wiinberg, B. (2014). Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 3: Assay activation and test protocol. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(1), 37–46. doi:10.1111/vec.12147
- Dupuy, A., Terrier, N., Sénécal, L., Morena, M., Leray, H., Canaud, B., & Cristol, J. (2003). La CRP est-elle plus qu ' un marqueur de l ' inflammation ? *Néphrologie*, 24, 337–341.
- Durante, W., Schini, V. B., Kroll, M. H., Catovsky, S., Scott-Burden, T., White, J. G. & Schafer, A. I. (1994). Platelets inhibit the induction of nitric oxide synthesis by interleukin-1 beta in vascular smooth muscle cells. *Blood*, 83(7), 1831–8.
- El Assar, M., Angulo, J., & Rodríguez-Mañas, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 380–401. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003
- Esmon, C. T. (2000). Regulation of blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 349–360.
- Esmon, C. T. (2004). The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thrombosis Research*, 114(5-6), 321–7. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.028
- Flatland, B., Koenigshof, A. M., Rozanski, E. a., Goggs, R., & Wiinberg, B. (2014). Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 2: Sample acquisition and handling. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(1), 30–36. doi:10.1111/vec.12142
- Forterre, M. (2013). *Influence de l'âge sur l'hémostase chez le chien: utilisation et évaluation de la thromboélastométrie chez le chien*. Master 2. VetAgroSup
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., & Benedictis, G. D. E. (2000). Inflamm-aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals New York Academy of Sciences*, 244–254.
- Freund, A., Orjalo, A. V, Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, 16(5), 238–46. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003
- Giesen, P. L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roqué, M., Fallon, J. T. & Nemerson, Y. (1999). Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2311–5.
- Gillet, A. C. (2002). *La protéine C-réactive chez le chien. Étude bibliographique et essai d'un kit utilisant une technique E.L.I.S.A*. Thèse. École Nationale Vétérinaire de Lyon

- Goggs, R., & Wiinberg, B. (2012). Variability in veterinary thromboelastography. *Veterinary Emergency and Critical Care Society*, 22, 275–6. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.034
- Gosselin, R., & Feldman, E. C. (2001). Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. *Archives of Surgery*, 136, 1003–1007.
- Goy-Thollot, I., Decosne-Junot, C., & Bonnet, J.-M. (2007). Influence of aging on adrenal responsiveness in a population of eleven healthy beagles. *Research in Veterinary Science*, 82(2), 195–201. doi:10.1016/j.rvsc.2006.07.010
- Grefte, A., Friedrichs, K., Harr, K., Concordet, D., Trumel, C., & Braun, J.-P. (2009). Reference values : a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(3), 288–298.
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University*., 6(11), 1045–56. doi:10.1631/jzus.2005.B1045
- Hanel, R. M., Chan, D. L., Conner, B., Gauthier, V., Holowaychuk, M., Istvan, S. & Wiinberg, B. (2014). Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(1), 47–56. doi:10.1111/vec.12145
- Iselin, B. M., Willimann, P. F., Seifert, B., Casutt, M., Bombeli, T., Zalunardo, M. P. & Spahn, D. R. (2001). Isolated reduction of haematocrit does not compromise in vitro blood coagulation. *British Journal of Anaesthesia*, 87(2), 246–9.
- Kale, S. S., & Yende, S. (2011). Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging and Disease*, 2(6), 501–511.
- Kelton, J. G., & Blajchman, M. A. (1980). Prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin). *Canadian Medical Association Journal*, 122(2), 175–9.
- Key, N. (2005). Blood-borne tissue factor. In *Third International Conference on Thrombosis and Hemostasis Issues in Cancer* (Vol. 1, pp. 9–11).
- Kirchhofer, D. & Nemersont, Y. (1996). Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. *Current opinion in biotechnology*, 7, 386-391.
- Klose, T. C., Creevy, K. E., & Brainard, B. M. (2011). Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21(6), 625–632. doi:10.1111/j.1476-4431.2011.00696.x
- Kol, A., & Borjesson, D. L. (2010). Application of thrombelastography / thromboelastometry to veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 4, 405–416. doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00263.x
- Lang, P., Dramé, M., Mahmoudi, R., Jolly, D., Lanièce, L., Saint-Jean, O., Somme, D., Heitz, D., Gauvain, J.B., Voisin, T., Wazières, B., Gonthier, R., Jeandel, C., Couturier, P., Ankri, J., Blanchard, F. & Novella, J.L. (2011). La fragilité : les enseignements de l'étude de la cohorte SAFEs et les perspectives d'avenir en matière de recherche. *Gériatrie et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*, 9 (2), 135-149.

- Levi, M., & van der Poll, T. (2005). Two-Way Interactions Between Inflammation and Coagulation. *Trends Cardiovasc Med*, 15(7), 254–259.
- Mari, D., Mannucci, P. M., Bottasso, B., & Bauer, K. A. (1995). Hypercoagulability in Centenarians: The Paradox of Successful Aging. *The American Society of Hematology*, 85(1), 3144–3149.
- Maroney, S. A., & Mast, A. E. (2012). Platelet tissue factor pathway inhibitor modulates intravascular coagulation. *Thrombosis Research*, 129 Suppl , S21–2. doi:10.1016/j.thromres.2012.02.023
- Mc Connell, M. F. (2000). BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. In M. J. Day, L. House, B. Bs, & A. Mackin (Eds.), *Business* (pp. 165–171). British Small Animal Veterinary Association.
- McMichael, M. (2012). New models of hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(2), 40–5. doi:10.1053/j.tcam.2012.07.005
- McMichael, M. a, & Smith, S. A. (2011). Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 40(2), 140–53. doi:10.1111/j.1939-165X.2011.00302.x
- McMichael, M., Goggs, R., Smith, S., Wagg, C., Warman, S., & Wiinberg, B. (2014). Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 1: System comparability. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(1), 23–29. doi:10.1111/vec.12143
- Mezzano, D., Matus, V., Sáez G., C., Pereira, J., & Panes, O. (2008). Tissue factor storage , synthesis and function in normal and activated human platelets. *Thrombos*, 122, Suppl, S31 – S36.
- Miller, D. & O'Callaghan, J. (2006). Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism*, 52 (10), 17-21.
- Minors, D. S. (2007). Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 214–216.
- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., & Tsujimoto, H. (2008). C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(2), 127–31.
- Nielsen, V., Cohen, B., & Cohen, E. (2005). Effects of coagulation factor deficiency on plasma coagulation kinetics determined via thrombelastography. doi:10.1111/j.1399-6576.2004.00602.x
- Norris, L. A. (2003). Blood coagulation. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 17(3), 369–383. doi:10.1053/S1521-6934(03)00014-2
- Ostrowski, S. R., Sørensen, A. M., Larsen, C. F., & Johansson, P. I. (2011). Thrombelastography and biomarker profiles in acute coagulopathy of trauma : a

- prospective study. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 19(1), 64. doi:10.1186/1757-7241-19-64
- Oswald, E., Stalzer, B., Heitz, E., Weiss, M., Schmugge, M., Strasak, A. & Haas, T. (2010). Thromboelastometry (ROTEM) in children: age-related reference ranges and correlations with standard coagulation tests. *British Journal of Anaesthesia*, 105(6), 827–35. doi:10.1093/bja/aeq258
- Pereira, M. (2003). The effects of aging on leukocyte glucocorticoid receptor concentration and response to dexamethasone in dogs. *Experimental Gerontology*, 38(9), 989–995. doi:10.1016/S0531-5565(03)00163-3
- Peyvandi, F. (2009). Results of an international, multicentre pharmacokinetic trial in congenital fibrinogen deficiency. *Thrombosis Research*, 124, S9–S11. doi:10.1016/S0049-3848(09)70158-6
- PROVETS, McMichael, M., Flatland, B., De Laforcade, A., Hanel, R., & Brainard, B. (n.d.). Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS) Evidence based guidelines on TEG/ROTEM assays in veterinary medicine, 1–18.
- Ramsey, I. (Ed.). (2011). *BSAVA - Small Animal Formulary* (7th editio., pp. 164– 165). British Small Animal Veterinary Association.
- Roeloffzen, W. W. H., Kluin-Nelemans, H.C., Mulder, A. B., Veeger, N. J.G. M., Bosman, L. & de Wolf, J.Th.M. (2010). In normal controls, both age and gender affect coagulability as measured by thromboelastography. *Anesthesia and analgesia*, 110, 987-94
- Rose, L. J., Dunn, M. E., Allegret, V., & Be, C. (2011). Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 4, 426–434. doi:10.1111/j.1939-165X.2011.00364.x
- Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., & Suuronen, T. (2008). Activation of innate immunity system during aging: NF-κB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Research Reviews*, 7(2), 83–105. doi:10.1016/j.arr.2007.09.002
- Sankarankutty, A., Nascimento, B., Teodoro da Luz, L., & Rizoli, S. (2012). TEG® and ROTEM® in trauma: similar test but different results? *World Journal of Emergency Surgery: WJES*, 7 Suppl 1(Suppl 1), S3. doi:10.1186/1749-7922-7-S1-S3
- Schmaltz, H. N., Fried, L. P. Xue, Q.L., Walston, J., Leng, S. X. & Semba, R. D. (2005). Chronic Cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *Journal of the American Geriatrics Society*, 6, 747-754.
- Smith, L. J., Mewhort-buist, T. A., Berry, L. R., & Chan, A. K. C. (2008). An Antithrombin-Heparin Complex Increases the Anticoagulant Activity of Fibrin Clots. *Research Letters in Biochemistry*, 2008. doi:10.1155/2008/639829
- Smith, S. A. (2009). The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(1), 3–10. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x

- Smith, S.A. (2010). Overview of hemostasis. In D. J. Weiss & K. J. Wardrop, (Eds.) *Schalm's Veterinary Hematology* (6th ed), (pp. 635–707). Singapore. Wiley-Blackwell.
- Smith, S. A., Mcmichael, M. A., Gilor, S., Galligan, A. J., & Hoh, C. M. (2012). Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *AJVR*, 73(6), 789–798.
- Stavrou, E., & Schmaier, A. H. (2010). Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thrombosis Research*, 125(3), 210–5. doi:10.1016/j.thromres.2009.11.028
- Stepanian, A., & de Prost, D. (2006). Le facteur tissulaire : nouveaux concepts. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 378, 29–34.
- Tem International GmbH (2010). Fonctionnement thromboélastométrie. Acedido em Dez. 3, 2012, disponível em:  
[http://www.ROTEM®.de/site/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1&Itemid=7&lang=fr](http://www.ROTEM®.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=7&lang=fr)
- Tvedten, H. (2012). *Small Animal - Clinical Diagnosis by laboratory methods*. (S. Elsevier, Ed.) (5th ed., pp. 92–111). Wilard, Michael D. Tvedten, Harold.
- Vallejo, A. N., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2004). T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(3), 119–24. doi:10.1016/j.molmed.2004.01.002
- Van der Pas, R., Leebeek, F.W.G., Hofland, L.J., de Herder, W. W. & Feelders, R.A. (2013). Hypercoagulability in Cushing's syndrome: prevalence, pathogenesis and treatment. *Clinical endocrinology*, 78 (4), 481-488.
- Van Zaane, B., Nur, E., Squizzato, A., Dekkers, O. M., Twickler, M. T. B., Fliers, E. & Brandjes, D. P. M. (2009). Hypercoagulable state in Cushing's syndrome: a systematic review. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(8), 2743–50. doi:10.1210/jc.2009-0290
- Vigo, C. (1985). Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3418–22.
- Wagg, C. R., Boysen, S. R., & Bédard, C. (2009). Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(4), 453–61. doi:10.1111/j.1939-165X.2009.00161.x
- Walston, J., Mcburnie, M. A., Newman, A., Tracy, R. P., Kop, W. J., Hirsch, C. H., & Fried, L. P. (2002). Frailty and Activation of the Inflammation and Coagulation Systems With and Without Clinical Comorbidities. *Arch Intern Med*, 162(2333-2341).
- Weinhold, B., Bader, A., Poli, V., Ru, U., Ther, R., Hannover, H., & Hannover, M. H. (1997). Interleukin-6 is necessary, but not sufficient, for induction of the human C-reactive protein gene in vivo. *Biochem. J.*, 325, 617–621.

- Wiinberg, B., Jensen, A. L., Johansson, P. I., Rozanski, E., Tranholm, M., & Kristensen, A. T. (2008). Thromboelastographic Evaluation of Hemostatic Function in Dogs with Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of Veterinary Intern Med*, 22, 357–365.
- Wiinberg, B., Jensen, A. L., Rojkjaer, R., Johansson, P., Kjelgaard-Hansen, M., & Kristensen, A. T. (2005). Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 34(4), 389–93.
- Wiinberg, B., Jensen, A. L., Rozanski, E., Johansson, P. I., Kjelgaard-Hansen, M., Tranholm, M., & Kristensen, A. T. (2009). Tissue factor activated thromboelastography correlates to clinical signs of bleeding in dogs. *The Veterinary Journal*, 179(1), 121–9. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.022
- Wiinberg, B., & Kristensen, A. T. (2010). Thromboelastography in veterinary medicine. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(7), 747–56. doi:10.1055/s-0030-1265291
- Wright, H., Moots, R., Bucknall, R. & Edwards, S., (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 49, 1618-1631.
- Zwaal, R. F. A, Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1636(2-3), 119–28. doi:10.1016/j.bbaliip.2003.07.003
- Zwaal, R. F., & Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4), 1121–32.

## Anexo 1: Proteínas hemostáticas, cofactores e inibidores

TABELA 11: PROTEÍNAS HEMOSTÁTICAS, COFACTORES E INIBIDORES

Classificação funcional	Sigla	Nome usual	Nome anterior	Característica
Via extrínseca	TF	Factor tissular	Tromboplastina	Cofactor
	FVII	Factor VII	Proconvertina	Zimogénio
	FVIIa	Factor VIIa		Enzima
Via de contacto	FXII	Factor XII	Factor de Hageman	Zimogénio
	FXIIa	Factor XIIa		Enzima
	PK	Precalicroína	Factor de Fletcher	Zimogénio
	K	Calicroína		Enzima
Via intrínseca	HK	Cininogénio de alto peso molecular	Factor de Williams-Fitzgerald-Flaujeac	Cofactor
	FXI	Factor XI		Zimogénio
Via intrínseca	FXIa	Factor XIa	Factor de Christmas	Enzima
	FIX	Factor IX		Zimogénio
	FIXa	Factor IXa	Factor anti-hemofílico	Enzima
	FVIII	Factor VIII		Pro-cofactor
	FVIIIa	Factor VIIa		Cofactor
	Via comum	FX	Factor X	Factor de Stuart-Prower
FXa		Factor Xa		Enzima
FV		Factor V		Pro-cofactor
FVa		Factor Va		Cofactor
Pro		Protrombina	Factor II	Zimogénio
Fg		Fibrinogénio	Factor I	Substrato
Fb		Fibrina		Produto final
FXIII		Factor XIII		Zimogénio
FXIIIa		FXIIIa		Enzima
Inibidores da coagulação	$\alpha$ 1PI	$\alpha$ 1-inibidor protease	$\alpha$ 1-antitripsina	
	AT	Antitrombina	Antitrombina III	
	TFPI	Inibidor do factor tissular		
	PC	Proteína C		Zimogénio
	PS	Proteína S		Cofactor
	TM	Trombomodulina		Cofactor

Classificação funcional	Sigla	Nome usual	Nome anterior	Característica
Fibrinólise	PLG PLM uPA  tPA	Plasminogénio Plasmina Activador uroquinase do plasminogénio Activador tissular do plasminogénio		Zimogénio Enzima
Inibidores da fibrinólise	$\alpha$ 2-AP PAI-1  TAFI	$\alpha$ 2-antiplasmina Inibidor do activador do plasminogénio -1 Inibidor da fibrinólise activado pela trombina	Inibidor da plasmina	enzima
Inibidores não específicos	C1-INH	Inibidor da C1 esterase		Inibidor

Adaptado de: Schalm's Veterinary Hematology 6<sup>th</sup> edition

## Anexo 2: Raças dos Cães para obtenção dos valores de referência

	Número	Porcentagem
American Staffordshire terrier	1	2,7
Pastor Alemão	1	2,7
Pastor Australiano	3	8,1
Pastor Australiano x labrador	2	5,4
Pastor Branco Suiço x husky	1	2,7
Cão Pastor dos Pirineus	1	2,7
Border collie	4	10,8
Border collie x Labrador	2	5,4
Bouledogue X Flat cloatted retriever	1	2,7
Bouvier Bernois	1	2,7
Bouvier d'apenzell	1	2,7
Cocker	2	5,4
X Labrador	2	5,4
X Fox terrier	1	2,7
Golden retriever	3	8,1
Grifo X Doberman	1	2,7
Husky	1	2,7
Labrador	2	5,4
Samoyede	1	2,7
Shi-tzu	1	2,7
Springer Spaniel	1	2,7
West higland terrier	1	2,7
SRD	1	2,7
X Braque	1	2,7
Yorkshire terrier	1	2,7
Total	37	100,0

SRD: sem raça determinada

X raça: cruzado com raça

### Anexo 3: Detalhe dos diferentes valores obtidos para os diferentes parâmetros nos cães para obtenção dos valores de referência

TABELA 12: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM NOS CAES PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA

EXTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
<b>n</b>	37	37	37	37	37	37	37
<b>Média</b>	51,95	40,95	161,65	54,46	61,19	98,62	94,65
<b>Desvio padrão</b>	15,68	6,08	41,84	5,56	6,29	3,049	7,61
<b>Mediana</b>	52	40	156	55	61	100	98
<b>Valor min</b>	32	31	90	43	51	88	72
<b>Valor max</b>	108	54	249	66	78	100	100
<b>Variância</b>	246,05	36,94	1750,4	30,97	39,6	9,297	57,901

TABELA 13: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO INTEM NOS CAES PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA

INTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
<b>n</b>	37	37	37	37	37	37	37
<b>Média</b>	146,95	42,84	125,08	55,2	67,57	99,92	97,86
<b>Desvio padrão</b>	37,35	5,98	45,68	5,5	6,53	0,363	2,97
<b>Mediana</b>	145	43	117	55	68	100	99
<b>Valor min</b>	53	28	57	40	48	98	85
<b>Valor max</b>	302	58	288	67	79	100	100
<b>Variância</b>	1395,33	35,81	2086,58	30,21	42,64	0,132	8,842

**TABELA 14: VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM NOS CAES PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERENCIA**

<b>FIBTEM</b>	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60</b> (%)
<b>n</b>	37	37		37		37	37
<b>Média</b>	53,14	6,81		8,03		80,35	78,62
<b>Desvio padrão</b>	18,29	2,72		3,131		10,557	12,287
<b>Mediana</b>	51	7		8		79	77
<b>Valor min</b>	32	2		3		58	47
<b>Valor max</b>	112	13		17		100	100
<b>Variância</b>	334,453	7,38		9,805		11,456	150,964

## Anexo 4: Detalhe dos diferentes valores obtidos para os diferentes parâmetros nos dois grupos de Beagles

TABELA 15 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM PARA OS BJ

EXTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Média</b>	47,9	55,3	94,7	65,3	71,3	96,6	92,1
<b>Desvio padrão</b>	8,397	4,762	15,464	4,523	3,199	7,820	10,115
<b>Mediana</b>	46,5	57	92,5	66	71,5	100	97
<b>Valor min</b>	36	48	77	57	66	75	66
<b>Valor max</b>	63	62	119	71	75	100	99
<b>Variância</b>	79,878	22,678	239,122	20,456	10,233	61,156	103,322
<b>Normalidade</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
<b>p-value</b>	0,420	0,389	0,310	0,409	0,263	<0,00001	0,00064

TABELA 16 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO INTEM PARA OS BJ

INTEM	CT (seg)	A10 (mm)	CFT (seg)	MCF (mm)	Ângulo (°)	Li 45 (%)	Li 60 (%)
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Média</b>	169,5	52,7	73,9	65,2	75,2	99,9	96,8
<b>Desvio padrão</b>	27,945	6,183	18,711	3,327	3,425	0,316	1,317
<b>Mediana</b>	175,5	53,5	72,5	65	75,5	100	97
<b>Valor min</b>	115	43	47	60	70	99	95
<b>Valor max</b>	198	63	103	70	80	100	99
<b>Variância</b>	780,944	38,233	350,1	11,067	11,733	0,1	1,733
<b>Normalidade</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<b>p-value</b>	0,222	0,944	0,571	0,777	0,501	<0,00001	0,575

**TABELA 17 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO FIBTEM PARA OS BJ**

<b>FIBTEM</b>	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60</b> (%)
<b>n</b>	10	10		10		10	10
<b>Média</b>	39,5	10,6		12,1		78,7	78,7
<b>Desvio padrão</b>	9,835	2,989		3,178		9,546	10,552
<b>Mediana</b>	37	10		12		77	77
<b>Valor min</b>	31	8		8		68	64
<b>Valor max</b>	66	18		19		94	95
<b>Variancia</b>	96,722	8,933		10,1		91,122	111,344
<b>Normalidade</b>	Não	Não		Sim		Sim	Sim
<b>p-value</b>	0,00047	0,008		0,423		0,148	0,469

**TABELA 18 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO EXTEM PARA OS BI**

<b>EXTEM</b>	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60</b> (%)
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Média</b>	34,3	67,7	64,3	74,8	78,1	99,9	98,3
<b>Desvio padrão</b>	2,312	4,27	11,963	3,084	2,47	0,316	0,675
<b>Mediana</b>	35	67,5	62,5	74,5	78,5	100	98
<b>Valor min</b>	32	60	48	69	73	99	97
<b>Valor max</b>	39	74	89	79	81	100	99
<b>Variança</b>	5,34	18,23	143,122	9,511	6,1	0,1	0,456
<b>Normalidade</b>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
<b>p-value</b>	0,04	0,97	0,77	0,79	0,12	<0,00001	0,015

**TABELA 19 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO INTEM PARA OS BI**

<b>INTEM</b>	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60</b> (%)
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Média</b>	177,2	65,2	50,8	72,8	79,6	99,9	98,7
<b>Desvio padrão</b>	42,394	4,131	11,272	2,530	2,459	0,316	0,949
<b>Mediana</b>	166	64,5	51	72,5	80	100	99
<b>Valor min</b>	120	60	34	69	76	99	97
<b>Valor max</b>	244	71	66	77	83	100	100
<b>Variança</b>	1797,289	17,067	127,067	6,4	6,044	0,1	0,9
<b>Normalidade</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<b>p-value</b>	0,27	0,19	0,49	0,61	0,42	<0,00001	0,29

**TABELA 20 - VALORES OBTIDOS PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS DO FIBTEM PARA OS BI**

<b>FIBTEM</b>	<b>CT</b> (seg)	<b>A10</b> (mm)	<b>CFT</b> (seg)	<b>MCF</b> (mm)	<b>Ângulo</b> (°)	<b>Li 45</b> (%)	<b>Li 60 (%)</b>
<b>n</b>	10	10	8	10	10	10	10
<b>Média</b>	34,7	23,9	75,5	25,5	79,9	86,6	86,9
<b>Desvio padrão</b>	3,683	8,117	20,8	7,821	2,88	5,441	6,707
<b>Mediana</b>	33,5	22,5	73,5	25	81	86	86,5
<b>Valor min</b>	31	13	51	14	75	76	75
<b>Valor max</b>	43	41	110	42	83	94	96
<b>Variança</b>	13,567	65,878	432,286	61,167	8,32	29,6	44,989
<b>Normalidade</b>	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
<b>p-value</b>	0,04	0,54	0,7	0,8	0,015	0,5	0,69

## **Anexo 5: RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

O estágio curricular, cujos objectivos foram adquirir e aprofundar conhecimentos na área da clínica de animais de companhia, foi realizado em Lyon, no *Centre Hospitalier d'Enseignement Vétérinaire* (CHEV) e no laboratório de análises bioquímicas da *antiga École Nationale Vétérinaire de Lyon*, actual VetAgro Sup e decorreu entre os dias 1 de Outubro de 2012 e 22 de Fevereiro de 2013.

O CHEV é o hospital da escola e encontra-se aberto ao público nos dias úteis das 8h às 17h. As consultas funcionam por marcação. O serviço de urgências, SIAMU (*Soins Intensifs, Anesthésiologie et Médecine d'Urgence*), está aberto 24h por dia nos 7 dias da semana. O estágio foi realizado nos serviços de reprodução, medicina interna, medicina especializada, cirurgia, serviço de urgência e laboratório um sistema de rotação semanal. O horário semanal dependia do serviço e era muito variável. No total, foram despendidas 596h.

No serviço de reprodução, quando em bloco cirúrgico, foi possível a realização de orquiectomias a gatos e ovariectomias a gatas. As cirurgias são efectuadas pelos alunos com supervisão dos internos. As consultas eram pré-cirúrgica onde era feita avaliação do animal pelo cirurgião e esclarecidas todas as questões relacionadas com as vantagens e inconvenientes do procedimento em questão com o proprietário; e pós-cirúrgicas, essencialmente pensos. A aluna ainda teve oportunidade de assistir a ecografias de controlo de gestação no serviço CERREC (*Centre d'Étude et de Recherche en Reproduction et Élevage des Carnivores*), procurado sobretudo por criadores.

No serviço de medicina interna, a aluna teve oportunidade de assistir a consultas de primeira opinião e a consultas de especialidade, entre as quais, cardiologia, gastroenterologia, dermatologia, neurologia, oftalmologia, comportamento animal e oncologia. No serviço de cirurgia foi possível assistir às consultas e acompanhar as cirurgias no bloco operatório.

O SIAMU é uma unidade de cuidados intensivos que recebe animais a qualquer hora do dia. Lá, a aluna teve oportunidade de participar nas consultas e apresentar o caso ao médico responsável. O serviço possui um internamento para animais em estado crítico no qual a aluna ficou responsável por monitorizar e cuidar de um determinado número de animais. No final do turno, a aluna ficou encarregada de realizar o relatório relativo ao dia ou noite em que esteve de serviço (relatar o comportamento, os valores de monitorização, o tratamento administrado, etc).

O trabalho em laboratório estava directamente relacionado com o projecto de investigação a decorrer na VetAgro Sup, subordinado ao tema "*Effet de l'âge sur l'hémostase et la régulation inflammatoire: conséquences potentielles sur la réponse au sepsis*" no qual a aluna

foi integrada. Era competência da aluna recolher a anamnese dos animais presentes no estudo e auxiliar na colheita de amostras (sangue). O processamento e análise das últimas eram feitos em laboratório onde a aluna teve oportunidade de utilizar diversos aparelhos (IDEXX Coag Dx™, IDEXX VetLab® Station, Sysmex XT-2000iV®, ROTEM®).