SÍLVIA VERÔNICA DE MAGALHÃES E CORRÊA

**Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e
na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada
(CID) em cães com pancreatite**

São Paulo

2017

SÍLVIA VERÔNICA DE MAGALHÃES E CORRÊA

Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada (CID) em cães com pancreatite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Marcia Mery Kogika

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3446
FMVZ

Corrêa, Sílvia Verônica de Magalhães e
Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada (CID) em cães com pancreatite. / Sílvia Verônica de Magalhães e Corrêa. -- 2017.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Mery Kogika.

1. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS). 2. Hemostasia. 3. Trombose.
4. Hipercoagulabilidade. 5. ReoRox. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 02 de março de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA TROMBOELASTOGRAFIA NA DETECÇÃO PRECOCE DA COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (CID) EM CÃES COM PANCREATITE", protocolado sob o CEUA nº 1721010215, utilizando 30 Cães (15 machos e 15 fêmeas), sob a responsabilidade de Marcia Mery Kogika, foi aprovado na reunião de 25/02/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "THROMBOELASTOGRAPHY ASSESSMENT IN EARLY DETECTION OF DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATIONS (DIC) IN DOGS WITH PANCREATITIS", protocol number CEUA 1721010215, utilizing 30 Dogs (15 males and 15 females), under the responsibility Marcia Mery Kogika, was approved in the meeting of day 02/25/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CORRÊA, Sílvia Verônica de Magalhães e

Título: **Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada (CID) em cães com pancreatite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Para o pitbull Pompom, meu filho de quatro patas, que sucumbiu à coagulação intravascular disseminada enquanto eu tentava compreendê-la.

AGRADECIMENTOS

Esta seção é o pesadelo dos mestrandos, porque sempre há a chance de esquecermos de alguém. Em tese, é opcional, mas como não agradecer a pessoas sem as quais nada disso teria acontecido? Então, abraçando o risco e torcendo para lembrar de todos, dirijo meu sincero e eterno muito obrigada:

Ao dr. **Élbio Antonio D'Amico** e à mais do que querida farmacêutica **Tânia Rúbia Flores da Rocha**, responsáveis pelo Laboratório de Hemostasia da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, que me permitiram levar um aparelho caro como o ReoRox G2 ao canil Vinha Del Mar e tornaram possível uma verdadeira maratona de exames, de forma a viabilizar que meu projeto fosse executado no prazo previsto, sem financiamento e de forma concomitante às minhas atividades profissionais. Uma lição de generosidade e de amor pelo aprendizado.

À **Mara Lúcia Montandon Borges**, proprietária da BioMédica e representante da MediRox no Brasil, que chegou viajar do Rio de Janeiro à minha casa, em São Paulo, para me orientar no manuseio do equipamento.

Ao seu **Arturo Claudio Carvacho Cortez**, proprietário do canil Vinha Del Mar, e a seus funcionários, especialmente **José Teixeira do Nascimento** e **Arenilton Nascimento Carvalho**, o Bahia, que não só me abriram as portas da propriedade, como não mediram esforços em me ajudar na escolha e na contenção dos animais.

Às médicas veterinárias **Renata Ramos Rodrigues** e **Lilian Regina Sewastjanow**, minhas colegas de residência e parceiras no interesse pelos mistérios da coagulação, que nunca me negaram auxílio ou minutos de seu tempo para a troca de ideias.

Às professoras do Departamento de Cirurgia, **Aline Magalhães Ambrósio**, **Silvia Renata Gaido Cortopassi** e **Denise Tabacchi Fantoni**, que viabilizaram meu acesso ao ReoRox G2 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade de São Paulo, permitindo que as amostras de sangue dos animais doentes fossem rapidamente analisadas.

À **Valéria Pires Corrêa**, companheira de todas as horas, sem a qual talvez nem médica veterinária eu fosse.

Aos meus pais, **Rogério Carlos Barreto Corrêa e Maria Helena Corrêa Magalhães**, e às minhas irmãs, **Clarissa e Cristiane Magalhães Costa**, com os quais aprendi que SER é muito melhor do que TER; que a vida é centrada em princípios e que amor e comprometimento com o que se decide fazer é o mínimo que se pode oferecer ao outro.

Aos amigos. Os que me mantiveram acordada com as conversas pelo WhatsApp; os que me garantiram equilíbrio ao me oferecer o ombro, a casa, o tempo; os que sempre me receberam com um largo sorriso, apesar da minha longa ausência e do meu constante silêncio.

Por fim, à minha orientadora e amiga **Marcia Mery Kogika**, que me aceitou como mestrande, ainda que o tema proposto não se encaixasse em sua linha de pesquisa. Obrigada, professora, por me ter permitido ser depositária de sua confiança.

RESUMO

CORRÊA, S.V.M. **Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada (CID) em cães com pancreatite.** [Thromboelastography assessment in clinically normal dogs and in early detection of disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs with pancreatitis]. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Coagulação Intravascular Disseminada (CID) é uma síndrome caracterizada pela ativação sistêmica da coagulação sanguínea, levando à trombose microvascular difusa e podendo comprometer a função de múltiplos órgãos. O acelerado consumo de plaquetas e fatores de coagulação pode, no entanto, dar origem a um estado de hipocoagulabilidade, o que confere à CID uma característica paradoxal na qual o excesso de coagulação pode causar uma diátese hemorrágica. Doenças que levam à Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) estão entre os principais gatilhos da CID. A pancreatite é uma dessas doenças. O maior desafio para o médico veterinário é diagnosticar a CID na fase precoce, silenciosa e de hipercoagulabilidade, visto que os testes laboratoriais de rotina, como contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), detectam apenas o estado de hipocoaguabilidade, que se estabelece na fase mais avançada da síndrome. Nesse contexto ganham importância os analisadores tromboelastográficos, equipamentos que avaliam a coagulação em sangue total e que, ao menos em tese, podem informar a velocidade de formação do coágulo, a força máxima que ele atinge e os padrões de sua dissolução. Este estudo é o primeiro realizado em cães com o aparelho ReoRox G2 (MediRox), uma das marcas disponíveis no mercado. Limites de referência para as variáveis do aparelho foram definidos a partir da análise do sangue de 49 animais clinicamente saudáveis para três tipos de reação: acelerada com fator tecidual (TF), acelerada com TF e um antagonista de agregação plaquetária (abciximab) e apenas com sangue recalcificado. Em seguida, foram comparados a esse intervalo de referência os valores obtidos pela análise tromboelastográfica do sangue de seis pacientes com pancreatite recém-diagnosticada. Nos três tipos de reação pelo menos 50% dos pacientes do Grupo Pancreatite apresentaram alterações sugestivas de hipercoagulabilidade. A variável MAXELAST (força máxima do coágulo) foi a que esteve alterada com mais frequência entre os animais doentes. Não houve alteração

nos marcadores de velocidade de fibrinólise. Estudos prospectivos que associem outras variáveis de trombose, protocolos de tratamento e prognóstico de pacientes com doenças subjacentes que predisponham à CID são necessários para que se possa afirmar que o traçado obtido pela tromboelastografia realmente representa um estado de hipercoagulabilidade *in vivo* em pacientes com pancreatite.

Palavras-chave: Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS). Hemostasia. Trombose. Hipercoagulabilidade. ReoRox.

ABSTRACT

CORRÊA, S.V.M. **Thromboelastography assessment in clinically normal dogs and in early detection of disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs with pancreatitis**. [Avaliação da tromboelastografia em cães clinicamente normais e na detecção precoce da coagulação intravascular disseminada (CID) em cães com pancreatite]. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) is a syndrome characterized by systemic activation of blood clotting, leading to diffuse microvascular thrombosis and may compromise multiple organ function. The accelerated consumption of platelets and coagulation factors may, however, originate a state of hypocoagulability, which gives the DIC a paradoxical characteristic in which excess coagulation can lead to a hemorrhagic diathesis. Diseases which cause Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) are among the major triggers of DIC, including pancreatitis. The greatest challenge for veterinarians is to diagnose DIC in the early, silent and hypercoagulable phase, since routine laboratory tests, such as platelet count, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), detect only the state of hypocoagulability, which occurs in the most advanced stage of the syndrome. In this context, thromboelastography analyzers stand out. They are equipment which evaluate coagulation in whole blood and, at least in theory, inform the speed of clot formation, its maximum force and how it dissolves. This is the first study performed in dogs with the ReoRox G2 (MediRox), one of the brands available in the market. Limits of reference were defined from blood analysis of 49 healthy animals for three reaction types: accelerated with tissue factor (TF), accelerated with TF and a platelet aggregation antagonist (abciximab) and with only recalcified blood. Next, values obtained by blood thromboelastographic analysis of six patients with newly diagnosed pancreatitis were compared to this reference range. In all three types of reactions, at least 50% of patients in the Pancreatitis Group presented alterations suggestive of hypercoagulability. The variable MAXELAST (maximum clot strength) was the one that was most frequently altered among ill animals. There was no change in fibrinolysis rate markers. Prospective studies associating other thrombosis variables, treatment protocols, and prognosis of patients with underlying diseases predisposing to DIC are necessary to confirm that the pathway obtained by

thromboelastography actually represents a state of hypercoaguability *in vivo* in patients with pancreatitis.

Key words: Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Hemostasis. Thrombosis. Hypercoaguability. ReoRox.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	FISIOPATOLOGIA DA PANCREATITE	18
2.2	HEMOSTASIA E INFLAMAÇÃO	21
2.2.1	Coagulação	21
2.2.2	Anticoagulação, Fibrinólise e Antifibrinólise	27
2.3	COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (CID)	31
2.3.1	CID e Pancreatite	31
2.3.2	Diagnóstico da CID	33
2.3.3	Analisadores Tromboelastográficos	35
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A Coagulação Intravascular Disseminada (CID) é uma síndrome caracterizada pela ativação sistêmica da coagulação sanguínea, que leva a uma trombose microvascular difusa, comprometendo a perfusão e podendo contribuir com a falência de múltiplos órgãos. Tal ativação constante da coagulação sanguínea pode, no entanto, esgotar plaquetas e fatores de coagulação, resultando em um estado de hipocoagulabilidade, o que confere à CID uma característica paradoxal na qual o excesso de coagulação pode dar origem a uma diátese hemorrágica (CHILDRESS, 2012; STOKOL, 2012; TAKAHIRA, 2003). Há trabalhos que indicam que a taxa de letalidade da CID varia entre 50% a 77% em cães e chega a 93% em gatos (HACKNER, s/d), mas o diagnóstico de tal síndrome ainda é controverso o bastante para levantar dúvida sobre a precisão desses dados.

Invariavelmente, a CID ocorre como complicação de uma doença subjacente, cuja etiologia pode ser infecciosa (bacteriana, fúngica, viral ou protozoária), inflamatória (trauma, choque, pancreatite, queimadura), neoplásica ou imunomediada. Por caminhos diversos, as doenças de base levam à expressão do fator tecidual (TF) na superfície de várias células do hospedeiro que estão em contato com o sangue, iniciando a cascata da coagulação de forma irrestrita, descontrolada e sistêmica (STOKOL, 2012).

A pancreatite é uma das afecções que podem evoluir para SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica) e, em seguida, para CID, podendo ser usada como modelo para o estudo da progressão da coagulação intravascular disseminada. Na pancreatite, a ativação intrapancreática de enzimas digestivas é o evento inicial da inflamação, embora não estejam claros os fatores que levam a essa ativação. A interrupção de tal processo depende do tratamento da doença de base, o que, na pancreatite, consiste apenas em medidas de suporte. Quando tais medidas não são suficientes para dar condições ao organismo de combater a doença, mais tripsina e mediadores inflamatórios são liberados em grande volume na circulação sanguínea, levando à SIRS e iniciando a ativação sistêmica da coagulação (GRANGER; REMICKE, 2005).

A partir desse momento, os eventos observados na pancreatite ou em qualquer doença inflamatória generalizada se assemelham: a coagulação ocorre de forma disseminada, enquanto a fibrinólise é inibida. O processo deve ser interrompido antes que a trombose excessiva gere lesão em outros órgãos ou que consuma plaquetas e fatores de coagulação, desencadeando um quadro hemorrágico (CHILDRESS, 2012).

A transição do quadro de trombose para eventos hemorrágicos caracteriza a CID como sendo de natureza dinâmica e progressiva, o que faz com que as manifestações clínicas variem da ausência de sinais à falência de órgãos (por trombose microvascular) ou ao sangramento evidente (petéquias, sufusões e hemorragias) (RALPH; BRAINARD, 2012). Em um estudo experimental de indução de pancreatite em cães verificou-se, à necrópsia, a presença de múltiplos microtrombos nos pulmões e rins dos animais (SATAKE *et al.*, 1981).

O maior desafio para o médico veterinário é diagnosticar a CID na fase precoce, silenciosa e de hipercoagulabilidade, visto que os teste laboratoriais de rotina, como contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), detectam apenas o estado de hipocoaguabilidade, que se estabelece na fase mais avançada da síndrome, na qual há poucos recursos para se tentar reverter o quadro (STOKOL, 2012).

É nesse cenário que os aparelhos de análise tromboelastográfica se apresentam como instrumentos potencialmente úteis, capazes de detectar a hipercoagulação e permitir uma intervenção terapêutica precoce, podendo, ao menos em teoria, reduzir a mortalidade desses pacientes.

A tromboelastografia é uma técnica viscoelástica realizada em sangue total e que permite, assim, a avaliação completa dos componentes da hemostasia do paciente (fatores solúveis e constituintes celulares), com exceção apenas do endotélio (THAWLEY *et al.*, 2016). O sangue é coagulado em um equipamento que mede a velocidade em que isso ocorre, a resistência do coágulo formado e a velocidade da fibrinólise, oferecendo as informações nas formas gráfica e numérica. Em estados de hipercoagulabilidade, portanto, a tromboelastografia pode indicar a formação precoce do trombo, a força excessiva do coágulo e a velocidade de sua dissolução (CHEN; TERUYA, 2009; STOKOL, 2012; THAWLEY *et al.*, 2016).

Em humanos, analisadores tromboelastográficos têm sido utilizados para avaliar o *status* coagulatório de pacientes com trauma, sepse, submetidos a

transplantes, cirurgias cardíacas e ortopédicas, além de inúmeras outras situações pós-cirúrgicas (BRUNO *et al.*, 2015).

Em cães, alguns estudos já concluíram que a tromboelastografia tem capacidade de identificar estados pró-trombóticos em quadros de parvovirose (OTTO *et al.*, 2000), anastomoses portossistêmicas (KELLEY *et al.*, 2013), neoplasias (KRISTENSEN *et al.*, 2008; VILAR *et al.*, 2011), anemia hemolítica imunomediada (SINNOTT; OTTO, 2009; FENTY *et al.*, 2011; GOGGS *et al.*, 2012), enteropatias (GOODWIN *et al.*, 2011), nefropatias com perda proteica (LENNON *et al.*, 2013; DONAHUE; BROOKS; OTTO, 2011), peritonite séptica (BENTLEY *et al.*, 2013) e hiperadrenocorticismismo (ROSE; DUNN; BEDÁRD, 2013; KOL *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013).

Um estudo avaliou 50 animais com doenças subjacentes que os predispunham à CID e concluiu que o estado de hipercoagulabilidade é o mais comum nesses pacientes e que a mortalidade em um segmento de 28 dias foi maior entre os cães que evoluíram para a hipocoagulação (WIINBERG *et al.*, 2008).

Existem diferentes analisadores de tromboelasticidade no mercado, como o norte-americano TEG (Tromboelastógrafo - Hemoscope Corporation), o alemão ROTEM (Tromboelastômetro - Pentapharm) e sueco ReoRox G2 (Reômetro de oscilação livre - MediRox). Embora façam aferições dos mesmos fenômenos fisiológicos, eles as expressam em variáveis que não são numericamente comparáveis entre si (SOLOMON *et al.*, 2015; MCMICHAEL *et al.*, 2014).

Até hoje, os estudos feitos com cães utilizaram equipamentos das marcas TEG ou ROTEM, não havendo, até onde se tem conhecimento, análise da coagulação sanguínea desses animais com a utilização do aparelho sueco ReoRox G2, seja para delimitar possíveis intervalos de referência para a espécie, seja para avaliar a capacidade do instrumento de detectar estados pró-trombóticos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é sugerir um possível intervalo de referência para as variáveis obtidas no ReoRox G2 a partir da análise do sangue de caninos clinicamente saudáveis, bem como verificar a capacidade de o equipamento detectar estados pró-trombóticos em cães com diagnóstico clínico de pancreatite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOPATOLOGIA DA PANCREATITE

A pancreatite é uma condição inflamatória do pâncreas exócrino, mais frequente em cães do que neoplasias ou insuficiências pancreáticas (XENOULIS, 2015). Em medicina veterinária, os quadros têm sido classificados em agudos e crônicos, sendo a reversibilidade das alterações do tecido pancreático a principal diferença entre eles. Na pancreatite aguda, retirada a causa de base e controlada a inflamação, o pâncreas volta ao seu estado anterior. Já a pancreatite crônica resulta de uma agressão persistente ao órgão, que leva à morte das células acinares, causando fibrose e atrofia, mesmo após o controle do quadro. A classificação, portanto, em crônica ou aguda depende da análise histológica do tecido pancreático e não deve ser feita exclusivamente a partir das manifestações clínicas do paciente (BOSTROM *et al.*, 2013; WATSON *et al.*, 2007).

Cães de qualquer raça, sexo ou idade podem desenvolver pancreatite, mas a maior parte dos pacientes são adultos a idosos, com mais de cinco anos (XENOULIS, 2015). Na maioria dos casos, a etiologia da doença não é determinada, embora haja estudos que apontem obesidade (LEM *et al.*, 2008; HESS *et al.*, 1999), hiperlipidemia (XENOULIS; STEINER, 2010a), hipercalcemia (FRICK *et al.*, 1990) e existência de doenças endócrinas (HESS *et al.*, 1999) como fatores de risco.

Toxinas (organofosforados, zinco, veneno de escorpião) e alguns fármacos (imunossupressores, quimioterápicos, diuréticos, anticonvulsivantes e antimicrobianos) também têm sido incriminados como potenciais indutores de pancreatite (WATSON, 2015), além de refluxo do suco duodenal pelo ducto pancreático em decorrência de obstruções causadas por neoplasias, corpos estranhos ou parasitos (VAN GEENEN *et al.*, 2010). Trauma (cirúrgico ou externo) (NAGAYA *et al.*, 2004), isquemia (choque, hipovolemia, oclusão venosa) (TANAKA *et al.*, 1994), doenças imunomediadas (WARMAN *et al.*, 2008) e agentes infecciosos (MÖHR *et al.*, 2000) também podem ser o gatilho da inflamação pancreática, embora os mecanismos de causa e efeito não tenham sido claramente estabelecidos para a maioria desses fatores (XENOULIS, 2015).

O processo resultante é a autodigestão do órgão. Fisiologicamente, o

pâncreas tem ao menos três mecanismos que tentam evitar essa autodestruição. O primeiro deles consiste no armazenamento das enzimas pancreáticas na forma de zimógenos (precursores inativos), que só serão clivados em moléculas ativas na luz intestinal, pelas enteropeptidases secretadas pelos enterócitos (XENOULIS, 2015). É essa a reação pela qual o tripsinogênio é convertido em tripsina, por exemplo, uma das principais enzimas pancreáticas.

O segundo mecanismo fisiológico de proteção pancreática consiste na total separação entre esses zimógenos digestivos e as enzimas lisossomais durante a síntese, o armazenamento e a secreção dessas substâncias, visto que as enzimas lisossomais também têm a capacidade de quebrar os zimógenos em moléculas ativas. Por fim, ainda que ocorra algum nível de ativação intrapancreática do tripsinogênio, por exemplo, uma molécula encarregada de inibir a ação de pequenos montantes de tripsina (PSTI ou SPINK 1) estará armazenada na mesma vesícula onde estão estocadas as enzimas e entrará em ação (MANSFIELD, 2012).

Quando os mecanismos fisiológicos de proteção são sobrepajados, seja pela ruptura intrapancreática concomitante de diversas vesículas digestivas e lisossomais, por mutação nos genes que codificam a SPINK 1 ou pelo refluxo de tripsina a partir do duodeno, o tecido pancreático começa a ser agredido, levando à inflamação, que pode evoluir de edematosa para hemorrágica e necrótica, conforme as enzimas digestivas vão sendo ativadas e a inflamação se perpetua (TRAVIS; SAFIAH; LIAW, 2012; SWINNEY, s/d).

Inicialmente, a doença se apresenta como uma afecção localizada. Em seguida, no entanto, o dano inflamatório à microvasculatura pancreática faz com que as enzimas digestivas ativas atinjam a circulação sanguínea. O organismo ainda tem mais uma linha de defesa, as proteases plasmáticas (alfa 1 e alfa macroglobulinas). Elas se ligam às enzimas digestivas, de forma a permitir que elas sejam fagocitadas por monócitos e macrófagos (SWINNEY, s/d).

Quando a concentração de enzimas digestivas supera a capacidade de inibição das proteases plasmáticas, elas ativam de forma sistêmica as células de defesa do organismo, levando à liberação inúmeros mediadores inflamatórios (TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas etc.) e caracterizando o quadro de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica). Moléculas pró-inflamatórias são também pró-coagulantes e, dessa forma, a SIRS induz a ativação intravascular disseminada da coagulação sanguínea (GRANGER; REMICK, 2005), a

principal complicação dos quadros de pancreatite, cujos mecanismos serão detalhados a seguir.

As manifestações clínicas variam com o estágio e a gravidade da pancreatite, que muitas vezes só é diagnosticada por ocasião do acometimento inflamatório sistêmico, quando as alterações clínicas se tornam mais evidentes (XENOULIS, 2015). Nessa fase, anorexia, êmese, diarreia, fraqueza e prostração são as queixas mais frequentes, mas não há manifestações patognomônicas da doença. Há casos de febre, hipotermia, arritmias, dificuldade respiratória e icterícia. A desidratação é possível, bem como a efusão peritoneal, podendo levar ao choque. A dor abdominal existe, mas costuma ser menos evidente do que em humanos, revelando-se mais frequentemente pela adoção da posição de prece ou durante a palpação, no exame físico (WEATHERTON; STREETER, 2009; RUAUX, 2000; HESS *et al.*, 1998). Sinais de sangramento só aparecem em um estágio bastante avançado da doença, como veremos em seguida. O mesmo ocorrendo com aumento nos tempo de coagulação (XENOULIS, 2015; WEATHERTON; STREETER, 2009; RUAUX, 2000).

Os resultados dos exames hematológicos de rotina são inespecíficos e insuficientes para o diagnóstico, mas permitem descartar outras alterações e afunilar a lista de diagnósticos diferenciais (XENOULIS, 2015). A neutrofilia (até com desvio à esquerda) é relativamente comum, mas também pode haver neutropenia. O hematócrito pode estar elevado, em caso de hemoconcentração, ou baixo, em decorrência do processo inflamatório. A trombocitopenia é observada em 50% dos casos e pode sugerir a coagulação intravascular disseminada já em fase descompensada, de hipocoagulação (XENOULIS, 2015; HESS *et al.*, 1998).

Ns bioquímica sérica pode ser detectado aumento da atividade das enzimas hepáticas (pela própria inflamação sistêmica ou por obstrução do ducto colédoco, isquemia ou drenagem de substâncias tóxicas das veias pancreáticas para a veia porta) e azotemia (por desidratação, isquemia ou agressão direta dos rins pelos mediadores inflamatórios). Pode ocorrer hipoalbuminemia devido a perdas por vasculite e efusão peritoneal. Quadros de êmese e desidratação podem desencadear distúrbios eletrolíticos e de equilíbrio ácido-básico (XENOULIS, 2015).

A biópsia do tecido pancreático, seguida por análise histopatológica, seria o exame de eleição para o diagnóstico definitivo da doença, mas não é realizada na prática clínica devido ao seu caráter invasivo e traumático, além de custo mais alto e maior tempo para a obtenção do resultado (XENOULIS; STEINER, 2010b;

CORDNER *et al.*, 2010). Dessa forma, entre os métodos não-invasivos, os exames com mais sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da pancreatite são a ultrassonografia abdominal (baseada no aumento da ecogenicidade do órgão e de seu entorno) e a mensuração da lipase pancreática específica canina (cPLI), por ELISA ou radioimunoensaio, feita a partir de anticorpos monoclonais desenvolvidos em coelhos contra a lipase produzida exclusivamente pelo pâncreas de cães (NEILSON-CARLEY *et al.*, 2011).

A ultrassonografia tem cerca de 75% a 95% de especificidade e de 56% a 84% de sensibilidade para o diagnóstico de pancreatite em cães e gatos, sendo esses índices bastante dependentes do equipamento e da experiência do operador (WILLIAMS *et al.*, 2013; WATSON *et al.* 2010; HESS *et al.*, 1998). Já a aferição da cPLI tem 66% a 100% de especificidade e de 21% a 94% de sensibilidade, conforme o estudo consultado e a intensidade da doença (MCCORD *et al.*, 2012; TRIVEDI *et al.*, 2011; XENOULIS; STEINER; 2010b; STEINER *et al.*, 2008), mas não está disponível em todos os serviços.

Mensurações de amilase e lipase por bioquímica sérica não têm bom valor prognóstico porque essas enzimas também são produzidas em outros órgãos e podem estar alteradas em casos de uso de glicocorticoides, hipertermia e doenças renal, hepática ou intestinal (XENOULIS, 2015).

2.2 HEMOSTASIA E INFLAMAÇÃO

2.2.1 Coagulação

O sistema hemostático é uma rede de cooperação complexa entre proteínas e células cujo objetivo é manter o sangue fluido nos vasos, produzindo e dissolvendo coágulos de fibrina e impedindo, simultaneamente, o sangramento e a oclusão dos vasos. Perturbações no equilíbrio das forças que impulsionam coagulação ou fibrinólise resultam em distúrbios hemorrágicos ou trombóticos. A inflamação é uma dessas perturbações (STOKOL, 2012; SMITH, 2010).

Em situações fisiológicas, a coagulação não acontece dentro dos vasos

porque as células que participam do processo estão em repouso (caso, por exemplo, das plaquetas e células endoteliais) e porque as proteínas que integram esse processo circulam na forma de precursores inativos (zimógenos ou pro-cofatores). Em caso de ativação dessas células ou de lesão na vasculatura, o sangue é exposto a componentes que são fisiologicamente intracelulares ou extravasculares, iniciando uma cascata de ativação celular e geração de enzimas ativas, que culmina na produção de coágulos estáveis e, de forma concomitante, também na ativação das moléculas que serão responsáveis por remover esses coágulos e restaurar o fluxo sanguíneo (SMITH, 2010).

Na inflamação, por exemplo, os leucócitos ativados liberam citocinas (TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8), que danificam o endotélio dos pequenos vasos, permitindo que componentes sanguíneos entrem em contato com componentes extravasculares. É assim que as plaquetas se aderem ao colágeno subendotelial, com o auxílio do Fator de von Willebrand (FvW ou, do inglês, vWF). A adesão ativa as plaquetas, que liberam Fator V (inicialmente intracelular) e recrutam outras plaquetas, formando o tampão responsável pela hemostasia primária (LIPPI *et al.*, 2009; FURIE; FURIE, 2007; WAGNER; BURGER, 2003). Essa adesão plaquetária, que caracteriza a hemostasia primária, depende, no entanto, de outro processo, que ocorre de forma concomitante e que ativará o FvW: a fase de iniciação da coagulação sanguínea, um componente da hemostasia secundária.

Na lesão vascular, os componentes séricos são expostos não só ao colágeno subendotelial, mas a outros componentes da matriz extravascular. Um deles é o Fator Tecidual (TF, tromboplastina ou Fator III), uma proteína transmembrana que, fisiologicamente, está presente na superfície das células musculares lisas e dos fibroblastos subendoteliais (Figura 1). O TF se liga ao Fator VII, que ocorre naturalmente na circulação, ativando-o. Juntos, formam o complexo TF-FVIIa, que ativará, em sequência, pequenas quantidades de FIX (Fator de Christmas) e FX (Fator de Stuart-Prower) (FERREIRA *et al.*, 2010; RIDDEL JR. *et al.*, 2007; BUTENAS; MANN, 2004; HOFFMAN, 2003; HOFFMAN; MONROE, 2001). Essa é a fase de iniciação do processo de coagulação sanguínea, que envolve desde a perturbação ao endotélio vascular e às células sanguíneas circulantes até a interação dos TF com o FVII (FERREIRA *et al.*, 2010).

Figura 1 – Fase de iniciação da coagulação sanguínea

Fonte: (MONROE, 2002)

Legenda: No alto, o fluxo sanguíneo normal é alterado por uma lesão endotelial (decorrente de inflamação, por exemplo), que permite que elementos sanguíneos entrem em contato com componentes extravasculares. Em seguida, a magnificação da região subendotelial mostra o Fator Tecidual (TF, em verde), expresso em células subendoteliais, se ligando ao Fator VII e formando o complexo TF-FVIIa, que ativa o FIX e o FX, caracterizando a fase de iniciação da coagulação

Fica evidente, portanto, que a lesão vascular causada pela inflamação expõe o TF à circulação sanguínea e desencadeia a cascata da coagulação. Ocorre, porém, que a lesão vascular não é a única forma de contato entre o TF e o sangue. A ativação de células endoteliais e de monócitos, que acompanha os processos inflamatórios, também faz com que essas células exponham o TF em suas superfícies, o que elas não o fazem constitutivamente. O mesmo ocorre em fragmentos de células que tenham sido rompidas por traumas externos ou choques intravasculares em formações neoplásicas, por exemplo (RALPH; BRAINARD, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010). Essa exposição disseminada do TF é a base da coagulação intravascular disseminada (CID), que decorre das inflamações sistêmicas, pois ativará de forma irrestrita toda a cascata de coagulação.

O FXa (ativado pelo complexo TF-FVIIa) se associa à forma também ativada do FV (pró-acelerina ou Fator Lábil), que foi liberado pelas plaquetas ativadas e pode ter sido ativado pelo próprio FXa, por proteases não-coagulantes e, em um

segundo momento, será ativado pela própria trombina, como se verá mais adiante. Juntos, FXa-FVa formam um complexo denominado protrombinase na superfície da célula que expõe o TF, seja ela subendotelial ou intravascular (Figura 2), iniciando a fase de amplificação da coagulação (FEREIRA *et al.*, 2010; VINE, 2009; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007; HOFMANN, 2003).

O complexo protrombinase transforma pequenas quantidades de FII (protrombina) em trombina. O volume é insuficiente para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas tem papel fundamental na hemostasia primária e na garantia de continuidade da cascata de coagulação. Primeiro porque cabe a essa trombina dissociar o complexo FVIII-FvW (fisiologicamente em circulação), ativar o FVIII livre e permitir que o FvW faça a mediação da já mencionada adesão plaquetária ao colágeno subendotelial. Além dessa, a trombina inicial tem outras três funções: (a) reagir com as plaquetas, fazendo com que elas cheguem à máxima ativação, liberem substâncias quimiotáticas que atraiam os fatores para o local do tampão plaquetário e exponham sítios de ligação para esses fatores ativados; (b) ativar mais FV, liberado pelas próprias plaquetas ativadas; e (c) ativar o FXI, em uma reação enzimática que explica os motivos pelos quais o FXII, que ativa o FXI pela conhecida via intrínseca ou via de contato, não é necessário para hemostasia normal nem relevante no processo de CID (VINE, 2009; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007; HOFMANN, 2003).

A ativação da coagulação por intermédio do FXII é aquela que acontece na punção venosa, quando o sangue entra em contato com a superfície da agulha, o que rendeu à via o nome de via de contato ou via intrínseca (visto que todos os componentes nela envolvidos estão em circulação, na forma inativa). O FXIIa, ativado pelo contato com a agulha, ativa o FXI, que, por sua vez, ativará o FIX, levando a sequência de reações enzimáticas ao mesmo ponto em que ela chega por intermédio do complexo TF-FVIIa. Atualmente, no entanto, é sabido que a rota de coagulação via FXIIa não é fundamental para hemostasia normal, visto que pacientes com deficiência de FXII não apresentam quadros hemorrágicos (MCMICHAEL, 2012; SMITH, 2010).

Algo semelhante ocorre na CID. Em modelos de sepse nos quais endotoxinas foram inoculadas em macacos babuínos, o estímulo não gerou uma maior produção de trombina a partir da ativação do FXII. Em contrapartida, quando a endotoxemia foi induzida juntamente com a inibição da formação do complexo TF-FVIIa, a

2.2.2 Anticoagulação, Fibrinólise e Antifibrinólise

Uma vez formado o coágulo de fibrina, o processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão, evitando a oclusão trombótica do vaso. Para controlar a coagulação disseminada intervêm, inicialmente, fatores anticoagulantes e, num segundo momento, fatores fibrinolíticos. Os principais anticoagulantes endógenos são o Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI), a Proteína C, a Proteína S e a Antitrombina (DELGIUDICE; WHITE, 2009; LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002).

O TFPI é uma proteína secretada por endotélio, fígado e monócitos, que forma um complexo quartenário com FT, FVIIa e FXa (Figura 4), retendo-os e inativando-os, o que limita a coagulação (DELGIUDICE; WHITE, 2009; LWALEED; BASS, 2006). Na inflamação sistêmica, no entanto, a concentração sérica de TFPI pode cair, porque ela é degradada por proteases secretadas pelos inúmeros neutrófilos ativados (WADA; MATSUMOTO; YAMASHITA, 2014).

A Proteína C (PC) é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K que, ativada, promove a proteólise dos cofatores FVa e FVIIIa, impedindo a formação dos complexos tenase e protrombinase. Em situação fisiológica, a própria via de coagulação leva a essa ativação, pois a trombina, após converter o fibrinogênio em fibrina, se liga à trombomodulina (uma proteína transmembrana das células endoteliais intactas), formando um complexo que ativa a Proteína C que esteja ligada a seu receptor endotelial (Figura 4). A atividade da PC é aumentada pela Proteína S, que circula livre no plasma e funciona como um cofator (ESMON, 2000a; ESMON, 2000b). Na inflamação sistêmica, no entanto, conforme previamente observado em modelos de endotoxemia, o número de células endoteliais intactas (não ativadas) cai drasticamente e, portanto, cai a expressão de trombomodulina e de receptores de PC, o que diminui a ativação do fator anticoagulante, favorecendo o quadro trombótico (LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002).

Figura 4 – Atuação dos antiacoagulantes endógenos

Fonte: (VERSTEEG et al., 2013, adaptado por CORRÊA, 2017)

Legenda: Em (1), o TFPI forma, fisiologicamente, um complexo quartenário com TF, FVIIa e FXa, inativando-os e impedindo a coagulação. Na CID, há menos TFPI. Em (2), o FIIa (trombina) se liga à proteína endotelial transmembrana trombomodulina (TM) e, juntas, elas ativam as moléculas de Proteína C que estejam ligadas aos seus receptores endoteliais (EPCR). A Proteína C ativada (APC) tem a atividade aumentada pela Proteína S em circulação e, juntas, elas promovem a proteólise dos FVa e FVIIIa, impedindo sua atividade. Na CID, o endotélio expressa menos trombomodulina e menos receptores de proteína C. Por fim, em (3) a Antitrombina (AT) inibe a atividade do FIIa (trombina) e dos demais fatores de coagulação. Na CID, os níveis de antitrombina caem

O quarto anticoagulante natural é a Antitrombina (AT). Também produzida pelo fígado e pelo endotélio, ela inibe a atividade da trombina (Figura 4) e de todos os fatores de coagulação ativados (exceto o FVIIa) (LIPPI *et al.*, 2009; VINE, 2009). Na inflamação sistêmica, as moléculas de AT têm seus níveis plasmáticos reduzidos pelo consumo (devido à contínua geração de trombina, o que também pode impactar os demais fatores anticoagulantes), por degradação por proteases produzidas por neutrófilos ativados e por redução de síntese (no endotélio e no fígado). Considerando que AT e PC ativada têm também funções anti-inflamatórias, a redução de seus níveis plasmáticos não resulta apenas em descontrole da coagulação, mas também na ausência de empecilhos para a escalada da inflamação, em um perigoso círculo vicioso (MYERS; MCGAVIN, 2009; PINTÃO; FRANCO, 2001).

Sobre a área lesada, o coágulo só deve existir em tamanho suficiente para evitar a saída de sangue do vaso, sem que leve à sua oclusão. Esse é o papel da fibrinólise, fase de finalização do processo de coagulação, baseada na degradação da fibrina pela ação da plasmina (SMITH, 2010).

A fibrinólise é desencadeada concomitantemente à iniciação da coagulação, pois os mesmos macrófagos e endotélio ativados que levaram a exposição do sangue ao TF são responsáveis por liberar o Ativador de Plasminogênio do Tipo Tecidual (t-PA ou AP-t), que converterá o plasminogênio em plasmina (SMITH, 2010; ZORIO *et al.*, 2008).

O plasminogênio é uma glicoproteína sérica sintetizada predominantemente pelo fígado, mas também por rim, cérebro, coração, pulmão, baço e intestino. Na presença de um coágulo, ele apresenta especificidade pela fibrina ali produzida, pois a fibrina e o endotélio ativado possuem sítios de ligação para a molécula de plasminogênio. A ligação do plasminogênio à fibrina se dá por intermédio do aminoácido lisina. Tal ligação altera a conformação molecular do plasminogênio, aumentando sua afinidade pelo t-PA (que usa resíduos de lisina para se ligar ao plasminogênio), reforçada pelo fato de o próprio t-PA ter receptores para o endotélio ativado (SMITH, 2010; ZORIO *et al.*, 2008).

Existe um coeficiente que mede exatamente essa afinidade, determinando a concentração necessária de determinada molécula para que se atinja a velocidade máxima de reação (K_M). No caso da transformação do plasminogênio em plasmina pelo t-PA, o K_M cai de 65 μM de moléculas de plasminogênio soltas no plasma para 0,15 a 1,5 μM de moléculas ligadas à fibrina. Ou seja: com muito menos moléculas de plasminogênio, desde que ligadas à fibrina, chega-se à mesma velocidade de reação. Essa diferença de afinidade explica porque o t-PA não ativa o plasminogênio circulante em plasmina de forma disseminada, como o faz a estreptoquinase, evitando o risco de quadros hemorrágicos (BAYNES; DOMINICZAK, 2014).

O segundo ativador endógeno da fibrinólise é o Ativador do Plasminogênio do Tipo Uroquinase (u-PA), secretado por várias células (fibroblastos, macrófagos, monócitos), mesmo que inativas, mas em pequeno volume. Ele se liga a um receptor endotelial e inicia a conversão de plasminogênio em plasmina. De fato, o u-PA age antes do t-PA, porque o t-PA é secretado pelo endotélio ainda na forma inativa e depende de um pouco de plasmina para ser ativado (MCMICHAEL, 2012; ZORIO *et al.*, 2008).

Produzir plasmina é o objetivo do sistema fibrinolítico, pois caberá a ela quebrar a fibrina e degradar FV e FVII, desacelerando a formação de trombos (LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002). A plasmina quebra o polímero de fibrina em vários pontos, liberando Produtos de Degradação da Fibrina (PDFs), que, por sua vez,

ainda atuam como anticoagulantes, inibindo a trombina, a polimerização da fibrina e a agregação plaquetária (MYERS; MCGAVIN, 2009).

Em contrapartida, cada vez que a fibrina é quebrada, ela volta a expor o sítio de ligação do aminoácido lisina, permitindo a ligação de nova molécula de plasminogênio e acelerando a fibrinólise. Esse segundo mecanismo é um dos que explicam porque, na fase inicial da coagulação intravascular disseminada, a fibrinólise acompanha a alta taxa de produção de fibrina e se acelera, reduzindo-se posteriormente (LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002).

Os últimos atores desse processo de coagulação-fibrinólise são as moléculas que integram o sistema antifibrinolítico. As principais são o Ativador da Inibição do Plasminogênio (PAI-1), o Inibidor da Fibrinólise Ativado por Trombina Ativada (TAFIa) e a alfa-2 antiplasmina / alfa-2 macroglobulina (SMITH, 2010).

A exemplo do plasminogênio, o PAI-1 é uma glicoproteína, mas seu sítio de síntese não é o fígado e, sim, plaquetas, macrófagos e células endoteliais ativadas. Ele inibe a fibrinólise ao oferecer ao t-PA e ao u-PA um substrato idêntico ao plasminogênio. Na tentativa de clivar o PAI-1, a exemplo do que fariam com o plasminogênio, t-PA e u-PA acabam retidos e inativados (SMITH, 2010; ZORIO *et al.*, 2008).

O segundo inibidor da fibrinólise, o TAFIa, é ativado pela trombina. Ao se ligar à trombomodulina, ela ativa a Proteína C e também o TAFIa. Ativado, o TAFIa remove as lisinas das moléculas de fibrina, impedindo a ligação do complexo t-PA-plasminogênio, o que resulta na redução da produção de plasmina e inibição da fibrinólise (SMITH, 2010; ZORIO *et al.*, 2008).

Por fim, sobre a plasmina produzida ainda pode se ligar a alfa-2 antiplasmina ou a alfa-2 macroglobulina, moléculas sintetizadas no fígado e que ocupam exatamente o sítio de ligação que permitiria à plasmina se acoplar à fibrina e quebrá-la em PDFs. Em circulação, a plasmina acaba degradada, sem conseguir iniciar a fibrinólise (SMITH, 2010; ZORIO *et al.*, 2008).

2.3 COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (CID)

2.3.1 CID e Pancreatite

A Coagulação Intravascular Disseminada (CID) tem sido descrita como uma coagulopatia por consumo ou como um estado trombohemorrágico (RALPH; BRAINARD, 2012). Invariavelmente, a CID ocorre como complicação de uma doença primária, cuja etiologia pode ser infecciosa (bacteriana, fúngica, viral ou protozoária), inflamatória (trauma, choque, pancreatite, queimadura), neoplásica ou imunomediada (STOKOL, 2012).

Por caminhos diversos, as doenças de base levam à expressão do TF na superfície de várias células do hospedeiro que estão em contato com o sangue, iniciando a cascata da coagulação de forma irrestrita, descontrolada e sistêmica (STOKOL, 2012). É o que acontece quando a pancreatite deixa de ser uma inflamação localizada e desencadeia a SIRS.

A associação entre pancreatite e ativação plaquetária foi comprovada já há algumas décadas. Um dos principais estudos nessa linha se deu com a administração de fluido pancreático de pacientes com pancreatite crônica em coelhos saudáveis, induzindo a agregação plaquetária (PRINZ *et al.*, 1984).

Anos mais tarde, estudos que aferiram os níveis de TF em humanos com pancreatite e em voluntários saudáveis evidenciaram a alta concentração do fator pró-trombótico nos indivíduos doentes (SAWA *et al.*, 2006). Soma-se a isso o fato de FII (protrombina) e fibrinogênio serem proteínas hepáticas de fase aguda, cuja produção é aumentada pelo fígado em resposta às citocinas inflamatórias. Dessa forma, a inflamação sistêmica também leva ao incremento da concentração sérica dessas moléculas precursoras, garantindo gatilho e substrato para a alta produção de trombina e fibrina, respectivamente.

Essa ativação sistêmica da coagulação sanguínea gera uma trombose microvascular difusa, que pode comprometer a perfusão e contribuir para a falência de múltiplos órgãos. É uma fase silenciosa e compensada da CID (RALPH; BRAINARD, 2012). Se persistir, a ativação constante da coagulação sanguínea pode esgotar plaquetas e fatores de coagulação, resultando em um estado de

hipocoagulabilidade e diátese hemorrágica, chegando à fase tardia e descompensada da CID (RALPH; BRAINARD, 2012; TAKAHIRA, 2003).

Fisiologicamente, o processo deveria ser modulado pelos anticoagulantes endógenos, mas, em geral, os três principais deles _TFPI, Proteína C (PC) e Antitrombina (AC)_ têm seus níveis plasmáticos reduzidos pelo quadro inflamatório, basicamente por três fatores: a) aumento do consumo das três moléculas, pelo excesso de produção de trombina; b) aumento da degradação, pelas proteases plasmáticas secretadas pelos neutrófilos ativados; c) redução da síntese pelo fígado (especialmente de AC, uma proteína de fase aguda negativa) e pelo endotélio (que expõe menos trombomodulina, essencial para a ativação da PC).

Em humanos com pancreatite, casos com mau prognóstico foram associados a baixos níveis de AT na admissão dos pacientes (MAEDA *et al.*, 2006). Em ratos com pancreatite induzida experimentalmente, a administração de altas doses de AT foi relacionada ao aumento da sobrevivência (BLEEKER *et al.*, 1992), embora a tendência não tenha se confirmado em estudos clínicos (AFSHARI *et al.*, 2007).

Também relevantes alterações dos níveis de PC foram detectadas em modelos experimentais e estudos clínicos. Nas análises que buscaram a Proteína C ativada, níveis baixos (pela falta da expressão de trombomodulina e de receptores de PC) foram relacionados à falência de múltiplos órgãos (LINDSTROM *et al.*, 2006).

Nos quadros iniciais de CID, o que se tem, portanto, é um sistema de coagulação acelerado e um sistema de anticoagulação suprimido, o que favorece o *status* trombótico do paciente e alimenta a inflamação, pois as moléculas protrombóticas são também potencialmente pró-inflamatórias, ao passo que os anticoagulantes endógenos, nesse momento suprimidos, têm características anti-inflamatórias (RALPH; BRAINARD, 2012).

De forma concomitante ao desequilíbrio entre coagulação e anticoagulação, o sistema antifibrinolítico se impõe à fibrinólise. Isso significa que os trombos na microvasculatura não só estão sendo formados de forma mais rápida, mas também estão sendo removidos de forma mais lenta, perpetuando o estado hipercoagulatório, silencioso e sem sangramento.

Na fase bastante inicial da CID, a fibrinólise tem a velocidade aumentada, visto que o endotélio e os macrófagos ativados pela inflamação secretam mais t-PA, que ativa plasminogênio em plasmina. A tendência, no entanto, não se mantém, porque a elevada concentração de citocinas inflamatórias estimula esse mesmo

endotélio, macrófagos e plaquetas a produzirem PAI-1, de forma tardia, mas sustentada. O PAI-1 é a molécula que mimetiza o plasminogênio, se liga ao t-PA e ao u-PA e, assim, os impede de ativar o plasminogênio em plasmina, retardando a fibrinólise e favorecendo os eventos trombóticos (MYERS; MCGAVIN, 2009; LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002; PINTÃO; FRANCO, 2001).

O prejuízo da fibrinólise por excesso de PAI-1 é um achado comum em pacientes humanos com trombose venosa profunda ou situação clínica com alto risco trombótico, como obesidade, síndrome metabólica, gravidez, complicações obstétricas e doenças coronarianas (ZORIO *et al.*, 2008). Em cães, um estudo experimental de indução de pancreatite indicou, à necrópsia, a presença de múltiplos microtrombos nos pulmões e rins dos animais (SATAKE *et al.*, 1981), mas os níveis de PAI-1 não foram aferidos.

Também no sentido de retardar a fibrinólise age a alfa-2 macroglobulina, molécula do sistema antifibrinolítico que tem sua produção aumentada pelo fígado na inflamação (proteína de fase aguda). Enquanto o PAI-1 impede a formação de plasmina, a alfa-2 se liga à pouca plasmina formada, impedindo que ela quebre a rede de fibrina, contribuindo assim para a trombose microvascular (MYERS; MCGAVIN, 2009; LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002; PINTÃO; FRANCO, 2001).

A CID é, portanto, uma síndrome dinâmica e progressiva, que transita da hipercoagulação à diátese hemorrágica, pelo consumo de plaquetas e fatores de coagulação. A fase silenciosa e trombótica é chamada de CID compensada. A hemorrágica, de CID descompensada. Não obstante os sangramentos serem mais frequentemente observados ao exame clínico, é a trombose microvascular sua fase mais precoce e cuja detecção poderia de forma mais impactante reduzir a disfunção de órgãos e a mortalidade. Ocorre, no entanto, que o diagnóstico da fase de hipercoagulação é mais difícil e não pode ser obtido pelos exames de rotina (MYERS; MCGAVIN, 2009; PINTÃO; FRANCO, 2001).

2.3.2 Diagnóstico da CID

Em medicina veterinária, a CID tem sido diagnosticada pela combinação de critérios clínicos (doença subjacente) e laboratoriais (alteração na hemostasia). Os

testes laboratoriais mais comuns são contagem de plaquetas, tempo de protrobina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), mensuração do fibrinogênio sérico e dos PDFs (produtos de degradação da fibrina) ou mais especificamente do D-dímero, que é um deles (STOKOL, 2012).

Na fase compensada da CID, no entanto, todos esses marcadores podem estar dentro dos valores de referência (WAGG; BOYSEN; BÉDARD, 2009). Isso significa que os exames laboratoriais de rotina são insensíveis ao estágio inicial da síndrome, quando a coagulação ainda se impõe ao consumo. Portanto, a ausência de trombocitopenia e de hipofibrinogenemia, bem como tempos normais de coagulação, não descartam a doença em fase compensada e de hipercoagulação. É nesse ponto que a tromboelastografia pode ser útil (LARSSON *et al.*, 2015; STOKOL, 2012).

A análise tromboelastográfica é realizada em sangue total, avaliando a hemostasia completa do paciente (fatores solúveis e constituintes celulares), com exceção apenas do endotélio. O sangue é coagulado em um equipamento que mede a velocidade em que isso ocorre, a resistência do coágulo formado e a velocidade da fibrinólise, oferecendo as informações nas formas gráfica e numérica. Potencialmente, portanto, a tromboelastografia pode detectar quando o processo é precoce, se forma coágulos mais densos e se há alterações em sua dissolução (STOKOL, 2012; CHEN; TERUYA, 2009).

Em humanos, analisadores tromboelastográficos têm sido utilizados para avaliar o *status* coagulatório de pacientes com trauma, sepse, submetidos a transplantes, cirurgias cardíacas e ortopédicas, além de inúmeras outras situações pós-cirúrgicas (BRUNO *et al.*, 2015). Um estudo que avaliou 200 transplantes hepáticos realizados na Espanha indicou que os pacientes monitorados com esses equipamentos no período perioperatório precisaram de menos unidades de sangue, pois havia informações sobre o tipo de coagulopatia em curso, reduzindo a incidência de complicações pós-cirúrgicas (LEON-JUSTEL *et al.*, 2015).

Parte das complicações decorrem do estado de hipercoagulabilidade que acomete 40% dos pacientes humanos no pós-operatório, já excluídos os submetidos a procedimentos cardíacos (BRUNO *et al.*, 2015). Tal tendência trombótica resulta da já descrita expressão excessiva de TF e fosfatidilserina pelo próprio trauma cirúrgico, a inflamação sistêmica, a perda de sangue e hipóxia, a estase venosa e a administração de fluidos intravenosos (STOKOL, 2010), evoluindo muitos casos para

quadros de trombose venosa profunda, quando o *status* hipercoagulatório dos pacientes não é monitorado e controlado.

Identificar a hipercoagulabilidade é o grande ganho que os analisadores tromboelastográficos oferecem à prática clínica, visto que os testes laboratoriais de rotina (contagem de plaquetas, TP, TTPA) detectam apenas o estado de hipocoaguabilidade (STOKOL, 2012), falhando em guiar uma intervenção precoce e em auxiliar a reduzir a mortalidade desses pacientes.

O benefício de acessar a coagulação em sangue total tem sido tão vastamente documentado que a Sociedade Européia de Anestesiologia (*European Society of Anaesthesiology*) incluiu as análises tromboelastográficas à beira leito entre os procedimentos recomendados para o monitoramento da coagulação e o manejo de sangramentos em transplantes, cirurgias pediátricas, cardiovasculares e ortopédicas (KOZEK-LANGENECKER *et al.*, 2013), todos eles pró-trombóticos.

Em cães, estudos prévios concluíram que a tromboelastografia têm capacidade de identificar estados pró-trombóticos em quadros de parvovirose (OTTO *et al.*, 2000), anastomoses portossistêmicas (KELLEY *et al.*, 2013), neoplasias (KRISTENSEN *et al.*, 2008; VILAR *et al.*, 2011), anemia hemolítica imunomediada (SINNOTT; OTTO, 2009; FENTY *et al.*, 2011; GOGGS *et al.*, 2012), enteropatias (GOODWIN *et al.*, 2011), nefropatias com perda proteica (LENNON *et al.*, 2013; DONAHUE; BROOKS; OTTO, 2011), peritonite séptica (BENTLEY *et al.*, 2013) e hiperadrenocorticismismo (ROSE; DUNN; BEDÁRD, 2013; KOL *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013).

Um estudo avaliou 50 animais com doenças subjacentes que os predispunham à CID, concluindo que o estado de hipercoagulabilidade é o mais comum nesses pacientes e que a mortalidade em um segmento de 28 dias foi maior entre os cães que evoluíram para a hipocoagulação, sugerindo um valor prognóstico para o exame tromboelastográfico (WIINBERG *et al.*, 2008).

2.3.3 Analisadores Tromboelastográficos

Existem diferentes analisadores de tromboelastografia disponíveis no mercado. Os três principais são o norte-americano TEG (Tromboelastógrafo –

Hemoscope Corporation), o alemão ROTEM (Tromboelastômetro - Pentapharm) e sueco ReoRox (Reômetro de oscilação livre - MediRox) (Figura 5).

Figura 5 – Analisadores tromboelastográficos, sistema de funcionamento e traçados finais

Fonte: (CORRÊA, 2017, a partir dos manuais dos fabricantes)

Legenda: Analisadores de viscoelasticidade ou tromboelastografia (esquerda), com suas respectivas formas de funcionamento (ao centro) e as curvas que oferecem como resultado da verificação do *status* coagulatório da amostra de sangue (direita), da formação à resolução do coágulo. De cima para baixo, TEG (Tromboelastógrafo / Hemoscope Corporation, EUA), ROTEM (Tromboelastômetro / Pentapharm, Alemanha) e ReoRox (Reômetro de oscilação livre / MediRox, Suécia) (Imagens disponíveis nos manuais dos fabricantes)

De maneira geral, considerando a forma de funcionamento do *hardware*, o que muda entre os equipamentos é a parte que se coloca em movimento: no TEG, roda a cubeta na qual o sangue está depositado; no ROTEM, o pino que está imerso no sangue; no ReoRox, a base da cubeta é que oscila de um lado a outro. Em todos os casos, no entanto, conforme o coágulo se forma e se dissolve, a força que une o pino à cubeta aumenta e, em seguida, diminui. É essa força que é aferida pelo equipamento, bem como a velocidade em que ela se altera (LARSSON *et al.*, 2015).

Os parâmetros mensurados são basicamente os mesmos nos três equipamentos, mas a diferença entre as técnicas de aferição resulta na já comprovada impossibilidade de comparação direta dos resultados obtidos ou de extrapolação dos valores de uma máquina para outra (SOLOMON *et al.*, 2015; MCMICHAEL *et al.*, 2014) (Quadro 1).

Quadro 1 – Variáveis mensuradas pelos analisadores tromboelastográficos e seus significados fisiológicos

	TEG	ROTEM	REOROX
Tempo transcorrido até o início/detecção da formação do tampão plaquetário	-	-	COT1
Tempo transcorrido até a formação total do tampão plaquetário (marca início de geração de trombina e, portanto, início da formação do coágulo)	R	CT	COT2
Tempo transcorrido entre o início da formação do coágulo até amplitude de 20 mm	K	CFT	-
Velocidade de formação do coágulo e de polimerização da fibrina	Alpha angle	Alpha angle	SLOPEDE SLOPEPAMIN
Estabilização do coágulo pelas plaquetas e fator XIII em sua força máxima	MA	MCF	MAXELAST
Tempo para força máxima	TMA	MCF-T	TIMETOMAX
Medidas do grau de fibrinólise depois de certo período de tempo*	CL45, CL 60	LY30, LY45, ML	CLOTSR30 CLOTSRPAMIN

Fonte: (SOLOMON *et al.*, 2015; LARSSON *et al.*, 2015; MCMICHAEL *et al.*, 2014; adaptado por CORRÊA, 2017)

Notas: COT (*clotting time*), R (*reaction time*), CT (*clotting time*), K (*coagulation time*), CFT (*clotting formation time*), Alpha angle (ângulo alpha – entre a curva e o eixo x), SLOPEDE (declive em graus), SLOPEPAMIN (declive em Pa/min), MA (*maximum amplitude*), MCF (*maximum clot firmness*), MAXELAST (*maximum elasticity*), TMA (*time to maximum amplitude*), MCF-T (*time to maximum clot firmness*), TIMETOMAX (*time to maximum elasticity*), CL45 / CL60 (lise depois de 45 e 60 minutos), LY30/45 (lise depois de 30 e 45 minutos), ML (*maximum lysis*), CLOTSR30 (*clot strength reduction in 30 minutes*), CLOTSRPAMIN (*clot strength reduction in Pa/min*). *Há variação do ponto de partida (TEG é do início do processo; ReoRox é a partir da elasticidade máxima)

Ao longo do processo de coagulação e fibrinólise, os equipamentos vão mensurando as variáveis e construindo uma imagem gráfica que relaciona a força do coágulo (eixo Y) com tempo decorrido (eixo X). Todas as variáveis podem ser graficamente observadas ao longo da curva de coagulação e fibrinólise (Figura 6). Estando o operador no domínio dos conceitos embutidos em cada uma dessas variáveis e ciente dos processos fisiológicos representados em cada trecho do gráfico (indicados no Quadro 1), fica evidente que mudanças nas características da imagem obtida representam alterações do processo hemostático (Figura 7).

Figura 6 – Indicação gráfica das variáveis aferidas pelo analisador tromboelastográfico ReoRox durante o processo de coagulação e fibrinólise

Fonte: (MEDIROX, 2008, adaptado por CORRÊA, 2017)

Figura 7 – Algumas das alterações gráficas possíveis de serem observadas no traçado do ReoRox e as alterações de coagulação e fibrinólise que representam

Fonte: (NARANI, 2005, adaptado por CORRÊA, 2017)

Em 2014, um grupo de 25 médicos veterinários que se dedicam ao estudo da hemostasia se reuniu para analisar os estudos produzidos com o uso de analisadores tromboelastográficos em medicina veterinária, definir padrões (analíticos e pré-analíticos) para esses testes, avaliar o grau de evidência científica das informações já produzidas e, principalmente, buscar reprodutibilidade e comparabilidade entre os trabalhos. Na ocasião foram considerados estudos feitos com a utilização do TEG e do ROTEM. As conclusões e recomendações foram publicadas em seis artigos pelo *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* (BRAINARD *et al.*, 2014; DELAFORCADE; GOGGS; WIINBERG, 2014; FLATLAND *et al.*, 2014; GOGGS *et al.*, 2014; HANEL *et al.*, 2014; MCMICHAEL *et al.*, 2014).

O grupo sugere que as análises sejam processadas a 37°C para todas as espécies, seguindo as recomendações do fabricante de cada equipamento, com venopunção jugular (GOGGS *et al.*, 2014), agulha de pelo menos 21 gauge e acondicionamento da amostra em tubo contendo citrato de sódio a 3,2%, mantendo a razão 9:1 entre sangue e anticoagulante (FLATLAND *et al.*, 2014).

Os valores de referência, de acordo com as recomendações, devem ser estabelecidos em cada centro de estudo, e as amostras dos pacientes sob investigação devem ser comparadas com tais valores, tendo todas as coletas sido feitas a partir de variáveis pré-analíticas padronizadas, tal como local de punção, intervalo entre punção e exame e temperatura de armazenagem da amostra (MCMICHAEL *et al.*, 2014).

Ainda de acordo com as recomendações, amostras de sangue de ao menos 40 indivíduos saudáveis devem ser usadas para o estabelecimento de intervalos de referência, sendo esses animais considerados clinicamente saudáveis com base no exame físico e nas análises hematológicas, incluindo hematócrito, contagem de plaquetas e níveis de fibrinogênio (HANEL *et al.*, 2014).

O grupo afirma que o tempo de formação do tampão plaquetário (R, CT ou COT2, conforme o equipamento) menor do que os valores definidos como referência ou a força máxima do coágulo (MA, MCF ou MAXELAST) acima do intervalo de referência são resultados consistentes com hipercoagulabilidade em animais de companhia, mas aponta que ainda persiste a falta de comparação de tais valores *in vitro* com um parâmetro final de trombose confiável *in vivo* (HANEL *et al.*, 2014).

A recomendação é que ao menos quatro variáveis do TEG/ROTEM sejam sempre analisadas. Além das duas já mencionadas, o grupo inclui K / CFT (não

disponível no ReoRox G2) e ALPHA ANGLE (equivalente ao SLOPEDE ou ao SLOPEPAMIN no ReoRox) e sugere que os pesquisadores deixem claro os critérios que estão sendo usados para definir hipercoagulabilidade (FLATLAND *et al.*, 2014). A sugestão, já adotada em diversos estudos, é que a existência de uma única variável fora do intervalo definido como referência já seja suficiente para incluir o paciente no grupo de *status* trombótico (ABELSON *et al.*, 2013; WAGG; BOYSEN; BÉDARD, 2009).

Sobre a necessidade ou não de uso de reagentes nas análises (TF ou cefalina), o grupo compara 50 estudos feitos com reagentes com 32 estudos feitos apenas com a recalcificação das amostras de sangue de cães, gatos ou cavalos. A maioria dos testes usou o TEG (apenas cinco deles usaram ROTEM). A conclusão é que amostras apenas recalcificadas ficam mais sujeitas a interferências pré-analíticas, que se refletem em variações analíticas superiores a 20%. Com base nesse índice, o grupo afirma que testes com reagentes não precisam ser feitos com amostras de sangue duplicadas e que testes com sangue apenas recalcificado podem, sim, ter valor diagnóstico, mas devem ser feitos simultaneamente em mais de uma amostra do mesmo paciente (DELAFORCADE; GOGGS; WIINBERG, 2014).

3 OBJETIVOS

O ReoRox G2 não teve o desempenho avaliado pela força tarefa montada para analisar os estudos produzidos com o uso de analisadores tromboelastográficos em medicina veterinária porque, até este momento, ele só foi adotado em pesquisas envolvendo seres humanos (TYNNGARD, 2017). O equipamento é o mais novo analisador de tromboelasticidade do mercado, e, embora já esteja atestada a correlação de seus resultados com os oferecidos por outros equipamentos semelhantes (SOLBECK *et al.*, 2012), os estudos clínicos em que foi envolvido ainda são limitados (LARSSON *et al.*, 2015).

De forma concomitante, considerando os dezenas de estudos feitos em espécies domésticas com os demais aparelhos de tromboelastografia disponíveis, nenhum deles aborda a avaliação do perfil de coagulação de cães com pancreatite, uma das doenças que sabidamente predispõem à resposta inflamatória sistêmica e, consequentemente, à coagulação intravascular disseminada.

Sendo assim, o que propõe neste estudo é a definição de valores de referência para cães clinicamente saudáveis com a utilização do aparelho ReoRox G2 e, em seguida, a avaliação da hipótese de que o referido equipamento possa gerar resultados para sugerir alterações hemostáticas pró-trombóticas em amostras de sangue de cães com pancreatite recém-diagnosticada e sem tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o número 1721010215 e realizado entre março de 2015 e novembro de 2016.

A primeira fase foi conduzida com o objetivo de delimitar um Grupo Controle e definir valores de referência para a análise tromboelastográfica realizada no aparelho ReoRox G2 (MediRox) a partir de amostras de sangue de cães clinicamente saudáveis. Para tanto, buscou-se um canil particular que concordasse em ter suas matrizes incluídas no estudo.

Os animais deveriam ser adultos (> 1 ano), sem doenças crônicas previamente diagnosticadas ou histórico de sangramentos. Não poderiam ter recebido medicações ou apresentado alterações clínicas (prostração, redução de apetite, êmese, diarreia, alterações de urina, ectoparasitas, lesões de pele, tosse e secreções nasal, ocular ou vulvar) um mês antes da coleta de sangue. O protocolo de imunização deveria estar atualizado para vacinas antirrábica e múltipla viral. Fêmeas não poderiam estar no cio, prenhes ou lactantes.

Os responsáveis pelo canil Vinha Del Mar (Cotia / SP) selecionaram animais que atendessem a esses critérios e, individualmente, eles foram submetidos a exame físico, com verificação de estado geral, turgor cutâneo, condições de pelame e de cavidade oral, tamanho e consistência de linfonodos periféricos, reação à palpação abdominal, epaxial e de membros, coloração de mucosas, temperatura corpórea e auscultação cardiopulmonar. Os que não apresentaram alterações ao exame físico foram pesados e tiveram amostra de sangue coletada, após jejum alimentar de oito horas. O mesmo foi feito com alguns animais sem raça definida, de proprietários particulares, para que cães de raças mistas estivessem representados na amostra de animais que integrariam o Grupo Controle.

Antes do início da coleta de sangue, os pontos de análise do equipamento ReoRox G2 eram calibrados com duas substâncias (Visco Diluent® e Diluent®) fornecidas pelo fabricante MediRox, cujas viscosidades se assemelham à do sangue, conforme orientações constantes no manual de instruções do equipamento (Figura 8). Após a calibração, as cubetas de coagulação eram posicionadas em três dos quatro pontos de análise do equipamento, ali permanecendo por cerca de uma

hora, até que o termostato indicasse que o conjunto atingiu temperatura estável de 37°C graus. O quarto ponto de análise do ReoRox G2 não foi utilizado. A porção final das cubetas de coagulação era do tipo banhada a ouro, com o objetivo de evitar a adesão plaquetária que acontece nos dispositivos de plástico e, de acordo com o fabricante, pode alterar os resultados da reação.

Os cães foram contidos em decúbito lateral. A coleta foi feita da veia jugular externa com agulha de 22 ou 23 gauge, conforme o porte do animal, com breve estase sanguínea promovida pela compressão da parede vascular caudal ao ponto da venopunção (Figura 8). Amostras obtidas com dificuldade (numerosas tentativas, necessidade de reposicionamento da agulha ou interrupção de fluxo sanguíneo) foram descartadas e a coleta foi repetida na veia jugular contralateral.

Figura 8 – Coleta de sangue e calibração do aparelho ReoRox G2

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Legenda: Coleta de sangue em veia jugular externa esquerda de animal do Grupo Controle, em decúbito lateral, com breve estase sanguínea promovida caudalmente ao ponto de coleta (esq.) e aparelho ReoRox G2 (dir.) com quatro ponto de análise, estando o primeiro já com a cubeta de coagulação, dois deles durante a fase de calibração e o quarto ponto sem uso

De cada paciente foram coletados 5,5 mL de sangue, acondicionados em tubos BD Vacutainer® contendo citrato de sódio a 3,2% (3,5 mL), EDTA K2 (1 mL) e ativador de coágulo (1 mL), nessa ordem, imediatamente homogeneizados. A amostra citratada era transferida sem abertura do tubo, com a introdução da agulha pela borracha vedadora, permitindo que o vácuo garantisse o preenchimento do reservatório e mantivesse a relação de 9:1 entre sangue e anticoagulante, de forma que o citrato de sódio quelasse o cálcio e impedisse o início da coagulação.

O sangue remanescente era transferido para os tubos com EDTA e ativador de coágulo diretamente da seringa, sem agulha e sem perfuração da tampa. Com essas amostras foram realizados perfis hematológicos (contador Siemens ADVIA 2120i®) e bioquímicos (Labtest LabMax 240®) dos pacientes, incluindo hemograma, leucograma, contagem de plaquetas e mensuração das concentrações séricas de ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina (FA) e atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT).

O sangue acondicionado em tubo citratado serviu para a análise tromboelastográfica no aparelho ReoRox G2 iniciada em, no máximo, 60 minutos após a coleta. Com o conjunto previamente aquecido, 25 µL de CaCl₂ (0,5 mol/L) eram instilados em cada uma das três cubetas que seriam utilizadas. Em seguida, a primeira cubeta recebia 100 µL do reagente FibScreen1® (Fib1), e a segunda cubeta recebia 100 µL do reagente FibScreen2® (Fib2). A terceira cubeta não recebeu reagente (apenas o cloreto de cálcio).

O primeiro terço de amostra de sangue de cada tubo citratado era retirado com a utilização de uma seringa BD® de insulina (1 mL), sem agulha. Preenchida com 1 mL de sangue, sem bolhas de ar, a seringa era encaixada na primeira cubeta do equipamento. O êmbolo da seringa era movimentado de forma que o sangue fosse depositado no fundo da cubeta, voltasse ao interior da seringa e fosse depositado novamente, permitindo que ele se misturasse homogeneamente ao cálcio e ao reagente ali previamente instilados. A seringa era mantida fixa, encaixada na cubeta, durante todo o procedimento. Finda a homogeneização dos componentes da reação, o botão que inicia a análise do primeiro canal era acionado. O procedimento se repetia, então, nos dois outros canais (Figura 9).

Antes que se possa processar o exame, é preciso indicar ao equipamento Reorox G2 que tipo de reagente está sendo usado em cada canal de coagulação e se o sangue depositado na cubeta foi previamente citratado ou está fresco. Neste estudo, todas as amostras foram inicialmente acondicionadas em tubos com citrato de sódio porque, dessa forma, elas poderiam ter a análise iniciada em até uma hora após a coleta, segundo o fabricante do equipamento, intervalo esse que deve ser reduzido a cinco minutos no caso de amostras de sangue fresco.

Todos os animais tiveram, portanto, três amostras de sangue recalcificadas e submetidas ao analisador ReoRox G2 para perfil de coagulação: uma com o reagente Fib1 (tromboplastina ou TF), outra com o reagente Fib2 (TF + abciximab) e

outras sem reagente nenhum. Os reagentes utilizados têm objetivos distintos. O Fib1 mostra a contribuição das plaquetas e da fibrina para a elasticidade e força do coágulo. O Fib2 deve inibir a função plaquetária e fornecer informações sobre a contribuição do fibrinogênio para a estrutura e força do coágulo. A diferença obtida pela comparação numérica da elasticidade máxima nos dois canais representa, em tese, a contribuição das plaquetas para a elasticidade e força do coágulo (LARSSON *et al.*, 2015).

Figura 9 – Análise tromboelastográfica e coágulos produzidos pelo equipamento

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Legenda: Análise tromboelastográfica em andamento em três dos quatro canais de coagulação do aparelho ReoRox (esq., luzes acesas). Ao centro, os três conjuntos de seringa e cubeta já retirados do aparelho, após o exame. À direita, a porção final das cubetas e os coágulos que, durante o exame, se formam em seu interior

O ReoRox G2 não prevê a análise tromboelastográfica sem reagente, apenas com sangue recalcificado, mas optou-se por testá-la como uma possível alternativa à redução do custo do exame, a exemplo do que já fizeram 32 estudos citados por Delaforcade, Goggs e Wiinberg (2014) com outros analisadores tromboelastográficos. Dessa forma, foi informado ao aparelho que a amostra da terceira cubeta de todos os pacientes estava misturada ao TF, o que fez o ReoRox processar a análise até o final, ainda que todos os tempos se mostrassem aumentados, pois não havia, de fato, o catalisador externo da reação.

Foram consideradas dez variáveis para o canal com Fib1, dez para o canal sem reagente e oito variáveis para o canal com Fib2, visto que, quando esse é o reagente informado ao equipamento, a programação é interrompida assim que o coágulo atinge sua força máxima, não havendo a mensuração das variáveis de fibrinólise. O fibrinogênio da amostra também foi aferido no canal com Fib1. Algumas

variáveis não foram selecionadas para todos os pacientes, por um erro de operação, e, por isso, foram desconsideradas do estudo.

O Grupo Controle tinha inicialmente 60 pacientes. Desses, 11 foram excluídos por alterações nos exames hematológicos e bioquímicos de triagem ou porque apresentaram alguma alteração clínica em até 15 dias após a coleta do sangue. Os 49 restantes tiveram a mesma amostra de sangue (resultado de uma única coleta) fracionada e submetida à análise tromboelastográfica nos três canais. Para cada indivíduo o aparelho deveria fornecer três curvas de coagulação e 29 variáveis: 10 com Fib1, 10 com sangue citratado, 8 com Fib2, além do fibrinogênio.

O Grupo Pancreatite foi formado por seis animais atendidos no Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET – FMVZ/USP) com manifestações clínicas e padrão ultrassonográfico compatíveis com pancreatite. Como a análise tromboelastográfica deveria ser feita logo após a confirmação ultrassonográfica da pancreatite, sem que nenhum tratamento tivesse sido instituído, pacientes tratados antes da confirmação ultrassonográfica da alteração pancreática ou com exames feitos em outras unidades de saúde não puderam ser incluídos no estudo. Todas as variáveis pré-analíticas do Grupo Pancreatite foram as mesmas do Grupo Controle.

Para os resultados obtidos no Grupo Controle foram calculados mediana e percentis 2,5 e 97,5. Os percentis fixam os limites máximo e mínimo da faixa de referência para dados cuja distribuição não se encaixa em uma curva normal, a fim de que, nesse intervalo, se encaixem 95% dos resultados obtidos a partir de amostras de sangue dos pacientes do Grupo Controle (HANEL *et al.*, 2014; FRIEDRICHS *et al.*, 2012), com pelos menos 40 indivíduos, de acordo com diretrizes fixadas pela *International Federation of Clinical Chemistry* (SOLBERG, 1987). Os resultados do Grupo Pancreatite foram comparados com esses limites para que se pudesse observar a frequência de alterações. Os resultados obtidos nos dois grupos também foram comparados entre si pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

No delineamento final do estudo, o Grupo Controle foi composto por 49 cães e o Grupo Pancreatite por seis cães. As Tabelas 1 e 2 detalham o perfil desses animais conforme raça, idade, sexo, *status* reprodutivo e peso.

Tabela 1 – Perfil dos 49 animais clinicamente normais (Grupo Controle), segundo definição racial ou não, idade, sexo, *status* reprodutivo e peso

Animal	Raça	Idade (em meses)	Sexo	Status reprodutivo	Peso (em kg)
Animal 1	Pastor alemão	144	M	NC	33
Animal 2	Golden retriever	121	F	C	35
Animal 3	SRD	112	M	C	11,2
Animal 4	Poodle	99	F	C	10,5
Animal 5	Golden retriever	63	M	NC	35,2
Animal 6	Golden retriever	65	M	NC	39,7
Animal 7	Golden retriever	36	F	NC	35,9
Animal 8	Border collie	60	M	NC	19,3
Animal 9	Border collie	43	M	NC	20,5
Animal 10	Border collie	77	F	NC	17,8
Animal 11	Doberman	30	M	NC	40,8
Animal 12	Doberman	82	F	C	31,2
Animal 13	Doberman	69	F	NC	33,5
Animal 14	Maltês	88	M	NC	4,2
Animal 15	Maltês	90	F	NC	3,8
Animal 16	Yorkshire	75	M	NC	3
Animal 17	Yorkshire	81	F	NC	5,2
Animal 18	Schnauzer	89	F	NC	9,8
Animal 19	Schnauzer	94	M	NC	8,2
Animal 20	SRD	119	F	C	12
Animal 21	SRD	120	F	C	14,5
Animal 22	Teckel	189	F	C	8
Animal 23	Yorkshire	31	F	NC	2,8
Animal 24	Schnauzer	94	F	NC	8
Animal 25	Bulldog francês	41	F	NC	11,8
Animal 26	Bulldog francês	88	M	NC	14,4
Animal 27	Bulldog francês	63	M	NC	10,1

(continua)

(continuação)

Animal 28	Shih Tzu	52	M	NC	5,9
Animal 29	Shih Tzu	26	F	NC	5,7
Animal 30	Border collie	15	M	NC	20,6
Animal 31	Doberman	19	M	NC	33,6
Animal 32	Maltês	71	F	NC	3,9
Animal 33	Yorkshire	77	M	NC	1,9
Animal 34	Shih Tzu	57	M	NC	5
Animal 35	Shih Tzu	52	F	NC	5,3
Animal 36	Spitz anão	16	F	NC	3,6
Animal 37	Spitz anão	64	F	NC	2,9
Animal 38	Doberman	26	F	NC	31,4
Animal 39	Doberman	71	F	NC	35,1
Animal 40	Doberman	38	F	NC	33,7
Animal 41	Doberman	43	F	NC	34,5
Animal 42	Doberman	12	F	NC	37,1
Animal 43	Doberman	12	F	NC	34,2
Animal 44	Golden retriever	36	M	NC	35,4
Animal 45	Golden retriever	24	M	NC	37,4
Animal 46	Chihuahua	27	M	NC	2,5
Animal 47	Chihuahua	48	M	NC	3
Animal 48	Golden retriever	60	M	NC	31,8
Animal 49	Golden retriever	57	M	NC	31,2
		63	F	NC	18,68
Média / Frequência			(53,1%)	(85,7%)	

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Notas: C (castrado); NC (não castrado); M (macho); F (fêmea)

Tabela 2 – Perfil dos seis cães do Grupo Pancreatite, por raça, idade, sexo, *status* reprodutivo e peso

Animal	Raça	Idade (em meses)	Sexo	Status reprodutivo	Peso (em kg)
P1	Bichon frise	156	F	C	5,4
P2	Poodle	144	M	C	4,4
P3	Poodle	168	F	C	8
P4	Poodle	132	M	NC	11
P5	Pitbull	132	F	NC	25
P6	Golden retriever	143	M	NC	34
		145,8	F	NC	14,6
Média / Frequência			(50%)	(50%)	

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Notas: C (castrado); NC (não castrado); M (macho); F (fêmea)

Os seis animais do Grupo Pancreatite apresentavam anorexia, êmese e prostração entre as manifestações clínicas que chamaram atenção dos responsáveis e os fizeram decidir pela consulta. Ao exame físico, todos também apresentavam algum grau de desidratação, e quatro deles manifestavam sensibilidade de discreta à intensa à palpação abdominal (P1, P2, P3 e P5). Outras alterações incluíam diarreia (P2 e P6), taquipneia (P1 e P6), colúria (P5), icterícia (P3) e perda de peso (P4). Entre os fatores de risco apontados como possíveis indutores da pancreatite identificou-se hipercolesterolemia (P1), diabetes mellitus (P2), abscessos hepáticos (P3) e inflamações pancreáticas anteriores (P4). Não foram notados fatores predisponentes nos pacientes P5 e P6 do Grupo Pancreatite.

Os exames ultrassonográficos dos seis pacientes do Grupo Pancreatite apontaram hiperecogenicidade e aumento de volume em lobo pancreático direito, com mesentério adjacente também hiperecócico.

Os dados das análises hematológicas e bioquímicas realizadas nas amostras de sangue dos cães do Grupo Pancreatite, bem como a sobrevivência dos pacientes, estão expostos na Tabela 3, com indicação dos valores que estão fora dos limites de referência. As alterações mais frequentes foram: hiperfibrinogenemia (100%); leucocitose, neutrofilia e azotemia (66,7%); monocitose, hiperfosfataseia e alterações nas concentrações de albumina (50%).

Tabela 3 – Detalhamento de valores obtidos nas análises hematológicas e bioquímicas realizadas em amostra de sangue dos cães do Grupo Pancreatite

Variável	Referência	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Hematócrito (%)	37 a 55	41	40	20	48	45	51
Hemoglobina (g/dL)	12 a 18	13,1	14	5,6	16	15,4	17,4
Leucócitos (/uL)	6000 a 17000	34800	38300	22100	11930	10270	37100
Segmentados (/uL)	3000 a 11500	32016	34470	16669	5670	8640	32648
Monócitos (/uL)	150 a 1350	1044	2418	2210	970	650	3339
Linfócitos (/uL)	1000 a 4800	1392	1412	221	1870	870	1113
ALT (U/L)	21 a 102	31,6	79,3	214,9	29,2	85,1	331,2
FA (U/L)	20 a 156	411,2	138,5	6599	102,3	234,4	145,1
Proteínas Totais (g/dL)	5,4 a 7,1	6,19	6,65	3,97	7,91	7,07	8,1
Albumina (g/dL)	2,4 a 3,3	2,4	2,8	2,1	4,7	3,3	5,2
Ureia (mg/dL)	10 a 40	61,2	50,5	316,4	35,3	14,3	186,7
Creatinina (mg/dL)	0,5 a 1,5	1,34	0,54	4,17	0,75	0,67	2,56

(continua)

		(continuação)					
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	200 a 500 mil	320	393	582	344	447	886
Fibrinogênio (mg/dL)	200 a 400	582	585	529	466	580	589
TTPA (seg)	10,7 a 16,4	35	34	10,9	14	14	13,8
TP (seg)	6,8 a 10,2	6,9	8,5	7	7,1	7	7
Sobrevida (dias)		5	> 365	1	42	9	2

Fonte: (CORRÊA, 2017; RIZZI; MEINKOTH; CLINKENBEARD, 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008)

Nota: valores em vermelho estão fora do intervalo de referência

Os dados numéricos fornecidos pelo aparelho ReoRox G2 para os pacientes do Grupo Controle e do Grupo Pancreatite foram tabulados no programa Microsoft Excel®. A tabulação evidenciou que, embora conseguisse construir a curva de coagulação, o equipamento, por vezes, não indicava algumas das variáveis numéricas ou o fazia com erro evidente, informando ser negativo, por exemplo, um período de tempo, um ângulo ou a força do coágulo. Seguindo o proposto pela literatura, as variáveis com erro evidente foram tidas como aberrantes ou *outliers* e eliminadas (FRIEDRICHS *et al.*, 2012; SOLBERG, 1987).

Nas reações que utilizaram o reagente Fib1, o equipamento deixou de fornecer 65 dos 539 resultados esperados para os 49 animais do Grupo Controle (12%) e indicou números claramente equivocados em 13 variáveis (2,4%), somando um índice de falha de 14,4%. Nas análises processadas apenas com sangue recalcificado 4,8% dos resultados não foram fornecidos e 1,3% deles tinham falhas evidentes (6,1% de falha total). Com o reagente Fib2, 10,2% das variáveis não foram fornecidas e 6,4% eram aberrantes (16,6% de falhas).

As falhas do equipamento são o motivo pelo qual, nas análises estatísticas apresentadas a seguir, o Grupo Controle considerado nos cálculos de cada variável nem sempre soma 49 indivíduos. Na maioria dos casos as falhas aconteceram em variáveis isoladas de alguns cães, mas houve casos em que todas as variáveis para um determinado reagente deixaram de ser fornecidas para o mesmo indivíduo. Isso aconteceu para os Animais 33 e 48 com o Fib1. Para o Animal 27 com o sangue citratado, e para os cães 33, 47 e 48 com Fib2.

Não houve variáveis faltantes nem falhas aberrantes para os reagentes Fib1 e Fib2 no Grupo Pancreatite, mas o equipamento não forneceu dados para os exames de dois dos pacientes (P3 e P5) quando foi utilizado o sangue recalcificado, deixando inclusive de formar a curva de coagulação.

As tabelas 4, 5 e 6 trazem os percentis 2,5 e 97,5, que marcam os limites que foram considerados como de referência do Grupo Controle, por tipo de reação, como previamente exposto.

No aparelho ReoRox G2, o início da formação do tampão plaquetário é dado por COT1 (em segundos) e o início do depósito de fibrina por COT2 (em segundos). A força e a elasticidade do coágulo formado são indicadas, respectivamente, pelas variáveis MAXELAST e EC (ambas em Pascal). A estrutura de fibrina mais forte e estável resulta da alta produção de trombina e está associada à trombose (WOLBERG; CAMPBELL, 2008).

O tempo para que se atinja essa força máxima do coágulo é apontado por TIMETOMAX (em segundos). A velocidade de deposição de fibrina é indicada pelas variáveis SLOPE (declive), expressas pelo ângulo que a curva de coagulação forma com o eixo de tempo (SLOPEDE) ou em Pascal/minuto (SLOPEPAMIN). Por fim, a velocidade de fibrinólise é indicada por CLOTSR ou CLOTSRPAMIN. A variável TEG é uma medida que a MediRox criou para tentar tornar seu exame comparável com a força máxima do coágulo indicada pelo aparelho TEG, cujo uso é mais difundido.

Tabela 4 – Percentis 2,5 e 97,5 para os resultados obtidos no Grupo Controle, por variável, com a utilização do reagente Fib1

Variável	n	Mínimo	P2,5	Mediana	P97,5	Máximo
COT1 (seg)	47	13,00	13,00	20,00	27,80	28,00
EC (Pa)	47	141,90	145,74	897,70	4127,58	4500,00
COT2 (seg)	46	33,00	34,05	51,00	96,95	98,00
SLOPEDE (graus)	36	34,50	34,50	61,60	86,50	86,50
SLOPE (Pa/min)	46	15,00	15,88	69,50	268,13	269,00
CLOTSR30 (%)	45	8,00	8,30	34,00	89,55	90,00
CLOTSR (Pa/min)	45	2,00	2,30	15,00	64,35	66,00
MAXELAST (Pa)	46	524,00	542,55	1445,20	2873,26	2907,80
FIBRINO (g/L)	38	15,50	15,50	34,10	67,20	67,20
TEG	35	86,10	86,10	86,50	92,10	92,10
TIMETOMAX (seg)	30	890,00	890,00	1874,00	2782,00	2782,00

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: n = número de casos avaliados, Mínimo = valor mínimo encontrado na amostra, P2,5 = Percentil 2,5, Mediana = Percentil 50, P97,5 = Percentil 97,5, Máximo = valor máximo encontrado na amostra

Tabela 5 – Percentis 2,5 e 97,5 para os resultados obtidos no Grupo Controle, por variável, com a utilização do reagente Fib2

Variável	n	Mínimo	P2,5	Mediana	P97,5	Máximo
COT1 (seg)	43	15,00	15,00	19,00	35,90	37,00
EC (Pa)	43	810,30	822,48	1693,10	2920,43	2920,70
COT2 (seg)	43	44,00	44,10	59,00	154,40	159,00
SLOPEDE (graus)	35	38,80	38,80	68,60	85,00	85,00
SLOPE (Pa/min)	43	32,00	32,60	91,00	518,80	546,00
MAXELAST (Pa)	43	810,40	822,59	1693,60	2926,86	2927,30
TEG	35	86,10	86,10	86,70	91,30	91,30
TIMETOMAX (seg)	41	1230,00	1238,70	2011,00	3065,55	3068,00

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: n = número de casos avaliados, Mínimo = valor mínimo encontrado na amostra, P2,5 = Percentil 2,5, Mediana = Percentil 50, P97,5 = Percentil 97,5, Máximo = valor máximo encontrado na amostra

Tabela 6 – Percentis 2,5 e 97,5 para os resultados obtidos no Grupo Controle, por variável, com a utilização do sangue apenas recalcificado

Variável	N	Mínimo	P2,5	Mediana	P97,5	Máximo
COT1 (seg)	46	93,20	97,37	262,50	637,58	643,00
EC (Pa)	46	741,50	757,18	1583,40	2589,96	2592,20
COT2 (seg)	46	134,00	138,03	310,00	680,03	697,00
SLOPEDE (graus)	38	37,10	37,10	66,30	82,00	82,00
SLOPE (Pa/min)	46	30,00	30,70	90,00	337,68	348,00
CLOTSR30 (%)	46	1,00	1,53	11,50	21,00	21,00
CLOTSR (Pa/min)	45	1,00	1,15	6,00	12,85	13,00
MAXELAST (Pa)	46	881,10	890,17	1831,00	2889,18	2901,60
TEG	38	86,10	86,10	86,75	89,00	89,00
TIMETOMAX (seg)	46	1798,00	1810,60	2396,00	3479,70	3493,00

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: n = número de casos avaliados, Mínimo = valor mínimo encontrado na amostra, P2,5 = Percentil 2,5, Mediana = Percentil 50, P97,5 = Percentil 97,5, Máximo = valor máximo encontrado na amostra

A comparação dos resultados obtidos pela análise tromboelastográfica das amostras sanguíneas do Grupo Pancreatite com os limites de referência fixados a partir do Grupo Controle (intervalo entre os percentis 2,5 e 97,5) está exposta nas Tabelas 7, 8 e 9, conforme o tipo de reação. As duas primeiras tabelas trazem ainda os valores de referência sugeridos pelo fabricante do equipamento para pacientes

humanos (com Fib1 e Fib2). Não há valores de referência em humanos para amostras de sangue que foram apenas recalcificadas (TYNNGARD, 2016).

De maneira geral, nos três tipos de reação pelo menos 50% dos indivíduos do Grupo Pancreatite apresentam alterações que indicam hipercoagulabilidade, sendo a variável MAXELAST a que apresenta maior frequência de alteração.

Com o reagente Fib1 (Tabela 7), 50% dos cães do Grupo Pancreatite apresentam valores fora da faixa de referência para as variáveis COT1, COT2, MAXELAST e FIBRINO. MAXELAST indica a resistência máxima do coágulo em Pascal. FIBRINO é a concentração de fibrinogênio fornecida em g/L. Ambas as variáveis apresentam valores acima da faixa de referência em 50% dos indivíduos do Grupo Pancreatite, sendo essas alterações sugestivas de um estado pró-trombótico. Em contrapartida, COT1 indica, em segundos, o tempo decorrido até o início da formação do tampão plaquetário. E COT2 indica, também em segundos, o tempo decorrido até o final da formação do tampão plaquetário e início do depósito de fibrina. Ambas as variáveis apresentam valores acima da referência em 50% dos indivíduos do Grupo Pancreatite com o reagente Fib1, o que pode ser sugestivo de um início de consumo de plaquetas e fatores de coagulação.

Tabela 7 – Comparação dos valores obtidos na análise tromboelastográfica dos pacientes do Grupo Pancreatite, com Fib1, com os limites de referência fixados a partir do Grupo Controle (faixa na qual se enquadram 95% dos cães clinicamente saudáveis)

Variável	P2,5	P97,5	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Humanos*
COT1 (seg)	13,00	27,80	146	52	48	15	21	17	20 a 35
EC (Pa)	145,74	4127,58	4286,8	1776,4	3757	2490,8	368	1804,4	X
COT2 (seg)	34,05	96,95	196	197	104	43	57	50	30 a 78
SLOPEDE (graus)	34,50	86,50	83,6	70,6	84,1	79,9	62	78,1	< 47
SLOPE (Pa/min)	15,88	268,13	407	118	628	239	77	202	37 a 216
CLOTSR30 (%)	8,30	89,55	9	11	17	22	74	35	< 82
CLOTSR (Pa/min)	2,30	64,35	5	5	11	20	21	21	X
MAXELAST (Pa)	542,55	2873,26	4500	1993,3	4500	3184,8	1427,1	2765,7	600 a 2211
FIBRINO (g/L)	15,50	67,20	103,4	46,5	103,4	73,5	33,6	64	X
TEG	86,10	92,10	89,5	87,8	94,2	87,7	86,5	88,3	X
TIMETOMAX (seg)	890,00	2782,00	1837	2138	552	2489	1515	1869	1404 a 2300

Fonte: (CORRÊA, 2017; WINSTEDT *et al.*, 2013)

Nota: (*) Valores apresentados no Manual de Aplicação (MediRox), a partir de 36 amostras; (X) Valores não disponíveis entre as referências definidas pelo fabricante para pacientes humanos

Quando comparados os resultados dos dois grupos de forma coletiva, usando o nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, há diferença estatística significativa entre os valores obtidos com Fib1 não só para MAXELAST e FIBRINO, mas para EC, SLOPEDE, SLOPEPAMIN e TEG, todos sempre maiores no conjunto do Grupo Pancreatite. COT1 e COT2 não têm diferenças relevantes entre os grupos, por essa forma de análise estatística (Apêndice A). Devido à pequena dimensão do Grupo Pancreatite, no entanto, optou-se por considerar a frequência das alterações para a discussão deste trabalho, para que cada caso pudesse ser individualmente analisado.

Nos testes com Fib2 (Tabela 8), 66,5% dos indivíduos do Grupo Pancreatite tiveram valores abaixo da faixa de referência para a variável TIMETOMAX e 50% tiveram valores acima da faixa de referência para as variáveis EC e MAXELAST. A variável TIMETOMAX afere, em segundos, o tempo decorrido até que o coágulo tenha alcançado sua força máxima. EC é uma medida de elasticidade do coágulo fornecida em Pa (Pascal). Redução de TIMETOMAX e aumento de EC e MAXELAST são alterações sugestivas de hipercoagulabilidade.

Tabela 8 - Comparação dos valores obtidos na análise tromboelastográfica dos pacientes do Grupo Pancreatite, com Fib2, com os limites de referência fixados a partir do Grupo Controle (faixa na qual se enquadram 95% dos cães clinicamente normais)

Variável	P2,5	P97,5	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Humanos*
COT1 (seg)	15,00	35,90	15	86	43	15	18	20	20 a 40
EC (Pa)	822,48	2920,43	4500	1868,9	4500	3063,6	1411	2596	X
COT2 (seg)	44,10	154,40	40	220	101	46	64	55	36 a 120
SLOPEDE (graus)	38,80	85,00	84,5	68,6	82,4	80,3	65,2	78,2	X
SLOPE (Pa/min)	32,60	518,80	481	106	493	253	88	204	5 a 12
MAXELAST (Pa)	822,59	2926,86	4500	1867,4	4500	3060,8	1411,6	2594,5	34 a 120
TEG	86,10	91,30	91	87,9	90,3	88,2	86,7	88	88
TIMETOMAX (seg)	1238,70	3065,55	882	1500	666	1128	1458	1182	734 a 1483

Fonte: (CORRÊA, 2017; WINSTEDT *et al.*, 2013)

Nota: (*) Valores apresentados no Manual de Aplicação (MediRox), a partir de 36 amostras; (X) Valores não disponíveis entre as referência definidas pelo fabricante para pacientes humanos

Quando analisados em conjunto, os valores dos Grupos Controle e Pancreatite seguiram com diferença estatística significativa, com Fib2, nas variáveis EC, SLOPEDE, SLOPEPAMIN, MAXELAST e TEG, a exemplo do que ocorreu com Fib1, sempre com resultados mais altos no Grupo Pancreatite. Com Fib2, porém, a

variável TIMETOMAX também apresenta diferença estatística relevante entre os grupos, sendo menor no Grupo Pancreatite (Apêndice B).

Por fim, considerados os valores obtidos com a análise tromboelastográfica de amostras apenas recalcificadas (Tabela 9), 66,6% dos indivíduos do Grupo Pancreatite apresentaram valores acima da faixa de referência para as mesmas variáveis EC e MAXELAST. É importante ressaltar que, para os dois indivíduos restantes, os exames falhou para todas as variáveis. Ou seja: EC e MAXELAST não tiveram valores dentro da referência para nenhum indivíduo do Grupo Pancreatite, considerando os exames concluídos com êxito com sangue apenas recalcificado.

Tabela 9 – Comparação dos valores obtidos na análise tromboelastográfica dos pacientes do Grupo Pancreatite, com amostra recalcificada, com os limites de referência fixados a partir do Grupo Controle (faixa na qual se enquadram 95% dos cães clinicamente normais)

Variável	P2,5	P97,5	P1	P2	P3	P4	P5	P6
COT1 (seg)	97,37	637,58	139	111	X	201	X	157
EC (Pa)	757,18	2589,96	3961	3587,8	X	2922,2	X	2717,4
COT2 (seg)	138,03	680,03	201	169	X	273	X	230
SLOPEDE (graus)	37,10	82,00	82,3	83,7	X	78,1	X	81,3
SLOPE (Pa/min)	30,70	337,68	333	412	X	203	X	289
CLOTSR30 (%)	1,53	21,00	6	6	X	8	X	18
CLOTSR Pa/min	1,15	12,85	7	6	X	8	X	15
MAXELAST (Pa)	890,17	2889,18	4219,3	3828,4	X	3165,3	X	3317,4
TEG	86,10	89,00	88,4	89,6	X	88,1	X	88,4
TIMETOMAX (seg)	1810,60	3479,70	2262	2320	X	2731	X	2218

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: (X) Equipamento não resultou valores

Se os grupos forem considerados coletivamente, nas amostras apenas recalcificadas os valores obtidos nas variáveis EC, SLOPEDE, SLOPEPAMIN, MAXELAST e TEG seguem expressivamente mais elevados no Grupo Pancreatite. Nessas amostras houve ainda diferença estatística relevante entre os valores obtidos para as variáveis COT1 e COT2, ambas significativamente menores no Grupo Pancreatite (Apêndice C).

A exemplo das informações numéricas, graficamente as curvas produzidas pelo aparelho para o Grupo Controle e para o Grupo Pancreatite também se mostram bastante diferentes. As figuras 10, 11 e 12 exemplificam essas diferenças a

partir dos traçados obtidos para o Animal 40 do Grupo Controle e para o P4 do Grupo Pancreatite.

Figura 10 – Traçados tromboelastográficos de animal do Grupo Controle e de animal do Grupo Pancreatite com Fib1

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Legenda: No alto, a reação com Fib1 para **Animal 40** do Grupo Controle e, em seguida, para animal **P4** do Grupo Pancreatite. Note que além das curvas serem claramente distintas, a escala numérica à direita também é maior no Grupo Pancreatite (2.500 Pa no Controle x 3.100 Pa no Pancreatite). Os valores numéricos das variáveis são mostrados à esquerda de cada gráfico. A Figura 6 localiza, no gráfico, o significado das variáveis

Figura 11 – Traçados tromboelastográficos de animal do Grupo Controle e de animal do Grupo Pancreatite com Fib2

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Legenda: No alto, a reação com Fib2 para **Animal 40** do Grupo Controle e, em seguida, para animal **P4** do Grupo Pancreatite. Note que além das curvas serem claramente distintas, a escala numérica à direita também é maior no Grupo Pancreatite (1.800 Pa no Controle x 3.000 Pa no Pancreatite). Os valores numéricos das variáveis são mostrados à esquerda de cada gráfico. Com o reagente Fib2 não estão disponíveis variáveis de fibrinólise

Figura 12 – Traçados tromboelastográficos de animal do Grupo Controle e de animal do Grupo Pancreatite com sangue recalcificado

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Legenda: No alto, a reação com sangue recalcificado para **Animal 40** do Grupo Controle e, em seguida, para animal **P4** do Grupo Pancreatite. Note que além das curvas serem claramente distintas, a escala numérica à direita também é maior no Grupo Pancreatite (2.500 Pa no Controle x 3.100 Pa no Pancreatite). Os valores numéricos das variáveis são mostrados à esquerda de cada gráfico. A Figura 6 localiza, no gráfico, o significado das variáveis

5 DISCUSSÃO

Um dos objetivos deste trabalho era definir valores de referência para o perfil tromboelastográfico de cães empregando o equipamento ReoRox G2, pois a utilidade de um exame complementar depende de que se conheçam os resultados esperados para indivíduos hígidos, a fim de que se possam identificar eventuais alterações. É essa a importância clínica de se processar exames com amostras biológicas de cães clinicamente normais: estabelecer valores que delimitem a faixa de referência, uma das ferramentas mais comumente utilizadas para a tomada de decisão na prática clínica (FRIEDRICHS *et al.*, 2012).

A definição de limites de referência está bastante documentada na literatura. Nas últimas diretrizes para definição de intervalos de referência da *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, publicadas em 2012, está previsto que eles englobem os 95% dos resultados mais centrais obtidos pelo exame da população saudável considerada como controle (excluídos os 2,5% de valores máximos e mínimos). A população controle, por sua vez, deve ter sido escolhida com base em sua história clínica (ausência de doença duas semanas antes ou depois da data da coleta), exame físico e resultado de exames laboratoriais de rotina (FRIEDRICHS *et al.*, 2012), tal como foi feito neste estudo.

As diretrizes da *American Society for Veterinary Clinical Pathology* sugerem ainda que 120 indivíduos integrem o Grupo Controle para que se definam os limites de referência por métodos não-paramétricos, com intervalo de confiança de 90%, mas o documento admite que a determinação de limites de referência a partir de grupos menores é possível e comum em medicina veterinária, sugerindo um número mínimo de 39 amostras e ressaltando que, quanto menor o grupo, menor a acurácia e a precisão dos limites estabelecidos (FRIEDRICHS *et al.*, 2012).

Para as análises tromboelastográficas, porém, a força-tarefa que revisou os estudos publicados com esses equipamentos optou por adotar a exigência mínima da *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, que coincide com as sugestões formuladas pela *International Federation of Clinical Chemistry* (SOLBERG, 1987), de acordo com as quais um universo de 40 indivíduos saudáveis é suficiente para a definição de limites de referência em cada centro de estudo (HANEL *et al.*, 2014). Foi esse o critério utilizado neste e em vários outros trabalhos.

Bauer, Eralp e Moritz (2009) se propuseram a estabelecer intervalos de

referencia para as variáveis do TEG na espécie canina testando 56 cães clinicamente saudáveis. Spiezia *et al.* (2010) validaram a aplicabilidade do analisador tromboelastográfico ROTEM em primatas, definindo valores de referência a partir de amostras de sangue de 40 indivíduos clinicamente saudáveis. Park *et al.* (2013) avaliaram a hemostasia de cães com hiperadrenocorticismo ACTH-dependente comparando 19 cães doentes com 40 animais hígidos.

Na medicina humana estão publicados diversos estudos baseados em intervalos de referência extraídos de grupos controle compostos por menos do que 120 indivíduos. Pesquisadores da Universidade de Toronto, por exemplo, em parceria com pesquisadores brasileiros, definiram limites de referência para a análise tromboelastográfica com o TEG a partir dos resultados obtidos em 95% dos 118 voluntários saudáveis, excluídos os 2,5% de valores máximos e mínimo. No grupo a ser estudado, os pacientes cujos resultados da análise não se encaixaram dentro desses limites foram considerados em estado anormal e propensos a manifestações clínicas decorrentes da alteração (SCARPELINI *et al.*, 2009). Polak *et al.* (2011), investigando o impacto da gestação no traçado tromboelastográfico do aparelho TEG, compararam os exames de 60 mulheres grávidas com 43 mulheres saudáveis, férteis e não-grávidas, delimitando a referência também pelos percentis 2,5 e 97,5. Foi o que também fizeram Tynngard *et al.* (2008), mas usando o ReoRox G2, com 50 grávidas e 60 não-grávidas.

Em medicina veterinária, há inúmeros estudos que analisam resultados tromboelastográficos em que o Grupo Controle não é composto pelo número mínimo de indivíduos sugerido pela *International Federation of Clinical Chemistry*. Otto *et al.* (2000) concluíram que a enterite por parvovírus leva os cães a um estado de hipercoagulabilidade comparando os resultados obtidos com o TEG em nove animais doentes e nove animais clinicamente saudáveis. Dunkel *et al.* (2010) analisaram hipercoagulabilidade e sobrevida em cavalos com doença gastrointestinal isquêmica ou inflamatória a partir de um grupo de 30 equinos clinicamente saudáveis. Saavedra *et al.* (2011) utilizaram o equipamento TEG para investigar anormalidades de coagulação em 32 cães com carcinoma, comparando-os a 19 cães hígidos. Goggs *et al.* (2012) analisaram variáveis tromboelastográficas de 30 cães com anemia hemolítica imunomediada e 30 animais saudáveis. Bentley *et al.* (2013) estudaram a hemostasia em 27 cães com peritonite séptica usando o TEG e concluíram que o estado pró-trombótico tem uma correlação positiva com a

sobrevida, utilizando valores de referência de estudos prévios. Foi o mesmo que fizeram Kelley *et al.* (2013) ao estudar a hemostasia de 21 cães com anastomoses portossistêmicas. Lennon *et al.* (2013) investigaram o *status* coagulatório de cães com nefropatia proteinúrica usando 28 animais doentes e oito animais controle. Fletcher *et al.* (2016) compararam o traçado tromboelastográfico de 28 cães com hemoperitônio espontâneo e 28 cães hígidos.

Na busca pelos limites de referência para cães no aparelho ReoRox G2 vieram à tona algumas dificuldades. Diferentemente do previsto na literatura, não foi verificada uma maior estabilidade do exame com a presença de reagentes, especialmente o TF, nas análises do Grupo Controle. Além de reduzir o tempo de reação, os estudos indicam que os reagentes reduzem o impacto das variáveis pré-analíticas nos valores finais (DELAFORCADE; GOGGS; WIINBERG, 2014). Não foi o que se verificou neste estudo, apesar de nele não se ter conduzido testes pareados de cada paciente para o canal sem reagente, como sugeriu a força-tarefa que estudou as análises tromboelastográficas.

Feita essa ressalva, o fato é que as reações com Fib 2 falharam em 16,6% das variáveis do Grupo Controle, as com Fib1 em 14,4% e as análises sem reagente em 10,2%. Em contrapartida, no Grupo Pancreatite não houve falha nos exames feitos com reagentes, o que vai ao encontro do proposto pela literatura, mas, para dois dos pacientes, não se obteve resultado para nenhuma das dez variáveis quando se processou o teste só com a amostra recalcificada.

O manual do equipamento ReoRox G2, fornecido pela empresa MediRox, não traz explicações sobre as possíveis causas de omissão ou erro em variáveis isoladas de um paciente. Já as falhas generalizadas no exame de determinado indivíduo são atribuídas a desajustes de operação (equipamento com temperatura instável, inclusão de bolhas de ar na amostra, encaixe impreciso entre a câmara de coagulação e o canal de análise, interferência cinética ou eletromagnética durante a operação etc.) (TYNNGARD, 2017).

Os erros aumentam o volume de sangue necessário para a realização do exame, pois exigem uma segunda coleta, podendo constituir um entrave ao uso do equipamento. Para cada tipo de reação é necessário 1 mL de sangue. Em cães de pequeno porte, considerando a necessidade de amostras para outros exames hematológicos e bioquímicos, muitos deles seriados, o volume pode ser o fator

limitante para a inclusão da análise tromboelastográfica na rotina de monitoramento das unidades de internação.

Para a avaliação da capacidade do equipamento ReoRox G2 de sugerir alterações hemostáticas pró-trombóticas em amostras de sangue de cães com pancreatite recém-diagnosticada e sem tratamento, o segundo objetivo deste estudo, compararam-se os valores obtidos para o Grupo Controle e o Grupo Pancreatite nas três formas de análise tromboelastográfica propostas (Fib1, Fib2 e sangue recalcificado). A comparação indica que o aumento da velocidade de formação e da força do coágulo são mais frequentemente notadas entre os animais com inflamação pancreática do que entre os animais clinicamente saudáveis, um resultado compatível com o estado pró-trombótico ou de hipercoagulação, de acordo com a literatura (HANEL *et al.*, 2014).

Está consistentemente documentado que a pancreatite é uma das doenças capazes de levar à SIRS e à CID (GRANGER; REMICK, 2005), sendo a sua fase inicial a de hipercoagulação (CHILDRESS, 2012). Em geral, a pancreatite é diagnosticada quando o animal apresenta manifestações clínicas da doença, o que sugere que a inflamação já evoluiu para uma resposta inflamatória sistêmica (XENOULIS, 2015). Considerando que os animais do Grupo Pancreatite tiveram amostras de sangue submetidas à análise tromboelastográfica no momento do diagnóstico, pouco depois de as manifestações clínicas terem sido percebidas pelos responsáveis, é possível supor que o quadro desses cães evoluía para um afecção sistêmica, fisiologicamente compatível com o estado de hipercoagulabilidade.

No aparelho ReoRox G2, como já foi mencionado, o início da formação do tampão plaquetário é dado por COT1 (em segundos) e o início do depósito de fibrina por COT2 (em segundos). A força e a elasticidade do coágulo formado são indicadas, respectivamente, pelas variáveis MAXELAST e EC (ambas em Pascal). O tempo para que se atinja essa força máxima do coágulo é apontado por TIMETOMAX (em segundos). A velocidade de deposição de fibrina é indicada pelas variáveis SLOPE (declive), expressas pelo ângulo que a curva de coagulação forma com o eixo de tempo (SLOPEDE), ou em Pascal/minuto (SLOPEPAMIN). Por fim, a velocidade de fibrinólise é indicada por CLOTSR ou CLOTSRPAMIN. A variável TEG é uma medida que a MediRox criou para tentar tornar seu exame comparável com a força máxima do coágulo indicada pelo aparelho TEG, cujo uso é mais difundido.

Ao analisar o perfil tromboelastográfico de cada um dos seis pacientes do

Grupo Pancreatite, observou-se que P1 e P3 são os cães com mais variáveis fora da faixa de referência, ainda que o exame de P3 não tenha sido concluído com êxito na análise sem reagente. Com o reagente Fib1, P1 apresenta quatro variáveis sugestivas de hipercoagulação (aumento de EC, SLOPEPAMIN, MAXELAST e FIBRINO) e duas variáveis sugestivas de hipocoagulação (aumento de COT1 e COT2). Já P3, com o mesmo Fib1, apresenta cinco variáveis sugestivas de hipercoagulação (aumento de SLOPEDE, MAXELAST, FIBRINO e TEG, com redução de TIMETOMAX) e duas de hipocoagulação (aumento de COT1 e COT2).

Com Fib2, P1 só tem variáveis alteradas em direção à hipercoagulação (aumento de EC e MAXELAST, com redução de COT2 e TIMETOMAX) e P3 mantém uma variável de hipocoagulação (aumento de COT1), estando outras três alteradas em direção ao estado pró-trombótico (aumento de EC e MAXELAST, com redução de TIMETOMAX). Sem reagente, o exame de P3 não resultou em valores numéricos, e o de P1 tem três variáveis fora da faixa de referência e que indicam hipercoagulação (aumento de EC, SLOPEDE e MAXELAST).

De acordo com a força-tarefa que analisou os estudos feitos com analisadores tromboelastográficos em medicina veterinária, uma única variável alterada em direção aos marcadores de trombose já permite ao observador afirmar que se está diante de um quadro de hipercoagulabilidade (HANEL *et al.*, 2014). No caso dos pacientes P1 e P3, no entanto, diante do caráter dinâmico da CID e da proporção entre variáveis que indicam hipercoagulação e hipocoagulação, é possível hipotetizar que ambos os cães se encontravam em um momento mais avançado e de transição da doença, no qual a trombose ainda prevalecia, mas começava a impor ao organismo as características que decorrem da coagulopatia por consumo (implicando em aumentos de COT1 e COT2).

Seguindo nas análises individualizadas, P2 tem apenas dois marcadores de hipocoaguabilidade nas reações com Fib1 e Fib2 (as demais variáveis estão na faixa de referência), mas apresenta cinco variáveis alteradas em direção à hipercoagulabilidade na análise sem reagente. De forma menos expressiva, o resultado também sugere a possibilidade de que P2 estivesse, no momento do exame, iniciando uma coagulopatia por consumo.

P4 e P6 têm apenas marcadores pró-trombóticos nas três formas de reação, respectivamente, sete e três variáveis alteradas no total. E P5 não apresenta alterações hemostáticas, embora o teste tenha falhado no sangue recalcificado.

Com base neste estudo, no entanto, nem a ausência de alterações na análise tromboelastográfica nem o *status* hipercoagulatório podem ser considerados como marcadores prognósticos de sobrevida, visto que o animal P5 (com traçado tromboelastográfico dentro da referência) foi a óbito nove dias após o exame, enquanto P2, já com marcadores de hipocoagulação em duas das três formas de análise, sobreviveu à doença. Dos seis animais, apenas P2 sobreviveu, uma taxa de letalidade de 83%, compatível com o previamente relatado (HACKNER, s/d). Os protocolos adotados no tratamento dos animais estão fora do escopo deste trabalho. E os pacientes não foram acompanhados de forma sequencial, o que, sendo a CID de natureza dinâmica, talvez alterasse a relação dos resultados com a sobrevida.

Diferentemente do que foi observado neste estudo, alguns trabalhos anteriores perceberam relação entre estado pró-trombótico e sobrevida. Bentley *et al.* (2013) estudaram a hemostasia em 27 cães com peritonite séptica usando o TEG e concluíram que o estado pró-trombótico tem uma correlação positiva com a sobrevida. Outro grupo de pesquisadores, que avaliou 50 animais com doenças subjacentes que os predispunham à CID, concluiu que o estado de hipercoagulabilidade é o mais comum nesses cães e que a mortalidade em um segmento de 28 dias foi maior entre aqueles que evoluíram para a hipocoagulação, sugerindo um valor prognóstico para o exame tromboelastográfico, quando ele viabiliza a intervenção e evita a progressão para a fase descompensada da CID (WIINBERG *et al.*, 2008).

Na outra ponta do processo hemostático, também de forma bastante homogênea, a análise tromboelastográfica com ReoRox G2 não indicou alterações de fibrinólise nos pacientes do Grupo Pancreatite. Fisiologicamente, a explicação talvez esteja no esperado aumento da concentração de PAI-1 (MYERS; MCGAVIN, 2009; ZORIO *et al.*, 2008), embora ela não tenha sido aferida neste estudo.

Este é o primeiro estudo que utiliza o aparelho ReoRox em cães (TYNNGARD, 2017), mas variáveis que indicam os mesmos fenômenos fisiológicos já se mostraram alteradas em trabalhos feitos com outros analisadores tromboelastográficos, o que foi interpretado pelos pesquisadores como marcadores de hipercoagulação, seguindo a diretriz da força-tarefa que analisou a produção científica sobre tromboelastografia.

Goggs *et al.* (2012) estudaram cães com anemia hemolítica imunomediada, Lennon *et al.* (2013) com nefropatia proteinúrica, e Park *et al.* (2013), com

hiperadrenocorticismo. Todos usaram o TEG e concluíram que esses pacientes formam coágulos mais fortes, precoces e de forma mais rápida do que os animais clinicamente saudáveis. A força máxima do coágulo, como aconteceu nos estudos citados e no presente trabalho, foi também a variável mais frequentemente alterada quando os pacientes eram cães com peritonite séptica (BENTLEY *et al.*, 2013).

No ReoRox G2 a força máxima do coágulo é dada pela variável MAXELAST, que se mostrou alterada pelo menos 50% dos indivíduos do Grupo Pancreatite em todas as análises e equivale às variáveis MA (TEG) ou MCF (ROTEM). Um trabalho que avaliou o *status* coagulatório de 23 pacientes com hiperadrenocorticismo espontâneo identificou a condição pró-trombótica em 22 desses cães: 75% deles tinham valores elevados da variável MA e 58% tinham também um segundo marcador de hipercoagulação (KOL *et al.*, 2013). A exemplo do que foi relatado para os pacientes P1, P2 e P3 com ReoRox G2, no estudo de Kol *et al.* (2013) dois dos pacientes tinham um padrão misto de coagulação: enquanto algumas variáveis indicavam hiper outras apontavam hipocoagulabilidade.

A comparação dos resultados de MAXELAST (força do coágulo) obtidos com Fib1 e Fib2 nos permite concluir que, para cães, o reagente Fib2 não exerceu a função de evitar a agregação plaquetária, o que contraria o que está proposto na literatura. O Fib2 é composto por fator tecidual e abciximab, uma molécula que se acopla ao receptor plaquetário GPIIb/IIIa (glicoproteína à qual fisiologicamente o fibrinogênio se liga para a ativação plaquetária). Em um experimento feito com beagles, o abciximab administrado por via intravenosa inibiu a agregação plaquetária e resultou em aumento do sangramento (KAGEYAMA, 2001). Se isso acontecesse na reação do ReoRox G2 e o receptor GPIIb/IIIa estivesse efetivamente ocupado pelo abciximab, a força do coágulo dos pacientes com Fib2 seria sempre menor do que com Fib1, porque restaria apenas a contribuição da fibrina ao processo (LARSSON *et al.*, 2015).

Ocorre, no entanto, que esse fenômeno não é observado no Grupo Controle nem no Grupo Pancreatite. No Grupo Controle, dos 42 pacientes para os quais o equipamento aferiu MAXELAST em Fib1 e Fib2, apenas 11 tiveram Fib2 menor do que Fib1. Uma hipótese alternativa ao não funcionamento do abciximab seria a falha do TF em catalisar a reação, mas a comparação da MAXELAST obtida com Fib1 (TF) com os valores para a variável obtidos com o sangue apenas recalcificado evidencia o papel funcional do TF: dos 42 pacientes para os quais o equipamento

aferiu MAXELAST em Fib1 e sem reagente, 31 resultaram em valores significativamente maiores na reação que não foi catalisada.

Nas análises laboratoriais de rotina, como prevê a literatura, os animais com diagnóstico de pancreatite apresentavam alterações inespecíficas, como leucograma inflamatório, azotemia e hiperfosfatemia (XENOULIS, 2015; HESS *et al.*, 1998). No coagulograma, diferentemente do que se espera na fase descompensada e de hipocoagulação da CID, a contagem plaquetária e o tempo de protrombina (TP) estavam normais, o que não pode descartar a CID em fase compensada e de hipercoagulação (LARSSON *et al.*, 2015; STOKOL, 2012).

Curiosamente, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que avalia a via intrínseca, estava aumentado em dois dos animais com pancreatite (P1 e P2), o que pode, à primeira vista, ser sugestivo de coagulopatia por consumo, apesar dos níveis normais de plaquetas e de TP normal. Esses pacientes também apresentaram marcadores de hipocoagulação na análise tromboelastográfica, mas em intensidade menor do que apresentaram marcadores de hipercoagulação.

Nesse momento é necessário lembrar que a rota de coagulação via FXII não é fundamental para hemostasia, visto que pacientes com deficiência de FXII não apresentam hemorragias (MCMICHAEL, 2012; SMITH, 2010). E que, em modelos de sepse com inoculação de endotoxinas, o estímulo não gerou uma maior produção de trombina a partir da ativação do FXII, fazendo com que se consolidasse o conceito de que a CID é um distúrbio TF-dependente (LEVI; JONGE; MEIJERS, 2002) e tornando clinicamente irrelevante essa elevação de TTPA.

O achado já fora percebido por Kristensen *et al.* (2008), que avaliaram a hemostasia de 49 cães com neoplasias. Deles, 22 apresentaram traçados tromboelastográficos compatíveis com hipercoagulação e 21 estavam dentro da referência, mas o TTPA estava aumentado em 93% deles.

A concentração de fibrinogênio, em contrapartida, estava aumentada nos seis animais do Grupo Pancreatite (> 466; referência 200 a 400 mg/dL) quando aferida pelos métodos laboratoriais de rotina e em três deles quando aferida pelo ReoRox G2. Não houve coincidência entre os níveis de fibrinogênio aferidos pelos métodos laboratoriais de rotina (mg/dL) e pelo ReoRox (g/L), ainda que calculados para as mesmas unidades de concentração. Apesar disso, entre os exames usualmente disponíveis, a aferição de fibrinogênio mostrou ser o achado que mais se relaciona com o quadro possivelmente pró-trombótico identificado pela

tromboelastografia, o que encontra respaldo na fisiologia da doença, visto que o fibrinogênio é uma proteína hepática de fase aguda, que se eleva em quadros de SIRS.

Saavedra *et al.* (2011) investigaram anormalidades de coagulação em 32 cães com carcinoma e os compararam, com a utilização do equipamento TEG, a 19 cães clinicamente saudáveis. Concluíram que 46% dos cães com carcinoma têm formação mais rápida de coágulo e que 32% deles têm aumento do fibrinogênio sérico. Outro estudo comparou o traçado tromboelastográfico obtido com a análise de amostras de sangue de 27 cães internados em unidades de terapia intensiva com os resultados obtidos pelos tradicionais exames de avaliação da hemostasia. Do 27 animais, 11 estavam hipercoagulando e 13 não tinha alterações hemostáticas, de acordo com os resultados tromboelastográficos. A hipercoagulação foi definida pela existência de uma única variável com valor fora da faixa de referência, indicando formação precoce ou mais firme de coágulos. Entre os exames de rotina, os que mais se relacionaram com o *status* trombótico sugerido pela análise tromboelastográfica foram o aumento da concentração de D-dímeros (o que significa que há muita fibrina sendo produzida e degradada) e, novamente, o aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio (WAGG; BOYSEN; BÉDARD, 2009).

O presente estudo conta com uma série de limitações. Uma delas é o pequeno número de pacientes que compõem o Grupo Pancreatite, o que limita o poder estatístico da análise. A segunda limitação é a falta de aferição de outros marcadores de hipercoagulação (níveis de TF, de fatores anticoagulantes e de PAI-1, por exemplo), que poderiam corroborar o *status* pró-trombótico sugerido pela análise tromboelastográfica.

Os animais que foram a óbito no Grupo Pancreatite não foram submetidos à necrópsia, por decisão dos responsáveis, o que poderia evidenciar a presença de trombos ou de hemorragias. O cruzamento desse achados com sucessivas análises tromboelastográficas poderia indicar se os resultados *in vitro* equivalem a situações de trombose ou diátese hemorrágica *in vivo*.

Atestar a correlação entre traçado do exame e estado clínico do paciente é um desafios ainda a ser enfrentado. Um estudo submeteu à avaliação do TEG sete cães com diagnóstico de trombose por exames de imagem: três deles apresentaram variáveis de hipercoagulação e três tinham valores tromboelastográficos normais (BAUER; MORITZ, 2013), podendo já estar evoluindo para uma coagulopatia por

consumo. Entre sete cães com enterite por parvovírus, todos tinham traçados tromboelastográficos compatíveis com estado pró-trombótico e quatro deles tinham evidência clínica de trombose (OTTO *et al.*, 2000). Por resultados como esse, alguns autores hipotetizam que a alteração do traçado nos analisadores tromboelastográficos é precursora da trombose clínica (FENTY *et al.*, 2011)

Por fim, o fato de apenas 14 raças estarem representadas no Grupo Controle levanta a possibilidade de os valores obtidos não serem representativos de toda a espécie canina. Especificidades raciais nas características de coagulação têm sido pouco estudadas, mas um trabalho que comparou o traçado tromboelastográfico do TEG obtido em 28 Grayhounds com o de 15 cães de outras raças evidenciou que os Greyhounds têm tempos mais longos de coagulação e formam coágulos mais fracos, o que clinicamente se traduz em tendência a sangramentos (VILAR *et al.*, 2008). Não há Greyhounds neste estudo.

6 CONCLUSÕES

A análise tromboelastográfica com o aparelho ReoRox oferece informações que não estão disponíveis por testes diagnósticos de rotina e parece ser útil para detectar estados de hipercoagulabilidade e auxiliar no diagnóstico precoce da CID em animais com pancreatite. Os valores obtidos por este estudo podem ser usados como referência para este equipamento, em nosso centro de estudo.

Entre as aferições de rotina, os níveis aumentados de fibrinogênio parece ser a variável que melhor se relaciona com os resultados da tromboelastografia, embora seja um marcador pouco específico de processo de hipercoagulação.

Estudos que utilizem as informações da tromboelastografia para a adoção precoce de protocolos terapêuticos anticoagulantes podem indicar se a informação tem papel relevante no manejo e monitoramento desses pacientes e se contribui para o aumento da sobrevida desses cães.

Mais estudos são necessários para que se possa afirmar que a hipercoagulabilidade identificada *in vitro* é um valor preditivo de trombose *in vivo* e se possa relacionar o traçado tromboelastográfico ao prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

- ABELSON, A.L.; O'TOOLE, T.E.; JOHNSTON, A.; RESPESS, M.; DELAFORCADE, A.M. Hypoperfusion and acute traumatic coagulopathy in severely traumatized canine patients. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 4, p. 395-401, 2013.
- AFSHARI, A.; WETTERSLEV, J.; BROK, J.; MOLLER, A. Antithrombin III in critically ill patients: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. **British Medical Journal**, v. 335, n. 7632, p. 1248-51, 2007.
- BAUER, N.; ERALP, O.; MORITZ, A. Establishment of reference intervals for kaolin-activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 5, p. 641-8, 2009.
- BAUER, N.; MORITZ, A. Characterisation of changes in the haemostasis system in dogs with thrombosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 129-36, 2013.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Medical biochemistry**. 4th ed. Saunders Elsevier, p. 79, 2014.
- BENTLEY, A.M.; MAYHEW, P.D.; CULP, W.T.; OTTO, C.M. Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 14-22, 2013.
- BLEEKER, W.K.; AGTERBERG, J.; RIGTER, G.; HACK, C.E.; GOOL, J.V. Protective effect of antithrombin III in acute experimental pancreatitis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 37, n. 2, p. 280-5, 1992.
- BOSTROM, B.M.; XENOULIS, P.G.; NEWMAN, S.J.; POOL, R.R.; FOSGATE, G.T.; STEINER, J.M. Chronic pancreatitis in dogs: a retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 73-9, 2013.
- BRAINARD, B. M.; GOGGS, R.; MENDEZ-ANGULO, J.L.; MUDGE, M.C.; RALPH, A.G.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 5: Nonstandard assays. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 24, n. 1, p. 57-61, 2014.
- BRUNO, B.; MAURELLA, C.; FALCO, S.; TARDUCCI, A.; ZANATTA, R. *et al.* Assessment of coagulation utilizing thromboelastometry in dogs undergoing orthopedic surgery. **Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 25, n. 3, p. 368-363, 2015.
- BUTENAS, S.; MANN, K. G. Active tissue factor in blood? **Nature Medicine**, v. 10, p.

1155-56, 2004.

CHEN, A.; TERUYA, J. Global hemostasis testing thromboelastography: old technology, new applications. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, n. 2, p. 391-407, 2009.

CHILDRESS, M.O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 42, n. 1, p. 123-55, 2012.

CORDNER, A.P.; ARMSTRONG, P.J.; NEWMAN, S.J.; NOVO, R.; SHARKEY, L.C.; JESSEN EMERITUS, C. Effect of pancreatic tissue sampling on serum pancreatic enzyme levels in clinically healthy dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 5, p. 702-7, 2010.

DELAFORCADE, A.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 3: Assay activation and test protocol. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 24, n. 1, p. 37-46, 2014.

DELGIUDICE, L. A.; WHITE, G. A. The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in health and disease states. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 19, n. 1, p. 23-29, 2009.

DONAHUE, S.M.; BROOKS, M.; OTTO, C.M. Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 21, n. 4, p. 346-55, 2011.

DUNKEL, B.; CHAN, D.L.; BOSTON, R.; MONREAL, L. Association between Hypercoagulability and Decreased Survival in Horses with Ischemic or Inflammatory Gastrointestinal Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1467-74, 2010.

ESMON, C. T. The endothelial cell protein C receptor. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 5, p. 639-43, 2000(a).

ESMON, C. T. The protein C pathway. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 9, p. S44-S48, 2000(b).

FENTY, R. K.; DELAFORCADE, A. M.; SHAW, S.E.; O'TOOLE, T. E. Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of thromboelastography. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 4, p. 463-7, 2011.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-21, 2010.

FLATLAND, B.; KOENIGSHOF, A.M.; ROZANSKI, E.A.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 2: Sample acquisition and handling. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 24, n. 1, p. 30-6, 2014.

FLETCHER, D.J.; ROZANSKI, E.A.; BRAINARD, B.M.; DELAFORCADE, A.M.; BROOKS, M.B. Assessment of the relationships among coagulopathy, hyperfibrinolysis, plasma lactate, and protein C in dogs with spontaneous hemoperitoneum. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 26, n. 1, p. 41-51, 2016.

FRICK, T. W.; HAILEMARIAM, S.; HEITZ, P. U.; LARGIADÈR, F.; GOODALE, R.L. Acute hypercalcemia induces acinar cell necrosis and intraductal protein precipitates in the pancreas of cats and guinea pigs. **Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1675-81, 1990.

FRIEDRICH, K.R.; HARR, K.E.; FREEMAN, K.P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R.M.; BARNHART, K.F.; BLANCO-CHAVEZ, J. ASVCP reference interval guidelines: determinations of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 441-453, 2012.

FURIE, B.; FURIE, B. C. In vivo thrombus formation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, suppl. 1, p. 12- 17, 2007.

GOODWIN, L.V.; GOGGS, R.; CHAN, D.L.; ALLENSPACH, K. Hypercoagulability in dogs with protein-losing enteropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 2, p. 273-7, 2011.

GOGGS, R.; BRAINARD, B.; DELAFORCADE, A.M.; FLATLAND, B.; HANEL, R.; MCMICHAEL, M.; WIINBERG, B. Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS): evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**, v. 24, n. 1, p. 1-22, 2014.

GOGGS, R.; WIINBERG, B.; KJELGAARD-HANSEN, M.; CHAN, D.L. Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia using thromboelastography. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 3, p. 347-53, 2012.

GRANGER, J.; REMICK, D. Acute pancreatitis: models, markers and mediators, **Shock**, v. 24, Suppl. 1, p. 45-51, 2005.

HACKNER, S. Disseminated intravascular coagulations: an update for the clinician. **Cornell University Veterinary Specialists**, [S/l]. Disponível em: <http://www.cuvs.org/pdf/article-disseminated-intravascular-coagulation.pdf>. Acesso em: 6 de janeiro de 2017.

HANEL, R.; CHAN, D.L.; CONNER, B.; GAUTHIER, V.; HOLOWAYCHUK, M.; ISTVAN, S.; WALKER, J.M.; WOOD, D.; GOGGS, R.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 4: Definitions and data reporting. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 47-56, 2014.

HESS, R.S.; SAUDERS, H.M.; VAN WINKLE, T.J.; SHOFR, F.S.; WASHABAU, R.J. Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 5, p. 665-70, 1998.

HESS, R.S.; KASS, P.; SHOFR, F.S.; VAN WHINKLE, T.J.; WASHABAOU, R.J. Evaluation of risk factors for fatal acute pancreatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 1, p. 46-51, 1999.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, n. 6, p. 958-65, 2001.

KAGEYAMA, S.; YAMAMOTO, H.; NAKAZAWA, H.; YOSHIMOTO, R. Anti-human vWF monoclonal antibody, AJvW-2 Fab, inhibits repetitive coronary artery thrombosis without bleeding time prolongation in dogs. **Thrombosis Research**, v. 101, n. 5, p. 395-404, 2001.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, p. 799-895.

KELLEY, D.; LESTER, C.; DELAFORCADE, A.; WEBSTER, C.R.L. Thromboelastographic evaluation of dogs with congenital portosystemic shunts. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 5, p. 1262-7, 2013.

KOL, A.; NELSON, R.W.; GOSSELIN, R.C.; BORJESSON, D.L. Characterization of thrombelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 675-81, 2013.

KOZEK-LANGENECKER, S.A.; AFSHARI, A.; ALBALADEJO, P.; SANTULLANO, C.A.A.; DE ROBERTIS, E.; FILIPESCU, D.C.; FRIES, D.; GO RLINGER, K.; HAAS, T.; IMBERGER, G.; JACOB, M.; LANCE, M.; LLAU, J.; MALLETT, S.; MEIER, J.; RAHE-MEYER, N.; SAMAMA, C.M.; SMITH, A.; SOLOMON, C.; VAN DER LINDEN, P.; WIKKELSO, A.J.; WOUTERS, P.; WYFFELS, P. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 30, n. 6, p. 270-382, 2013.

KRISTENSEN, A. T.; WIINBERG, B.; JESSEN, L. R.; ANDREASEN, E.; JENSEN, A.L. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 1, p. 140-7, 2008.

LARSSON, M.D.; TYNNGARD, N.; KANDER, M.D.; BONNEVIER, M.F.; SCHÖTT, M.D. Comparison of point-of-care hemostatic assays, routine coagulation tests, and outcome scores in critically ill patients. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 5, p. 1032-8, 2015.

LEM, K.Y.; FOSGATE, G.T.; NORBY, B.; STEINER, J.M. Association between dietary factors and pancreatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 9, p. 1425-31, 2008.

LENNON, E.M.; HANEL, R.M.; WALKER, J.M.; VADEN, S.L. Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 3, p. 462-8, 2013.

LEON-JUSTEL, A.; NOVAL-PADILLO, J.; ALVAREZ-RIOS, A.; MELLADO, P. *et al.* Point-of-care haemostasis monitoring during liver transplantation reduces transfusion requirements and improves patient outcome. **Clinica Chimica Acta**, n. 446, p. 277-283, 2015.

LEVI, M.; JONGE, E.; MEIJERS, J. The diagnosis of disseminated intravascular coagulation. **Blood review**, v. 16, n. 4, p. 217-223, 2002.

LINDSTROM, O.; KYLANPPA, L.; MENTULA, P.; PUOLAKKAINEN, P.; KEMPPAINEN, R.; FERNANDEZ, J.A.; GRIFFIN, J.H.; REPO, H.; PETAJA, J. Upregulated but insufficient generation of activated protein C is associated with development of multiorgan failure in severe acute pancreatitis. **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. R16, 2006.

LIPPI, G.; FAVAROLO, E. J.; FRANCHINI, M.; GUIDI, G. C. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, n. 35, v. 1, p. 9-22, 2009.

LWALEED, B. A.; BASS, P. S. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. **The Journal of Pathology**, v. 208, n. 3, p. 327-339, 2006.

MAEDA, K.; HIROTA, M.; ICHIRARA, A.; OHMURAYA, M.; HASHIMOTO, D.; SUGITA, H.; TAKAMORI, H.; KANEMITSU, K.; BABA, H. Applicability of disseminated intravascular coagulation parameters in the assessment of the severity of acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 32, n. 1, p. 87-92, 2006.

MANSFIELD, C. Acute pancreatitis in dogs: advances in understanding, diagnostics, and treatment. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, n. 3, p. 123-132, 2012.

MCCORD, K.; MORLEY, P.S.; ARMSTRONG, J.; SIMPSON, K.; RISHNIW, M.; FORMAN, M.A.; BILLER, D.; PARNELL, N.; ARNELL, K.; HILL, S.; AVGERIS, S.; GITTELMAN, H.; MOORE, M.; HITT, M.; OSWALD, G.; MARKS, S.; BURNEY, D.; TWEDT, D. A multi-institutional study evaluating the diagnostic utility of the spec cPLTM and SNAP® cPLTM in clinical acute pancreatitis in 84 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 4, p. 888-96, 2012.

MCMICHAEL, M. New models of hemostasis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 40-45, 2012.

MCMICHAEL, M.; GOGGS, R.; SMITH, S.; WAGG, C.; WARMAN, S.; WIINBERG, B. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 1: System comparability. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 23-9, 2014.

MEDIROX. **Application Manual ReoRox G2**. [S.I.][2008]

MÖHR, A.J.; LOBETTI, R.G.; VAN DER LUGT, J.J. Acute pancreatitis : a newly

recognised potential complication of canine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n. 4, p. 232-9, 2000.

MONROE, D.M. In: **Proceedings of the XXV International Congress of the World International of Hemophilia**. Sevilha: 2002.

MYERS, R. K.; MCGAVIN, M. D. Respostas Celulares e Teciduais à Lesão. In McGavin, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2009, p. 73-91.

NAGAYA, M.; KUBOTA, S.; ISOGAI, A.; TADOKO, M.; AKASHI, K. Ductular cell proliferation in islet cell neogenesis induced by incomplete ligation of the pancreatic duct in dogs. **Surgery Today**, v. 34, n. 7, p. 586-92, 2004.

NARANI, K.K. Thrombelastography in the perioperative period, **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 49, n. 2, p. 89-95, 2005.

NEILSON-CARLEY, S.C.; ROBERTSON, J. E.; NEWMAN, S.J.; KUTCHMARICK, D.; RE;FORD, R.; WOOSLEY, K.; STEINER, J.M. Specificity of a canine pancreas-specific lipase assay for diagnosing pancreatitis in dogs without clinical or histologic evidence of the disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 3, p. 302-7, 2011.

OTTO, C. M.; RIESER, T. M.; BROOKS, M. B.; RUSSELL, M. W.; Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 10, p. 1500–1504, 2000.

PARK, F.M.; BLOIS, S.L.; ABRAMS-OGG, A.C.; WOOD, R.D.; ALLEN, D.G.; NYKAMP, S.G.; DOWNIE, A. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 5, p. 1136-42, 2013.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 12, p. 1217-9, 2007.

PINTÃO, M. C. T.; FRANCO, R. F. Coagulação Intravascular Disseminada. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 34, n. 3-4, p. 282- 291, 2001.

POLAK, F.; KOLNIKOVA, I.; LIPS, M.; PARIZEK, A.; BLAHA, J.; STRIESKY, M. New recommendations for thromboelastography reference ranges for pregnant women. **Thrombosis Research**, v. 128, n. 4, p. e14-7, 2011.

PRINZ, R.A.; FAREED, J.; ROCK, A.; SQUILLACI, G.; WALLENGA, J. Platelet activation by human pancreatic fluid. **The Journal of Surgical Research**, V. 37, N. 4, P. 314-9, 1984.

RALPH, A.G.; BRAINARD, B.M.; Update on disseminated intravascular coagulation: when to consider it, when to expect it, when to treat it. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 65-72, 2012.

RIDDEL JR., J. P.; AOUIZERAT, B. E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D. P. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 24, n. 3, p. 123-31, 2007.

RIZZI, T. E.; MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal Hematology of the dog. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010, p. 799-810.

ROSE, L.; DUNN, M.E.; BÉDARD, C. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on Coagulation Parameters. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 207-11, 2013.

RUAUX, C.G. Pathophysiology of organ failure in severe acute pancreatitis in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 22, n. 6, p. 531-5, 2000.

SAAVEDRA, P.V.; GARCIA, A.L.; LÓPEZ, S.Z.; COUTO, G. Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: A thromboelastographic characterization of hypercoagulability. **The Veterinary Journal**, v. 190, n.2, p. e78–e83, 2011.

SATAKE, K.; UCHIMA, K.; UMEYAMA, K.; APPERT, H. E.; HOWARD, J. M. The effects upon blood coagulation in dogs of experimentally induced pancreatitis and the infusion of pancreatic juice. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 153, n. 3, p. 341-5, 1981.

SAWA, H.; UEDA, T.; TAKEYAMA, Y.; YASUDA, T.; MATSUMURA, N.; NAKAJIMA, T.; AJIKI, T.; FUJINO, Y.; SUZUKI, Y.; KURODA, Y. Elavation of plasma tissue factor levels in patients with severe acute pancreatitis. **Journal of Gastroenterology**, v. 41, n. 6, p. 575-81, 2006.

SCARPELINI, S.; RHIND, S.G.; NASCIMENTO, B.; TIEN, H.; SHEK, P.N.; PENG, H.T.; HUANG, H.; PINTO, R.; SPEERS, V.; REIS, M.; RIZOLI, S.B. Normal range values for thromboelastography in healthy adult volunteers, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 12, p. 1210-7, 2009.

SINNOTT, V. B.; OTTO, C. M.; Use of thromboelastography in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 39 cases (2000–2008). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 5, 484–488, 2009.

SMITH, S. Overview of hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 635-653.

SOLBECK, S.; WINDELOV, N.A.; BAEK, N.H.; NIELSEN, J.D.; OSTROWSKI, S.R.; JOHANSSON, P.I. In-vitro comparison of free oscillation rheometry (ReoRox) and rotational thromboelastometry (ROTEM) in trauma patients upon hospital admission. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 23, n. 8, p. 688-92, 2012.

SOLBERG, H. E. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. **Clinica Chimica Acta**, v. 170, n. 2-3, p. S13-S32, 1987.

SOLOMON, C.; SCHÖCHL, H.; RANUCCI, M.; SCHÖTT, U.; SCHLIMP, C.J.

Comparison of fibrin-based clot elasticity parameters measured by free oscillation rheometry (ReoRox) versus thromboelastometry (ROTEM). **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 75, n. 3, p. 239-46, 2015.

SPIEZIA, L.; BERTINI, D.; BOLDRIN, M.; RADU, C.; BULATO, C.; GAVASSO, S.; COZZI, E.; SIMIONI, P. Reference values for thromboelastometry (ROTEM) in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Thrombosis Research**, v. 126, n. 4, p. e294-7, 2010.

STEINER, J.M.; NEWMAN, S.; XENOULIS, P.; WOOSLEY, K.; SUCHODOLSKI, J.; WILLIAMS, D.; BARTON, L. Sensitivity of serum markers for pancreatitis in dogs with macroscopic evidence of pancreatitis. **Veterinary Therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 263-73, 2008.

STOKOL, T. Disseminated intravascular coagulation. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 679-688.

STOKOL, T. Laboratory diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs and cats: the past, the present and the future. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 189-202, 2012.

SWINNEY, G. Canine pancreatitis. **Australian Veterinary Association**. Disponível em:
<http://www.ava.com.au/sites/default/files/CANINE%20PANCREATITIS_GSwinney.pdf>. Acessado em: 5 de janeiro de 2017.

TAKAHIRA, R. K. Distúrbios da hemostasia em veterinária: patogenia e avaliação clínico-laboratorial. In GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre, UFRGS, 2003, p. 46-64.

TANAKA, T.; ICHIBA, Y.; MIURA, Y.; ITO, H.; DOHL, K. Canine model of chronic pancreatitis due to chronic ischemia. **Digestion**, v. 55, n. 2, p. 86-9, 1994.

TAYLOR, F.B.J.; CHANG, A.; RUF, W. *et al.* Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. **Circulatory Shock**, v. 33, n. 3, p. 127-134, 1991.

THAWLEY, V.J.; SÁNCHEZ, M.D.; DROBATZ, K.J.; KING, L.G. Retrospective comparison of thromboelastography results to postmortem evidence of thrombosis in critically ill dogs: 39 cases (2005-2010). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 428-36, 2016.

TRAVIS, G.; SAFIAH, M.; LIAW, P. Coagulation Abnormalities in Acute Pancreatitis – Treatment and Complications. In: SAEZ, L.R. **Pancreatitis – Treatment and Complications**, Rijeka: Intech, 2012. P. 59-72.

TRIVEDI, S.; MARKS, S.L.; KASS, P.H.; LUFF, J.A.; KELLER, S.M.; JOHNSON, E.G.; MURPHY, B. Sensitivity and specificity of canine pancreas-specific lipase (cPL) and other markers for pancreatitis in 70 dogs with and without histopathologic

evidence of pancreatitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1241-7, 2011.

TYNNGARD, N. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por correa-silvia@uol.com.br em 11.fev.2016, 3.jan.2017, 4.jan.2017.

TYNNGARD, N.; LINDAHL, T.L.; RAMSTROM, S.; RAF, T.; RUGARN, O.; BERLIN, G. Free oscillation rheometry detects changes in clot properties in pregnancy and thrombocytopenia. **Platelets**, v. 19, n. 5, p. 373-8, 2008.

VAN GEENEN, E. J. M.; VAN DER PEET, D. L.; BHAGIRATH, P.; MULDER, C.J.; BRUNO, M.J. Etiology and diagnosis of acute biliary pancreatitis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 495-502, 2010.

VERSTEEG, H.H.; HEEMSKERK, J.W.; LEVI, M.; REITSMA, P.H. New fundamentals in hemostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 327-58, 2011.

VILAR, P.; COUTO, C.G.; WESTENDORF, N.; IAZBIK, C.; CHARSKIE, J.; MARIN, L. Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 374-9, 2008.

VILAR, P.; LARA, G.A.; ZALDIVAR, L.S.; COUTO, G. Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. e-78-83, 2011.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.

WADA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMASHITA, Y. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. **Journal of Intensive Care**, v. 2, n. 1, p. 15, 2014.

WAGG, C.; BOYSEN, S.R.; BEDARD, C. Thromboelastography in dogs admitted to an intensive care unit. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 453-61, 2009.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in inflammation and thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 12, p. 2131-7, 2003.

WARMAN, S.; HALL, E.J.; SUCHODOLSKI, J.; STEINER, J.M.; Canine pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in dogs with IMHA. **Proceedings of the BSAVA Congress**, Birmingham. p. 506; abstract 97, 2008.

WATSON, P.J.; ROULOIS, A.J.; SCASE, T.; JOHNSTON, P.E.; THOMPSON, H.; HERRTAGE, M.E. Prevalence and breed distribution of chronic pancreatitis at post-mortem examination in first-opinion dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, n. 11, p. 609-18, 2007.

WATSON, P.J.; ARCHER, J.; ROULOIS, A.J.; SCASE, T.J.; HERRTAGE, M.E. Observational study of 14 cases of chronic pancreatitis in dogs. **Veterinary Record**, v. 167, n. 25., p. 968-76, 2010.

WATSON, P. Pancreatitis in dogs and cats: definitions and pathophysiology. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2015.

WEATHERTON, L.K.; STREETER, E. M. Evaluation of fresh frozen plasma administration in dogs with pancreatitis: 77 cases (1995-2005). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 6, p. 617-22, 2009.

WILLIAMS, J.M.; PANCIERA, D.L.; LARSON, M.M.; WERE, S.R. Ultrasonographic findings of the pancreas in cats with elevated serum pancreatic lipase immuno-reactivity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 913-8, 2013.

WIINBERG, B.; JENSEN, A.L.; JOHANSSON, P.I.; ROZANSKI, E.; TRANHOLM, M.; KRISTENSEN, A.T. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 357-65, 2008.

WINSTEDT, D.; TYNNGÅRD, N.; OLANDERS, K.; SCHÖTT, U. Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. **Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2013.

WOLBERG, A.S.; CAMPBELL, R.A., 2008. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 1, p. 15-23, 2008.

XENOULIS, P.G.; STEINER, J.M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 12-21, 2010a.

XENOULIS, P.G.; STEINER, J.M. Canine and feline pancreatic lipase immunoreactivity. **The Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 12-21, 2010b.

XENOULIS, P. G. Diagnosis of pancreatitis in dogs and cats. **Journal os Small Animal Practice**, v. 56, n. 1, p. 13-26, 2015.

ZORIO, E.; GILABERT-ESTELLÉS, J.; ESPAÑA, F.; RAMÓN, L.A. *et al.* Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 923-929, 2008.

APÊNDICE A – VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS OBTIDAS COM REAGENTE FIB1, SEGUNDO O GRUPO DE ESTUDO

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	P25	Mediana	P75	p*
COT1 (seg)	Controle	47	20,17	13,00	28,00	18,00	20,00	22,00	0,236
	Pancreatite	6	49,83	15,00	146,00	16,50	34,50	75,50	
EC (Pa)	Controle	47	1047,58	141,90	4500,00	549,10	897,70	1216,00	0,017
	Pancreatite	6	2413,90	368,00	4286,80	1424,30	2147,60	3889,45	
COT2 (seg)	Controle	46	55,89	33,00	98,00	47,00	51,00	63,25	0,102
	Pancreatite	6	107,83	43,00	197,00	48,25	80,50	196,25	
SLOPEDE (graus)	Controle	36	64,15	34,50	86,50	57,20	61,60	76,90	0,019
	Pancreatite	6	76,38	62,00	84,10	68,45	79,00	83,73	
SLOPE (Pa/min)	Controle	46	101,13	15,00	269,00	51,50	69,50	157,25	0,006
	Pancreatite	6	278,50	77,00	628,00	107,75	220,50	462,25	
CLOTSR30 (%)	Controle	45	39,53	8,00	90,00	20,50	34,00	55,50	0,183
	Pancreatite	6	27,33	5,00	74,00	9,50	19,50	44,75	
CLOTSR (Pa/min)	Controle	45	18,24	2,00	66,00	9,00	15,00	23,50	0,455
	Pancreatite	6	13,83	5,00	21,00	5,00	15,50	21,00	
MAXELAST (Pa)	Controle	46	1506,31	524,00	2907,80	984,55	1445,20	1872,75	0,003
	Pancreatite	6	3061,82	1427,10	4500,00	1851,75	2975,25	4500,00	
FIBRINO (g/L)	Controle	38	35,78	15,50	67,20	23,60	34,10	45,18	0,004
	Pancreatite	6	70,73	33,60	103,40	43,28	68,75	103,40	
TEG	Controle	35	87,05	86,10	92,10	86,30	86,50	87,60	0,011
	Pancreatite	6	89,00	86,50	94,20	87,40	88,05	90,68	
TIMETOMAX (seg)	Controle	30	1881,40	890,00	2782,00	1525,75	1874,00	2142,75	0,832
	Pancreatite	6	1733,33	552,00	2489,00	1274,25	1853,00	2225,75	

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: Em vermelho, variações estatisticamente significantes; (*) Nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney

APÊNDICE B – VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS OBTIDAS COM REAGENTE FIB2, SEGUNDO O GRUPO DE ESTUDO

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	P25	Mediana	P75	p*
COT1 (seg)	Controle	43	19,67	15,00	37,00	18,00	19,00	21,00	0,975
	Pancreatite	6	32,83	15,00	86,00	15,00	19,00	53,75	
EC (Pa)	Controle	43	1745,88	810,30	2920,70	1254,90	1693,10	2098,80	0,016
	Pancreatite	6	2989,92	1411,00	4500,00	1754,43	2829,80	4500,00	
COT2 (seg)	Controle	43	62,95	44,00	159,00	48,00	59,00	73,00	0,879
	Pancreatite	6	87,67	40,00	220,00	44,50	59,50	130,75	
SLOPEDE (graus)	Controle	35	65,74	38,80	85,00	59,70	68,60	72,70	0,032
	Pancreatite	6	76,53	65,20	84,50	67,75	79,25	82,93	
SLOPE (Pa/min)	Controle	43	113,67	32,00	546,00	65,00	91,00	130,00	0,015
	Pancreatite	6	270,83	88,00	493,00	101,50	228,50	484,00	
MAXELAST (Pa)	Controle	43	1750,88	810,40	2927,30	1257,10	1693,60	2100,00	0,016
	Pancreatite	6	2989,05	1411,60	4500,00	1753,45	2827,65	4500,00	
TEG	Controle	35	87,09	86,10	91,30	86,50	86,70	87,30	0,007
	Pancreatite	6	88,68	86,70	91,00	87,60	88,10	90,48	
TIMETOMAX (seg)	Controle	41	2104,15	1230,00	3068,00	1691,50	2011,00	2574,00	<0,001
	Pancreatite	6	1136,00	666,00	1500,00	828,00	1155,00	1468,50	

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: Em vermelho, variações estatisticamente significantes; (*) Nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney

APÊNDICE C – VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS OBTIDAS COM REAÇÃO SEM REAGENTE, SEGUNDO O GRUPO DE ESTUDO

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	P25	Mediana	P75	p*
COT1 (seg)	Controle	46	314,61	93,20	643,00	208,75	262,50	438,50	0,007
	Pancreatite	4	152,00	111,00	201,00	118,00	148,00	190,00	
EC (Pa)	Controle	46	1635,69	741,50	2592,20	1118,08	1583,40	2033,33	0,001
	Pancreatite	4	3297,10	2717,40	3961,00	2768,60	3255,00	3867,70	
COT2 (seg)	Controle	46	353,39	134,00	697,00	263,00	310,00	432,25	0,015
	Pancreatite	4	218,25	169,00	273,00	177,00	215,50	262,25	
SLOPEDE (graus)	Controle	38	66,11	37,10	82,00	58,30	66,30	76,55	0,005
	Pancreatite	4	81,35	78,10	83,70	78,90	81,80	83,35	
SLOPE (Pa/min)	Controle	46	118,17	30,00	348,00	60,75	90,00	151,50	0,004
	Pancreatite	4	309,25	203,00	412,00	224,50	311,00	392,25	
CLOTSR30 (%)	Controle	46	11,22	1,00	21,00	7,00	11,50	15,00	0,519
	Pancreatite	4	9,50	6,00	18,00	6,00	7,00	15,50	
CLOTSR (Pa/min)	Controle	45	6,64	1,00	13,00	4,50	6,00	9,00	0,225
	Pancreatite	4	9,00	6,00	15,00	6,25	7,50	13,25	
MAXELAST (Pa)	Controle	46	1835,16	881,10	2901,60	1305,25	1831,00	2242,30	0,001
	Pancreatite	4	3632,60	3165,30	4219,30	3203,33	3572,90	4121,58	
TEG	Controle	38	87,02	86,10	89,00	86,40	86,75	87,63	0,005
	Pancreatite	4	88,63	88,10	89,60	88,18	88,40	89,30	
TIMETOMAX (seg)	Controle	46	2563,20	1798,00	3493,00	2168,50	2396,00	3004,00	0,453
	Pancreatite	4	2382,75	2218,00	2731,00	2229,00	2291,00	2628,25	

Fonte: (CORRÊA, 2017)

Nota: Em vermelho, variações estatisticamente significantes; (*) Nível descritivo de probabilidade do teste não-paramétrico de Mann-Whitney