

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TRANSTORNOS DA HEMOSTASIA EM CÃES AZOTÊMICOS**

**FERNANDA VOLL COSTA VENTURA**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TRANSTORNOS DA HEMOSTASIA EM CÃES AZOTÊMICOS**

**Autora:** Fernanda Voll Costa Ventura

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

**Orientador:** Félix Hilario Diaz González

**PORTO ALEGRE**

**2011**

V468t Ventura, Fernanda Voll Costa

Transtornos da hemostasia em cães azotêmicos. / Fernanda Voll Costa Ventura – Porto Alegre : UFRGS, 2011.

41 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011. Félix Hilário Diaz González, Orient.

1. Patologia animal 2. Azotemia: veterinária: cães 3. Hemostasia 4. Uremia: cães I. Diaz González, Félix Hilário, Orient. II. Título.

CDD 619.6026

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Fernanda Voll Costa Ventura

**TRANSTORNOS DA HEMOSTASIA EM CÃES AZOTÊMICOS**

Aprovada em 16 de fevereiro de 2011

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Félix Hilario Diaz González

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Daniel Gerardi (UFRGS)

Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Simone Tostes Oliveira Stedile (UFPR)

Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Sônia Terezinha dos Anjos Lopes (UFSM)

Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas filhas, Luísa e Bruna, e ao meu marido, Luis Fernando, pela compreensão, apoio, amor e cumplicidade.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e apoio sempre oportuno.

Aos colegas e amigos pelo incentivo, pelas palavras encorajadoras, sugestões e comentários.

Aos animais, motivo da busca por conhecimento.

Ao meu orientador Félix Hilario Diaz González pela oportunidade e confiança.

Ao Prof. Cláudio Roberto S. Mattoso pela parceria e apoio imprescindíveis.

## TRANSTORNOS DA HEMOSTASIA EM CÃES AZOTÊMICOS

Autora: Fernanda Voll Costa Ventura

Orientador: Félix Hilario Diaz González

### RESUMO

A uremia é uma desordem sistêmica que pode estar associada à disfunção plaquetária adquirida, levando a alterações na hemostasia primária. Vários modelos de interferência entre a uremia e a falha na hemostasia já foram propostos, porém o mecanismo exato é desconhecido, e a tendência ao sangramento parece ser de origem multifatorial. O teste do tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) pode ser utilizado na avaliação da hemostasia primária em animais. O fator de von Willebrand (FvW:Ag) normal ou aumentado, observado na maioria dos cães urêmicos, contribui para o diagnóstico de uma alteração plaquetária adquirida. A contagem de plaquetas e os testes de coagulação normais associados a um aumento no TSMO dão suporte à suspeita de um defeito qualitativo. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis anormalidades na hemostasia, buscando estabelecer uma relação entre os resultados de exames laboratoriais e alterações no tempo de sangramento. A hemostasia foi avaliada em quarenta cães azotêmicos, urêmicos ou não. O aumento no TSMO foi observado em 35% dos cães azotêmicos. O teste de Spearman demonstrou haver correlação entre o TSMO e os valores de creatinina, uréia e hematócrito, porém, o ajuste pela Regressão Linear Múltipla evidenciou o hematócrito como única variável associada com o TSMO. Valores de hematócrito abaixo do intervalo de referência para a espécie foram observados em 92,86% dos pacientes que apresentaram aumento no TSMO. Esses valores reduzidos parecem contribuir para a tendência ao sangramento, embora não possam ser considerados como fator determinante preditivo, uma vez que sua ocorrência nem sempre se associou com interferências no TSMO.

**Palavras-chave:** azotemia, uremia, plaquetas, disfunção plaquetária, tempo de sangramento da mucosa oral, cães.

## **HEMOSTATIC DISORDERS IN AZOTEMIC DOGS**

Author: Fernanda Voll Costa Ventura

Adviser: Félix Hilario Diaz González

### **ABSTRACT**

*Uremia is a systemic disorder that may be associated with acquired platelet dysfunction, leading to changes in primary hemostasis. Several interference models between uremia and hemostasis failure have been proposed, but the exact mechanism is unknown, and bleeding tendencies seem to have a multifactorial origin. The buccal mucosal bleeding time (BMBT) test can be used in the assessment of primary hemostasis in animals. Normal or increased von Willebrand factor (vWF:Ag), observed in most uremic dogs, contributes to the diagnosis of an acquired platelet alteration. Normal platelet counts and coagulation tests associated with BMBT raises support the suspicion of a qualitative defect. The aim of this study was to investigate possible hemostasis abnormalities, trying to establish a relation between the results of laboratory tests and changes in bleeding times. Hemostasis was evaluated in forty azotemic dogs, uremic or not. Increase in BMBTs was observed in 35% of the azotemic dogs. Spearman's test showed a correlation between BMBT and the values of creatinine, urea and hematocrit; however, adjusting for Multiple Linear Regression showed hematocrit as the only variable associated with BMBT. Hematocrit values below reference range for the species was observed in 92,86% of the patients showed an increase in BMBT. These low values appear to contribute to the tendency to bleed, although they cannot be considered as a predictive determining factor, since their occurrence is not always associated with interference in BMBT.*

**Key words:** azotemia, uremia, platelets, platelet dysfunction, buccal mucosa bleeding time, dogs.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b> Reação plaquetária básica..... | 18 |
|--------------------------------------------------|----|

### ARTIGO

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b> Correlação de Spearman entre TSMO e as variáveis uréia, creatinina e hematócrito..... | 35 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE QUADROS

### ARTIGO

- Quadro 1** - Média e desvio padrão, valor mínimo e máximo das variáveis com distribuição simétrica em cães azotêmicos ..... 34
- Quadro 2** - Mediana e intervalo interquartil, valor mínimo e máximo das variáveis com distribuição assimétrica em cães azotêmicos..... 34

## SUMÁRIO

|              |                                                  |           |
|--------------|--------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                           | <b>10</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS.....</b>                            | <b>12</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Objetivos gerais.....</b>                     | <b>12</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Objetivos específicos.....</b>                | <b>12</b> |
| <b>3</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                | <b>13</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Hemostasia.....</b>                           | <b>13</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>O endotélio na hemostasia.....</b>            | <b>14</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>As plaquetas.....</b>                         | <b>15</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b>A função das plaquetas na hemostasia.....</b> | <b>16</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Avaliação da hemostasia.....</b>              | <b>20</b> |
| <b>3.5</b>   | <b>Azotemia e uremia.....</b>                    | <b>23</b> |
| <b>3.6</b>   | <b>Hemostasia e uremia.....</b>                  | <b>23</b> |
| <b>4</b>     | <b>ARTIGO.....</b>                               | <b>25</b> |
| <b>5</b>     | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                 | <b>36</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                          | <b>37</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A hemostasia é um mecanismo protetor que previne o sangramento excessivo após uma lesão ao sistema vascular. Ela depende de interações complexas entre o endotélio dos vasos, plaquetas, fatores de coagulação (e seus co-fatores) e fatores fibrinolíticos. As plaquetas, fundamentais para a hemostasia normal, são ativadas, aderem ao local da lesão e secretam substâncias necessárias para a coagulação e para o processo de cicatrização, formando agregados que impedem a perda sanguínea (SMITH, 2010). Este processo, definido como hemostasia primária, é seguido pela formação de um coágulo de fibrina e um processo de fibrinólise (GOPEGUI; FELDMAN, 2004a).

A uremia é reconhecida como uma causa de disfunção plaquetária em animais e humanos. Várias moléculas e vias estão envolvidas nos defeitos de adesão, agregação e secreção plaquetária (FRY, 2010). O teste do tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) é útil na avaliação da hemostasia primária em cães e gatos. O aumento no tempo necessário para a formação do tampão hemostático após a indução de uma lesão sugere prejuízos à função plaquetária. A doença de von Willebrand e o uso de alguns medicamentos também podem causar alterações na hemostasia primária. A apresentação clínica e o histórico, juntamente com os resultados de exames de coagulação, auxiliam na identificação do distúrbio associado (COUTO, 2006). O prolongamento no tempo de sangramento observado em cães azotêmicos com contagem de plaquetas e testes de agregação normais sustentam a presença de uma disfunção plaquetária adquirida associada a interferências sobre a excreção renal (BRASSARD et al., 1994).

Diferentes padrões de correlação entre a tendência ao sangramento, verificados através do teste do tempo de sangramento, e os resultados de exames laboratoriais simples e de fácil acesso, tais como hematócrito e níveis séricos de creatinina e uréia, foram identificados através de pesquisas (FERNANDEZ et al., 1985; BRASSARD et al., 1994; HO et al., 2008) e descritos em revisões (HEDGES, 2007; SHEN; FRENKEL, 2007). Estudos envolvendo os receptores plaquetários (GPIIb-IIIa), responsáveis pela agregação, constataram a existência de uma correlação negativa entre a creatinina sérica e a expressão desses receptores (SREEDHARA et al., 1996), o que sugeriria a

associação entre esse metabólito e o sangramento urêmico. A identificação de exames que fossem determinantes para o aumento no TSMO permitiria detectar os pacientes com maior propensão ao sangramento, possibilitando a adoção de medidas que pudessem reduzir perdas adicionais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

- Estabelecer uma relação entre os resultados de exames laboratoriais rotineiros e facilmente acessíveis (hematológicos e/ou bioquímicos) e alterações hemostáticas que possam predispor cães azotêmicos, urêmicos ou não, ao sangramento.
- Tentar identificar, entre os testes propostos neste estudo, o que mais se associa à alteração no TSMO de cães azotêmicos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar o TSMO em cães azotêmicos.
- Verificar a presença de alterações na hemostasia primária, através do teste do TSMO, e relacionar com os achados dos testes de TP, TTPa e PDFs.
- Verificar a relação entre os valores plasmáticos de uréia e/ou creatinina e alterações no TSMO.
- Identificar alterações laboratoriais relacionadas a interferências na hemostasia primária através dos testes realizados em cães azotêmicos.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Hemostasia**

A hemostasia é um processo adaptativo que controla a fluidez do sangue dentro do sistema vascular. Ela depende de interações complexas entre plaquetas, fatores de coagulação, fatores fibrinolíticos e vasos sanguíneos, sendo dividida em hemostasia primária, secundária e terciária, embora ocorram de forma simultânea e interdependente (STOCKHAM; SCOTT, 2008). Diante de uma lesão vascular ocorre a formação de um tampão hemostático primário que tem por objetivo interromper ou limitar o sangramento (hemostasia primária). Esse evento inicial é seguido pela ativação da cascata da coagulação que resulta na formação de fibrina e estabilização do coágulo (hemostasia secundária), e pela dissolução deste coágulo após o processo de cicatrização (hemostasia terciária) (McCONNEL, 2000; LASNE et al., 2006).

A hemostasia primária requer a interação entre parede vascular, plaquetas e proteínas adesivas (LASNE et al., 2006). A quantidade e a integridade estrutural das plaquetas são importantes para a hemostasia normal (GENTRY et al., 2008). A exposição do colágeno subendotelial estimula a adesão plaquetária através da ligação com seus receptores de membrana. As plaquetas são ativadas sofrendo modificações que levam à exposição de receptores de fibrinogênio e liberação de grânulos, ativando outras plaquetas e favorecendo a formação de agregados (McCONNEL, 2000). A liberação do fator de von Willebrand (FvW) contribui para o desenvolvimento desse processo (BECKER et al., 2000; GENTRY et al., 2008). A lesão subendotelial expõe também o fator tissular (TF ou F III) responsável pelo início da hemostasia secundária. O resultado final disso é a conversão do fibrinogênio em fibrina por ação da trombina (fator II). A formação da fibrina desenvolve-se sobre o tampão plaquetário inicial e confere maior resistência à ação da plasmina. A fibrinólise, mediada pela plasmina, caracteriza a hemostasia terciária e garante a dissolução do coágulo e reparo da estrutura vascular (McCONNEL, 2000).

### 3.2. O endotélio na hemostasia

As células endoteliais estão envolvidas no processo de controle da hemostasia (CINES et al., 1998). Sob condições fisiológicas o endotélio promove vasodilatação, previne adesão e ativação plaquetária, impede a formação de trombina e a deposição de fibrina (BECKER et al., 2000). Essas propriedades anticoagulantes são asseguradas pela expressão de adenosina difosfatase, síntese e secreção de prostaciclina ( $PGI_2$ ) e óxido nítrico (NO) que contribuem para a inibição da agregação plaquetária (STOKOL, 2000; GENTRY et al., 2008; SMITH, 2010). Além disso, produzem ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e tipo tecidual (tPA) que favorecem a formação da plasmina, substância responsável pela dissolução de coágulos que possam estar presentes (SMITH, 2010).

A expressão de trombosmodulina, glicosaminoglicanos e inibidor do fator tissular sobre a superfície de membrana das células endoteliais inibe a produção de trombina (SMITH, 2010). Os glicosaminoglicanos atuam como co-fatores da antitrombina III (ATIII) (CINES et al., 1998). A trombosmodulina interfere na ação da trombina, e atua como co-fator ativando a proteína C, cuja atividade é potencializada pela proteína S sintetizada por células endoteliais. A proteína C inativa os fatores V e VIII da coagulação, enquanto a trombosmodulina liga-se ao fator X ativado (Xa) impedindo sua ação. O inibidor do fator tissular (TFPI) sintetizado pelas células endoteliais previne a interação do fator tissular com o fator VII ativado (VIIa) impedindo a produção de trombina e fibrina (CINES et al., 1998; SMITH, 2010).

A lesão do endotélio vascular induz alterações que levam à expressão de sua atividade pró-coagulante (CINES et al., 1998). A vasoconstrição é uma resposta inicial à lesão mediada por reflexo neurogênico e pela endotelina (GENTRY et al., 2008). As células endoteliais liberam FvW que é mediador da adesão e agregação plaquetária (RUGGERI, 2003) e tem importante função relacionada com a estabilização do fator VIII (STOKOL, 2000), além disso, também expressam receptores para a trombina, responsável por iniciar eventos pró-coagulantes e pró-inflamatórios (SMITH, 2010). A expressão do fator tissular (TF) pelas células endoteliais induz a formação de fibrina sobre a superfície dessas células, a trombina participa desse processo através da ativação de plaquetas, enzimas e co-fatores da coagulação (CINES et al. 1998). A contribuição da trombina nesse processo ocorre devido à perda da expressão da trombosmodulina e proteoglicanos. A liberação do FvW das células endoteliais facilita a

ligação das plaquetas ao colágeno subendotelial exposto e contribui para a ativação e liberação de grânulos que facilitam a agregação e a formação do coágulo. A liberação do inibidor do plasminogênio (PAI-1) impede a fibrinólise. A síntese e secreção de tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e fator ativador plaquetário (PAF) contribuem para a agregação e ativação plaquetária. A expressão aumentada de moléculas de adesão como a P-selectina promove a adesão das plaquetas à superfície endotelial. A exposição do fosfolípido plaquetário fosfatidilserina induz a formação de trombina (BECKER et al., 2000; GENTRY et al., 2008).

### 3.3. As plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos derivados de células-tronco hematopoiéticas. As plaquetas circulantes de mamíferos possuem estrutura discóide, são desprovidas de núcleo e contém componentes funcionais importantes:  $\alpha$ -grânulos, grânulos densos, grânulos de glicogênio, mitocôndrias, lisossomos, citoesqueleto, sistema de canais, fosfolípidos e glicoproteínas (STOCKHAM; SCOTT, 2008a), sendo fundamentais para a hemostasia normal. Quando ativadas aderem ao local da lesão, secretam moléculas necessárias para a coagulação e cicatrização, e formam agregados evitando a perda de sangue (SMITH, 2010). Para que possam cumprir seu papel na hemostasia, a quantidade e integridade estrutural das plaquetas são fundamentais (GENTRY et al, 2008).

A membrana da plaqueta é formada por fosfolípidos distribuídos assimetricamente; as alterações nessa distribuição determinam a ativação plaquetária (STOKOL, 2000; BOUDREAUX, 2010). As proteínas e glicoproteínas atuam como receptores presentes na membrana interna e externa. As glicoproteínas estão envolvidas na ligação com o FvW, colágeno e fibrinogênio, importantes nos processos de adesão e agregação plaquetária (BOUDREAUX, 2010). As proteínas G são receptores associados à membrana das plaquetas, esses receptores se ligam a substâncias agonistas causando uma série de reações importantes para os processos que envolvem a adesão, agregação e secreção plaquetária (GENTRY et al, 2008).

Os grânulos plaquetários armazenam substâncias importantes do ponto de vista funcional. Os grânulos densos contêm Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ADP, ATP e serotonina; e os grânulos  $\alpha$  armazenam proteínas envolvidas na hemostasia e reparo vascular, entre as quais albumina, fibronectina, trombospondina, fibrinogênio, fator plaquetário 4,

trombomodulina, FvW, fator V e fatores de crescimento, que mediante estímulo apropriado, secretam seu conteúdo (GENTRY et al., 2008; BOUDREAUX, 2010). A liberação de ADP e serotonina da primeira camada de plaquetas aderidas ao local de dano vascular é importante no recrutamento de plaquetas adicionais e desenvolvimento do tampão plaquetário (GENTRY et al., 2008). A extrusão do conteúdo dos grânulos e a alteração na morfologia da plaqueta resulta na exposição de GPIIb-IIIa e de marcadores de membrana como a P-selectina (ou CD62) sobre a superfície das plaquetas ativadas. Os grânulos de glicogênio, juntamente com as mitocôndrias, fornecem energia para os processos de exocitose (GENTRY et al., 2008; BOUDREAUX, 2010).

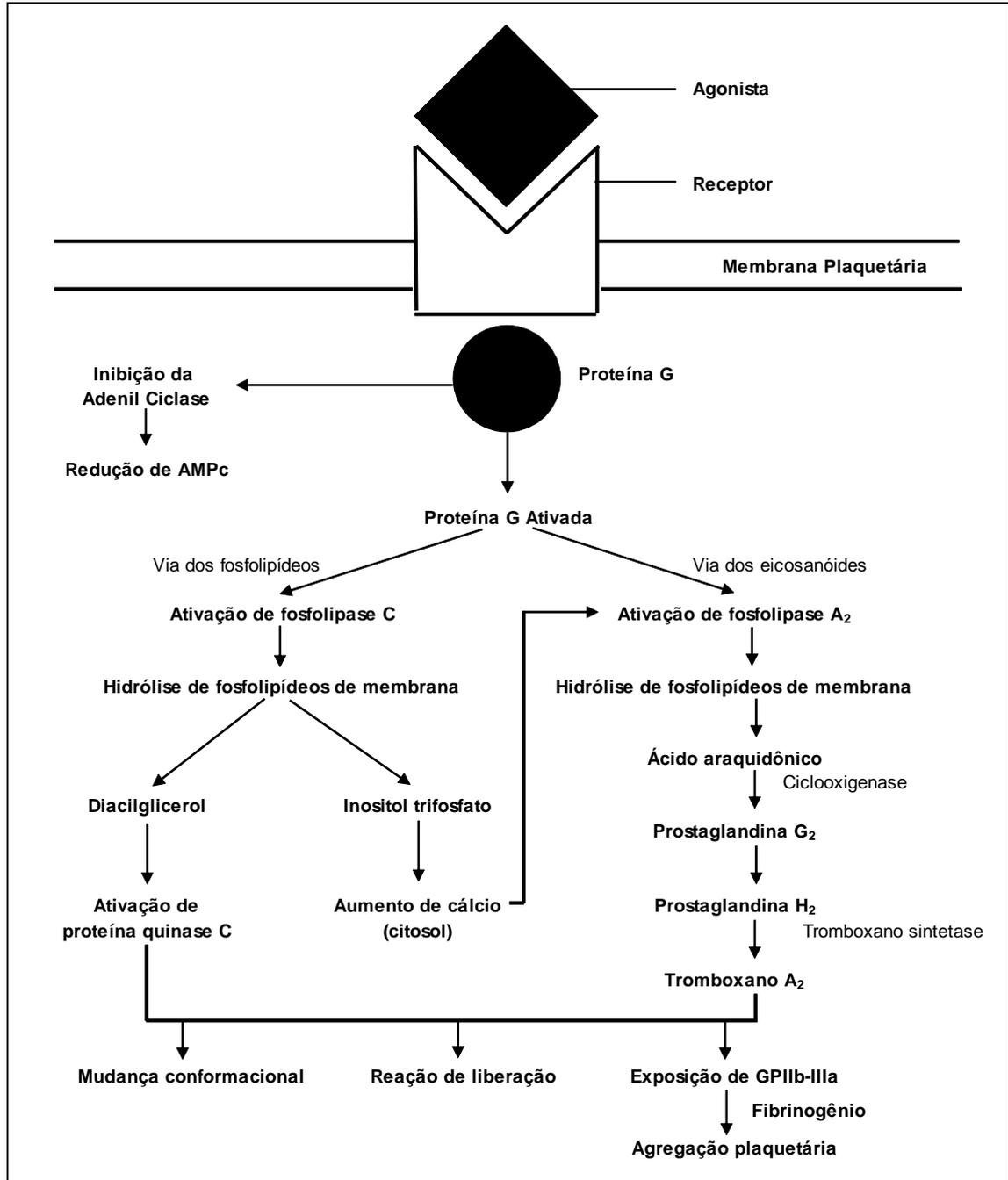
O intercâmbio de substâncias entre o meio externo e o citoplasma das plaquetas é assegurado pela presença de um sistema de canais (STOCKHAM; SCOTT, 2008a). É através destes canais que o conteúdo dos grânulos  $\alpha$  e grânulos densos são secretados durante as reações de liberação (STOKOL, 2000). As plaquetas também possuem o sistema de túbulos densos, um resquício do retículo endoplasmático dos megacariócitos, cujas membranas contêm ciclooxigenase e tromboxano sintetase necessárias à síntese de prostaglandinas e tromboxano (BOUDREAUX, 2010). Esses túbulos também permitem o armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$ . O estímulo ao armazenamento é mediado pela adenilciclase que promove aumento nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), enquanto a redução no AMPc, mediada pela fosfodiesterase, estimula reações de liberação. O cálcio liberado é essencial para a ativação, reações de liberação e agregação plaquetária (STOKOL, 2000).

### **3.3.1. A função das plaquetas na hemostasia**

As plaquetas são fundamentais na formação do tampão hemostático inicial que caracteriza a hemostasia primária, além de participar na cascata da coagulação pela liberação de fatores da coagulação e exposição da fosfatidilserina, um fosfolípídeo de membrana que confere a plaqueta atividade pró-coagulante. A adesão, agregação, secreção e atividade pró-coagulante são processos através dos quais as plaquetas exercem suas funções (STOKOL, 2000).

A agregação plaquetária depende da interação com substâncias agonistas e da ligação aos seus receptores específicos na membrana (STOKOL, 2000). Quando substâncias agonistas ligam-se aos receptores plaquetários, os sinais externos são reconhecidos e se desenvolvem reações que favorecem a adesão, agregação, liberação

de grânulos (Fig. 1) e posterior formação de fibrina. A ligação do agonista ao seu receptor específico ativa proteínas G, estimulando a fosfolipase C, a fosfolipase A<sub>2</sub> e inibindo a adenilciclase. A fosfolipase C hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) na membrana plaquetária à diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O DAG ativa a proteína quinase C, que através de segundo mensageiros, leva à agregação plaquetária, mudança conformacional e secreção de grânulos. O inositol 1,4,5-trifosfato promove a liberação de cálcio do sistema de túbulos densos com subsequente aumento na sua concentração no citosol. O aumento na concentração de cálcio intracelular favorece mudanças na conformação, secreção de grânulos e ativação de GPIIb-IIIa. A fosfolipase A<sub>2</sub> catalisa a liberação do ácido araquidônico de fosfolipídeos da membrana, levando à síntese de prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub>. O tromboxano A<sub>2</sub> promove o recrutamento adicional de plaquetas e a secreção de grânulos. As vias da fosfolipase C (via dos fosfolipídeos) e da fosfolipase A<sub>2</sub> (via dos eicosanóides) se desenvolvem de forma integrada, além de aumentar a concentração de cálcio intracelular, o inositol 1,4,5-trifosfato também ativa a fosfolipase A<sub>2</sub>, estimulando a produção de ácido araquidônico. O ácido araquidônico e o tromboxano A<sub>2</sub> podem estimular a fosfolipase C. A inibição da adenilciclase reduz a formação de AMPc e promove a liberação de cálcio do sistema de túbulos densos (STOKOL, 2000; BOUDREAUX; CATALFAMO, 2010).



**Figura 1.** Reação plaquetária básica. Fonte: Stokol, T. (2000).

Diante de uma lesão, a liberação do FvW das células endoteliais facilita a ligação das plaquetas ao colágeno subendotelial (NIESWANDT; WATSON, 2003; GENTRY et al., 2008). A adesão das plaquetas a parede do vaso ocorre através da interação com receptores. O tipo de receptor e o ligante envolvido pode variar de modo que em condições de baixa velocidade de fluxo, as plaquetas aderem ao colágeno, laminina e fibronectina através de receptores integrinas; e em altas velocidades de fluxo, como as encontradas nas arteríolas e na microcirculação, requerem a participação de

FvW e GPIIb-IX-V (STOKOL, 2000). Ao aderir ao colágeno, as plaquetas ativam seus receptores, perdem sua forma discóide e emitem pseudópodos (GENTRY et al., 2008).

As principais integrinas envolvidas na adesão plaquetária e estabilização do tampão hemostático primário são as glicoproteínas GPIIb-IIIa,  $\alpha_2\beta_1$ , GPIIb-IX-V e GPVI (SHATTIL; NEWMAN, 2004). A GPVI e  $\alpha_2\beta_1$  são receptores específicos de colágeno importantes no processo de adesão plaquetária (SARRATT et al., 2005). A interação entre colágeno, FvW e GPIIb-IX-V é seguida pela ligação do colágeno ao receptor GPVI que ativa as integrinas  $\alpha_2\beta_1$  e GPIIb-IIIa, induz à liberação de ADP e formação de tromboxano. Essa ligação aumenta a afinidade entre o colágeno e o seu receptor e entre GPIIb-IIIa e seus ligantes fibrinogênio, FvW, fibronectina, vitronectina, e trombospondina (GENTRY et al., 2008). A ligação do colágeno ao seu receptor GPVI ativa a fosfolipase C, induzindo a formação de IP3 (inositol 1,4,5 trifosfato) e DAG (1,2 diacilglicerol). O IP3 contribui para a liberação de cálcio dos grânulos dentro do sistema de túbulos densos. O DAG e cálcio ativam uma proteína quinase C (PKC) e induzem mudança conformacional que resulta no aumento da afinidade entre o fibrinogênio e seu receptor, favorecendo a agregação plaquetária (GENTRY et al., 2008; BOUDREAUX; CATALFAMO, 2010). A fosfolipase  $A_2$  também é ativada produzindo ácido araquidônico, prostaglandinas e tromboxano, importante no recrutamento da plaquetas e secreção de grânulos. A consequência disso é a ativação, por mudança conformacional, dos receptores de fibrinogênio, que culminam na agregação plaquetária (STOKOL, 2000; SHATTIL; NEWMAN, 2004). A GPIIb-IIIa é importante no processo de agregação, secreção, desenvolvimento de atividades pró-coagulantes e retração do coágulo. Além do fibrinogênio, a GPIIb-IIIa pode ligar-se a compostos que tenham uma sequência RGD (arginina-glicina-aspartato) similar, tal como fator de von Willebrand, fibronectina, vitronectina e trombospondina (GENTRY et al., 2008).

A fosfolipase  $A_2$  é fosforilada durante a ativação plaquetária induzida por trombina, ADP e colágeno. A fosforilação associada ao aumento do cálcio intracelular leva a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas ( $PGG_2$  e  $PGH_2$ ) e tromboxano  $A_2$  (TXA). A síntese de tromboxano resulta em agregação plaquetária e liberação do conteúdo dos grânulos densos. As plaquetas de cães possuem receptores para tromboxano  $A_2$  (TXA). A ligação ao TXA contribui para a mudança na forma das plaquetas e ativação da fosfolipase C (BOUDREAUX; CATALFAMO, 2010).

A trombina resultante da expressão do fator tissular, assim como o ADP e o colágeno, atua como agonista plaquetário recrutando plaquetas adicionais para o

crescimento do tampão hemostático e ativando a GPIIb-IIIa (GENTRY et al., 2008). A trombina pode se ligar à GPIb-IX-V ou a proteínas G. A ligação da trombina à subunidade Ib $\alpha$  do complexo GPIb-IX-V resulta na ativação plaquetária através da indução da liberação de ADP e sinalização através de receptores de ADP. A trombina ligada a este complexo fica protegida da inativação pela antitrombina. A via do inositol trifosfato (IP3) é considerada importante para a agregação plaquetária e a ligação à proteína G é fundamental à ativação. A subunidade Ib $\alpha$  do complexo GPIb-IX-V é também um ligante para a P-selectina e FvW, os quais são translocados dos corpos de Weibel-Palade para a superfície endotelial em resposta a estímulos como o da trombina (BOUDREAUX; CATALFAMO, 2010).

### **3.4. Avaliação da hemostasia**

A hemostasia efetiva envolve respostas integradas por fatores de coagulação solúveis circulantes, plaquetas e parede vascular. A avaliação laboratorial mínima da hemostasia inclui contagem de plaquetas, tempo de sangramento, tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de protrombina. A necessidade de outros testes baseia-se nos resultados desses exames preliminares (BAKER, 2006).

As plaquetas são fundamentais na formação do tampão inicial que interrompe a perda sanguínea logo após a lesão vascular. Para exercer essa função, precisam estar em número suficiente e funcionalmente normais. A contagem plaquetária pode ser feita através de contadores automáticos ou métodos manuais. A estimativa em esfregaço sanguíneo também pode ser realizada. A faixa de variação normal em cães é de 200.000 a 500.000/ $\mu$ L. Diante da contagem de plaquetas normal, a avaliação do tempo de sangramento e a resposta plaquetária aos agonistas (*in vitro*) podem fornecer informações a respeito da função plaquetária (BAKER, 2006). Embora não haja definição precisa do grau a partir do qual a trombocitopenia prolongue o tempo de sangramento, acredita-se que isso ocorra com contagens abaixo de 70.000 a 100.000/ $\mu$ L (STOCKHAM; SCOTT, 2008b).

O tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) é um teste diagnóstico simples a ser incluído na avaliação de pacientes em que se suspeite de um defeito hemostático primário (FORSYTHE; WILLIS, 1989; BAKER, 2006), que consiste em uma incisão padrão feita na mucosa do lábio superior e na mensuração do tempo entre o momento da incisão e o fim do sangramento (JERGENS et al., 1987; BAKER, 2006). A

interrupção do sangramento reflete a formação do tampão hemostático que caracteriza a hemostasia primária. A carência de fatores da coagulação não impede que essa fase da hemostasia ocorra, embora o sangramento possa ser reiniciado uma vez que interferências na hemostasia secundária prejudicam o processo de estabilização do coágulo (BAKER, 2006). Em cães saudáveis, o TSMO é de 1,83 a 4,75 minutos (FORSYTHE; WILLIS, 1989), sendo que o teste realizado tanto em animais anestesiados quanto em não anestesiados não apresentou diferenças significativas em relação a este parâmetro (JERGENS et al., 1987). Além da trombocitopenia, a disfunção plaquetária, induzida por fármacos ou secundária a doenças, e doença de von Willebrand podem interferir no tempo de sangramento (GOPEGUI; FELDMAN, 2006a). Um histórico sobre fármacos utilizados ajuda a direcionar o diagnóstico (McCONNEL, 2000). A disfunção plaquetária congênita é rara, mas pode ser observada na doença de von Willebrand (COUTO, 2006; GOPEGUI; FELDMAN, 2006a), sendo associada com interferência na hemostasia primária em cães. O tempo de sangramento costuma ser usado como triagem para a doença de von Willebrand em raças pré-dispostas (ex. Doberman Pinscher). A dosagem do fator de von Willebrand (FvW:Ag) pode ser realizada pelo método de ELISA utilizando anticorpo espécie-específico. Os cães com sangramento devido a deficiência do FvW apresentam FvW:Ag abaixo de 35% (STOCKHAM; SCOTT, 2008b).

O número de plaquetas adequado, os testes de agregação em resposta a vários agonistas e testes de coagulação normais, junto com um aumento no TSMO são achados consistentes com o defeito hemostático primário (FRY, 2010). Os testes de agregação plaquetária são indicados quando existem defeitos na hemostasia primária ou aumento no TSMO, desde que outras causas, tais como trombocitopenia e deficiência de FvW, tenham sido excluídas. Devem ser realizados em até 4 horas após a coleta e requerem equipamentos especializados, razão pela qual não são utilizados na avaliação de rotina de pacientes veterinários. A habilidade de agregação e liberação do conteúdo de seus grânulos é testada em um agregômetro pela adição de diferentes substâncias agonistas (McCONNEL, 2000). A anormalidade vascular é considerada uma alteração incomum, o diagnóstico é difícil e requer biopsia incisional (BAKER, 2006).

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e o tempo de protrombina (TP) são utilizados na avaliação da hemostasia secundária e auxiliam no diagnóstico de deficiências de fatores de coagulação. O TTPa é sensível à deficiência dos fatores da via intrínseca (XII, XI, IX, VIII) e da via comum (fibrinogênio, II, V, X), enquanto o TP

identifica anormalidades na via extrínseca (VII) e na via comum da coagulação (McCONNEL, 2000). A atividade pró-coagulante específica dos fatores pode ser mensurada por ensaio de TP e TTPa com base no ponto final de formação do coágulo. Distúrbios hepáticos, deficiência de vitamina K e processos de coagulação intravascular disseminada (CID) podem interferir no resultado destes testes (GOPEGUI; FELDMAN, 2006b).

As concentrações de fibrinogênio e produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio (PDFs) podem fornecer informações adicionais a respeito da hemostasia (BAKER, 2006). O fibrinogênio é essencial para a função plaquetária, especialmente, para a agregação, podendo ser quantificado por meio da precipitação por calor ou pelo método de von Clauss que avalia o fibrinogênio funcional (GOPEGUI; FELDMAN, 2006a). O método de precipitação por calor não é sensível o suficiente para detectar redução na concentração de fibrinogênio, sendo mais adequado o uso de kits baseados no método de von Clauss, onde a velocidade de formação do coágulo após a adição de trombina ao plasma diluído é proporcional à concentração de fibrinogênio (McCONNEL, 2000). Deficiências hereditárias, insuficiência hepática e coagulação intravascular disseminada (CID) devem ser consideradas diante da redução nos valores de fibrinogênio (BROOKS, 2010). Estados inflamatórios agudos ou crônicos devem ser considerados em aumento dos valores de fibrinogênio.

Os PDFs encontram-se elevados diante do aumento da fibrinólise (CID) ou redução na sua depuração (insuficiência hepática), e podem inibir a agregação plaquetária (FRY, 2010). Diferentes kits comerciais de aglutinação em látex estão disponíveis para detecção de PDFs, a coleta pode ser realizada em tubos específicos ou em tubos contendo citrato de sódio. O kit que utiliza amostras de plasma citratado tem a vantagem de permitir que a avaliação da concentração dos PDFs e outros testes que avaliam a coagulação (TP, TTPa, fibrinogênio, FvW) sejam realizados a partir da coleta em um único tubo (STOKOL et al., 1999). Os PDFs inibem as funções da trombina e plaquetas competindo com o fibrinogênio por seu local de ligação (BAKER, 2006; STOCKHAM; SCOTT, 2008b).

A avaliação dos dímeros D é um teste mais sensível que os PDFs, que pode ser utilizado no diagnóstico de CID em cães. A fragmentação eritrocitária observada no esfregaço sanguíneo, a contagem plaquetária baixa, o aumento nos resultados de TP e TTPa e os baixos valores de fibrinogênio contribuem para o diagnóstico dessa condição. Os testes de coagulação de rotina são insensíveis na detecção de processo crônicos de

CID, visto que essa condição está associada a uma contínua, porém compensada ativação da coagulação (STOKOL, 2010).

### **3.5. Azotemia e uremia**

A azotemia refere-se ao aumento na concentração sanguínea de produtos nitrogenados não-protéicos, principalmente uréia e creatinina, podendo ser considerada pré-renal, renal ou pós-renal, dependendo da etiologia associada. A redução na perfusão dos rins leva à azotemia pré-renal, e a persistência desta condição, pode induzir lesão ao parênquima resultando em azotemia renal e insuficiência do órgão. Interferências à excreção urinária resultam em azotemia pós-renal. Os sinais clínicos secundários à alteração dos rins incluem manifestações extra-renais variáveis (Di BARTOLA, 2004), tais como anorexia, apatia, vômito, diarreia e hemorragia, entre outros, que caracterizam a uremia (POLZIN et al., 2004).

### **3.6. Hemostasia e uremia**

Um aumento no tempo de sangramento tem sido observado em indivíduos urêmicos (MOAL et al., 2003). A etiologia da alteração hemostática é complexa, e diferentes mecanismos têm sido propostos como causa do sangramento urêmico (JURK; KEHREL, 2007; SHEN; FRENKEL, 2007; GALBUSERA et al., 2009). O maior defeito encontrado nessa síndrome envolve a hemostasia primária (GALBUSERA et al., 2009), onde a interação entre plaquetas, e entre plaquetas e vasos sanguíneos é fundamental (STASSEN, 2004; GALBUSERA et al., 2009).

Anormalidades envolvendo glicoproteínas da membrana das plaquetas foram relacionadas com disfunção plaquetária (GAWAZ et al., 1994). A inibição da adesão ao subendotélio e a formação de agregados foram atribuídos a um fator plasmático (ZWAGINGA et al., 1991). Um aumento na concentração de fragmentos de fibrinogênio foi observado em cães urêmicos; embora não esteja claro se esse fato é devido à redução na excreção renal ou ao aumento da fibrinólise, sua ligação a GPIIb-IIIa bloqueia a interação dos receptores ao fibrinogênio normal (THEKKEDATH et al., 2006). Estudos envolvendo pacientes humanos com insuficiência renal crônica demonstraram que, além da presença de toxinas urêmicas que interferem na ligação do fibrinogênio ao seu receptor, a reduzida agregação plaquetária é parcialmente atribuída

a um defeito na ativação de GPIIb-IIIa (SREEDHARA et al., 1996; KOZEK-LANGENECKER et al., 1999; MOAL et al., 2003), enquanto a interação entre GPIb e FvW permanece inalterada (ESCOLAR et al., 1990). A diálise mostrou ser capaz de reduzir, mas não eliminar o risco de sangramento, o que sustenta a hipótese de que a alteração hemostática nesse pacientes é de origem multifatorial (REMUZZI et al., 1978).

Moal et al. (2003) observaram um aumento no período necessário para a resposta das plaquetas ao colágeno e correlacionaram com o aumento nos níveis de creatinina sérica em humanos. Uma correlação entre o tempo de sangramento e a creatinina plasmática foi estabelecida em pacientes com insuficiência renal (MEZZANO et al., 1997). Outros autores verificaram correlação significativa entre TSMO e concentração de uréia sérica em cães com insuficiência renal induzida (BRASSARD et al., 1994).

O baixo hematócrito tem sido considerado como principal fator determinante de sangramento em humanos urêmicos, embora não seja o único (LIVIO et al., 1982; FERNANDEZ et al., 1985; REMUZZI, 1988). Gawaz et al. (1994) observaram que a correção da anemia em pacientes urêmicos estava associada a um aumento na expressão do GPIIb-IIIa e melhora na função plaquetária, sugerindo uma relação entre a redução no hematócrito e a tendência ao sangramento (GAWAZ et al., 1994).

Em animais urêmicos, as alterações hemostáticas esperadas estão relacionadas à hemostasia primária, deste modo, a contagem plaquetária normal associada aos resultados normais nos testes de coagulação e de agregação dão ênfase a suspeita de uma disfunção plaquetária (FRY, 2010). De acordo com Mischke et al. (2004) não existem diferenças significativas nos testes de agregação plaquetária entre cães normais e urêmicos, e os valores de agregação máxima e concentrações de uréia ou creatinina não se correlacionaram. Em humanos urêmicos, Zwaginga et al. (1991) também verificaram que apesar dos defeitos na formação de agregados observados *in vivo*, não havia alteração nos testes com o agregômetro. Os altos níveis de FvW que foram observados na uremia parecem compensar o defeito de adesão (ZWAGINGA et al., 1990).

#### **4. ARTIGO**

Os resultados e discussão deste trabalho são apresentados na forma de artigo científico. O artigo foi formatado de acordo com as orientações da revista à qual será submetido.

## Alterações na hemostasia em cães azotêmicos<sup>1</sup>

F. V. C. Ventura<sup>2\*</sup>, F. O. Conrado<sup>2</sup>, N. R. C. Hlavac<sup>2</sup>, S. T. Oliveira<sup>3</sup>, C. R. S. Mattoso<sup>4</sup>, F. H. D. González<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Ventura F.V.C., Conrado F.O., Hlavac N.R.C., Oliveira S.T. & González F.H.D. 2011. [**Alterations of hemostasis in azotemic dogs**] Alterações na hemostasia em cães azotêmicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil. E-mail: [fernandavcv@terra.com.br](mailto:fernandavcv@terra.com.br)

Uremia is a systemic disorder that can lead to acquired platelet dysfunction. Normal platelet counts and normal coagulation tests, associated with increased bleeding time emphasize the suspicion of a qualitative platelet defect. The objective of this study was to verify the presence of abnormalities in primary hemostasis associated with azotemia in dogs, trying to establish a correlation between the results of hematological, biochemical tests, and assessment of hemostasis using the buccal mucosal bleeding time (BMBT) test. Forty azotemic dogs were analyzed, regardless of the presence of clinical symptoms. A moderate positive correlation was observed between BMBT and blood levels of urea and creatinine, and a negative and significant correlation with the hematocrit. Despite this association, the blood levels of urea and creatinine did not show to be good indicators of increased BMBT, and the result of hematocrit, alone, was not decisive for the occurrence of bleeding, although it has been determined that the bleeding tendency to increase as that anemia worsens.

**INDEX TERMS:** Bleeding time, azotemia, uremia, hemostasis, dogs.

**RESUMO.-** A uremia é uma desordem sistêmica que pode levar à disfunção plaquetária adquirida. A contagem de plaquetas e testes de coagulação normais, associados ao tempo de sangramento aumentado dão ênfase à suspeita de um defeito plaquetário qualitativo. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de anormalidades na hemostasia primária associada à azotemia em cães, buscando estabelecer uma relação entre os resultados de exames hematológicos, bioquímicos e a avaliação da hemostasia utilizando-se o teste de sangramento da mucosa oral (TSMO). Quarenta cães azotêmicos foram incluídos no estudo, independente da presença de sinais clínicos. Foi observada uma correlação moderada positiva entre o TSMO e os níveis sanguíneos de uréia e creatinina, e uma correlação negativa e significativa com o hematócrito. Apesar dessa associação, os níveis sanguíneos de uréia e creatinina não mostraram ser bons indicadores de aumento no TSMO, e o resultado do hematócrito, isoladamente, não foi determinante para a ocorrência de sangramento, ainda que se tenha constatado que a tendência ao sangramento aumente à medida que a anemia se agrava.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Tempo de sangramento, azotemia, uremia, hemostasia, cães.

### INTRODUÇÃO

O termo azotemia designa o aumento na concentração de compostos nitrogenados não-protéicos no sangue resultante da redução na taxa de filtração glomerular devido a alterações pré-renais, renais ou pós-renais (DiBartola 2004, Ware 2006). A determinação

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, CEP 90540-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [fernandavcv@terra.com.br](mailto:fernandavcv@terra.com.br)

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, PR, CEP 80035-050, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC, CEP 88520-000, Brasil.

laboratorial quantitativa dos níveis sanguíneos de uréia e creatinina é utilizada no diagnóstico desta condição e seus valores elevados sugerem prejuízos à excreção renal (Fettman & Rebar 2007). Na uremia o aumento nos níveis sanguíneos destes compostos é decorrente de insuficiência renal ou doença pós-renal e pode levar à manifestação de sinais clínicos referidos como síndrome urêmica (Ware 2006). Os principais sinais clínicos encontrados em cães afetados incluem depressão, fraqueza, anorexia, vômito e diarreia; o sangramento urêmico também pode estar presente e manifestar-se sob a forma de petéquias, equimoses, sangramento gastrointestinal, gengival e dos locais de venopunção (Cowgill & Elliott 2004). A uremia é reconhecida como uma causa de disfunção plaquetária adquirida em pessoas e animais (Fry 2010). A presença de sangramento associado ao número de plaquetas e fatores da coagulação normais sugere um defeito qualitativo adquirido das plaquetas como causa do sangramento (Brassard et al. 1994, Polzin et al. 2004). O prolongamento no teste do tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) em cães com insuficiência renal foi um achado consistente com o defeito de adesão plaquetária (Brassard et al. 1994, Fry 2010).

Nos humanos, a uremia é considerada a mais comum das desordens sistêmicas associada com disfunção plaquetária clinicamente importante (Boccardo et al. 2004). Um aumento na tendência ao sangramento tem sido associado com vários graus de insuficiência renal e com complicações cirúrgicas (Sohal et al. 2006), de modo que um perfil completo da coagulação é recomendado antes de qualquer procedimento invasivo nestes pacientes (Salman 2001). O teste do tempo de sangramento em humanos permite avaliar o risco de sangramento, e correlaciona-se melhor com as complicações que os índices de azotemia ou testes de agregação plaquetária *in vitro* (Steiner et al. 1979, Fernandez et al. 1985, Weigert & Schafer 1998). A anemia foi associada com o prolongamento no tempo de sangramento em pacientes humanos urêmicos (Livio et al. 1982, Fernandez et al. 1985, Weigert & Schafer 1998). Uma redução na expressão de receptores envolvidos no processo de agregação foi verificada em plaquetas de pacientes humanos urêmicos (Gawaz et al. 1994, Moal et al. 2003). Sreedhara et al. (1996) e Kozec-Langenecker et al. (1999) relacionaram os prejuízos na expressão do receptor plaquetário de fibrinogênio (GPIIb-IIIa) com aumento dos valores séricos de creatinina em humanos. Em estudo envolvendo oito cães com lesão renal induzida, Brassard et al. (1994) encontraram uma correlação positiva entre o tempo de sangramento e a determinação quantitativa da uréia sanguínea. A tendência ao sangramento associada à uremia não pode ser atribuída a deficiências no FvW, visto que níveis sanguíneos elevados deste fator tem sido observados em pacientes humanos com doença renal (Zwaginga et al. 1990).

Assim como em seres humanos, a possibilidade de hemorragia pode ser um fator limitante frente a procedimentos invasivos e cirúrgicos em cães. A etiologia multifatorial do sangramento urêmico e possíveis associações entre o sangramento e exames simples e de fácil acesso como o hemograma e as análises quantitativas séricas de creatinina e uréia incentivaram a busca por relações entre indicadores laboratoriais associados à azotemia e a presença de alterações hemostáticas em cães naturalmente afetados, bem como a identificação do teste que melhor se relaciona com a tendência ao sangramento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cães

Quarenta cães azotêmicos provenientes do atendimento no setor de clínica de pequenos animais do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foram submetidos à avaliação da hemostasia, independentemente dos sinais clínicos apresentados, mediante consentimento do médico veterinário responsável e do proprietário. Foi coletado sangue de 17 machos e 23 fêmeas com idade média de  $9,5 \pm 4,2$  anos, de diferentes raças, entre as quais SRD (n=17), Poodle (n=7), Cocker Spaniel (n=3), Pastor Alemão (n=2), Border Collie, Fox Terrier, Boxer, Airedale Terrier, Lhasa Apso, São Bernardo, Dálmata, Beagle, Rottweiler, Dogue Alemão e Spitz Alemão (n=1).

Os animais não haviam recebido qualquer fármaco reconhecido por interferir na hemostasia ou transfusão sanguínea nos trinta dias anteriores. O histórico de cada paciente foi obtido a fim de excluir possíveis doenças hemostáticas congênitas. Foram considerados azotêmicos os cães com valores séricos de uréia superiores a 60 mg/dL e/ou de creatinina maior que 2,0 mg/dL. A classificação da azotemia (pré-renal, renal, pós-renal) não foi considerada na seleção dos animais. Animais com contagem plaquetária abaixo de 100.000/ $\mu$ L não foram incluídos na pesquisa para evitar problemas hemorrágicos adicionais ao paciente e interferências nos resultados do TSMO. A avaliação hepática foi realizada através da dosagem das enzimas alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e de alguns compostos sintetizados pelo fígado (proteínas totais, albumina, uréia) devido a participação do órgão nos processos relacionados à hemostasia. O encaminhamento dos animais mortos para necropsia foi condicionado à aceitação do proprietário. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da UFRGS sob o protocolo número 19459.

### **Coleta de amostras**

Foi realizada venopunção da veia jugular para coleta de sangue através do método de coleta à vácuo. Foram utilizados tubos contendo EDTA-K<sub>2</sub>, tubos com ativador de coágulo e tubos contendo citrato de sódio 3,2% através de punção única. A amostra obtida em tubo com EDTA-K<sub>2</sub> foi utilizada para realização do eritrograma, contagem de plaquetas, análises bioquímicas de alanino aminotransferase (ALT), uréia e creatinina. O soro foi utilizado para determinação de fosfatase alcalina (FA), albumina e proteínas totais. O plasma citratado, separado em no máximo 20 minutos após a coleta, foi destinado à realização dos tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e protrombina (TP), dosagem de fibrinogênio, antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag) e produtos de degradação da fibrina (PDFs). As contagens de eritrócitos, plaquetas e determinação de hemoglobina foram realizadas em contador automático de células (ABX Micros ABC Vet, Horiba, São Paulo, Brasil). O valor do hematócrito foi obtido pela técnica do microhematócrito. A morfologia celular foi observada por microscopia óptica em lâminas coradas com panótico rápido. A determinação da atividade da ALT e FA e as concentrações de uréia, creatinina, proteínas totais (PT) e albumina foram realizadas através de espectrofotometria em um analisador semi-automático (Metrolab DR 1600, Buenos Aires, Argentina) usando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Para a determinação do TTPa foi utilizado o kit APTTest *ellágico* (Wiener, Rosário, Argentina), e para o TP, o kit Soluplastin (Wiener, Rosário, Argentina). A dosagem do fibrinogênio foi feita pelo método de formação do coágulo utilizando o kit HemoStat Fibrinogen (Human, Wiesbaden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. A análise de PDFs foi realizada por determinação semi-quantitativa por aglutinação de partículas em látex (FDP Plasma, Diagnostica Stago, New Jersey, USA), conforme as instruções do fabricante. Para a determinação dos PDFs e do FvW:Ag, uma alíquota de plasma citratado mantido a -20°C foi utilizada. A dosagem do FvW:Ag foi realizada pelo método de ELISA direto com anti-FvW canino (Sheep anti-canine VWF, Research Diagnostics Inc., Concord, MA). Para os demais testes, as amostras (plasma, plasma citratado ou soro) foram processadas logo após a separação. Todas as análises foram realizadas em duplicata. O tempo de sangramento da mucosa oral (TSMO) foi realizado através de uma incisão de 0,5 x 0,1 cm no lábio superior utilizando um dispositivo padronizado (Surgicut, ITC, New Jersey, USA), conforme técnica descrita por Marks (2000). O tempo de sangramento, em minutos, foi aferido com o auxílio de um cronômetro, se estendendo do momento da incisão inicial até a parada do sangramento, que corresponde ao tempo necessário para a formação do tampão plaquetário. Os resultados foram julgados com base nos valores de referência adotados (quadros 1 e 2) e validados em nosso laboratório para cães normais.

### **Análise estatística**

No que se refere à análise estatística, as variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas pela média e o desvio padrão, e aquelas com distribuição assimétrica pela

mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75). As variáveis quantitativas foram associadas entre si pelo coeficiente de correlação de Spearman, e foi realizada uma análise de Regressão Linear Múltipla para ajuste para potenciais fatores de confusão na relação entre uréia e TSMO e entre creatinina e TSMO. Para esta regressão, a variável TSMO sofreu uma transformação logarítmica, devido a sua assimetria. As variáveis albumina, PT, ALT, FA, PDFs, TP e TTPa foram classificadas em categorias com base nos seus valores de referência. Para avaliar a associação das variáveis categóricas ALT e FA com o TSMO foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e para as demais variáveis o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram analisados no programa SPSS v.17.0.

## RESULTADOS

Dos 40 cães azotêmicos incluídos nessa pesquisa, 36 (90%) apresentavam sinais clínicos de uremia, sendo anorexia e vômito os mais comuns; no momento da coleta nenhum cão apresentava sangramento espontâneo. Os valores médios e desvios padrão das variáveis com distribuição simétrica, e os valores de mediana e intervalo interquartil das variáveis com distribuição assimétrica obtidos são mostrados nos quadros 1 e 2, respectivamente.

O aumento do TSMO foi observado em 35% dos cães (14/40); destes, 92,86% (13/14) estavam anêmicos. Em 25% (10/40) dos animais não se observou aumento do TSMO, apesar de estarem anêmicos. Quarenta por cento dos cães (16/40) não apresentaram anemia ou aumento do TSMO. Considerando somente os cães com valor de hematócrito abaixo de 37%, 56,52% (13/23) apresentavam TSMO prolongado. Entre os animais coletados, cinco apresentaram contagem plaquetária entre 100.000 e 200.000/ $\mu$ L, sendo que destes apenas um apresentou aumento do TSMO.

Dos animais incluídos neste estudo, 45% (18/40) vieram a óbito por causas naturais, outros 12,5% (5/40) foram eutanasiados. A ocorrência de morte observada foi de 57,14% (8/14) nos cães com TSMO aumentado, e 57,69% (15/26) nos cães com TSMO normal. A necropsia foi realizada em 43,48% (10/23) dos animais; destes, 90% (9/10) apresentavam insuficiência renal crônica e em 10% (1/10) a azotemia ocorreu como consequência de insuficiência cardíaca grave. Entre os animais não necropsiados (13/23), um cão morreu em consequência de obstrução do trato urinário por urólito e ruptura vesical subsequente, dez eram suspeitos de insuficiência renal crônica e dois não tiveram diagnóstico definido. Entre os animais que estavam vivos até o final da coleta dos dados (17/40), 11 eram insuficientes renais crônicos, sendo cinco com TSMO aumentado; quatro cães eram suspeitos de leptospirose, sendo que apenas um tinha TSMO aumentado; uma cadela apresentava insuficiência renal aguda devido à piometra e um cão apresentava azotemia pós-renal aguda secundária a ruptura vesical, ambos com TSMO normal. O diagnóstico de insuficiência renal foi baseado na anamnese, achados clínicos e laboratoriais; em algumas ocasiões o exame ultra-sonográfico foi realizado.

No presente estudo valores aumentados de ALT e FA foram encontrados em 27,5% (11/40) e 47,5% (19/40) dos animais, respectivamente. No entanto, não houve diferença estatística na distribuição de valores de TSMO entre as categorias de FA ( $P= 0,361$ ) e ALT ( $P= 0,788$ ). Na análise dos PDFs, 27,5% (11/40) das amostras apresentaram algum grau de aglutinação. Os resultados de TTPa acima dos valores de referência foram observados em 15% (6/40) dos animais. Valores reduzidos de albumina ocorreram em 65% dos pacientes. Em relação ao TSMO, tanto nos animais com valor normal quanto aumentado, os resultados de PDFs ( $P= 0,462$ ), TTPa ( $P= 0,706$ ), valores de albumina ( $P= 0,556$ ) e proteínas totais ( $P= 0,442$ ), não mostraram diferenças estatísticas significativas. Um prolongamento no TP foi observado em apenas 2,5% (1/40) dos pacientes, não sendo possível estabelecer associações para essa variável. Esses dados demonstraram que os resultados das análises de ALT, FA, albumina, proteínas totais, TTPa, TP e PDF não contribuíram para o aumento no TSMO dos cães deste estudo.

Um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio foi observado em 20% (8/40) dos animais. No que se refere à determinação do FvW:Ag, 54,28% das amostras apresentaram valores elevados e 34,29% resultaram em valores situados dentro da faixa de variação considerada normal. Valores de FvW:Ag classificados como suspeitos para a doença de von Willebrand (resultados entre 50% e 70%) ocorreram em 8,57% das amostras sem que houvesse aumento concomitante no resultado do TSMO dos respectivos cães. Em 2,86% das amostras foi encontrado resultado de FvW:Ag de 35,49%, a amostra analisada era de um cão não anêmico cujo valor de TSMO estava aumentado, considerado portador para a doença de von Willebrand.

Não houve correlação significativa entre hematócrito e uréia ( $r_s = -0,28$ ;  $P = 0,076$ ), fibrinogênio e TSMO ( $r_s = -0,25$ ;  $P = 0,126$ ), plaquetas e TSMO ( $r_s = -0,16$ ;  $P = 0,322$ ), e FvW:Ag e TSMO ( $r_s = -0,11$ ;  $P = 0,533$ ). Foi observada correlação estatisticamente significativa entre creatinina e TSMO ( $r_s = 0,38$ ;  $P = 0,017$ ), hematócrito e o TSMO ( $r_s = -0,47$ ;  $P = 0,002$ ), uréia e TSMO ( $r_s = 0,34$ ;  $P = 0,032$ ) e hematócrito e creatinina ( $r_s = -0,36$ ;  $P = 0,022$ ) (Fig. 1). Considerando o hematócrito um potencial fator de confusão para a relação entre uréia e TSMO, e creatinina e TSMO, foi feita uma análise de Regressão Linear. Para essa análise, e considerando o TSMO como variável dependente (a sua transformação logarítmica) e creatinina e hematócrito, como independentes, a única variável que se associou com o TSMO foi o hematócrito ( $P = 0,002$ ), não havendo associação entre creatinina e TSMO quando feito o ajuste para esta variável ( $P = 0,154$ ). Quando foi realizada a regressão linear múltipla com uréia e hematócrito como variáveis independentes, o hematócrito continuou sendo a única variável associada ao aumento no TSMO ( $P = 0,001$ ) não havendo relação entre uréia e TSMO quando ajustada para esta variável ( $P = 0,192$ ).

## DISCUSSÃO

O teste do tempo de sangramento foi considerado bom preditor de sangramento clínico em pacientes humanos urêmicos (Steiner et al. 1979), sendo também utilizado para verificar a função plaquetária em pacientes veterinários sob a mesma condição (Baker 2007). Um estudo desenvolvido com o propósito de avaliar o TSMO em cães com diferentes afecções verificou a ocorrência de aumento no tempo de sangramento em 83,3% (5/6) dos animais azotêmicos e vinculou essa alteração aos níveis elevados de creatinina sérica (Jergens et al. 1987). Estudos de prevalência de sangramento urêmico em cães não foram encontrados. No presente estudo observou-se aumento no TSMO em apenas 35% dos pacientes estudados, sem relação direta entre esse aumento e as concentrações plasmáticas de uréia ou creatinina. A discrepância no percentual relacionado ao aumento no TSMO entre os dois estudos pode ser devido à diferença no número de animais urêmicos avaliados.

Brassard et al. (1994) induziram insuficiência renal em cães e verificaram a ocorrência de prolongamento no tempo de sangramento em presença de resultados normais nos testes de coagulação (TP e TTPa), provas de agregação e contagem plaquetária, similar ao que é visto em pacientes humanos urêmicos e compatível com alterações na hemostasia primária. Através desse estudo, observaram uma correlação positiva entre o TSMO e os valores de uréia, sugerindo que as alterações na hemostasia primária observadas nesses animais estariam relacionadas ao acúmulo de uréia ou outras toxinas urêmicas; associações entre o TSMO e os níveis de creatinina e o TSMO e o hematócrito não foram encontradas. Por outro lado, Ho et al. (2008) observaram pobre correlação do tempo de sangramento com a creatinina e nenhuma com a uréia dosada em pacientes humanos, concluindo que o sangramento não poderia ser previsto pelos níveis sanguíneos desses metabólitos.

Outros autores relacionaram a severidade da anemia com o prolongamento no tempo de sangramento em pacientes humanos urêmicos (Livio et al. 1982, Fernandez et al. 1985). Ao excluir de seu estudo indivíduos trombocitopênicos, Fernandez et al. (1985) verificaram que aumento no tempo de sangramento relacionado ao hematócrito poderia ocorrer independente do número de plaquetas, situação semelhante à observada neste

estudo. Gordge et al. (1988) avaliaram o tempo de sangramento e a função plaquetária e observaram um aumento no tempo de sangramento em pessoas com insuficiência renal crônica, sem alteração nos testes funcionais plaquetários; ainda de acordo com esses autores o único índice que se correlacionou com o sangramento foi o hematócrito. Embora os testes de função plaquetária não tenham sido realizados no presente estudo, foi encontrado um resultado similar no que se refere à interferência do hematócrito sobre a tendência ao sangramento. No entanto, deve-se considerar que a anemia pode ser tanto causa do sangramento (Fernandez et al. 1982) quanto a consequência da própria insuficiência renal (Ware 2006). A deficiência de eritropoetina observada em doenças renais crônicas leva à anemia. A associação entre o baixo hematócrito e o aumento no sangramento deve-se ao fato de que os eritrócitos circulantes deslocam as plaquetas aproximando-as da parede dos vasos sanguíneos e facilitando seu contato com o endotélio (Turitto & Weiss 1980). O uso da eritropoetina tem contribuído para aumentar o hematócrito e reduzir o tempo de sangramento em pacientes humanos urêmicos (Moia et al. 1987, Viganò et al. 1991), seu efeito sobre os receptores plaquetários GPIIb/IIIa envolvidos na hemostasia primária levam a diminuição do tempo de sangramento (Cases et al. 1992) Apesar da correlação evidenciada entre TSMO e hematócrito, e embora a maioria dos animais com aumento no tempo de sangramento fossem anêmicos, nem todos os que apresentaram baixo valor de hematócrito tiveram aumento no TSMO.

A diminuição do fator de von Willebrand poderia contribuir para o aumento na tendência ao sangramento (Stockham & Scott 2008), porém, não houve correlação entre FvW:Ag e TSMO. Os resultados obtidos no presente trabalho permitem excluir a presença da doença associada ao aumento no TSMO. O predomínio de valores normais a aumentados frente ao TSMO prolongado e resultados na faixa de suspeita para a doença que ocorreram associados a resultados normais de TSMO sustentam a ausência de tal doença. Os pacientes estudados não apresentavam histórico que fundamentasse a suspeita da forma congênita dessa doença, apesar disso, um cão apresentou valor de FvW:Ag compatível com o estado portador da deficiência desse fator, esse animal foi o único que apresentou aumento no TSMO sem redução concomitante do hematócrito. O aumento no TSMO não foi associado aos testes que avaliam a hemostasia secundária e terciária, tais como TP, TTPa e PDFs, o que era esperado, já que a interferência que ocorre na uremia é com a hemostasia primária (Fry 2010).

Os resultados encontrados na presente pesquisa indicaram uma associação estatisticamente significativa entre o TSMO e o hematócrito, e entre o TSMO e a concentração de uréia e creatinina, porém, os resultados mostraram uma melhor correlação entre o aumento no sangramento e o hematócrito. O aumento no tempo de sangramento foi observado em 56,52% (13/23) dos animais com valor de hematócrito abaixo de 37%, apesar de 92,85% (13/14) dos cães com hematócrito baixo apresentarem aumento no TSMO.

### CONCLUSÕES

Através dessa pesquisa, conclui-se que os valores de uréia e creatinina não podem ser utilizados como preditivos de sangramento em cães azotêmicos. Embora a análise dos dados tenha indicado uma correlação moderada entre esses valores e o TSMO, estes indicadores de azotemia perderam poder de correlação quando ajustado para o hematócrito. O hematócrito foi o teste que melhor se relacionou com o aumento no tempo de sangramento. Apesar da ocorrência de anemia não estar obrigatoriamente vinculada ao aumento no TSMO, a associação estabelecida demonstrou que quanto mais baixos os valores de hematócrito, maiores as chances de sangramento, independente dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina.

**Agradecimentos.-** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado.

### REFERÊNCIAS

Baker D.C. 2007. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos, p.170-187. In: Thrall M.A. (Ed.), Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca, São Paulo.

- Boccardo P., Remuzzi G. & Galbusera M. 2004. Platelet dysfunction in renal failure. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 30:579-589.
- Brassard J.A., Meyers K.M., Person M. & Dhein C.R. 1994. Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model of uremic bleeding. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 124:48-54.
- Cases A., Escolar G., Reverter J.C., Ordinas A., Lopez-Pedret J., Revert L. & Castillo R. 1992. Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney International*. 42:668-672.
- Cowgill L.D. & Elliott D.A. 2004. Insuficiência renal aguda, p. 1701-1721. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Vol. 2. 5<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- DiBartola S.P. 2004. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal, p. 1686-1701. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Vol. 2. 5<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Fernandez F., Goudable C., Sie P., Ton-That H., Durand D., Suc J.M. & Boneu B. 1985. Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. *British Journal of Haematology*. 59:139-148.
- Fettman M.J. & Rebar A. 2007. Avaliação laboratorial da função renal, p. 285-310. In: Thrall M.A. (Ed.), *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo.
- Forsythe L.T. & Willis S.E. 1989. Evaluation oral mucosa bleeding times in healthy dogs using a spring-loaded device. *Canadian Veterinary Journal*. 30:344-345.
- French T.W., Blue J.T. & Stokol T. *Clinical Pathology Modules*. Cornell University. Disponível em: <<http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/index.htm>>. Acessado em: 23 jan de 2011.
- Fry M.M. 2010. Acquired platelet dysfunction, p. 626-631. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology*. 6<sup>th</sup> ed. Willey-Blackwell, USA.
- Galbusera M., Remuzzi G. & Boccardo P. 2009. Treatment of bleeding in dialysis patients. *Seminars in Dialysis*. 22:279-286.
- Gawaz M.P., Dobos G., Späth M., Scholimeyer P., Gurland H.J. & Mujais S.K. 1994. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. *Journal of the American Society Nephrology*. 5:36-46.
- Gordge M.P., Faint R.W., Rylance P.B. & Neild G.H. 1988. Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 60:83-87.
- Ho S., Gemmell R. & Brighton T.A. 2008. Platelet function testing in uraemic patients. *Hematology*. 13:49-58.
- Jergens A.E., Turrentine M.A., Kraus K.H. & Johnson G.S. 1987. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. *American Journal of Veterinary Research*. 48:1337-1342.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L (Eds). 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed. Academic Press, San Diego, 932p.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L (Eds). 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. 932p.
- Kozec-Langenecker S.A., Masaki T., Mohammad H., Green W., Mahammad S.F. & Cheung A.K. 1999. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. *Kidney International*. 56:299-305.
- Livio M., Marchesi D., Remuzzi G., Gotti E. Mecca G. & De Caetano G. 1982. Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet*. 320:1013-1015.
- Marks S.L. 2000. The buccal mucosal bleeding time. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 36:289-290.

- Mezzano D., Tagle R., Pais E., Panes O., Pérez M., Downey P., Muñoz B., Aranda E., Barja P., Thambo S., González F., Mezzano S. & Pereira J. 1997. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. *Thrombosis Research* 88:465-472.
- Moal V., Brunet P., Dou L., Morange S., Sampol J. & Berland Y. 2003. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 18:1834-1841.
- Moia M., Mannucci P.M. & Vizzotto L. 1987. Improvement in the haemostatic defect of uremia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet*. 2:1227-1229.
- Noris M. & Remuzzi G. 1999. Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood*. 94:2569-2574.
- Polzin D.J., Osborne C.A., Jacob F. & Ross S. 2004. Insuficiência renal crônica, p. 1721-1751. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. Vol. 2, 5<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rizzi T.E., Meinkoth J.H. & Clinkenbeard K.D. 2010. Normal hematology of the dog, p.799-810. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology*. 6<sup>th</sup> ed. Willey-Blackwell, USA.
- Salman S. 2001. Uremic bleeding: pathophysiology, diagnosis, and management. *Hospital Physician*. 37(5):45-50. Disponível em: <[http://www.turner-white.com/pdf/hp\\_may01\\_uremic.pdf](http://www.turner-white.com/pdf/hp_may01_uremic.pdf)>. Acessado em: 20 abr de 2010.
- Sohal A.S., Gangji A.S., Crowther M.A. & Treleaven D. 2006. Uremic bleeding: pathophysiology and clinical risk factors. *Thrombosis Research*. 118:417-422.
- Sreedhara R., Itagaki I., Hakim R.M. 1996. Uremic patients have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *American Journal of Kidney Diseases*. 27:355-364.
- Steiner R.W., Coggins C. & Carvalho A.C.A. 1979. Bleeding time in uremia: a useful test to assess clinical bleeding. *American Journal of Hematology*. 7:107-117.
- Stockham S.L. & SCOTT M.A. 2008. Hemostasis, p. 259-321. In: *Ibid.* (Eds), *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2<sup>a</sup> ed. Blackwell, USA.
- Stokol T., Parry B.W. & Mansell P.D. 1995. Von Willebrand's disease in Scottish Terriers in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 72:404-407.
- Turitto V.T. & Weiss H.J. 1980. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science*. 207:541-543.
- Viganò G., Benigni A., Mendogni D., Mingardi G., Mecca G. & Remuzzi G. 1991. Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding. *American Journal of Kidney Diseases*. 18:44-49.
- Zwaginga J.J., Ljsseldijk M.J.W., Beeser-Visser N., De Groot P.G., Vos J. & Sixma J.J. 1990. High von Willebrand factor concentration compensates a relative adhesion defect in uremic blood. *Blood*. 75:1498-1508.
- Ware W.A. 2006. Manifestações clínicas das doenças do trato urinário, p. 547-561. In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds), *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 3<sup>a</sup> ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Weigert A.L. & Schafer A.I. 1998. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. *American Journal of the Medical Sciences*. 316:94-104.

**Quadro 1. Média e desvio padrão, valor mínimo e máximo das variáveis com distribuição simétrica em cães azotêmicos**

| Variáveis                           | Média e desvio padrão | Valores mínimos | Valores máximos | Valores de referência        |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL) | 5,21 ± 1,63           | 1,79            | 8,76            | 5,50 - 8,50 <sup>a</sup>     |
| Hemoglobina (g/dL)                  | 11,76 ± 3,67          | 4,50            | 21,80           | 12,00 - 18,00 <sup>a</sup>   |
| Hematócrito (%)                     | 36,25 ± 10,70         | 13,00           | 65,00           | 37,00 - 55,00 <sup>a</sup>   |
| VCM (fL)                            | 70,34 ± 5,69          | 54,64           | 85,18           | 60,00 - 77,00 <sup>a</sup>   |
| CHCM (%)                            | 32,32 ± 1,22          | 30,00           | 35,51           | 32,00 - 36,00 <sup>a</sup>   |
| Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)   | 378,85 ± 188,13       | 101             | 877             | 200,00 - 500,00 <sup>a</sup> |
| TP (seg)                            | 6,34 ± 1,29           | 5,00            | 12,25           | < 10,00 <sup>b</sup>         |
| TTPa (seg)                          | 17,50 ± 3,36          | 11,53           | 28,00           | 15,00 - 20,00 <sup>b</sup>   |
| Fibrinogênio (mg/dL)                | 350,47 ± 180,27       | 136,00          | 953,28          | 100,00 - 500,00 <sup>c</sup> |
| Uréia (mg/dL)                       | 300,92 ± 154,75       | 94,43           | 661,20          | 21,00 - 60,00 <sup>d</sup>   |
| Creatinina (mg/dL)                  | 6,24 ± 4,07           | 2,05            | 18,01           | 0,50 - 1,50 <sup>e</sup>     |
| Proteína total (g/L)                | 65,52 ± 12,87         | 46,45           | 92,49           | 54,00 - 71,00 <sup>e</sup>   |
| Albumina (g/L)                      | 23,00 ± 5,60          | 14,51           | 36,20           | 26,00 - 33,00 <sup>e</sup>   |

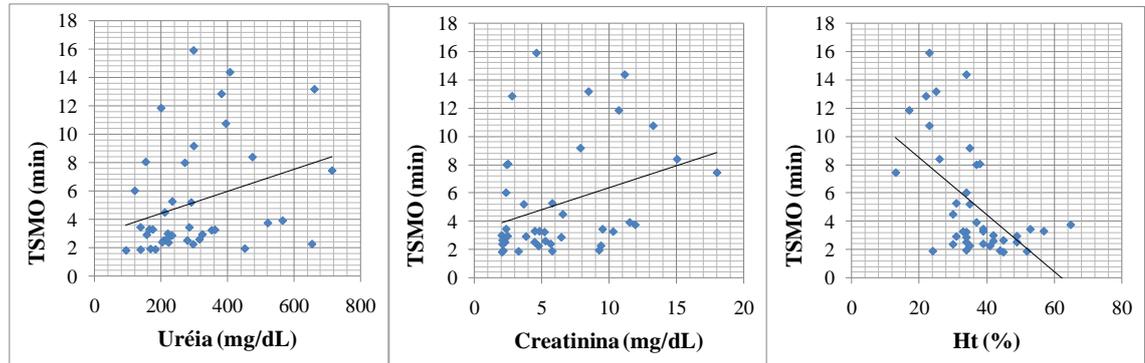
Fonte: <sup>a</sup> Rizzi et al., 2010; <sup>b</sup> French et al. (Cornell University); <sup>c</sup> Baker, 2007; <sup>d</sup> Kaneko et al., 1997; <sup>e</sup> Kaneko et al., 2008

**Quadro 2. Mediana e intervalo interquartil, valor mínimo e máximo das variáveis com distribuição assimétrica em cães azotêmicos**

| Variáveis   | Mediana | Intervalo interquartil |        | Valor mínimo | Valor máximo | Valores de referência       |
|-------------|---------|------------------------|--------|--------------|--------------|-----------------------------|
|             |         | 25                     | 75     |              |              |                             |
| TSMO (min)  | 3,28    | 2,50                   | 7,83   | 1,85         | 15,88        | 1,83 - 4,75 <sup>a</sup>    |
| FvW: Ag (%) | 187,95  | 100,40                 | 289,67 | 35,49        | 648,6        | 70,00 - 180,00 <sup>b</sup> |
| ALT (U/L)   | 57,31   | 32,29                  | 106,10 | 10,48        | 849,87       | 21,00 - 102,00 <sup>c</sup> |
| FA (U/L)    | 142,96  | 82,73                  | 398,15 | 16           | 3475,56      | 20,00 - 156,00 <sup>c</sup> |

Fonte: <sup>a</sup> Forsythe e Willis, 1989; <sup>b</sup> Stokol et al., 1995; <sup>c</sup> Kaneko et al., 2008

**Fig 1. Correlação de Spearman entre TSMO e as variáveis uréia, creatinina e hematócrito.**



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenha sido constatada uma correlação entre o aumento no tempo de sangramento da mucosa oral e o resultado de alguns testes laboratoriais em cães azotêmicos, não é possível prever a tendência à perda sanguínea a partir da análise destes resultados. O hematócrito foi a variável que apresentou melhor associação com a tendência ao sangramento, apesar do aumento no TSMO nem sempre ocorrer em animais anêmicos. Nesse estudo, os cães não foram reavaliados após a instituição da fluidoterapia, no entanto, os dados obtidos chamaram atenção para a possibilidade da anemia decorrente da insuficiência renal ser exacerbada pela hemodiluição causada pelo tratamento de suporte da doença, contribuindo para uma redução ainda maior do hematócrito e aumentando as chances de sangramento.

## REFERÊNCIAS

- BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL M. A. (Ed.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 14, p. 170-187.
- BECKER, B. F. et al. Endothelial function and hemostasis. **Clinical Research in Cardiology** [abstract]. v. 89, n. 3, p. 160-167, 2000.
- BOCCARDO, P.; REMUZZI, G.; GALBUSERA, M. Platelet dysfunction in renal failure. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 30, p. 579-589, 2004.
- BOUDREAUX, M. K. Platelet structure. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Cap. 75, p. 561-568.
- BOUDREAUX, M. K.; CATALFAMO, J. L. Platelet biochemistry, signal transduction, and function. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Cap. 76, p.569-575.
- BRASSARD, J. A. et al. Experimentally induced renal failure in the dog as an animal model of uremic bleeding. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v.124, n. 1, p. 48-54, 1994.
- BROOKS, M. B. Hereditary coagulopathies. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Cap. 86, p. 661-667.
- CASES, A. et al. Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. **Kidney International**. v. 42, p. 668-672, 1992.
- CINES, D. B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, p. 3527-3561, 1998.
- COUTO, C. G. Distúrbios da hemostasia. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G (Eds). **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 89, p. 1149-1164.
- COWGILL, L. D.; ELLIOTT, D. A. Insuficiência Renal Aguda. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 168, p. 1701-1721.
- DiBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 167, p. 1686-1701.

- ESCOLAR, G. et al. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. **Blood**. v. 76, n. 7, p. 1336-1340, 1990.
- FERNANDEZ, F. et al. Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. **British Journal of Haematology**. v. 59, n. 1, p. 139-148, 1985.
- FETTMAN, M. J.; REBAR, A. Avaliação laboratorial da função renal. In: THRALL, M. A. (Ed). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 21, p. 285-310.
- FORSYTHE, L. T.; WILLIS, S. E. Evaluating oral mucosa bleeding times in healthy dogs using a spring-loaded device. **Canadian Veterinary Journal**. v. 30, p. 344-345, 1989.
- FRY, M. M. 2010. Acquired Platelet Dysfunction. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Cap. 83, p. 626-631.
- GALBUSERA, M.; REMUZZI, G.; BOCCARDO, P. Treatment of bleeding in dialysis patients. **Seminars in Dialysis**. v. 22, n. 3, p. 279-286, 2009.
- GAWAZ, M. P. et al. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 5, n.1, p. 36-46, 1994.
- GENTRY, P.; BURGESS, H.; WOOD, D. Hemostasis. In: KANECO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2008. Chap. 10, p. 287-330.
- GOPEGUI, R. R.; FELDMAN, B. F. Plaquetas e doença de von Willebrand. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.) **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. v. 2, cap. 179, p. 1915-1927.
- GOPEGUI, R. R.; FELDMAN, B. F. Coagulopatias e trombose. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.) **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b . v.2, cap. 180, p. 1927-1941.
- GORDGE, M. P. et al. Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 60, n. 1, p. 83-87, 1988.
- HO, S.; GEMMELL, R.; BRIGHTON, T. A. Platelet function testing in uraemic patients. **Hematology**. v. 13, n. 1, p. 49-58, 2008.
- JERGENS, A. E. et al. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. **American Journal of Veterinary Research**. v. 48, n.9, p. 1337-1342, 1987.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Inherited and acquired disorders of platelet function. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. v. 34, p. 6-19, 2007.

KOZEC-LANGENECKER, S. A. et al. Fibrinogen fragments and platelet dysfunction in uremia. **Kidney international**. v. 56, p. 299-305, 1999.

LASNE, D.; JUDE, B.; SUSEN, S. From normal to pathological hemostasis. **Canadian Journal of Anesthesia**. v. 53, n. 6, p. S2-S11, 2006.

LIVIO, M. et al. Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. **The Lancet**. v. 320, n. 8306, p. 1013-1015, 1982.

McCONNEL, M. F. Overview of haemostasis. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J (Eds). **Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. UK: British Small Animal Veterinary Association, 2000. Chap. 9, p. 165-171.

MEZZANO, D. et al. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. **Thrombosis Research**. v. 88, p. 465-472, 1997.

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

MOAL, V. et al. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 18, n. 9, p. 1834-1841, 2003.

NIESWANDT, B.; WATSON, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? **Blood**. v. 102, n.2, p. 449-461, 2003.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? **Blood**. v. 94, n. 8, p. 2569-2574, 1999.

POLZIN, D. J. et al. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária. doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 169p. 1721-1751.

REMUZZI, G. et al. Bleeding in renal failure: altered platelet function in chronic uraemia only partially corrected by haemodialysis. **Nephron**. v. 22, p. 347-353, 1978.

REMUZZI, G. Bleeding in renal failure. **The Lancet**. v. 331, n. 8596, p. 1205-1208, 1988.

RUGGERI, Z. M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 1, p. 1335-1342, 2003.

SALMAN, S. [2001]. Uremic bleeding: pathophysiology, diagnosis, and management. **Hospital Physician**, v. 37, n. 5, p. 45-50, 2001. Disponível em: <[http://www.turner-white.com/pdf/hp\\_may01\\_uremic.pdf](http://www.turner-white.com/pdf/hp_may01_uremic.pdf)>. Acesso em 20 abr. 2010.

SARRAT, K. L. et al. GPVI and  $\alpha 2\beta 1$  play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. **Blood**. v. 106, p. 1268-1277, 2005.

SHATTIL, S. J.; NEWMAN, P. J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. **Blood**. v. 104, p. 1606-1615, 2004.

SHEN, Y. P.; FRENKEL, E. P. Acquired platelet dysfunction. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. v.21, p. 647-661, 2007.

SMITH, S. A. Overview of hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Chap. 84, p. 635-653.

SOHAL, A. S. et al. Uremic bleeding: pathophysiology and clinical risk factors. **Thrombosis Research**. v. 118, p. 417-422, 2006.

SREEDHARA, R.; ITAGAKI, I.; HAKIM, R. M. Uremic patients have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 27, n. 3, p. 355-364, 1996.

STASSEN, J. M.; ARNOUT, J.; DECKMYN, H. The hemostatic system. **Current Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 17, p. 2245-2260, 2004.

STEINER, R. W.; COGGINS, C.; CARVALHO, A. C. A. Bleeding time in uremia: a useful test to assess clinical bleeding. **American Journal of Hematology**. v. 7, p. 107-117, 1979.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Platelets. In:\_\_\_\_\_. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2. ed. USA: Blackwell, 2008a. Chapter 4, p. 224-257.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Hemostasis. In:\_\_\_\_\_. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2. ed. USA: Blackwell, 2008b. Chapter 5, p. 259-321.

STOKOL, T. von Willebrand's Disease. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J (Eds). **Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester: UK, 2000. Chapter 14, p. 229-236.

STOKOL, T. et al. Evaluation of kits for the detection of fibrin(ogen) degradation products in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 13, p. 478-484, 1999.

STOKOL, T. Disseminated Intravascular Coagulation. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. USA: Willey-Blackwell, 2010. Chap. 88, p. 679-688.

THEKKEDATH, U. R. et al. Elevated fibrinogen fragments levels in uremic plasma inhibit platelet function and expression of glycoprotein IIb-IIIa. **American Journal of Hematology**. v. 81, p. 915-926, 2006.

TURITTO, V. T; WEISS, H. J. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. **Science**. v. 207, p. 541-543, 1980.

VIGANÒ, G. et al. Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 18, n. 1 p. 44-49, 1991.

WARE, W. A. Manifestações clínicas das doenças do trato urinário. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G (Eds). **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap.41, p. 547-561.

WEIGERT, A. L.; SCHAFER, A. I. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 316, n. 2, p. 94-104, 1998.

ZWAGINGA, J. J. et al. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorder can be attributed to factors in plasma. **Arteriosclerosis and thrombosis**. v. 11, n. 3, p. 733-744, 1991.

ZWAGINGA, J. J. et al. High von Willebrand factor concentration compensates a relative adhesion defect in uremic blood. **Blood**. v. 75, p. 1498-1507, 1990.