

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Mariah Gois Ceregatti

**PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES PORTADORES DE NEOPLASIA
MAMÁRIA MALIGNA**

Belo Horizonte
2022

Mariah Gois Ceregatti

**PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES PORTADORES DE NEOPLASIA
MAMÁRIA MALIGNA**

Dissertação apresentada no Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Fabiola de Oliveira Paes Leme

Co-orientadoras: Prof. Dra. Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho
Prof. Dra. Ana Paula Lucas Mota

Belo Horizonte
2022

C414p Ceregatti, Mariah Gois, 1990-
Perfil hemostático de cães portadores de neoplasia mamária maligna / Mariah Gois Ceregatti
-2022.
80f.: il.

Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme
Coorientadoras: Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Ana Paula Lucas Mota

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.
Bibliografias: f. 16 a 33.

1. Cão - Doenças - Teses - 2. Tumores em animais - Teses - 3. Mamas - Tumores - Teses - I. Leme, Fabiola de Oliveira Paes - II. Costa Val, Adriane Pimenta da - III. Mota, Ana Paula Lucas - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - MARIAH GOIS CEREGATTI

Às 08:30 horas do dia 24 de fevereiro de 2022, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES PORTADORES DE NEOPLASIA MAMÁRIA MALIGNA”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinária**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Fabiola de Oliveira Paes Leme**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Fabiola de Oliveira Paes Leme	x	
Claudio Roberto Scabelo Mattoso	x	
Gleidice Eunice Lavalle	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	x	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme**, Professora do Magistério Superior, em 24/02/2022, às 12:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleidice Eunice Lavalle**, Médica Veterinária, em 24/02/2022, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Roberto Scabelo Mattoso**, Usuário Externo, em 24/02/2022, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1261182** e o código CRC **065CB473**.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me apoiaram, incentivaram, compreenderam as minhas ausências e meus momentos de dificuldades e, graças a vocês, hoje, o projeto de pesquisa do mestrado se tornou esse trabalho pelo qual eu tenho tanto carinho.

Primeiramente à minha mãe que sempre me apoiou independente das minhas escolhas e dos meus sonhos, que nunca mediu esforços para sempre dar o melhor para mim e para a minha irmã e que por muitas vezes deixou os projetos pessoais de lado para apoiar os nossos. Obrigada ao meu pai, Helder, que infelizmente não está aqui presencialmente, mas que sempre carrego no coração, gostaria que você estivesse comigo durante essa etapa. Obrigada, pelos ensinamentos de respeito, honestidade, pela educação, amor, compaixão, lealdade, cumplicidade, além de sempre nos encorajar a sermos o melhor de nós. Obrigada, Pai e Mãe.

A Dra. dentista Gerusa, a pessoa mais esforçada e batalhadora que eu conheço. Obrigada por sempre estar ao meu lado (sem encostar hahaha), por sempre me defender e apoiar. Amo você, ermã!

Aos meus avós Waldomiro e Maria, os amores da vida da menina da “touxinha”, que sempre me amaram, mimaram, ensinaram seus valores e construíram uma família da qual eu tenho muito orgulho em fazer parte. Obrigada por todo o apoio emocional, financeiro e pelo carinho! Vô Miro, gostaria tanto que você estivesse aqui para ver e entender essa conquista. E, também, aos meus Tios Luciane e Romildo, e aos meus primos Lucas e Alexandre, por sempre estarem presentes com conselhos, um colo, uma carona, um abraço e por sempre me incentivarem. Amo vocês, muito obrigada.

À minha orientadora, Prof. Fabiola de Oliveira Paes Leme, que me acolheu, comprou as minhas ideias e sonhos e batalhou por elas sempre ao meu lado. Obrigada pelo conhecimento transmitido, pelas oportunidades, pela confiança, pela

paciência e por ser esse exemplo de mulher forte, batalhadora e com um coração imenso.

Às minhas co-orientadoras, Prof. Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho e Prof. Ana Paula de Mota Lucas, obrigada pelos ensinamentos e pelas oportunidades de aprendizado e de vivência.

À Dra. Gleidice Eunice Lavallo, um dos grandes presentes que o mestrado trouxe, que honra tive em aprender, compartilhar da sua rotina. Muito obrigada, principalmente, por todo o acolhimento e pelo exemplo de humildade, compaixão, paixão à profissão e aos seus pacientes e por sempre deixar claro o motivo de estarmos desenvolvendo ciência.

À médica veterinária Carla Caires pela parceria, disposição e pelo bom humor de sempre na seleção de pacientes para o estudo. À Karen Nagakaki pela ajuda com as histopatologias.

Obrigada à equipe do laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, por todo o apoio, cooperação, carinho e suporte durante a fase experimental desse trabalho. Obrigada a Ross, Mari, Barbra, Anna, Leleo, July, Yasmin e Amanda Sulista, a Maraiá não está com amostras do projeto para vocês ajudarem a processar nesse momento, não se assustem!

Aos queridos alunos de iniciação científica que colaboraram intensamente, ouviram e espero que tenham sentido o gostinho delicioso da hemostasia, obrigada, Laura, Brenda, Ana Luiza, Ana Flávia, Larissa e Elom.

Aos funcionários do HV da Escola de Veterinária da UFMG, em especial à Fernanda Castilho, a rainha da coleta com vácuo, ao Ailton e a todos os médicos veterinários residentes e contratados que fizeram parte, direta ou indiretamente da

etapa prática desse estudo, meu agradecimento pela ajuda nas coletas e nas trocas de experiências. Assinado, “a vampirona do lab”.

Aos amigos, Cinthia, Jéssica, Maria Gabriella, Cláudio, Joana, Acácia, Ágatha e Michele, por ouvirem, acolherem e compartilharem experiências.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Obrigada à Celer e especial à Pollyanna, pelo apoio financeiro e fornecimento de insumos para o desenvolvimento desse projeto e dos demais! À Bioclin, pelo fornecimento de insumos e pelo suporte técnico.

E por fim, aos pacientes que participaram do estudo e seus tutores, obrigada pela cooperação para que possamos desenvolver ciência e saúde!

“O médico, que depende do laboratório para fazer seu diagnóstico, provavelmente é inexperiente; aquele que diz que não precisa de laboratório é desinformado. Em ambos os casos, o paciente está em perigo.”

J. A. Halsted

RESUMO

As neoplasias mamárias em cães são extremamente relevantes na oncologia veterinária devido à sua alta incidência, diversidade histológica ou pela decorrência das síndromes paraneoplásicas. A presença de discrasias hemostáticas já foi bem descrita em humanos e está correlacionada ao pior prognóstico. O carcinoma inflamatório mamário (CIM) é a apresentação clínico - patológica localmente invasiva, extremamente agressiva, com alto potencial metastático, de curso agudo e prognóstico desfavorável. O objetivo desse estudo foi determinar o perfil hemostático em cães com CIM e compará-lo ao de pacientes com carcinomas mamários não inflamatórios e ao grupo de pacientes saudáveis. Participaram deste estudo 58 cães alocadas em quatro grupos: pacientes saudáveis (CONTROLE, n=25); carcinoma inflamatório mamário (CIM, n=9), neoplasia mamária sem metástase (NMSM, n=12) e neoplasia mamária com metástase (NMCM, n=12). Realizou-se o exame físico completo, com atenção especial ao exame das glândulas mamárias, estadiamento clínico pelo sistema TNM, hemograma, avaliação hemostática, consistindo na concentração de plaquetas, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), concentração de fibrinogênio, concentração de dímeros-d e exame histopatológico. A concentração de plaquetas diferiu do controle apenas para o grupo NMCM, que apresentou as maiores concentrações, já os grupos CIM e NMSM foram equivalentes entre si e ao CONTROLE. O TP do grupo CIM se encontra encurtado quando comparado ao CONTROLE e as concentrações de fibrinogênio de dímeros d maiores, entretanto tais parâmetros foram estatisticamente equivalentes aos grupos NMSM e NMCM. Para o TTPa, nos grupos CIM e NMCM ocorreu prolongamento quando comparados ao do controle, o grupo NMSM foi equivalente aos demais grupos. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as neoplasias mamárias induzem alterações hemostáticas, provavelmente devido à inflamação, especialmente em pacientes portadores de carcinoma inflamatório.

Palavras-chaves: coagulopatias, discrasias sanguíneas, hipercoagulabilidade

ABSTRACT

Mammary neoplasms in dogs are extremely important in veterinary oncology due to its high incidence, histological diversity or as a result of paraneoplastic syndromes. The presence of hemostatic dyscrasias has been well described in humans and is correlated with a worse prognosis. Inflammatory mammary carcinoma (IMC) is a locally invasive, extremely aggressive clinical-pathological presentation with a high metastatic potential, an acute course and an unfavorable prognosis. The aim of this study was to determine the hemostatic profile in dogs with IMC and to compare it to that of patients with non-inflammatory mammary carcinomas and to a group of healthy patients. Fifty-eight dogs divided into four groups participated in this study: healthy patients (CONTROL, n=25); inflammatory mammary carcinoma (IMC, n=9), mammary neoplasia without metastasis (NMSM, n=12) mammary neoplasia with metastasis (NMCM, n=12). A complete physical examination was performed, with special attention to the examination of the mammary glands, clinical staging by the TNM system, blood count, hemostatic evaluation, consisting of platelet concentration, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (PTT), fibrinogen concentration, d-dimer concentration; and the histopathological examination were performed. The platelet concentration differed from the CONTROL only for the NMCM group, which presented the highest concentrations, whereas the CIM and NMSM groups were equivalent to each other and to the CONTROL. The PT of the IMC group was shortened when compared to the CONTROL and the fibrinogen concentrations and d-dimers were greater, however such parameters were statistically equivalent to the NMSM and NMCM groups. For PTT, in the CIM and NMCM groups there was a prolongation when compared to the CONTROL, the NMSM group was equivalent to the other groups. The results obtained in this study suggest that mammary neoplasia induce hemostatic changes, probably due to inflammation, especially in patients with inflammatory carcinoma.

Keywords: coagulopathy, hematologic dyscrasias, hypercoagulability

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Concentração de plaquetas em cães no grupo de cães hígidos (n=17); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (n=12). 43
- Figura 2. Tempo de protrombina em cães, no grupo de cães hígidos (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (n=12). 48
- Figura 3 Tempo de tromboplastina parcial ativada em cães, no grupo de cães hígidos (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (n=12). 51
- Figura 4 Concentração de fibrinogênio em cães, no grupo de cães hígidos (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (n=12). 54
- Figura 5 Concentração de dímeros- d no grupo de cães hígidos (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (n=12). 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise descritiva da concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e concentração de dímeros-d no grupo de cães híidos (CONT); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (CIM), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (NMCM); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (NMSM).	42
----------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.	22
----------	---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Aprovação CEUA – Comissão de ética no uso de animais	69
Anexo 2	Termo de consentimento livre e esclarecido- TCLE	71
Anexo 3	Hemogramas individuais dos pacientes com carcinoma inflamatório mamário	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por Cento
CEUA	Comitê De Ética No Uso De Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CIM	Carcinoma Inflamatório Mamário
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-Acético
et al.	E Colaboradores
FT	Fator tecidual, Tromboplastina tecidual
g/dL	Gramas Por Decilitro
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IBGE	Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística
mg/dL	Miligramas Por Decilitro
NMCM	Neoplasia Mamária Com Metástase
NMSM	Neoplasia Mamária Sem Metástase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PDFs	Produtos De Degradação Da Fibrina
PDW	<i>Platelet Distribution Width</i>
PPP	Plasma Pobre Em Plaquetas
PRP	Plasma Rico Em Plaquetas
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
rpm	Rotações Por Minuto
s	Segundos
t-PA	Ativador do plasminogênio tipo tecidual
TNF α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TP	Tempo De Protrombina
TT	Tempo de Trombina
TTPa	Tempo De Tromboplastina Parcial Ativada
u-TPA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Fisiologia e avaliação laboratorial sistema hemostático.....	16
2.2	Neoplasias mamárias em cadelas.....	21
2.3	Carcinoma inflamatório mamário.....	24
2.4	Hemostasia no paciente oncológico.....	26
3.	JUSTIFICATIVA	34
4.	HIPÓTESE	35
5.	OBJETIVOS	35
5.1	Objetivo Geral.....	35
5.2	Objetivos Específicos.....	35
6.	MATERIAL E MÉTODOS	36
6.1	Aspectos éticos.....	36
6.2	População.....	36
6.3	Critérios de inclusão e exclusão.....	36
6.3.1	Critérios de inclusão no grupo controle.....	36
6.3.2	Critérios de inclusão no grupo pacientes com neoplasia mamária.....	37
6.3.3	Critérios de inclusão no grupo pacientes com carcinoma inflamatório mamário.....	37
6.3.4	Critérios de exclusão do grupo controle.....	38
6.3.5	Critérios de exclusão dos grupos com neoplasia mamária com e sem metástase e grupo carcinoma inflamatório.....	38
6.4	Tempos de coletas.....	38
6.5	Procedimentos.....	39
6.5.1	Coletas de sangue venoso.....	39
6.5.2	Hemograma.....	39
6.5.3	Avaliações de hemostasia.....	40
6.5.3.1	Coagulômetro Clotimer com amostras de plasma pobre em plaquetas.....	40
6.5.3.2	Mensuração da concentração de dímeros-d.....	40
6.5.4.	Análise estatística.....	41
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
7.1	Plaquetas.....	43
7.2	Tempo de protrombina.....	47
7.3	Tempo de tromboplastina parcial ativada.....	50
7.4	Fibrinogênio.....	53
7.5	Dímeros-d.....	56
8.	CONCLUSÕES	60
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
10.	PERSPECTIVAS FUTURAS	62
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
12.	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

Os animais de estimação, principalmente os cães, fazem parte de um número considerável de lares brasileiros. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, cerca de 40% dos municípios brasileiros possuem lares com ao menos um cão como animal de estimação (IBGE, 2013). O maior cuidado por parte dos tutores, bem como a evolução dos conhecimentos na medicina veterinária, fez com que a expectativa destes indivíduos aumentasse, bem como a prevalência das doenças sistêmicas crônicas, como as neoplasias (VAIL; THAMM; LIPTAK, 2020).

Os tumores de mama são as neoplasias mais frequentes em cadelas, com etiologia e apresentações clínicas diversas. A maioria destes tumores são carcinomas, justificando a necessidade de promover o diagnóstico e adotar medidas terapêuticas acuradas. O diagnóstico da condição, normalmente, é realizado através do exame clínico com avaliação da lesão, pesquisa de metástases e estadiamento do paciente, além da avaliação do tipo histológico e da graduação histológica tumoral. O estadiamento do paciente e a graduação tumoral são determinantes para o tratamento e prognóstico do paciente (CASSALI *et al.*, 2020).

O carcinoma inflamatório é uma forma de manifestação dos carcinomas mamários, com presença de intensa reação inflamatória e embolização tumoral nos vasos linfáticos da derme. O paciente com carcinoma inflamatório mamário é um desafio na oncologia veterinária, visto que a entidade clínica é a mais agressiva dos carcinomas na cadela, com rápida evolução, altas taxas de metástase e prognóstico ruim (ALENZA; TABANERA; PEÑA, 2001).

O câncer em si não é o único motivo de complicações para um paciente. A produção de substâncias ou agentes pela neoplasia são, também, determinantes do estado de saúde, pois podem causar alterações clínicas distantes do sítio tumoral primário ou de metástases, condição conhecida como síndrome paraneoplásica.

Dentre as principais síndromes paraneoplásicas, destacam-se as discrasias sanguíneas, como o comprometimento do sistema hemostático (BAYLEY, 2020).

As discrasias sanguíneas são condições que fogem à homeostase sanguínea, que podem ser decorrentes de alterações nos elementos que o constituem e em sua qualidade. A expressão fenotípica das discrasias hemostáticas incluem-se a trombose e a hemorragia (CHILDRESS, 2002).

Enquanto na medicina, as discrasias sanguíneas associadas às neoplasias são consideradas determinantes do prognóstico e podem anteceder a descoberta da neoplasia em si, na medicina veterinária, as informações sobre esse estado ainda são insuficientes, principalmente quando relacionadas ao sistema hemostático e, em muitas vezes, essa avaliação não é incluída nos protocolos de avaliação clínica e estadiamento do paciente oncológico.

Em cadelas acometidas por neoplasia mamária, certas discrasias sanguíneas relacionadas ao sistema hemostático já foram identificadas (TRENTIN, 2014; de OLIVEIRA, 2019), entretanto, até o presente momento, há a necessidade de explorar tal estado, principalmente no paciente com carcinoma inflamatório mamário, em que o comprometimento hemostático pode estar presente (MARCONATO *et al.*, 2009).

É necessário, também, investigar se os testes hemostáticos de rotina veterinários utilizados, como a concentração de plaquetas, o tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e os dímeros-d podem refletir diretamente a patogenia das neoplasias sendo uma importante ferramenta para determinar o prognóstico e/ou chance de óbito do paciente com carcinoma inflamatório mamário.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil hemostático em cães portadores de carcinoma inflamatório mamário através da concentração de plaquetas,

tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e da concentração dos dímeros-d e compará-los ao perfil de pacientes saudáveis e de pacientes com carcinomas mamários não inflamatórios com presença ou não de metástase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia e avaliação laboratorial do sistema hemostático

A hemostasia consiste em uma série de processos intimamente regulados que mantêm o sangue em estado fluido nos vasos sem lesão, ao mesmo tempo que pode formar, rapidamente, um tampão hemostático ou coágulo no sítio de lesão vascular, com o objetivo de prevenir e interromper sangramento e hemorragias, garantindo a fluidez nos vasos sanguíneos (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Os principais elementos do sistema hemostático são os vasos sanguíneos, as plaquetas, os elementos do plasma, como os fatores e facilitadores da coagulação e os anticoagulantes endógenos. Além deles, diversas células, como as células endoteliais e as próprias plaquetas, desempenham importante função promovendo superfícies para que as reações ocorram e para o fornecimento de fatores de crescimento e regeneração (FERREIRA *et al.*, 2010).

Conceitualmente, a hemostasia é dividida nas etapas de vasoconstrição, formação do *plug* plaquetário (hemostasia primária), formação do coágulo de fibrina (hemostasia secundária) e dissolução do coágulo ou fibrinólise (hemostasia terciária) (GEDDINGS; MACKMAN, 2014). Entretanto, os elementos do sistema hemostático são ativados em uma série de reações simultâneas em diferentes intensidades (VERSTEEG *et al.*, 2013).

A resposta imediata à lesão vascular e consequente lesão endotelial é a vasoconstrição para evitar a hemorragia. Entretanto, esta é uma resposta transitória

e mediada por substâncias, como a endotelina, produzidas pelo próprio endotélio lesionado (DAVENPORT *et al.*, 2016).

O endotélio intacto age como uma barreira física que impede o contato das plaquetas com o espaço extravascular. Com a injúria vascular, ocorre a exposição de elementos pró-coagulantes como a matriz subendotelial pró-coagulante (que inclui o colágeno, laminina e fibronectina) e ocorre a iniciação da ação plaquetária no processo hemostático (VERSTEEG *et al.*, 2013).

As plaquetas se ligam a proteínas da matriz subendotelial exposta, como o colágeno, através de moléculas de adesão ou receptores de membrana, como as glicoproteínas. Em vasos com alta pressão e conseqüente alto fluxo sanguíneo, as plaquetas precisam ser “desaceleradas” para que possam aderir firmemente à matriz extracelular exposta, quem medeia esse processo é uma proteína plasmática multimérica, chamada fator de Von Willebrand (FvW). O processo de ligação entre a plaqueta e o FvW é chamado de adesão plaquetária, que desencadeia uma série de alterações morfológicas nas plaquetas, que passam a estar ativadas. O processo de ativação envolve a liberação de mediadores pró-coagulantes (tromboxano, FvW, ADP, fatores de coagulação, cálcio), elementos de reparação tecidual e vasoconstrição (serotonina), além da mudança de formato das plaquetas por meio de um *flip* na sua membrana com exposição da fosfatidilserina e liberação de micropartículas pró-coagulantes. Todo este processo provoca recrutamento e ativação de mais plaquetas ao local da lesão endotelial. O processo de agregação, que consiste na ligação plaqueta a plaqueta é mediado pelo fibrinogênio. Os processos de adesão, ativação e agregação plaquetárias formam o *plug* hemostático primário, interrompendo a hemorragia por certo tempo na lesão endotelial (CATANI *et al.*, 2020).

A injúria endotelial também leva à expressão do fator tecidual em células como os fibroblastos e células musculares levando à ativação em cascata de alguns dos elementos plasmáticos, para a formação da fibrina. O *plug* hemostático primário ganha

consistência e garante a prevenção de hemorragias maiores com a formação do coágulo de fibrina (hemostasia secundária) em uma série de reações na chamada cascata de coagulação (FERREIRA *et al.*, 2010).

A trombina é responsável, além de outras funções, pela conversão do fibrinogênio em fibrina. O processo de geração de trombina, e conseqüente fibrina, é dividido nas fases de iniciação e amplificação/propagação (HOFMAN e MONROE, 2011). A trombina medeia a sua própria produção e a ativação de demais fatores da coagulação, plaquetas e elementos, inclusive da fibrinólise. Os fatores de coagulação são proteínas produzidas principalmente pelos hepatócitos, que circulam no plasma em sua forma não ativada (zimógenos), sendo alguns dependentes de cálcio e da vitamina K para assumir sua forma ativa (FERREIRA *et al.*, 2010).

O fator tecidual (FT), é uma pequena proteína transmembrana normalmente expressado nos fibroblastos perivasculares e nas células musculares lisas. O FT endotelial se liga ao FVII, formando um complexo (T-FVIIa) que inicia uma série de reações que culminam na geração de trombina. O complexo FT-FVIIa, juntamente ao cálcio e fosfolípidios, formam um complexo que promove a ativação do fator X e fracamente leva à ativação do FIX. A ativação do FIX pelo complexo FT-FVIIa é chamada de via alternativa. O FIXa pode se difundir da superfície dos fibroblastos para participar das etapas de propagação e amplificação da geração de trombina (VERSTEEG *et al.*, 2013).

A pequena quantidade de trombina gerada pelo TF-FVIIa na fase de iniciação amplifica a coagulação ativando o FXI, que associado aos fosfolípidios das plaquetas, ao FVIIIa e ao FIXa, promovem a ativação do FX (FXa). A associação do FIXa, FVIIIa, fosfolípidios e do cálcio é chamado de complexo tenase. Já o FXIa amplifica a ativação de FIX na superfície das plaquetas ativadas e na presença de cálcio em um mecanismo de retroalimentação. O complexo tenase sustenta a produção do FXa e,

com a liberação de fatores quimiotáticos mais plaquetas e fatores de coagulação são atraídos para o local da lesão (HOFMAN e MONROE, 2011).

O FXa associado ao FVa, forma um complexo denominado protrombinase, também na presença de fosfolipídios e cálcio. O FV pode ser ativado pelo FXa ou por proteases não coagulantes. Na etapa de iniciação, o complexo protrombinase transforma pequenas quantidades de protrombina em trombina, que são insuficientes para a formação do coágulo de fibrina, mas capazes de ativar e atrair um número maior de plaquetas que irão expor os sítios para ancorar as reações e ampliar e propagar a geração de mais trombina. Também ocorre a ativação de fatores de coagulação (FV, FVIII e FIX) nas superfícies plaquetárias, caracterizando a ampliação e a propagação da geração da trombina (HOFMAN e MONROE, 2011).

A propagação da geração de trombina é resultado, principalmente, da ação dos complexos tenase e protrombinase, fazendo com que grande quantidade de protrombina seja convertida em trombina. A trombina cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que se polimerizam por ação do FXIIIa promovendo a formação de um coágulo de fibrina resistente. Esta sequência é conhecida como hemostasia secundária e consolida o tampão plaquetário inicial em um coágulo estável (HOFMAN e MONROE, 2001).

Depois de ativada, a cascata de coagulação deve ficar restrita ao local da lesão para prevenir a coagulação inadequada e não localizada, potencialmente perigosa por dificultar a perfusão tecidual. Todo o processo deve se dar em locais com exposição de fosfolipídios além de ser controlada por quatro principais anticoagulantes: a antitrombina, a proteína C, a proteína S e o inibidor da via do fator tecidual (VERSTEEG *et al.*, 2013).

A antitrombina é uma proteína produzida pelo fígado sendo um importante anticoagulante endógeno, além de inibir a trombina também inibe a maioria dos

fatores de coagulação ativados. Já as proteínas C e proteína S, tem suas formas ativadas PCa e PSa, mediante à ligação da trombina à trombomodulina (receptor das células endoteliais) e atuam inibindo o FVIIIa e FVa, diminuindo significativamente a produção de trombina. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) inibe diretamente o complexo fator tecidual-fator VIIa e o fator Xa (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Ao mesmo tempo que o coágulo está sendo construído, ocorre a ativação da cascata fibrinolítica visando moderar a localização e o tamanho do coágulo. Quando o endotélio está regenerado, a mesma cascata é responsável pela degradação do coágulo. As células endoteliais sintetizam o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), que cliva o plasminogênio (proteína plasmática) em sua forma ativa, a plasmina. A fibrinólise é realizada principalmente pela plasmina, que quebra a fibrina e interfere em sua polimerização. A quebra da fibrina gera os produtos de degradação da fibrina (PDFs), dentre eles os dímeros-d. Os dímeros-d são produtos apenas da fibrina cruzada, produzida pelo FXIIIa. As células endoteliais também modulam o equilíbrio entre coagulação e anticoagulação, expressando elementos que atuam em vias pró-coagulantes como os inibidores do ativador de plasminogênio (PAIs) que bloqueiam a fibrinólise e expressam receptores para a promoção da anticoagulação como a trombomodulina (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Os distúrbios hemostáticos representam um importante desafio para o médico veterinário tanto a nível de diagnóstico quanto de terapia devido à grande rapidez que as alterações ocorrem hemodinamicamente (LANGHORN *et al.*, 2019). Dentre as indicações para a avaliação hemostática, estão os pacientes que apresentam doença que sabidamente compromete o sistema hemostático mesmo que estes não apresentem sinais clínicos (STOCKHAM; SCOTT, 2008) como é o caso das neoplasias.

A avaliação hemostática do paciente veterinário é normalmente realizada através da avaliação clínica, pelos testes de concentração de plaquetas, tempo de

protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), concentração de fibrinogênio e concentração dos dímeros-d (SAAVEDRA *et al.*, 2011).

A maioria dos testes utilizados na rotina clínica foram delineados para a avaliação e diagnóstico dos estados de hipocoagulabilidade, como, por exemplo os ensaios tradicionais de coagulação baseados em plasma, como o TP e o TTPa que refletem apenas o início da formação da fibrina. Além disso, TP e TTPa prolongados não necessariamente se correlacionam com o risco de sangramento (FERREIRA *et al.*, 2010).

As alterações hemostáticas, relacionadas ao potencial pró-trombótico, no paciente oncológico veterinário são pouco documentadas pela deficiência de métodos acessíveis ao diagnóstico da condição e por, muitas vezes, o tromboembolismo ser uma doença de sinais clínicos muito inespecíficos. O diagnóstico da trombose, quando realizado, ocorre durante a necropsia (ANDREASEN *et al.*, 2012).

A coagulação intravascular disseminada (CIVD) é uma síndrome adquirida decorrente da ativação excessiva do sistema hemostático, trata-se de uma condição clínica devastadora caracterizada pela perda do controle local do sistema hemostático em resposta à lesão celular sustentada e sistêmica (TOH; ALHAMDI, 2013). É uma condição relativamente comum nos pacientes oncológicos (CHILDRESS, 2002) e que da mesma forma que as condições de hipercoagulabilidade é subdiagnosticada (MARUYAMA *et al.*, 2004).

2.2 Neoplasias Mamárias em cadelas

Os tumores de mama são as neoplasias mais frequentes em cadelas sendo um importante desafio na medicina veterinária (CASSALI *et al.*, 2020). A incidência dos tumores mamários varia dependendo da população estudada, podendo ser relacionada à idade, à exposição hormonal, à raça e, com menor contribuição, podem

ser citados, a dieta e o escore corporal do paciente. Em cães, a incidência é diretamente relacionada à ovariectomia ou ovariohisterectomia e a idade em que a mesma é realizada (SORENMO; WORLEY; ZAPULLI, 2020).

As neoplasias mamárias são normalmente detectadas pelo exame clínico de rotina, apresentando-se como nódulos únicos ou múltiplos, que podem acometer uma ou ambas as cadeias mamárias, estes podem ter tamanho variável e estar aderidos ou móveis (SORENMO *et al.*, 2011). As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são geralmente as mais acometidas, provavelmente pela maior quantidade de parênquima mamário presente (SORENMO *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014).

A presença de sinais sistêmicos é variável. A maioria dos cães com tumores mamários são sistemicamente saudáveis. O agravamento da condição ocorre quando há metástase e sinais clínicos importantes como caquexia, dificuldade respiratória, ulceração da epiderme, com conseqüente inflamação e possível infecção (GOLDSCHIMIDT; PEÑA; ZAPPULLI, 2017) e a ocorrência de síndromes paraneoplásicas (de OLIVEIRA, 2019; TRENTIN, 2014).

Os sítios metastáticos distantes podem incluir linfonodos regionais e distantes, fígado, pulmões, ossos (SORENMO; WORLEY; ZAPULLI, 2020) e medula óssea (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A investigação de metástases no paciente antes do início da terapia é recomendada, uma vez que cães com metástase podem não ser beneficiados pelo procedimento cirúrgico e a sobrevida desses pacientes é significativamente menor se comparada à dos pacientes sem metástase. A pesquisa de metástases inclui, além da palpação e exames de citologia e ou histopatologia de linfonodos, exame radiográfico da cavidade torácica nas projeções látero-lateral esquerda e direita e ventro-dorsal, além da ultrassonografia abdominal (CASSALI *et al.* 2020).

Os pacientes com tumores mamários são estadiados de acordo com o sistema TNM, onde T avalia o tamanho do tumor primário, N o envolvimento de linfonodos regionais e M a presença de metástases à distância, conforme indica o Quadro 1. O estadiamento proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma adaptação do sistema de estadiamento tumoral de humanos do *American Joint Committee on Cancer Staging Manual* (2010) e vem sendo adaptado para uso para cães com tumores epiteliais (não-inflamatórios).

Quadro 1. Sistema de estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.

Estadiamento	Tamanho	Linfonodos regionais	Metástases distantes
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	T ₁ , T ₂ , T ₃ e CIM	N ₁	M ₀
V	T ₁ , T ₂ , T ₃	N _{0,1}	M ₀

T: tamanho do tumor primário; em que T₁ < 3,0cm de diâmetro, T₂: entre 3,0 e 5,0 cm de diâmetro, T₃ > 5,0cm de diâmetro. N: envolvimento de linfonodos regionais; em que N₀: sem evidencia de metástases, N₁: linfonodos regionais envolvidos. M: metástases em órgãos distantes; onde M₀: sem evidencias de metástases à distância, M₁: presença de metástases em órgãos distantes ou linfonodos que não drenam as cadeias mamarias. CIM: Carcinoma Inflamatório Mamário. (Adaptado de OWEN, 1980).

Essas categorias determinam o prognóstico do paciente (SORENMO; WORLEY; ZAPULLI, 2020). Embora não definidos pela OMS como parâmetros de estadiamento do paciente com tumor de mama, os exames complementares, como hemograma, urinálise, avaliação de bioquímica sérica e avaliação hemostática podem refletir o estado geral de saúde do paciente e direcionar à atenção aos achados que podem alterar significativamente o curso da doença (BAYLEY, 2020). O comprometimento hemostático é uma importante síndrome paraneoplásica (BAYLEY, 2020), sendo tromboembolismo venoso (TEV), tromboembolismo pulmonar (TEP) e a

CIVD manifestações que podem acometer cães com neoplasias (CHILDRES, 2002; de MEIS e LEVY, 2007).

Outro exame complementar de extrema importância é a classificação do subtipo histológico e graduação tumorais. Alguns subtipos histológicos apresentam maior agressividade sendo determinantes para a conduta terapêutica e conseqüentemente para o prognóstico destes pacientes. Além da classificação em subtipos histológicos, os tumores mamários devem receber uma pontuação durante o exame histológico de acordo com características morfológicas para a graduação tumoral. Dentre estas características pontua-se a formação de túbulos, polimorfismo nuclear e número de mitoses por campo e com base na pontuação total, determina-se o grau do tumor em Grau I (Baixo Grau) tumor bem diferenciado, Grau II (Intermediário) moderadamente diferenciado e Grau III (Alto Grau) pouco diferenciado (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

Normalmente, o tratamento do câncer de mama na espécie canina é baseado na remoção do tumor e da cadeia mamária. A associação à quimioterapia depende do estadiamento do paciente, sendo indicada normalmente para os casos mais avançados, e depende dos subtipos e grau histológicos (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

2.2. Carcinoma inflamatório mamário

Os carcinomas inflamatórios mamários (CIM) representam um subconjunto clinicamente importante de tumores em cães. O CIM é caracterizado como uma síndrome que envolve o rápido crescimento tumoral em região de glândulas mamárias associado a inflamação intensa na pele devido à invasão dos vasos linfáticos da derme (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001). A entidade é um dos maiores desafios na oncologia veterinária por sua rápida evolução, altas taxas de metástase e prognóstico ruim (PEÑA *et al.*, 2003; RIBEIRO; ESTRELA- LIMA; CASSALI, 2018).

Embora não estabelecida, a etiologia do CIM pode estar relacionada a influências hormonais, como a fase lútea do ciclo estral ou ao uso de progestágenos e alterações genéticas (PEÑA *et al.*, 2003). O CIM apresenta uma incidência média de 7,6% de casos dentre as cadelas que apresentam neoplasias mamárias malignas (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001).

Existem duas formas de apresentação do CIM: primária e secundária. O CIM primário acomete animais sem histórico prévio de neoplasia mamária e a lesão já apresenta as características inflamatórias. Já no secundário, o desenvolvimento de sinais clínicos do CIM ocorre em recidivas após cirurgias para exérese de neoplasias mamárias (PEÑA *et al.*, 2003).

A condição é identificada pelo exame clínico. As pacientes apresentam, de forma súbita, o crescimento ao longo da cadeia mamária da lesão em placa, extensa, não delimitada, associada a sinais de inflamação (dor, eritema, hipertermia, edema) na derme ou epiderme e por vezes, a presença de ulceração. A neoplasia mamária pode ser detectável ou não (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001).

Os principais sinais clínicos associados ao CIM incluem sinais de dor envolvendo a região mamária, axilas, virilha e face interna da parte proximal dos membros, juntamente com edema e sinais de alterações inflamatórias. A presença de apatia, fraqueza, anorexia também é relatada (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001).

A embolização das células da neoplasia nos vasos linfáticos da derme e consequente interrupção da drenagem linfática dá origem ao significativo edema e inflamação presentes nestes pacientes (BARRENO *et al.*, 2019). Cães afetados podem ser diagnosticados erroneamente como tendo mastite ou dermatite grave já que a região acometida apresenta sinais de inflamação (RIBEIRO; ESTRELA- LIMA; CASSALI, 2017).

Para sustentar o próprio crescimento e de metástases, as células neoplásicas precisam de oxigênio e nutrientes e, portanto, usam de mecanismos adaptativos que promovem a angiogênese, linfagiotropismo e, até mesmo, mimetizam vasos sanguíneos normais (BARRENO *et al.*, 2019). No caso do CIM, a maquinaria celular é mais bem adaptada para utilizar esses mecanismos, e por conta disso há uma maior chance de proliferação, crescimento, disseminação e metástase (RIBEIRO; ESTRELA- LIMA; CASSALI, 2017).

Assim como as metástases dos carcinomas mamários não inflamatórios, metástases do CIM podem ocorrer em linfonodos regionais, tecido adiposo e muscular; e de forma distante, em pulmão, coração, útero, vesícula urinária (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001) e medula óssea (de OLIVEIRA, 2020).

A confirmação do diagnóstico é realizada através do exame histopatológico, com a presença de êmbolos, de origem epitelial, neoplásicos nos vasos linfáticos da derme. A presença de envolvimento linfático na derme, chamado embolia, na ausência de características clínicas do carcinoma inflamatório, classifica a condição como carcinoma inflamatório oculto (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001). O CIM está associado a carcinomas mamários de alto grau, tipos histológicos pouco diferenciados e de pior prognóstico (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2001; PEÑA *et al.*, 2003, de OLIVEIRA, 2020).

Além do envolvimento loco-regional extenso, alguns cães com CIM tem sinais de doença sistêmica (SORENMO; WORLEY; ZAPULI, 2020) como distúrbios hemostáticos. Coagulopatias podem estar presentes em cerca de 20% dos pacientes com CIM refletindo em menor sobrevida (*odds ratio* 0.28) (MARCONATO *et al.*, 2009).

O tratamento cirúrgico é contraindicado em animais que apresentam CIM devido ao elevado risco de disseminação tumoral, desenvolvimento de síndromes paraneoplásicas, como a coagulação intravascular disseminada (CIVD), e a dificuldade para a obtenção de margens livres (MARCONATO *et al.*, 2009). Para

promover melhoria da qualidade de vida do paciente indicam-se terapias paliativas com analgésicos que promovam o controle efetivo da dor associada e anti-inflamatórios não esteroidais, como os coxibes, inibidores seletivos de COX-2, e terapias alvo (ALONSO-MIGUEL *et al.*, 2021).

2.3. Hemostasia no paciente oncológico

A neoplasia afeta o funcionamento do sistema hemostático da mesma forma que o sistema hemostático interfere na evolução da neoplasia. Essa relação é reconhecida desde o século XIX, quando Armand Trousseau descreveu a presença de trombose em pacientes com neoplasias ainda não diagnosticadas (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013).

As alterações hemostáticas decorrentes do processo neoplásico incluem tendências hemorrágicas e principalmente trombóticas (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013). Essas alterações em pacientes oncológicos humanos já são bem estabelecidas e a avaliação e o manejo do sistema hemostático nesses pacientes é um importante determinante na evolução. Dentre as causas de mortalidade precoce nos pacientes com câncer iniciando a quimioterapia, o tromboembolismo se destaca (KHORANA, 2012). Entretanto, os quadros de hipercoagulabilidade e trombose são dificilmente diagnosticados na medicina veterinária (ANDREASEN *et al.*, 2012).

A principal manifestação do desequilíbrio hemostático em pacientes humanos é o desenvolvimento da trombose. A etiologia é multifatorial e, de certa forma, ainda há muito a se esclarecer. O desenvolvimento da trombose já foi associado aos fatores da neoplasia como local, tipo histológico, graduação e tempo de evolução, também relacionados ao tratamento incluindo procedimentos cirúrgicos, uso de cateteres, a hospitalização, uso de quimioterápicos, medicamentos anti-angiogênicos e o uso de hemocomponentes, além de fatores relacionados ao paciente como idade, etnia e comorbidades e, por fim, aos biomarcadores. Dentre os biomarcadores listados,

alguns parâmetros como concentração de plaquetas, concentração de leucócitos, expressão de FT, concentração de dímeros-d, expressão de P-selectina e o potencial de geração de trombina são imprescindíveis para a determinação de risco de trombose nestes pacientes (KHORANA, 2012).

A integridade endotelial, as mudanças hemodinâmicas e a hipercoagulabilidade são os elementos da tríade de Virchow, que predispõe a formação do trombo e podem estar comprometidos no paciente oncológico (NASSER; FOX; AGBARYA, 2020), sendo evidente a perturbação hemostática nos pacientes oncológicos veterinários em decorrência de efeitos diretos do tumor e de substâncias produzidas pela neoplasia (CHILDRESS, 2012).

A presença do tumor sólido em um volume significativo pode levar à compressão de vasos sanguíneos (CASSALI et al., 2020) resultando em alterações de fluxo sanguíneo e consequente disfunção endotelial (NASSER; FOX; AGBARYA, 2020). Estudos mais recentes justificando essa casualidade em animais domésticos são ausentes, entretanto a indução da oclusão da veia cava ou da aorta em cães resultou em formação de coágulo em poucos minutos (FAREED *et al.*, 1985). Esse efeito pode ser agravado pelo decúbito, frequentemente visto que nos pacientes com CIM que apresentam debilidade significativa por conta de dor, anorexia, fraqueza (ALENZA; TABANERA, PEÑA, 2001).

A integridade endotelial também é comprometida nos vasos da neoplasia. Os vasos do tumor são anormais por conta de defeitos em todas as estruturas vasculares: o endotélio, os pericitos e a membrana basal. Mais especificamente, relacionado ao endotélio, a disfunção pode ser decorrente da monocamada endotelial defeituosa, visto que as células neoplásicas não são uniformes e ocorre a formação de *gaps* fazendo com que o endotélio deixe de agir como barreira entre o meio extra e intravascular e seja mais frágil. Os vasos da neoplasia, também, podem ter pequenas projeções que formam “vasos anômalos” dentro dos próprios vasos, pra promover

invasão e metástase e como consequência podem causar comprometimento da oxigenação na região e amplificar a lesão endotelial (DUDLEY, 2012). Em murinos, o comprometimento endotelial, identificado pela ruptura do glicocálix, inflamação endotelial e aumento da permeabilidade endotelial, foi um evento importante para a metástase de câncer de mama na forma precoce e tardia, com alterações hemostáticas significativas (SURAJ *et al.*, 2019).

O endotélio disfuncional também pode expressar elementos pró-coagulantes sendo a expressão de FT importante no comprometimento hemostático do paciente oncológico. A expressão constitutiva de FT, foi observada de forma significativa em culturas celulares de carcinomas mamários e pulmonares em cães e em micropartículas com capacidade de gerar trombina via ativação do FX, mesmo na ausência do FVIIa (STOCKOL *et al.*, 2011). Também se observou, a expressão de FT nas células luminais da neoplasia mamária em cães. Não houve correlação entre a graduação do tumor e a expressão de FT. Contudo, associação significativa entre a expressão de FT e antitrombina e plasminogênio foi observada. Como também, a expressão significativa de FT em um dos casos com metástase em linfonodo de carcinoma mamário anaplásico em que o paciente desenvolveu CIVD (ANDREASEN *et al.*, 2016).

No caso do CIM, a angiogênese exacerbada e a mímica vasculogênica, mediadas, em parte pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são importantes alterações endoteliais observadas, visto que as células neoplásicas podem se comportar morfológicamente como células endoteliais e expressar elementos pró-coagulantes como os corpúsculos de Weibel-Palade que contém FvW e o próprio FT. Assim o potencial de ativar o sistema hemostático destes pacientes está exacerbado pela expressão destes elementos pró-coagulantes (BARRENO *et al.*, 2019).

Além da expressão de FT pelas células neoplásicas, fragmentos celulares chamados microvesículas ou micropartículas (MPs) também podem expressar FT e

exercer atividade pró-coagulante (STOCKOL *et al.*, 2011; KOBAYASI *et al.*, 2019). As MPs são vesículas pequenas (0,1–1,0 µm de diâmetro) originadas durante a ativação ou dano celular com capacidade para expressar diferentes proteínas, fosfolípidios e até mesmo ácidos nucleares, podendo agir como mediadores em diversas condições patológicas (CREMER *et al.*, 2018). Destacam-se neste contexto as MPs oriundas de plaquetas, que são capazes de expressar fosfolípidos e conseqüentemente potencializando o desequilíbrio hemostático destes pacientes, além de promover crescimento e metástase da neoplasia (TOTH *et al.*, 2008).

Culturas celulares de neoplasia mamária apresentaram, além do FT na superfície das células, MPs com atividade pró-coagulante associadas ao FT. No estudo, também foram avaliados cães com outras neoplasias malignas e, embora, não tenha sido observada diferença significativa na atividade pró-coagulante plasmática entre o grupo com e sem CIVD, a atividade pró-coagulante do FT no plasma foi notavelmente maior em três dos cinco cães com CIVD (KOBAYASI *et al.*, 2019).

O fator pró-coagulante do câncer é uma protease correlacionada à vitamina K, expressa exclusivamente nas células da neoplasia, capaz de ativar diretamente o FX sem a necessidade de formar o complexo protrombinase. Além do fator pró-coagulante do câncer, polifosfatos e material nuclear liberados das células da neoplasia devido à sua fragilidade, e mucinas produzidas podem ativar a via induzida por contato via FXII (NICKEL *et al.*, 2015).

Não apenas o endotélio é comprometido por esses elementos produzidos ou relacionados à neoplasia mamária, mas há uma relação muito evidente, porém, não completamente entendida, entre as plaquetas e a neoplasia. Cães com neoplasia mamária podem apresentar trombocitose (DUDA 2017; de OLIVEIRA, 2019) sem correlação com o estadiamento dos pacientes (de OLIVEIRA, 2019) ou trombonormocitemia (TRENTIN, 2014; de OLIVEIRA, 2018), que pode estar associada à hiper-reatividade plaquetária (TRENTIN, 2014). Avaliando o CIM, de

Oliveira (2018) observou animais trombonormocitêmicos e estatisticamente semelhantes aos pacientes com ou sem metástase.

A interação das células da neoplasia e plaquetas tem sido demonstrada na progressão do câncer, incluindo crescimento tumoral, angiogênese, metástase e na trombose associada ao câncer. Dentre os mecanismos que justificam essa correlação são citados: a proteção plaquetária nas células tumorais disseminadas (CTDs) de eventos mecânicos e do sistema imune do hospedeiro, presença de fatores solúveis derivados das plaquetas que promovem a metástase, a hiper-reatividade plaquetária provocadas pelas células da neoplasia e trombocitose induzida pelo câncer (SYLMAN *et al.*, 2017).

Esta interação é um pouco melhor esclarecida na medicina humana, visto que em pacientes com tumores a concentração de plaquetas é uma excelente ferramenta para o estabelecimento do prognóstico da doença, sendo os pacientes com neoplasias sólidas malignas e com trombocitose os que apresentaram maior chance de desenvolvimento de metástase e menor sobrevida (BUERGY *et al.*, 2012).

Os mecanismos que justificam a variabilidade na concentração de plaquetas nos pacientes com neoplasia mamária e, em especial, no CIM pode incluir trombocitose reacional à inflamação, visto que pacientes com CIM são pacientes com evidências clínicas e laboratoriais significativas de inflamação, a metástase pulmonar pode alterar o microambiente medular e levar ao aumento da produção de plaquetas nesse sítio (de OLIVEIRA, 2020). Já, o consumo plaquetário em processos hemostáticos (disseminados ou não) (MARCONATO *et al.*, 2009), a mielofitose (de OLIVEIRA, 2018) e possivelmente nos mecanismos adaptativos da neoplasia para proteção de eventos mecânicos e imunes (SYLMAN *et al* 2017), podem cursar com trombocitopenia.

Algumas anormalidades hemostáticas já foram bem caracterizadas no carcinoma mamário não inflamatório na espécie canina, entre elas hiperfibrinogenemia (STOCKHAUS *et al.*, 1999; TRENTIN, 2014; DUDA, 2017; de OLIVEIRA, 2019), prolongamento do TP (STOCKHAUS *et al.*, 1999; TRENTIN, 2014), prolongamento do TTPa em pacientes em estadios III e IV (STOCKHAUS *et al.*, 1999) e do TT (DUDA *et al.*, 2017). O prolongamento dos tempos de coagulação se dá quando mais de 70% de um ou mais fatores correlacionados a via foram consumidos ou apresentam anormalidades (STOCKHAM e SCOTT, 2008), assim os tempos de coagulação apresentam uma sensibilidade diagnóstica satisfatória apenas para os quadros de hipocoagulabilidade moderada a intensa.

Os pacientes portadores de CIM expressam moléculas pró-coagulantes e há uma forte associação inflamatória que poderia potencializar as alterações hemostáticas (DUDA, 2017), quando há um consumo dos fatores de coagulação ocorre o prolongamento destes tempos, refletindo uma fase tardia de comprometimento da hemostasia. A presença de coagulopatia em cadelas com CIM mostrou-se um importante fator prognóstico. Em 43 cadelas avaliadas com carcinoma inflamatório, das quais em 29 foi realizada a avaliação hemostática, as alterações foram observadas em seis pacientes (21%) e três destes apresentavam metástase distante. Essas seis pacientes também apresentaram tempo de sobrevivência significativamente mais curto em relação às demais (MARCONATO, 2009).

O sistema fibrinolítico também pode ser influenciado pelo microambiente tumoral, gerando como síndrome paraneoplásica o estado de hiperfibrinólise. Já houve o relato de neoplasias capazes de produzir o ativador do plasminogênio do tipo tecidual e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) (DANO *et al.*, 2005).

Os múltiplos potenciais ativadores do sistema hemostático, já citados, com potencial para desequilibrar o sistema e promover a CIVD no paciente com CIM são evidentes. A CIVD é uma síndrome secundária caracterizada pela perda dos

mecanismos que regulam o sistema hemostático. Inicialmente, os mecanismos regulatórios dos inibidores, são capazes de conter as alterações hemostáticas de forma local. Entretanto, quando a ativação exacerbada da hemostasia se propaga os mecanismos reguladores ficam sobrecarregados e ocorre a evolução para a fase descompensada ou evidente da CIVD, com formação de trombos em vários locais e, em última instância, consumo dos elementos do sistema hemostático, prolongamento dos tempos de coagulação e estabelecimento do quadro hemorrágico (LEVI, 2009).

O estudo das alterações hemostáticas em pacientes oncológicos é desafiador, principalmente quanto ao diagnóstico do estado pró-trombótico ou de hipercoagulabilidade, que aparentemente é o mais prevalente nos pacientes com neoplasias mamárias (DUDA 2017; TRENTIN, 2014; de OLIVEIRA, 2019).

Os testes de coagulação raramente são solicitados pelo médico veterinário na rotina clínica, mesmo tendo em vista o potencial trombótico nas diversas doenças que acometem os pacientes, em especial as neoplasias. Soma-se a esse fato, a limitação analítica dos principais testes utilizados para a detecção do estado de hipercoagulabilidade e de sua manifestação clínica que é o tromboembolismo, tornando difícil a identificação *antemortem* dessas condições (KRISTENSEN *et al.*, 2008).

A avaliação hemostática no paciente com neoplasia mamária é de extrema importância visto que este é um paciente com comprometimento hemostático evidente. Os testes de hemostasia refletem o comprometimento sistêmico causado pela neoplasia, possibilitando a intervenção terapêutica adequada e também podem ser utilizados como biomarcadores, direcionando a conduta clínica- oncológica.

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma inflamatório mamário é uma importante entidade clínica em cadelas e estudos que determinam e/ou reconhecem o perfil hemostático destes pacientes são escassos. É importante que os médicos veterinários conheçam as alterações hemostáticas relacionadas à neoplasia mamária, principalmente às relacionadas ao carcinoma inflamatório mamário, visando o diagnóstico otimizado para a instituição e determinação da terapêutica, garantindo, assim, melhor prognóstico dos pacientes.

É necessário, também, investigar se os testes hemostáticos rotineiramente utilizados podem refletir diretamente a patogenia e a progressão das neoplasias sendo uma importante ferramenta para determinar o prognóstico do paciente com carcinoma inflamatório mamário.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil hemostático em cães portadores de carcinoma inflamatório mamário através da concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e da concentração dos dímeros-d e comparar ao perfil hemostático de pacientes saudáveis e de pacientes com carcinomas mamários não inflamatórios com presença ou não de metástase.

4. HIPÓTESE

Pacientes com carcinoma inflamatório mamário apresentam comprometimento hemostático significativo e diferem dos pacientes portadores de carcinomas mamários não inflamatórios.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil hemostático de cadelas portadoras de carcinoma inflamatório mamário, através dos testes de concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e concentração de dímeros-d.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Selecionar pacientes fêmeas da rotina de oncologia clínica que atendam os critérios propostos neste estudo e separa-los em grupos: carcinoma inflamatório, neoplasia mamária sem metástase, neoplasia mamária com metástase;
- 5.2.2. Selecionar pacientes machos e fêmeas para compor o grupo controle (pacientes saudáveis);
- 5.2.3. Avaliar, de todos os animais selecionados, o perfil hemostático;
- 5.2.4. Detectar nos pacientes com neoplasia mamária o estado pró-trombótico utilizando as determinações de **plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e da concentração dos dímeros-d.**

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Aspectos éticos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob protocolo 371/2019 (anexo 1), registrado no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária e desenvolvido após anuência do Hospital Veterinário da mesma instituição. Os tutores dos referidos pacientes autorizaram o uso das amostras coletadas para realização das avaliações propostas pelo estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (anexo 2).

6.2. População

Foram avaliados 58 cães (*Canis lupus familiaris*), com idades e raças variadas, alocados nos seguintes grupos:

- Grupo Pacientes Com Carcinoma Inflamatório (CIM): nove cães, fêmeas
- Grupo Controle (CONTROLE): 25 cães, machos e fêmeas
- Grupo Pacientes Com Neoplasia Mamária Sem Metástase (NMSM): 12 cães, fêmeas
- Grupo Pacientes Com Neoplasia Mamária Com Metástase (NMCM): 12 cães, fêmeas.

6.3. Critérios de inclusão e exclusão

6.3.1. Critérios de inclusão no Grupo controle

Para o grupo controle (CONTROLE), foram triados cães, entre um e sete anos de idade, fêmeas (n=13) e machos (n=12), castrados, dóceis, clinicamente saudáveis

avaliados por histórico, exame físico completo (segundo protocolo do HV-UFMG), avaliando temperatura retal, tempo de preenchimento capilar (TPC), ausculta cardíaca e pulmonar, palpação dos linfonodos mandibulares, poplíteos e/ou outros que estivessem palpáveis e avaliação da mucosa oral e ocular. Realizou-se o hemograma, avaliação bioquímica sérica (ureia, creatinina, alaninoaminotransferase, aspartatoaminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil- transferase, proteína sérica total, albumina, globulinas, amilase, colesterol total e triglicérides totais), avaliação hemostática (concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e concentração de dímeros-d) e avaliação sorológica para *Leishmania* spp. (ELISA e RIFI), cuja titulação deveria ter sido realizada em, no máximo seis meses anteriores à participação na presente pesquisa.

6.3.2. Critérios de inclusão no Grupo com neoplasia mamária

A seleção de pacientes para os grupos de neoplasia mamária foi realizada na rotina do serviço de Oncologia Clínica do HV- UFMG consistindo de pacientes diagnosticados com neoplasias da glândula mamária que foram avaliados através dos mesmos exames clínico e laboratoriais descritos para o grupo controle. Para os pacientes com carcinoma inflamatório houve a parceria com uma oncologista volante que atende na região de Belo Horizonte para a seleção dos casos. Destes pacientes, também foi realizada a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos linfonodos inguinais e/ou axilares que drenavam a cadeia mamária acometida, quando palpáveis. Além de exame radiográfico da cavidade torácica nas projeções látero-lateral esquerda e direita e ventro-dorsal, também foi realizada ultrassonografia abdominal para a pesquisa de metástase. Os pacientes foram estadiados de acordo com a classificação TNM estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Após as avaliações supracitadas os pacientes foram realocados em dois subgrupos: NMSM (estádios I, II e III) e NMCM (estádios IV e V). O exame histopatológico foi realizado nas peças excisadas durante a mastectomia, para os pacientes em que o

procedimento era indicado, e em caso de localização dos linfonodos regionais a avaliação histopatológica era realizada em ambos os órgãos.

6.3.3. Critérios de inclusão no Grupo com carcinoma inflamatório mamário

Foram incluídas no grupo carcinoma inflamatório (CIM) as pacientes que apresentaram características clínicas durante a avaliação clínica, como a presença de sinais de inflamação associados à neoplasia mamária ou com confirmação de embolismo tumoral nos vasos linfáticos da derme no exame de histopatologia.

6.3.4. Critérios de exclusão do grupo controle

Foram excluídos do grupo CONTROLE os animais que apresentaram alterações nos parâmetros de avaliação citados anteriormente. Também foram excluídos pacientes em que as amostras não estivessem adequadas, segundo os critérios de rejeição do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

6.3.5. Critérios de exclusão dos grupos com neoplasia mamária com e sem metástase e grupo carcinoma inflamatório

Foram excluídos pacientes que apresentaram neoplasia mamária associada a qualquer comorbidade que pudesse comprometer o sistema hemostático. Também, foram excluídos pacientes em curso de tratamento com medicamentos que alterassem a função hemostática (anti-inflamatórios não esteroides, antifibrinolíticos, corticosteroides e outros). Também foram excluídos pacientes em que as amostras não estivessem adequadas, segundo os critérios de rejeição do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

6.4. Tempos de coletas

As coletas das amostras de sangue foram realizadas pontualmente, sempre após as avaliações durante as consultas clínicas e antes da realização de intervenções terapêuticas e/ou cirúrgicas.

6.5. Procedimentos

6.5.1. Coletas de sangue venoso

Para as análises foi realizada a coleta de sangue da veia jugular externa, com dispositivo a vácuo em tubos apropriados da marca Sarstedt® (Nümbrecht, Alemanha). O primeiro tubo preenchido foi o tubo com ativador de coágulo para obtenção de soro e avaliação bioquímica, seguido pelos tubos contendo citrato de sódio a 3,8% para a avaliação hemostática e por fim o tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA-10%), como é preconizado pela Clinical & Laboratories Standards Institute (CLSI). As coletas eram realizadas respeitando-se a proporção entre anticoagulante e amostra, evitando-se tempo prolongado de garrote e após adequada antisepsia.

6.5.2. Hemograma

Para a realização de hemograma até 1,5 mL de sangue venoso foram acondicionados em tubo com EDTA 10% Sarstedt® (Nümbrecht, Alemanha) proporcionais ao volume de amostra. A amostra foi processada em, no máximo, 30 minutos após a coleta. O esfregaço sanguíneo foi confeccionado e corado como preconiza o protocolo de rotina do laboratório - panóptico rápido (Laborclin®, Curitiba, Brasil). As concentrações de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e mensuração da concentração de hemoglobina foram realizados em aparelho hematológico por impedância -Icounter - Vet (Diagno®, Belo Horizonte, Brasil). O hematócrito ou volume globular foi mensurado pelo método do microhematócrito (JAIN, 1993). A avaliação

morfológica celular (eritrócitos, leucócitos e de plaquetas) e a contagem diferencial de leucócitos foram feitas nos esfregaços sanguíneos corados. A concentração de plaquetas foi conferida utilizando-se o método de Fônio adaptado, durante a avaliação dos esfregaços sanguíneos, juntamente com a avaliação morfológica das mesmas. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados.

6.5.3. Avaliações de hemostasia

As avaliações de hemostasia foram realizadas a partir de sete mL de sangue acondicionados em tubos de plástico com citrato de sódio a 3,8% (Sarstedt®, Nümbrecht, Alemanha) sempre respeitando a proporção de sangue e anticoagulante indicados.

6.5.3.1. Tempos de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPa) e a concentração de fibrinogênio em amostras de plasma pobre em plaquetas

As amostras de sangue citratadas foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos. Em seguida, o plasma era aliquoteado em volume de 500 µL e acondicionados em microtubos de polipropileno do tipo *Eppendorf*. Após essa separação era realizada uma nova centrifugação a 2.000 rotações por minuto (rpm) por mais 20 minutos. O sobrenadante com volume fixado em 490 µL foi coletado para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) e transferido para novos microtubos em, no mínimo, três alíquotas, sendo uma destas analisada assim que terminada a centrifugação e as demais congeladas a -80°C para testes futuros.

Os tempos de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPa) e a concentração de fibrinogênio de cada paciente foram determinados utilizando analisador de coagulação com sistema de detecção densitométrico (Clotimer ®,

Sorocaba, Brasil) e reagentes comerciais (Quibasa - Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil) conforme bula dos fabricantes, com realização de verificação do controle de qualidade com plasma controle, semanalmente.

6.5.3.1. Concentração dos dímeros-d em amostras de plasma pobre em plaquetas

As mensurações da concentração dos dímeros-d foram realizadas utilizando imunoensaio de fluorescência para mensuração quantitativa no equipamento ECO Reader F (Ecodiagnóstica®, Santa Luzia, Brasil) utilizando plasma pobre em plaquetas, conforme recomendado pelo fabricante.

6.5.4. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2019). Em todos os testes adotou-se o nível de significância de 5%.

Na análise foram avaliadas todas as variáveis numéricas dos pacientes de todos os grupos. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Realizou-se os testes de normalidade e de homocedasticidade para cada variável na sua unidade original e aplicou-se a transformação logarítmica quando não houve distribuição normal.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 1 para análise descritiva. Para os analitos de tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), concentração de fibrinogênio e concentração de dímeros-d o grupo controle foi utilizado como valor de referência (dados ainda não publicados), visto que o equipamento, reagentes e metodologias foram validadas para o presente estudo.

Tabela 1. Análise descritiva da concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, concentração de fibrinogênio e concentração de dímeros-d no grupo de cães hígdos (CONTROLE); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário (CIM), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase (NMCM); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase (NMSM).

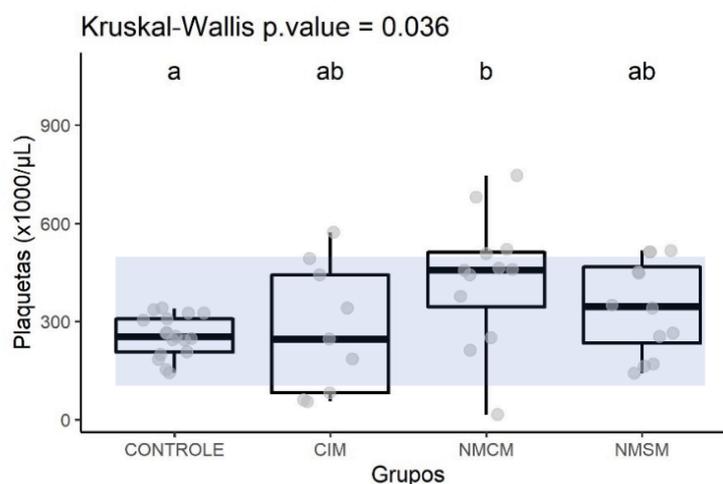
Variável	Grupo	Média	Desvio Padrão	Min.	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Coef. Var.	Núm. Valid.	% Valid.
Plaquetas (x10 ³ /μL)	CONTROLE	255,4	62,6	143	207	254	308	25%	17	68%
	CIM	275,2	196,4	56	82	246	443	71%	9	100%
	NMCM	427,4	198,7	15	313	458	514	46%	12	100%
	NMSM	343,8	143,6	142	212	345,5	482	42%	12	100%
Tempo de Protrombina (segundos)	CONTROLE	9,8	1,0	6,9	9,3	9,8	10,6	10%	25	100%
	CIM	8,4	1,2	7	7,45	8,275	9,2	14%	8	89%
	NMCM	9,8	4,0	7,2	8,25	8,7	9,55	40%	12	100%
	NMSM	8,9	1,4	6,9	7,875	9	9,75	16%	12	100%
Tempo de Tromboplastina parcial ativada (segundos)	CONTROLE	13,6	2,3	11	12,2	12,8	13,6	17%	25	100%
	CIM	21,8	11,9	10,85	14,5	15,8	30	55%	9	100%
	NMCM	18,8	11,2	12,6	14	14,95	17,35	60%	12	100%
	NMSM	14,7	3,9	7	12,45	14,3	17,945	26%	12	100%
Fibrinogênio (mg/dL)	CONTROLE	240,7	120,9	102	159	217	280	50%	25	100%
	CIM	466,9	187,4	104	376	545	612	40%	9	100%
	NMCM	399,3	220,5	50	189,5	438	612,5	55%	12	100%
	NMSM	343,5	118,1	203	238,5	336,5	412,5	34%	12	100%
Dímeros-d (mg/L)	CONTROLE	64,6	42,9	50	50	50	50	66%	24	96%
	CIM	850,0	1326,6	50	100	300	800	156%	9	100%
	NMCM	941,7	2822,9	50	50	100	200	300%	12	100%
	NMSM	150,0	243,1	50	50	50	150	162%	12	100%

Min.: Mínimo; Coef. Var.: Coeficiente de variação; Núm. Valid.: número de dados válidos; % Valid.: percentual de dados válidos.

7.1. Plaquetas

Na análise da concentração das plaquetas, a mediana do grupo CIM não diferiu da dos demais grupos estudados. Entretanto, o grupo NMCM teve maiores concentrações quando comparado ao grupo CONTROLE como demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1. Concentração de plaquetas em cães no grupo de cães hígdidos- CONTROLE (n=17); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário- CIM (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase- NMCM (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase- NMSM (n=12).



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p=0,036$) teste de Kruskal-Wallis. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical se estende do valor mínimo ao valor máximo. Linha em azul identifica os valores de referência para a espécie $175-500 \times 10^3/\mu\text{L}$ segundo Jain (1993).

Essa equivalência estatística pode ser justificada pela grande dispersão da concentração de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), principalmente nas cadelas do grupo NMCM que apresentou quartis muito amplos (máximo de 746.000 e mínimo de 15.000) e com cinco pacientes (41,6%) fora dos intervalos de referência. Entretanto, observa-se que

o grupo CIM (mediana de $246 \times 10^3/\mu\text{L}$) apresentou um dos pacientes com concentração de plaquetas ($573 \times 10^3/\mu\text{L}$), acima do intervalo de referência e 125,6% superior à mediana do grupo CONTROLE (mediana de $254 \times 10^3/\mu\text{L}$). Segundo Jain (1993) a concentração de plaquetas de cães deve ser inferior a $500 \times 10^3/\mu\text{L}$, sendo que contagens superiores podem predispor ao potencial trombótico.

Os mecanismos de trombocitose no paciente com CIM podem incluir a trombocitose reativa (SYLMAN *et al.*, 2017) ou trombocitose paraneoplásica (CATANI *et al.*, 2020). Em um modelo *in vitro* de tumor ovariano em camundongos, observou-se que as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) podem ser expressas pelas células tumorais e induzir a produção hepática de trombopoetina (TPO) levando à megacariopose e consequente trombocitose (STONE *et al.*, 2003). Alguns tipos tumorais podem produzir diretamente TPO, o fator estimulante de crescimento de granulócitos e macrófagos (G-CSF), fator de crescimento de fibroblastos (b-FGF), interleucinas 6 (IL-6), e 1 (IL-1). As plaquetas, as MPs, e as células endoteliais da medula óssea também tem capacidade de induzir a proliferação e diferenciação dos megacariócitos potencializando o quadro de trombocitose (PLANTUREX *et al.*, 2018). Todos os mecanismos apontados podem ser considerados como causa de trombocitose nos pacientes com neoplasia mamária deste estudo.

A trombocitose, no momento do diagnóstico do câncer de mama, relacionada ao pior prognóstico em pacientes humanos (TAUCHER *et al.*, 2003) é condizente ao observado com as pacientes do grupo NMCM, entretanto diferindo dos pacientes do grupo CIM. A trombocitose leva ao maior potencial de gerar complicações tromboembólicas vasculares e à baixa sobrevida em pacientes humanos com diferentes tumores, como câncer de esôfago, câncer de bexiga, câncer de mama inflamatório e câncer epitelial de ovário (CATANI *et al.*, 2020), e parece atuar como simbionte à progressão da neoplasia (PLANTUREX *et al.*, 2018).

Além de um maior número de plaquetas circulantes, as trombopatias, como a hiperagregabilidade plaquetária, também já foram observadas em cães com neoplasia mamária (TRENTIN, 2014), sendo mais um fator importante a ser considerado no risco trombótico no paciente portador de CIM. Alguns tipos tumorais podem levar a ativação e secretar agonistas plaquetários como o tromboxano e ativar a trombina (PLANTUREX *et al.*, 2018).

Da mesma forma que a trombocitose e a hiperagregabilidade plaquetária direcionam ao estado pró-trombótico o processo inflamatório do câncer exerce importante influência. As plaquetas podem ser ativadas diretamente por endotoxinas ou por mediadores pró-inflamatórios (fator ativador de plaquetas, trombina, expressão de P-selectina) que possibilitam a ativação de mais plaquetas e leucócitos em um mecanismo de retroalimentação. Além disso, neutrófilos e monócitos ativados podem produzir IL-6 levando à maior expressão de FT, que por sua vez desencadeia a cascata de coagulação (LEVI; van der POLL, 2005).

A trombocitopenia [concentração de plaquetas inferior a $175 \times 10^3/\mu\text{L}$ (JAIN, 1993)], observada em 33,3% (3/9) dos pacientes do grupo CIM, é um achado relativamente comum em pacientes veterinários com neoplasias (CHILDRESS, 2012). A coleta das amostras nos pacientes com CIM foi bastante difícil, o que pode justificar a presença de agregados plaquetários em 55,6% dos pacientes deste grupo. A manipulação dos pacientes com CIM foi, de certa forma, mais difícil em parte por conta da dor e da inflamação que podem ter causado vasoconstrição periférica, como descreveram PEÑA *et al.*, (2003), assim como também pode se dever ao comprometimento sistêmico causado pela doença.

Além das interferências pré-analíticas, o próprio processo inflamatório é um potencializador da ativação plaquetária, como já discutido, podendo promover pseudotrombocitopenia da inflamação, que também deve ser um mecanismo considerado para estas pacientes. As plaquetas ativadas se ligam umas às outras e a leucócitos, processo chamado satelitismo, promovendo falsas diminuições de

concentração das mesmas e, possível aumento em seu volume médio- VPM, visto que um agregado plaquetário acaba sendo lido pelo equipamento como uma grande plaqueta (LEME *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual o satelitismo plaquetário ocorre ainda não é bem esclarecido, especula-se que o EDTA induza a alterações na membrana das plaquetas levando a ligação plaqueta-plaqueta e plaqueta-leucócito pela expressão de epítomos autólogos não reconhecidos pelo sistema imune e, também, pela expressão de elementos plaquetários como a p-selectina e a liberação do fibrinogênio pelos grânulos, após a ativação que induzem a agregação plaquetária e a adesão aos neutrófilos (MORSELLI *et al.*, 1999). A ligação plaqueta-leucócitos não foi observada no presente estudo (dados ainda não publicados, anexo 3), sendo os agregados plaquetários observados provavelmente decorrentes das limitações durante a coleta das amostras.

Os mecanismos utilizados pelas células tumorais disseminadas para promover a metástase em associação às plaquetas podem ser considerados como uma possível causa de trombocitopenia nos pacientes do CIM e NMSM. O processo de agregação plaquetária induzida pelo tumor, formando um aglomerado de células tumorais e plaquetas, é um *gatilho* para a secreção de vários elementos que facilitam a angiogênese e o crescimento tumoral (HAEMMERLE *et al.*, 2018).

Observou-se em três dos pacientes intensamente trombocitopênicos, dois do grupo CIM e em um paciente do grupo NMCM, a evolução para o quadro de CIVD, considerando-se os critérios propostos por Wiinberg *et al.* (2010). Devido à ativação exacerbada e multifatorial dos elementos do sistema hemostático no paciente com câncer, ocorre um consumo exagerado das plaquetas e fatores de coagulação para formação do coágulo de fibrina. De acordo com WIINBERG *et al.* (2008), a CIVD é uma síndrome secundária caracterizada pelo desequilíbrio dos elementos pró-coagulantes e anticoagulantes com perda dos mecanismos locais de controle destas reações, dessa forma, rapidamente o paciente em CIVD, pode passar da fase de hipercoagulabilidade (geração excessiva de fibrina) para a fase de hipocoagulabilidade ou hemorrágica.

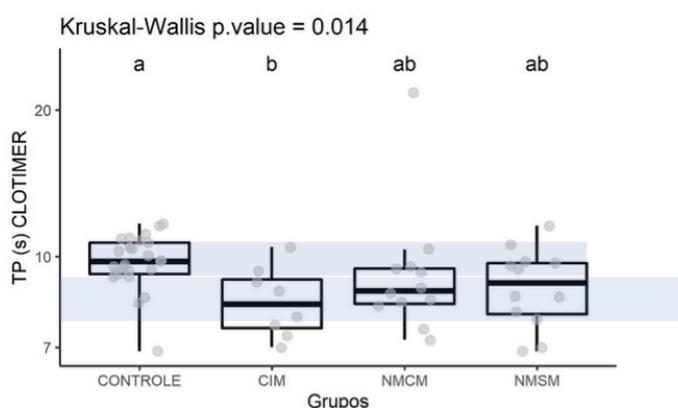
Embora não tenha sido realizado o exame citológico da medula óssea destes pacientes, a presença de células tumorais disseminadas (CTDs) na medula óssea, como descrito por de OLIVEIRA *et al.* (2020) é um potencial à mielofitose e consequente trombocitopenia. A presença das CTDs também já foi descrita no sangue periférico e medula óssea de um labrador de sete anos que foi a óbito devido à coagulação intravascular disseminada (JAILLARDON *et al.*, 2012).

Apesar de existirem poucos estudos em medicina veterinária sobre a correlação entre a neoplasia e a população plaquetária, é possível que haja correlação principalmente nos pacientes com doença mais avançada e dependendo do tipo histológico e graduação da neoplasia (de OLIVEIRA *et al.* 2019), como ocorreu nas pacientes do grupo NMCM.

7.2. Tempo de Protrombina

Para o tempo de protrombina (TP), a mediana observada nas pacientes do CIM diferiu da do grupo CONTROLE, considerando-se encurtada e foi estatisticamente equivalente as dos grupos NMSM e NMCM. Os grupos NMSM e NMCM foram equivalentes entre si e ao grupo controle. O TP das pacientes do grupo CIM (mediana de 8,275 segundos) tenderam ao encurtamento (84,43% da mediana do grupo controle), como ilustrado no Gráfico 2.

Gráfico 2. Tempo de protrombina em cães, no grupo de no grupo de cães hígdos- CONTROLE (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário- CIM (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase- NMCM (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase- NMSM (n=12).



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p=0,014$) teste de Kruskal-Wallis. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical se estende do valor mínimo ao valor máximo. Caixa azul: valor de referência considerado do grupo CONTROLE.

O TP é um teste cronométrico, que avalia a coagulação ativada pelo FT (fator tecidual, tromboplastina tecidual ou FIII), chamada via extrínseca, composta pelo FVIIa, e via comum (FX, FV, FII e fibrina). O fim do teste é dado pela formação da fibrina e o resultado, em segundos, desencadeada pela adição de cálcio, fosfolipídios e FT exógeno ao plasma citratado do paciente (MINEO *et al.*, 2007).

O relativo encurtamento, mais evidente nos grupos CIM e NMCM, pode estar associado, entre outros fatores, ao processo inflamatório decorrente da neoplasia. De acordo com Levi e van der Poll (2005) a expressão *in vivo* de FT é possivelmente, em grande parte, mediada pela IL-6.

A expressão constitutiva de FT já foi também observada nas células luminais de linhagens celulares de carcinomas não inflamatórios mamários em cães e também nas micropartículas (MPs) liberadas no microambiente tumoral. Além da maior expressão, o FT exibido por essa linhagem celular, mostrou-se funcionalmente ativo e sem necessidade de formar o complexo com o FVIIa para ativar o FX (STOKOL *et al.*, 2011). Em estudo realizado por Andreasen *et al.* (2016), a expressão de FT foi associada ao crescimento invasivo do tumor, o que poderia ser comparado aos pacientes dos grupos NMCM e CIM deste estudo. Andreasen *et al.* (2016) relataram ter havido expressão significativa de TF em um dos pacientes, que apresentava metástase em linfonodo de um carcinoma mamário anaplásico, em que houve o desenvolvimento de CIVD.

A maior expressão de FT pelas células da neoplasia e pelas MPs, associada à maior expressão induzida pela inflamação poderiam estar somando a um quadro de hipercoagulabilidade conforme sugerido por Stokol *et al.* (2011). Embora o TP, não tenha sido projetado para o diagnóstico da hipercoagulabilidade, o perfil de TP e TTPa encurtados e a concentração dos dímeros-d aumentada, foram anteriormente associados à hipercoagulabilidade, detectada em 23 cães pelo método de tromboelastometria (SONG *et al.*, 2016).

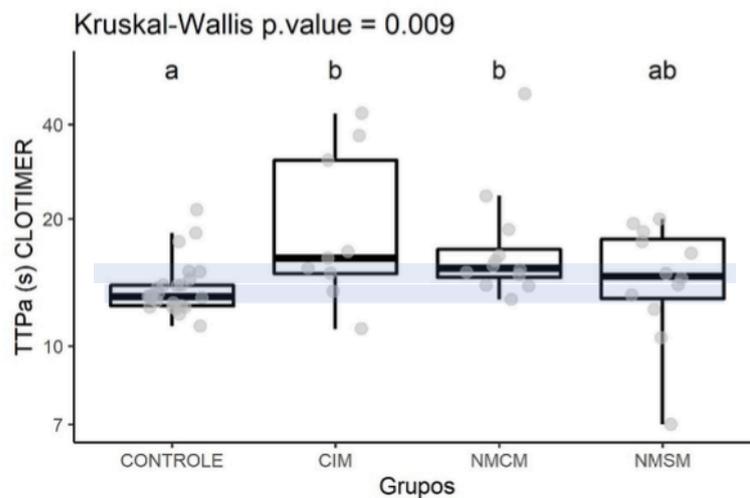
Outro fator a ser considerado é a hiperfibrinogenemia, apresentada nos pacientes com neoplasia mamária, em especial nos pacientes do grupo CIM. Altas concentrações de fibrinogênio coincidem com encurtamento do TP e do TTPa como também documentaram Kurata *et al.* (2003). Nos pacientes com doença avançada, CIM e NMCM, as alterações de TP apresentaram significado clínico e sugerem o maior comprometimento hemostático, possivelmente pela maior expressão de FT decorrente do processo inflamatório e da expressão inadequada de FT pelas células da neoplasia e pela hiperfibrinogenemia.

Três pacientes (33,3%) do grupo CIM foram atendidos como encaminhamento pós mastectomia. A lesão tecidual provocada pelo procedimento cirúrgico pode ter potencializado o desequilíbrio hemostático. Segundo Moldal *et al.* (2012), mesmo procedimentos eletivos, com mínimo trauma tecidual causam ativação hemostática em cães e predis põem ao estado de hipercoagulabilidade por conta expressão de FT pelos tecidos manipulados (STOCKOL *et al.*, 1999). Outra possibilidade é a hiperfibrinogenemia consequente do processo inflamatório, associada aos processos de cicatrização (LEVI; van der POLL, 2005).

7.3. Tempo de tromboplastina parcial ativada

Para o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), as medianas dos pacientes do grupo CIM e do grupo NMCM diferiram da do grupo CONTROLE. Já a mediana do grupo NMSM (14,3 segundos) foi equivalente à do grupo CONTROLE e as dos grupos CIM e NMCM (15,8 segundos e 14,95 segundos, respectivamente). A mediana do TTPa das pacientes do grupo CIM (15,8 segundos) foi 23,43% superior à do grupo controle (12,8 segundos) como ilustrado no Gráfico 3.

Gráfico 3. Tempo de tromboplastina parcial ativada em cães, no grupo de cães hígdos- CONTROLE (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário- CIM (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase- NMCM (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase- NMSM (n=12).



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p=0,009$) teste de Kruskal-Wallis. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical se estende do valor mínimo ao valor máximo. Caixa azul: valor de referência considerado do grupo CONTROLE.

Duarte *et al.* (2018) consideram que TP e TTPa possuem sensibilidade analítica satisfatória apenas para os quadros de hipocoagulação moderada a intensa, visto que o ponto final da reação ocorre quando apenas 5% da trombina é gerada, capaz de formar um coágulo de fibrina. Para o prolongamento nos tempos de coagulação superiores a 70%, um ou mais fatores de coagulação relacionados à via devem ter sido consumidos ou perdidos (STOCKHAM e SCOTT, 2008). Considerando esta deficiência analítica, HARVEY (2012) sugeriu que os tempos de coagulação (TP, TTPa) devem ser interpretados como alterados quando forem superiores a 30% do tempo controle. Dessa forma, um maior percentual de pacientes do grupo CIM

estiveram mais próximo dessa variação (23,43%) do que as dos grupos NMCM (21,54%) e NMSM (16,25%).

A reação do TTPa é dada pela adição de cloreto de cálcio em uma solução de plasma citratado do paciente com fosfolípidios pró-coagulantes (tromboplastina parcial) pré-aquecidos. O tempo para a formação do coágulo de fibrina dá o final do teste (MINEO *et al.*, 2007). Embora a via de ativação por contato composta pelos FXII, FXI, FIX, FVIII não seja igualmente responsável pela geração de trombina como a via ativada pelo fator tecidual (FERREIRA *et al.*, 2010), a atividade dos fatores e, em consequência, o TTPa sofrem influência significativa dos processos inflamatórios e fibrinolíticos (MINEO *et al.*, 2007). Segundo Levi e van der Poll (2005) a inflamação leva à ativação da hemostasia via IL-6 levando à maior expressão de FT, já o fator de necrose tumoral α (TNF α) e a IL-1 interferem nos mecanismos de anticoagulação endógenos. Os autores consideraram, também, que as principais interfaces que conectam os sistemas hemostático e inflamatório sejam o FT, a trombina, o sistema proteína C e o sistema fibrinolítico (LEVI; van der POLL, 2005), justificando o desequilíbrio hemostático observado, principalmente nos pacientes do grupo CIM.

Na via considerada intrínseca, a ativação pelo contato com substâncias de carga negativa, pode ser induzida pela calicreína que é uma proteína, também, relacionada ao processo inflamatório. Em neoplasias mamárias em mulheres, além da interface hemostasia- inflamação, a calicreína está associada à promoção, inibição da proliferação das células da neoplasia, angiogênese, invasão e metástase (WOLF *et al.*, 2001). Em cadelas com neoplasia mamária, a calicreína já foi identificada na saliva como um possível marcador de neoplasias mamárias (FRANCO-MARTINÉZ *et al.*, 2020), demonstrando o mesmo potencial inflamatório associado às alterações nos tempos de coagulação observados neste estudo.

Nos pacientes com CIM deste estudo, o TTPa (mediana) apresentou achados que podem sugerir hipocoagulabilidade enquanto o TP (mediana) não. Tal fato pode

estar associado à sobreposição dos elementos do sistema hemostático aos do processo inflamatório, como discutiram Levi e van der Poll (2005).

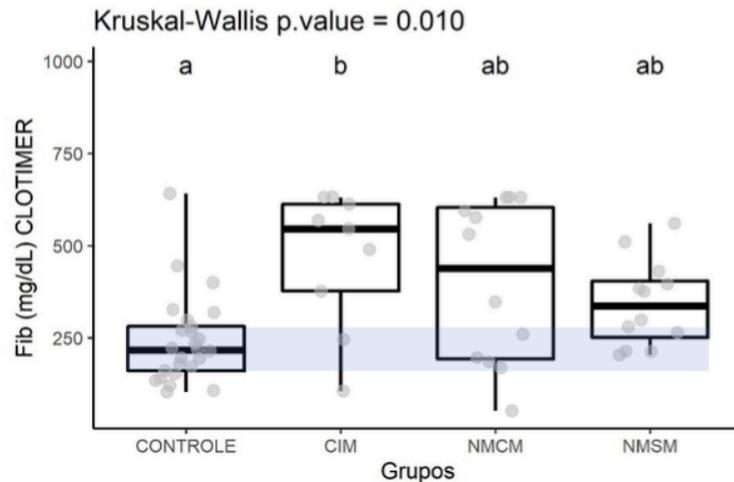
O TTPa ligeiramente prolongado nos pacientes com CIM, pode estar associado à reação inflamatória sistêmica causada, principalmente, pela embolização tumoral nos vasos da derme, tal como descreveram Ribeiro; Estrela- Lima; Cassali, (2017) e, em parte, por alterações pró-inflamatórias da própria neoplasia (Andreasen *et al.*, 2012). Embora, a tendência ao encurtamento tenha ocorrido no TP, provavelmente pela hiperfibrinogenemia (KURATA *et al.*, 2003), a influência da inflamação e da proteólise de fatores da via ativada por contato, pode ser um mecanismo mais evidente nos pacientes com CIM e NMCM, o que justificaria apenas o TTPa prolongado (FERREIRA *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que as citocinas pró-inflamatórias também estão correlacionadas à malignidade, sendo associadas aos mecanismos modulatórios e adaptativos de angiogênese, proliferação e metástase (ANDREASEN, 2012), além da infiltração leucocitária (ANDRÉS *et al.*, 2013) e possivelmente mais expressas nos pacientes com metástase e no CIM.

7.4. Fibrinogênio

A mediana da concentração de fibrinogênio das pacientes do grupo CIM (545 mg/dL) foi maior que a do grupo CONTROLE (217 mg/dL), entretanto, os grupos NMSM (336,5 mg/dL) e NMSM (438 mg/dL) foram semelhantes ao grupo CONTROLE e ao grupo CIM.

Gráfico 4. Concentração de fibrinogênio em cães, no grupo de cães hígidos- CONTROLE (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário- CIM (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase- NMCM (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase- NMSM (n=12).



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p=0,010$) teste de Kruskal-Wallis. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical se estende do valor mínimo ao valor máximo. Caixa azul: valor de referência considerado do grupo CONTROLE.

Os pacientes dos grupos CIM, NMCM e NMSM apresentaram aumento de, respectivamente, 151,1%, 101,8% e 54,8% na concentração de fibrinogênio quando comparados ao grupo CONTROLE. A hiperfibrinogenemia é um achado comum em pacientes com doença maligna, sendo uma das principais alterações hemostáticas em pacientes com neoplasia mamária (STOCKHAUS *et al.*, 1999; DUDA *et al.*, 2014) e correlacionado positivamente com o tipo histológico e graduação do tumor, tamanho e estadio clínico do paciente (de OLIVEIRA *et al.*, 2019).

De acordo com a literatura consultada, o fibrinogênio tem sua produção nos hepatócitos mediada pela IL-6 e é, em parte, armazenado em grânulos plaquetários. O fibrinogênio media o processo de agregação plaquetária e é consumido durante a

coagulação conforme é convertido a fibrina. Além das funções hemostáticas, o fibrinogênio está relacionado à resposta aguda à inflamação em algumas espécies animais (STOCKHAM e SCOTT, 2008). No entanto, para fins de monitorar a inflamação em cães, o fibrinogênio tem um baixo valor clínico e, portanto, não é usado no diagnóstico veterinário (CÉRON; ECKERSALL; MARTINÉZ-SUBIELA, 2005).

A simbiose entre hemostasia, câncer e inflamação, novamente, pode justificar a hiperfibrinogenemia nos pacientes com neoplasia mamária. A inflamação associada ao processo neoplásico e o próprio microambiente tumoral levam à produção de citocinas inflamatórias, como a IL-6, promovendo produção hepática do fibrinogênio (LEVI; van der POLL, 2005). A presença da hiperfibrinogenemia já foi associada ao quadro de hipercoagulabilidade em pacientes com carcinoma (ANDREASEN *et al.*, 2016) e no hiperadrenocorticism, sendo que estes pacientes apresentaram maior potencial de geração de trombina e conseqüentemente fibrina (VARGAS-MORA, *et al.*, 2021).

Além de potencializar o risco trombótico no paciente com câncer, o fibrinogênio, pode atuar, também, no crescimento tumoral, promovendo proliferação celular e, conseqüentemente mais produção de IL-6 (LEVI; van der POLL, 2005). Segundo Cao *et al.* (2020) o fibrinogênio está presente no estroma de tumores sólidos, promovendo um possível sítio para a agregação plaquetária, mediando a proliferação celular e formando uma matriz extracelular que se liga às superfícies das células tumorais formando potenciais CTDs.

Andreasen *et al.* (2012) associaram a hiperfibrinogenemia e o discreto prolongamento da mediana do TTPa a alterações pró-inflamatórias no microambiente tumoral em pacientes em que foram evidenciados sinais de hipercoagulabilidade na tromboelastometria. Acredita-se que o mesmo mecanismo possa estar acontecendo com as pacientes dos grupos CIM e NMCM deste estudo, uma vez que apresentaram perfil semelhante para fibrinogênio e TTPa, conforme os achados de Saavedra *et al.*

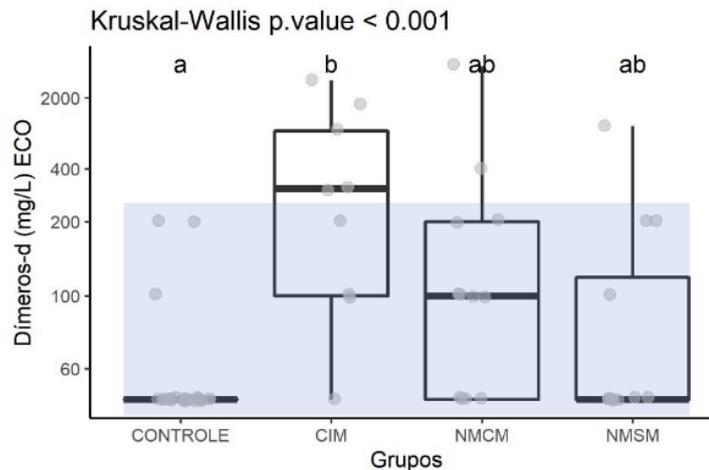
(2011), que concluíram que a hiperfibrinogenemia, de fato, tem ação na hipercoagulabilidade dos carcinomas.

A hiperfibrinogenemia pode ser um dos elementos responsáveis pela progressão da doença (STOCKHAUS *et al.*; 1999) e já foi observada, em cães com neoplasia mamária, de forma mais pronunciada em graus avançados da neoplasia, como nos graus histopatológicos II e III, nos pacientes com tumores maiores que cinco centímetros e com presença de metástase (de OLIVEIRA *et al.*, 2019). Pacientes com presença de metástase distante, como as do grupo NMCM, podem apresentar hiperfibrinogenemia e aumento da concentração de dímeros-d, quando comparados aos pacientes sem metástase ou com metástase local, tal como descreveram Andreasen *et al.* (2012) o que pode estar associado aos efeitos na neoplasia do fibrinogênio e vice e versa, como mencionaram CAO *et al.* (2020).

7.5. Dímeros-d

A mediana da concentração dos dímeros-d das pacientes do grupo CIM foi maior que a da do grupo CONTROLE. Os grupos NMSM e NMCM foram semelhantes ao grupo CONTROLE e ao grupo CIM.

Gráfico 5. Concentração de dímeros-d no grupo de cães hígdidos- CONTROLE (n=25); grupo de cães com carcinoma inflamatório mamário- CIM (n=9), grupo de cães com neoplasia mamária com metástase- NMCM (n=12); grupo de cães com neoplasia mamária sem metástase- NMSM (n=12).



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,001$) teste de Kruskal-Wallis. As partes superior e inferior da caixa indicam os quartis superior e inferior, respectivamente, a linha horizontal representa o valor mediano e a linha vertical se estende do valor mínimo ao valor máximo. Caixa azul: valor de referência considerado do grupo CONTROLE.

Os dímeros-d, são fragmentos da fibrina cruzada, degradada pela plasmina no processo de fibrinólise (WEITZ *et al.*, 2017). Concentrações aumentadas de dímeros podem estar relacionadas a processos de fibrinólise aumentada ou diminuição no *clearance* destes por disfunção hepática ou renal (STOCKHAM e SCOTT, 2008). Infelizmente, o diagnóstico da trombose e da hipercoagulabilidade não são possíveis com o uso dos dímeros-d em isolado, visto que este teste tem um significativo valor preditivo negativo (WIINBERG *et al.*, 2010).

No presente estudo, a elevação da concentração dos dímeros-d foi observada em cinco das nove pacientes avaliadas no grupo CIM (55,6%), utilizando o valor de referência indicado pelo fabricante (> 300 mg/mL ou $0,3$ μ g/mL). Segundo o fabricante,

concentrações acima de 0,5 µg/mL (ECO Diagnóstica) são fortemente associadas a tromboembolismo pulmonar (TEP). Destes cinco pacientes, dois apresentavam concentrações de fibrinogênio superiores a 500 mg/dL, entretanto, o diagnóstico de TEP ou hiperfibrinólise não pôde ser confirmado. Assim a maior concentração de dímeros -d nestes pacientes pode estar associada à inflamação desencadeada pelo processo neoplásico, como descreveram Schutte *et al.* (2015). Embora não exista diferença significativa entre os grupos com neoplasia mamária, os achados sugerem uma possível relação entre os níveis de dímero-d e o estadiamento do tumor, indicando que, em pacientes com doença em estágio mais avançado, como os presentes nos grupos CIM e NMCM a concentração plasmática de dímeros-d pode estar associada à morbidade do processo e, dessa forma ao pior prognóstico, tal como relataram Halaby *et al.* (2015).

A hiperfibrinólise desencadeada pelo câncer já foi descrita por Dano *et al.* (2005). Tanto o t-PA quanto o u-PA são expressos nas células da neoplasia, sendo o u-PA principalmente envolvido em funções celulares e o t-PA na regulação da deposição de fibrina intravascular. No mecanismo inibitório da fibrinólise, já foi descrita a participação do PAI-1 na patogênese de muitas doenças vasculares e no câncer. Assim, pode-se propor que a presença da produção de elementos fibrinolíticos pelas células tumorais, induziriam a maiores concentrações de produtos de degradação da fibrina, dentre eles os dímeros-d.

Os níveis plasmáticos de dímeros-d já foram relacionados à invasão linfovascular, estágio clínico e envolvimento de linfonodos no câncer de mama em mulheres, sendo considerado um marcador clinicamente importante de metástase tumoral precoce (BLACKWELL *et al.*, 2000), assim como recomendaram Lu *et al.* (2019), em uma meta análise, onde as concentrações dos dímeros-d foram utilizadas, não apenas para o estadiamento das pacientes com câncer de mama, mas também para o diagnóstico precoce. Segundo os autores, os casos de óbito em mulheres chegam a ser maiores do que 40% e aumentam a medida em que o diagnóstico é mais tardio. Os mesmos autores ainda mencionam haver uma associação direta entre

as concentrações dos dímeros -d e a característica hormonal do tumor, assim como a presença de metástase. Todas estas observações explicam as diferenças encontradas no presente estudo, em que tanto o processo inflamatório, bem como a presença de metástases contribuíram para o aumento das concentrações de dímeros-d nas pacientes dos grupos CIM e NMCM, embora NMCM sem diferença estatística do controle.

Na medicina veterinária, as informações concretas sobre a incidência de tromboembolismo em pacientes com neoplasias são deficientes (ANDREASEN *et al.*, 2016), entretanto CHILDRESS (2012) consideraram que a neoplasia seja uma das principais causas de tromboembolismo em pequenos animais, contribuindo significativamente para a morbidade e mortalidade nestes pacientes.

Portanto, a condição de hipercoagulabilidade nos pacientes com neoplasia mamária, em especial dos grupos CIM e NMCM, deve ser considerada e pode estar refletida na associação de testes hemostáticos como contagem de plaquetas, determinação dos tempos de coagulação (TP, TTPa, TT), concentração de dímeros-d e, deve ser especialmente correlacionada ao quadro clínico apresentado pelo paciente. De acordo com Cui *et al.* (2019) 50% dos casos de trombose venosa profunda em mulheres portadoras de câncer de mama são subclínicos e aumentam exponencialmente as taxas de óbito. Para melhor interpretar estes casos os autores recomendaram a associação das concentrações dos dímeros-d ao volume plaquetário médio (VPM). De acordo com seus resultados, portadoras de câncer tem uma predisposição a apresentarem redução no VPM quando em estado de tromboembolismo venoso.

A falta de diferença observada nas pacientes do NMSM pode estar associada a dispersão das variáveis do estudo, com coeficientes de variação, de certa forma, amplos e devido à forma com que os pacientes foram alocados. É possível que o comprometimento hemostático no grupo NMSM seja menos pronunciado do que nos

demais grupos, e que ocorra para os pacientes com tumores de graduação histológica mais avançada (de OLIVEIRA *et al.*, 2019).

8. CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi conduzido, pode se concluir que as neoplasias mamárias induzem alterações hemostáticas hipercoaguláveis, devido a processos inflamatórios, mais pronunciadamente observado em pacientes portadores de carcinoma inflamatório.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da identificação, patogenia e o diagnóstico das alterações hemostáticas serem melhores estabelecidas na medicina humana, a realidade do médico veterinário é bem diferente. O diagnóstico das alterações hemostáticas no paciente veterinário não é sensível o suficiente, não permitindo a intervenção precoce, principalmente nos casos de hipercoagulabilidade.

Neste estudo foi possível observar o quanto a avaliação hemostática fundamental para a avaliação clínica do paciente oncológico. Também, sugere-se que o comprometimento hemostático, decorrente principalmente do processo inflamatório, mais evidente pode estar associado ao estadiamento clínico mais avançado da doença (estádios IV e V) nos pacientes com neoplasia mamária e com carcinoma inflamatório.

Os testes hemostáticos utilizados: concentração de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, fibrinogênio e os dímeros-d refletem, em parte o comprometimento hemostático nos pacientes com neoplasia mamária com metástase e carcinoma inflamatório. Embora possam sugerir o risco protrombótico, não são sensíveis para o diagnóstico da hipercoagulabilidade e para os quadros de coagulação intravascular disseminada não evidente se utilizados de forma isolada, portanto é importante que estes achados sejam interpretados de forma

conjunta considerando principalmente a condição capaz de perturbar o equilíbrio hemostático.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os avanços nos estudos e no conhecimento sobre oncologia veterinária, a demanda por um melhor diagnóstico, manejo, tratamento e prognóstico do paciente com neoplasia mamária é cada vez maior.

As alterações hemostáticas nos pacientes veterinários, em especial nas neoplasias mamárias, é uma linha de estudo que necessita de maior investigação. Ainda há muito a se esclarecer em relação à patofisiologia da condição, como também, é necessário o desenvolvimento de métodos que sejam mais sensíveis para o diagnóstico dos estados de hipercoagulabilidade e diagnóstico de trombose.

Nestas perspectivas incluem-se a avaliação do volume plaquetário médio, a dosagem e fenotipagem das micropartículas, o teste de potencial de geração de trombina bem como a pesquisa das células tumorais disseminadas e a sua correlação com o comprometimento hemostático nestes pacientes.

Também se faz necessário pesquisar e elucidar a interação da inflamação e hemostasia no paciente oncológico.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENZA, M.D.P; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). *JAVMA*, v.219, n.8, 2001.

ALONSO-MIGUEL, D.; VALDIVIA, G.; GÁRCIA-SAN-JOSE, P. *et al.* Clinical outcome of dogs diagnosed with canine inflammatory mammary cancer treated with metronomic cyclophosphamide, a cyclooxygenase-2 inhibitor and toceranib phosphate. *Vet Comp Oncol*, p.1-10, 2021.

ANDREASEN, E.B.; NIELSEN, O.L.; TRANHOLM, M. *et al.* Expression of tissue factor in canine mammary tumours and correlation with grade, stage and markers of haemostasis and inflammation. *Vet Comp Oncol*, v. 14, n.2, p.191-201, 2016.

ANDREASEN, E.B.; TRANHOLM, M.; WIINBERG, B. *et al.* Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression. *Acta Vet Scand* v.54, n.3, p. 1-8, 2012.

BARRENO, L.; CÁCERES, S.; ALONSO-DIEZ, A.; *et al.* Vasculogenic mimicry-associated ultrastructural findings in human and canine inflammatory breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, v. 19, n.750, p.1-9.

BAYLEY, D.B. Paraneoplastic syndromes. In: VAIL, D.M; THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. *Withrow and MacEwen's Small Animal Oncology*. 6. ed. Missouri, 2020. p.98-107.

BUERGY, D.; WENZ, F.; BROCKMANN, M.A. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*, v.130, p.2747-2760, 2012.

CASSALI, G.D; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors 2013. *BJVP*, v. 13, n.3, p. 38-69, 2014.

CASSALI, G.D; JARK, P., G.E.; GAMBA, C.; *et al.* Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors. *BJVP*, v. 13, n.3, p. 555-574, 2020.

CATANI, M.V.; SAVINI, I.; TULLIO, V.; *et al.* The “janus face” of platelets in cancer. *Int J Mol Sci*, v.21, n.788, p. 1-23, 2020.

CÉRON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTINÉZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Path*, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. *Vet Clin N Am*, v. 42, n. 1., p. 123-155, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE(CLSI/ NCCLS).
Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture;
Approved Standard – 6th Ed. CLSI/NCCLS Document H3-A6 v.27, n.26, Wayne, PA
USA:NCCLS, 2008.

CREMER, S.E.; KROGH, A.K.H; HEDSTRÖM, M.E.K *et al.* Analytical validation of a flow cytometric protocol for quantification of platelet microparticles in dogs. *Vet Clin Path*, v.47, n.2. p.186-196.

CUI, L.; LI, N.; FU, S. *et al.* Combination of preoperative d-dimer and mean platelet volume predicts post operative deep venous thrombosis in breast cancer patients. *Cancer Biomark*, v.21,n.4, p. 909-913, 2018.

DANO, K.; BEHRENDT, N.; HEYER-HANSEN, G. *et al.* Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*, n.93, n.4, p.676-681, 2005.

DAVENPORT, A.P.; HYNDMAN, K.A.; DHAUN, N. *et al.* Endothelin. *Pharmacol Rev*.v.68, n.2, p.257-418, 2016.

de OLIVEIRA, J.R.; CAMPLESI, A.C.; CALAZANS, S.G. *et al.* Evaluation of Hemostasis in Female Dogs with Mammary Carcinoma and the Influence of Clinical Stage and Histopathological Grade. *Acta Sci Vet* v.47, 2019.

de OLIVEIRA, M.R. Pesquisa de células tumorais disseminadas em medula óssea, alterações hematológicas e bioquímicas em cadelas com neoplasia mamária em estadiamento clínico avançado. 76 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/38676>>.

de OLIVEIRA, M.R.; SILVEIRA, T.L., CARNEIRO, R.A. *et al.* Bone marrow metastasis in inflammatory mammary carcinoma: A case report in dog. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v.8, m.10, p.1087-1090.

DUARTE, R.C.F.; RIOS, D.R.A; REZENDE, S.M.; *et al.* Standardization and evaluation of the performance of the thrombin generation test under hypo- and hypercoagulability conditions. *Hematol Transfus Cell Ther*, in press, 2018.

DUDA, N.C.; VALLE, S.F.; MATHEUS, J.P. *et al.* Paraneoplastic hematological, biochemical, and hemostatic abnormalities in female dogs with mammary neoplasms. *Pesqui Vet Brasil*, v,37, n. 5, p. 479-484, 2017.

DUDLEY, A.C. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2:a006536, 2012.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost*, v.11, p.223-233, 2013.

FAREED, J.; WALENGA, J.M.; KUMAR, A. *et al.* A modified stasis thrombosis model to study the antithrombotic actions of heparin and its fractions. *Semin Thromb Hemost*, v,11, p. 155–175, 1985.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Ver Bras Hematol Hemoter*, v.35, n.5, 416-421, 2010.

FRANCO-MARTINÉZ, L.; GELEMANOVIC, A.; HORVATIC, A. *et al.* Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine Mammary Tumors. *Animals* v.10. n.741, 2020.

GEDDINGS, J.E.; MACKMAN, N. Recently Identified Factors that Regulate Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost*, v.111.n.4, p.570-574, 2014.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten, D. J. Tumors in domestic animals. 5. Ed, p. 723 – 765, 2017.

HALABY, R.; POPMA, C.J.; COHEN, A. D-dimer elevation and adverse outcomes. *J Thromb Thrombolysis*, v.39, p.55-59, 2019.

HARVEY, J.W. Evaluation of Hemostasis Coagulation and Platelet Disorders. In: HARVEY, J.W. Veterinary-Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas. St Louis: Elsevier Saunders, 2012, p.191-233.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemostasis*. v. 85, n.6, p.958-965, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa nacional de Saúde de 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. p.105. Disponível em:<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/saude.html>>. Acesso em 15 nov. 2021.

JAILLARDON, L.; BARTHÉLEMY, A.; GOY-THOLLOT, I. *et al.* Mammary gland carcinoma in a dog with peripheral blood and bone marrow involvement associated with disseminated intravascular coagulation. *Vet Clin Path*, n.41, n.2, p.261-265, 2012.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p

KHORANA, A. A. PL-02 risk assessment for cancer-associated thrombosis: What is the best approach? *Thromb Res. Anais*, 2012.

KRISTENSEN, A.T.; WIINGERG, B.; JESSEN, L.R. Evaluation of human recombinant tissue factor- activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *J Vet Intern Med*, v. 22, p.140-147, 2008.

KURATA, M.; SASAYAMA, Y.; YAMASAKI, N. *et al.* Mechanism for shortening PT and TTPa in dogs and rats – Effect of fibrinogen on PT and aTTP. *J Toxicol Sci*, v.28, n.5, p.439-443, 2003.

LANGHORN, R.; BOCHSEN, L.; WILSEN, J.L. *et al.* Thromboelastography-guided transfusion in dogs with hypocoagulable disorders: a case series. *Acta Vet Scandj*, v.61, n.35, 2019.

LEVI, M. Disseminated intravascular coagulation in cancer patients. *Best Pract Res Cl Ha*, v.22, p.129-136, 2009.

LEVI, M.; van der POLL. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med*, v.15, n.7, p. 254-259, 2005.

LIMA, L.G.; CHAMMAS, R.; MONTEIRO, R.Q.; *et al.* Tumor-derived micro vesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidilserine-dependent manner, *Cancer Lett*, v.283, p.168-175, 2009.

LU, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Q. *et al.* The association of d-dimer with clinicopathological features of breast cancer and its usefulness in differential diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *PLos One*, v.14, n.9, 2019.

MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D. *et al.* Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). *Javma-J Am Vet Med A*, v.235, n.8, p. 967- 972, 2009.

MINEO, H.K.; GARABED, R.B. Evaluation of a bench-top coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen concentrations in healthy dogs. *Am J Vet Res*, v.68, n.12, p.1342-1347, 2007.

MITCHEL, R.N. Hemodynamic Disorders, Thromboembolic Disease, and Shock. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 10. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2020. p. 115-139.

MOLDAL, E.R.; KRISTENSEN, A.T.; PEETERS, M.E. *et al.* Hemostatic response to surgical neutering via ovariectomy and ovariohysterectomy in dogs. *Am J Vet Res*, n.73, n.9, p.1469-1476.

MORSELLI, M.; LONGO, G.; BONACORSI, G. *et al.* Anticoagulant pseudothrombocytopenia with platelet satellitism. *Haematologica*, v.84, n.7, 1999.

NASSER, N.J.; FOX J.; AGBARYA A. Potential Mechanisms of Cancer-Related Hypercoagulability. *Cancers (Basel)*, v.29, n.12, 2020.

NICKEL, K.F.; RONQUIST, G.; LANGER, F. *et al.* The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood*, v.126, n.11. p.1379-1389.

PEÑA, L.; SILVÁN, G.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; *et al.* Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem*, v.84, p.211-216, 2003.

PÉREZ-ALENZA M.D. TABANERA, F, PEÑA L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *Javma-J Am Vet Med A*, v. 218, n.8, p. 1110- 1114, 2001.

PLANTUREUX, L.; MÈGE, D.; CRESCENCE, L.; *et al.* Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis. *Cancers (Basel)*, v.10, n.11,p.1-23, 2018.

PINHO, V. F.; COUTINHO, E. S. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 2, p. 351-360, 2005

RIBEIRO, L.G.R; ESTRELA-LIMA, A.; CASSALI, G.D. Apresentações clínicopatológicas de carcinomas mamários In: CASSALI, G.D.; FERREIRA, E.; CAMPOS, C.B. Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento. MedVet, São Paulo, 2017 p.117-121.

SAAVEDRA, P.V.; GARCÍA, A.L.; LÓPEZ, S.Z. *et al.* Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: A thromboelastographic characterization of hypercoagulability. *Vet J*, v.190, p.78-83, 2011.

SCHUTTE, T.; THIJS, A. SMULDERS, Y.M. Never ignore extremely elevated d-dimer levels: they are specific for serious illness. *Neth J Med*, v.74, n.10, 443-448, 2016.

SHUSTOVA, O.N.; ANTONOVA, O.A.; GOLUBEVA, N. V. *et al.* Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells. *Blood Coagul Fibrin*, v. 28, p. 373–382, 2017.

SONG, J.; DROBATZ, K.J.; SILVERSTEIN, D.C. Retrospective evaluation of shortened prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006–2011). *J Vet Emerg Crit Car*, v.26, n.3. p.398-405.

SORENMO,K.U.; RASOTTO, R.; ZAPULLI,V. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; ZAPULLI,V. Tumors of mammary gland. In: VAIL, D.M; THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. Withrow and MacEwen's Small Animal Oncology. 6. ed. Missouri, 2020, p.604-621.

STOCKHAM, S.L; SCOTT, M.A. Hemostasis. In: STOCKHAM, S.L; SCOTT, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. 2. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008, p.261–312.

STOKOL, T.; DADDONA, J.L.; MUBAYED, L.S; *et al.* Evaluation of tissue factor expression in canine tumor cells. *Am J Vet Res*, v.72, n.8, p.1097-106, 2011.

STONE, R. L.; NICK, A.; MCNEISH, I.A. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *New Engl J Med*, v.366, p. 610–618.

SURAJ, J.; KURPINKA, A.; ZAKRZVESKA, A. *et al.* Early and late endothelial response in breast cancer metastasis in mice: simultaneous quantification of endothelial biomarkers using a mass spectrometry-based method. *Dis Model Mech*, v. 13, n.3, 2019.

SYLMAN, J.L.; MITRUGNO, A.; TORMOEN, G.W. *et al.* Platelet count as a predictor of metastasis and venous thromboembolism in patients with cancer. *Converg Sci Phys Oncol*, v. 3 023001, 2017.

TAUCHER, S.; SALAT, A.; GNANT, M.G. *et al.* Impact of pretreatment thrombocytosis on survival in primary breast cancer. *Thromb. Haemost*, v.89,n.6, p.1098–1106, 2003.

TOH, C.H.; ALHMANDI, Y. Current consideration and management of disseminated intravascular coagulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p.286-291, 2013.

TOTH, B.; LIEBHARDT, S.; STEINING, K. Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thromb Haemost*, v.100, n.4, p.663-669.

TRENTIN, T.C. Aplicação de testes hemostáticos na avaliação do risco trombótico em cadelas com carcinoma mamário. 2014. 94 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/124095>>.

VAIL, D.M; THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. Why worry about cancer in pets? Introduction. In: VAIL, D.M; THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. *Withrow and MacEwen's Small Animal Oncology*. 6. ed. Missouri, 2020, p.20-21.

VARGAS-MORA, S.E.; ROMÃO, F. G.; SANTOS, B. *et al.* Thrombin Generation Assay and Hemostatic Profile for Elucidating Hypercoagulability in Endogenous Canine Hyperadrenocorticism. *Topics in Companion An Med*, v.45, 2021.

VERSTEEG, H.H.; HEEMSKERK, J.W.M; LEVI, M. *et al.* New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, v.93, p.327-358, 2013.

WEITZ, J.I.; FREDENBURGH, J.C.; EIKELBOOM, J.W. A test in context: D-dimer. *JACC*, v. 70, n.19, p.2411-2420, 2017

WIINBERG, B.; JENSEN, A.L.; JOHANSSON, P.I. *et al.* Development of a model-based scoring system for diagnosis of canine disseminated intravascular coagulation with independent assessment of sensitivity and specificity. *Vet J*, n185, p.292-298, 2010.

WIINBERG, B.; JENSEN, A.L.; JOHANSSON, P.I. *et al.* Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *J Vet Intern Med*, n.22, p.357–365.

WOLF, W.C.; EVANS, D.M, CHAO, L. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *Am J Pathol*, v.159, p.1797-1805.

ZABOROWSKI, M.P.; BALAJ, L.; BREAKFIELD, X.O. *et al.* Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, v.65, n.8, p.783-797, 2015.

12. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação CEUA- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 371/2019
Título do projeto: Perfil hemostático e determinação de micropartículas em cães com neoplasia mamária
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Fabiola de Oliveira Paes Leme
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião "on line" do dia 06/04/2020. Validade: 06/04/2020 à 05/04/2025.

Belo Horizonte, 06/04/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2 – TCLE para pacientes oncológicos

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Perfil hemostático e avaliação de micropartículas plaquetárias em cães saudáveis e com neoplasia mamária”**. Pedimos sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte do material biológico de seu animal. A utilização do material biológico e das informações clínicas obtidas está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se o (a) Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos avaliar e comparar perfil hemostático e a expressão de micropartículas plaquetárias em cães saudáveis e cães com neoplasia mamária.

Para tal serão colhidas amostras de sangue por venopunção de vaso periférico (preferencialmente jugular externa) em momento único durante o atendimento clínico previsto na rotina de atendimento de tais pacientes pelo protocolo padrão do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG que tem como potenciais riscos a formação de hematoma. A pesquisa contribuirá para o melhor entendimento e desenvolvimento de meios diagnósticos de risco trombótico em cães.

Para participar deste estudo o (a) Sr. (a) não terá nenhum custo relacionado aos testes de hemostasia, nem receberá qualquer vantagem financeira. Tais testes são fundamentais no entendimento e diagnóstico de possíveis estados pré-trombóticos. Além disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o (a) Sr. (a) tem assegurado o direito à indenização. Ressalva-se que os custos relacionados à consulta, hemograma, perfil bioquímico e exames de imagem não estão inclusos na isenção, uma vez que fazem parte dos exames e da conduta previstos na rotina de atendimento destes pacientes.

O (A) Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o (a) Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome, o nome de seu cão ou o material que indique a participação não serão liberados sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Escola de Veterinária da UFMG, e a outra será fornecida ao (à) Senhor (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 128 da Escola de Veterinária da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira

(Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de
Identidade _____ e tutor do cão

_____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "**Perfil hemostático e avaliação de micropartículas plaquetárias em cães saudáveis e com neoplasia mamária**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o material biológico do meu cão seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o material biológico do meu cão possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Fabiola de Oliveira Paes Leme

Endereço: Escola de Veterinária da UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha

CEP: 31270-901/ São Luiz, Belo Horizonte – MG.

Telefone: (31) 3409-2000

E-mail: fabiola.ufmg@gmail.com



Assinatura do pesquisador responsável

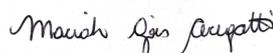
Data

Mariah Gois Ceregatti

Endereço: Escola de Veterinária da UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha

CEP: 31270-901/ São Luiz, Belo Horizonte – MG.

E-mail: mceregatti@ufmg.br



Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar: COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade

Administrativa II - 2º andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 3409-4592

(Anexo 3)- Hemogramas individuais dos pacientes com carcinoma inflamatório mamário.

Variável	Pacientes									Valores de Referência*	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mínimo	Máximo
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	6,28	3,66	6,89	5,50	4,70	6,36	4,35	6,72	7,28	5,5	8,5
Hemoglobina (g/dL)	15,2	8,9	15,1	11,6	10,7	14,2	8,8	15,8	16,7	12	18
Hematócrito (%)	43	27	47	34	36	44	27	43	48	37	55
VCM (fL)	85,6	60,8	75,8	73,1	73,1	73,1	73,1	64,0	65,9	60	77
CHCM	35,4	32,9	32,1	34,1	29,7	32,3	32,7	36,7	34,8	32	36
HCM (g/dL)	24,2	13,1	21,9	21,1	22,8	22,3	20,3	23,5	22,9	19,9	24,5
RDW (%)	14,2	13,1	14,2	20,3	14,4	15,4	15,7	185	14,2	12	15
Plaquetas (x10 ³ /μL)	340	443	82	492	573	246	60	185	56	175	500
Agregados plaquetários	0	0	3+	0	3+	3+	0	3+	3+	Ausentes	
Leucócitos (x10³/μL)	7,0	21,1	33,3	11,5	11,8	8,21	33,3	11,1	5,83	6,0	17,0
Mielócitos (/μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Metamielócitos (/μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bastonetes (/μL)	0	0	0	0	118	0	333	0	0	0	300
Segmentados (/μL)	5180	15403	25308	9315	9440	6733	26640	7548	4431	3000	11500
Linfócitos (/μL)	1520	211	2664	1035	944	493	1998	2886	933	1000	4800
Eosinófilos (/μL)	210	1899	4995	575	236	246	0	111	233	150	1250
Basófilos (/μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	Raros	
Monócitos (/μL)	70	3587	333	575	1062	3200	4329	555	3200	150	1350
Aspecto do plasma	CE	DH	DH	DH	DH	CE	DH	DH/DL	CE	CE	
Observações	Discreto (1+), Moderado (2+), Intenso (3+)										
	Característico da espécie (CE), Discretamente hemolisado (DH), Discretamente lipêmico (DL)										

(Anexo 4)- Avaliações histológicas, utilizando a classificação de Cassali *et al.*, 2014, dos pacientes com neoplasias mamárias deste estudo - Parte 1.

Paciente	Grupo	Diagnóstico histológico
1	NMSM	MAbdCr direita: Carcinoma em tumor misto, MIng direita: tumor misto benigno, MAbdCd direita: Carcinoma em tumor misto/papiloma
2	CMI	Diagnóstico clínico
3	NMCM	MTCr esquerda: Tumor misto benigno, AbdCd direita: tumor misto benigno, linfonodo axilar direito: micrometástase focal bloco mamário Cd esquerdo: Carcinoma em tumor misto grau I
4	NMCM	MAbCd: Carcinoma em tumor misto, MIng: carcinoma sólido grau III, figado: Adenocarcinoma- sugerindo carcinoma sólido da mama.
5	NMSM	Ming esquerda: Tumor misto benigno, MTCd esquerda: carcinoma <i>in situ</i> , MTCd direita: tumor misto benigno MAbCr esquerda: carcinoma <i>in situ</i>
6	NMCM	Não teve biópsia, tumor com metástase em pulmão (Imagem)
7	CMI	Não foi realizado avaliação histopatológica.
8	NMCM	Mamas não identificadas no exame histológico: Carcinoma tubular GRAU III, carcinoma tubular com areas micropapilares <i>in situ</i> III. MIng esquerda: Carcinoma em tumor misto, linfonodo inguinal esquerdo : metástase de carconoma tipo misto
9	NMSM	MAbCr: Carcinoma em tumor misto
10	NMSM	Ming esquerda: Carcinoma em tumor misto grau I
11	NMCM	Diagnóstico clínico e imaginológico: Tumor com metástase em pulmão e possivelmente sistema nervoso central
12	NMCM	MIng direita: Carcinoma papilar invasor, MAbCd esquerda: carcinoma papilar invasor, linfonodo ing direito: micrometástases multifocais

(Anexo 4)- Avaliações histológicas, utilizando a classificação de Cassali *et al.*, 2014, dos pacientes com neoplasias mamárias deste estudo - Parte 2.

Paciente	Grupo	Diagnóstico histológico
13	NMCM	Entre MAbCd e MIng: Carcinoma papilar invasor com áreas micropapilares in situ, grau II; linfonodo Ing: áreas de micrometástase
14	NMCM	MTCd esquerda: Carcinoma em tumor misto, MABCr esquerda: carcinoma papilar invasor, MIng esquerda: adenomioepitelioma maligno e carcinoma em tumor misto, Não identificado: carcinoma basalóide grau II, MTCr direita: tumor misto benigno, Não identificado: carcinoma em tumor misto, Não identificado: carcinoma papilar invasor. Imagem: metástase pulmonar
15	CIM	Carcinoma lobular pleomórfico com invasão linfática
16	CIM	Diagnóstico clínico
17	CIM	Diagnóstico clínico
18	NMSM	MTCr direita: Carcinoma em tumor misto, MTCd direita: carcinoma em tumor misto e MIng: carcinoma em tumor misto.
19	NMSM	MIng direita: Carcinoma túbulo-papilar baixo grau (grau I) e carcinoma ductal in situ
20	NMSM	Carcinoma papilar invasor/papiloma, carcinoma papilar in situ em tumor misto
21	NMSM	Carcinoma em tumor misto com áreas micropapilares in situ e tumor misto benigno, carcinoma em tumor misto e lipoma (?)
22	NMSM	MABCd: Ectasia de glândula moderada e carcinoma papilífero simples com margens comprometidas, MIng: carcinoma tubular simples margens estreitas.
23	NMSM	MTCd direita: Adenomioepitelioma benigno, MIng esquerda: adenoma tubular.

(Anexo 4)- Avaliações histológicas, utilizando a classificação de Cassali *et al.*, 2014, dos pacientes com neoplasias mamárias deste estudo - Parte 3.

Paciente	Grupo	Diagnóstico histológico
24	NMCM	MTCr: Carcinoma micropapilar invasivo grau II, MACr: adenoma tubular simples, Linfonodo axilar direito: macrometástase de neoplasia mamária com extensão extracapsular
25	NMSM	MTCd: Carcinoma em tumor misto in situ
26	NMCM	Diagnóstico clínico
27	NMCM	MABCr esquerda: Tumor misto grau II, imagem: comprometimento pulmonar
28	CIM	Diagnóstico clínico
29	NMCM	MABCr: Ectasia ductal difusa moderada; MABCd: tumor misto benigno; MIng: carcinoma em tumor misto; linfonodo Ing: macrometástase de neoplasia mamária
30	CIM	Diagnóstico clínico
31	CIM	Diagnóstico clínico
32	CIM	Diagnóstico clínico
33	NMSM	MABCr: Carcinoma em tumor misto

Abd- abdominal; **CIM-** Carcinoma inflamatório mamário; **Cd-** caudal, **Cr-** cranial; **Ing-** inguinal; **M-** mama; **NMSM-** neoplasia mamária sem metástase, **NMCM-** Neoplasia mamária com metástase, **T-** torácica,