

Université de Montréal

Caractérisation de l'état hypercoagulable associé à  
l'hyperadrénocorticisme chez le chien

par

LARA ROSE

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

26 avril 2011

©Lara Rose, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé  
Caractérisation de l'état hypercoagulable associé à  
l'hyperadrénocorticisme chez le chien

présenté par

Lara Rose

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie-Claude Blais, présidente-rapporteuse

Marilyn Dunn, directrice de recherche

Christian Bédard, codirecteur de recherche

Patrick Burns, membre du jury

# Résumé

Cette étude avait comme objectif d'évaluer la coagulation par l'utilisation de la thrombélastographie (TEG®) et de la génération de thrombine (GT) chez des beagles en santé recevant de la prednisone ainsi que chez des chiens atteints d'hyperadrénocorticisme (HAC).

Dans un premier temps, six beagles adultes en santé ont été évalués dans une étude prospective longitudinale au cours de laquelle chaque individu recevait 1 mg/kg/jour de prednisone par la voie orale pendant 2 semaines. Après un arrêt de traitement d'une durée de 6 semaines, ils ont finalement reçu 4 mg/kg/jour de prednisone pour encore 2 semaines. Les tracés TEG® et les mesures de la GT ont été obtenus au temps 0, à la fin des 6 semaines d'interruption de traitement, ainsi qu'à la suite des 2 dosages de prednisone. Suite aux 2 traitements avec la prednisone, des résultats significatifs, lorsque comparés aux valeurs de base, ont été obtenus pour la cinétique du caillot (« clot kinetics » ou K), l'angle alpha ( $\alpha$ ) et l'amplitude maximale (« maximal amplitude » ou MA). La GT avait augmenté de manière significative mais seulement après la dose de 1 mg/kg/jour de prednisone.

Dans un deuxième temps, 16 chiens atteints d'HAC ont été évalués avant l'initiation d'un traitement pour leur condition. Quinze chiens ont été évalués par TEG® et 15 par GT. Les données obtenues ont ensuite été comparées aux valeurs normales. L'analyse par TEG® a démontré que 12/15 chiens avaient au moins un paramètre suggérant un état d'hypercoagulabilité. L'analyse par GT a démontré que 4/15 chiens avaient des changements compatibles avec un état d'hypercoagulabilité. Un test t-pairé pour des valeurs de variance inégales a démontré que le groupe de chiens atteints d'HAC avait des tracés hypercoagulables et un potentiel endogène de thrombine (« endogenous thrombin potential » ou ETP) plus élevé, lorsque comparé à la population de référence.

**Mots-clés :** Hypercoagulable, prednisone, Cushing, hyperadrocorticisme, thrombélastographie, génération de thrombine, coagulation, canine

# Abstract

The purpose of this study was to use thrombelastography (TEG®) and thrombin generation (TG) to evaluate coagulation in healthy beagles receiving oral prednisone as well as client-owned dogs diagnosed with hyperadrenocorticism (HAC).

Six healthy adult beagles were used in a prospective longitudinal study whereby all dogs received 1 mg/kg of prednisone orally once daily for two weeks, followed by a 6-week washout period and then 4 mg/kg of prednisone orally once daily for two weeks. TEG® tracings and TG measurements were obtained at baseline, at the end of the washout period and at the end of both corticosteroid trials. Significant results as compared to baseline were obtained for clot kinetics (K), alpha angle ( $\alpha$ ) and maximum amplitude (MA), with tracings compatible with a hypercoagulable profile following both corticosteroid trials. Thrombin generation resulted in a significant increase in endogenous thrombin potential (ETP) after the 1 mg/kg/day trial only.

Secondly, sixteen dogs affected by HAC were evaluated. Fifteen dogs were evaluated by TEG® and 15 dogs were evaluated by TG before treatment and compared to the normal reference values. For the TEG® analysis, 12/15 dogs had at least one parameter that suggested hypercoagulability. A paired t test for values with unequal variance was used to compare the HAC dogs to the healthy dogs and found that HAC dogs have hypercoagulable TEG® tracings. The same results were found when TG was used with the ETP elevated in the HAC dogs. However, when dogs were evaluated individually, only 4/15 had hypercoagulable TG results.

**Keywords:** Hypercoagulable, prednisone, Cushing, hyperadrenocorticism, thrombelastography, thrombin generation, coagulation, canine

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension des écrits.....	6
1.    Syndrome de Cushing canin (Hyperadrénocorticisme).....	7
A.    Pathophysiologie.....	7
B.    Signalement et signes cliniques.....	9
C.    Anomalies clinicopathologiques les plus fréquentes.....	10
a.    Hématologie.....	10
b.    Glucose.....	11
c.    Alanine aminotransférase (ALT) et phosphatase alcaline (ALP).....	11
d.    Cholestérol, triglycérides et lipémie.....	12
e.    Analyse urinaire.....	12
I.    Densité urinaire.....	12
II.   Protéinurie.....	12
III.  Infection.....	13
D.    Diagnostic.....	13
a.    Tests de dépistage.....	13
I.    Ratio cortisol : créatinine urinaire.....	13
II.   Stimulation à l'ACTH (corticotropin).....	14
III.  Freinage à la dexaméthasone faible dose.....	15
b.    Tests de différentiation.....	16
I.    Freinage à la dexaméthasone faible dose.....	16
II.   Imagerie.....	16
i.    Radiographie.....	16
ii.   Échographie abdominale.....	17

iii.	Tomodensimétrie et résonance magnétique .....	17
III.	Freinage à la dexaméthasone forte dose .....	17
IV.	ACTH endogène .....	18
E.	Hyperadrénocorticisme atypique ou sous-clinique (excès d'hormones sexuelles) ..	19
F.	Traitements.....	20
a.	Mitotane (Lysodren®, o,p-DDD).....	20
b.	Trilostane (Vetoryl®).....	21
c.	Kétoconazole.....	21
d.	Sélégiline (L-Deprenyl).....	21
e.	Hypophysectomie.....	22
f.	Surrénalectomie.....	22
g.	Radiation pituitaire.....	22
h.	Autres traitements .....	22
G.	Pronostic.....	23
H.	Les complications du syndrome de Cushing pouvant contribuer aux phénomènes thromboemboliques.....	24
a.	Hypertension artérielle .....	24
b.	Maladie glomérulaire .....	25
2.	La coagulation.....	26
A.	Modèle cellulaire de la coagulation.....	29
a.	Initiation .....	29
b.	Amplification .....	30
c.	Propagation .....	30
B.	Hypercoagulabilité .....	33
C.	Évaluation de l'hypercoagulabilité.....	35
3.	L'hyperadrénocorticisme et les thromboembolies : une revue de la littérature humaine et canine .....	36
4.	Thrombélastographie .....	39
A.	Principes du test .....	39
B.	Études antérieures chez le chien.....	42
5.	Génération de thrombine.....	42
A.	Thrombine.....	42
B.	Mesure de la génération de thrombine .....	44

C.	Études portant sur l'utilisation de la génération de thrombine pour évaluer la coagulation .....	47
Chapitre 2 : Articles .....		49
1.	Article 1 : .....	50
A.	Abstract .....	51
B.	Introduction .....	52
C.	Materials and Methods .....	55
a.	Study design .....	55
b.	Blood collection .....	56
c.	Thrombelastography .....	56
d.	Fluorogenic thrombin generation .....	56
e.	Statistical analysis .....	57
D.	Results .....	59
a.	Thrombelastography .....	59
I.	R .....	59
II.	K .....	59
III.	$\alpha$ .....	59
IV.	MA .....	60
b.	Thrombin generation .....	60
I.	Lag time .....	60
II.	ETP .....	60
III.	Peak .....	61
IV.	Time to peak .....	61
E.	Discussion .....	62
F.	References .....	68
G.	Figures to accompany the article .....	71
2.	Article 2 : .....	78
A.	Abstract .....	80
B.	Introduction .....	81
C.	Materials and Methods .....	83
a.	Study design .....	83
b.	Blood collection .....	84
c.	Thrombelastography .....	84
d.	Calibrated Automated Thrombogram .....	85



e.	Statistical analysis .....	86
D.	Results .....	88
a.	Individual dogs .....	88
	I. Thrombelastography .....	88
	II. Thrombin generation .....	88
	III. Platelets .....	89
b.	Group comparison .....	91
	I. Thrombelastography .....	91
	II. Thrombin generation .....	91
E.	Discussion .....	92
F.	References .....	97
	Chapitre 3 : Discussion .....	100
	Conclusion .....	115
	Sources documentaires .....	117

# Liste des tableaux

<i>Tableau I: Études démontrant un lien entre l'hyperadrénocorticisme et le thromboembolies</i> .....	37
<i>Tableau II: Mécanismes misent en cause pour la formation de thromboses lors</i> .....	38
<i>Tableau III : Paramètres mesurés à partir du tracé de TEG®</i> .....	41
<i>Tableau IV : Paramètres et interprétation du thrombogramme</i> <sup>84,85</sup> .....	46
<i>Tableau V : Études évaluant la relation entre la génération de thrombine et les états hypercoagulables.</i> <sup>60</sup> .....	48
<i>Tableau VI : Données sur les patients HAC.</i> .....	111

## Article 2 :

<i>Table Ii: Mean values of TEG® parameters of individual dogs compared to reference values (values in bold are abnormal)</i> .....	89
<i>Table Iii: Mean values of TG parameters of individual dogs compared to reference values (values in bold are abnormal).</i> .....	90
<i>Table Iiii: Automated platelet counts at the time of diagnosis of HAC compared to reference values</i> .....	90
<i>Table Iiv: Mean HAC values and mean normal values for TEG® and TG parameters</i> .....	91

# Liste des figures

<i>Figure 1 : Voies de synthèse des hormones au niveau surrénalien</i> .....	19
<i>Figure 2 : La cascade de coagulation</i> .....	27
<i>Figure 3: Les inhibiteurs naturels de la coagulation</i> .....	28
<i>Figure 4: Modèle cellulaire de la coagulation</i> .....	32
<i>Figure 5 : Schématisation de l'appareil et du tracé TEG®</i> .....	40
<i>Figure 6 : La production de thrombine (facteur II)</i> .....	43
<i>Figure 7 : Thrombogramme. AUC :Aire sous la courbe (“Area under the curve”), ETP:Potentiel endogène de thrombine (“Endogenous thrombin potential”). (Les paramètres sont décrits dans le tableau qui suite)</i> .....	46

## Article 1

Figure 1 a : R (minutes) .....	71
Figure 1 b : K (minutes).....	72
Figure 1 c : $\alpha$ - angle (degrees) .....	72
Figure 1 d : MA values (mm).....	73
Figure 2 a : Lag time values (mm).....	74
Figure 2 b : Endogenous Thrombin Potential values (nM.min-1) .....	75
Figure 2 c : Peak Height (nM) .....	76
Figure 2 d : Time to Peak (minutes) .....	77

## Article 2

Figure 1.1.a : Thrombogram (AUC : area under the curve, ETP: endogenous thrombin potential)..	86
---	----

# Liste des abréviations

ACT : Temps de coagulation activée, « Activated clotting time »

ACTH : hormone adrénocorticotrope, « Adrenocorticotropic hormone »

ADH : Hormone antidiurétique, « Anti-diuretic hormone »

ALP : Alanine transaminase

ALT : Alanine aminotransférase

APC : Anti-protéine C

APS : Syndrome des antiphospholipides, « Anti-phospholipid syndrome »

aPTT : Temps de céphaline activée, « Activated partial thromboplastin time »

AT : Antithrombine

AUC : Aire sous la courbe, « Area under the curve »

$\alpha$  : L'angle alpha

CAT : Thrombogramme calibré automatisé, « Calibrated automated thrombogram »

CBC : Hématologie, « Complete blood count »

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CO : Contraceptifs oraux

CRH : Hormone de libération de la corticotrophine, « Corticotropin releasing hormone »

CS : Syndrome de Cushing, « Cushing syndrome »

ETP : Potentiel endogène de thrombine, « End-thrombin potential » ou « Endogenous thrombin potential »

FDP : produit de dégradation de la fibrine, « Fibrinogen degradation products »

FT : Facteur tissulaire

GT : Génération de thrombine

HAC : Hyperadrénocorticisme

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineux

K : La cinétique de la formation du caillot « Clot kinetics »

LA : Anticoagulant lupus, « Lupus anticoagulant »

LY30 : Temps de lyse à 30 minutes

MA : Amplitude maximale, « Maximum amplitude »

PBS : Solution à la saline tamponnée par le phosphate, « Phosphate-buffered saline »

PDH : Hyperadrénocorticisme hypophysaire, « Pituitary-dependent hyperadrenocorticism »

PPP : Plasma pauvre en plaquettes

PRP : Plasma riche en plaquettes

PT : Temps de prothrombine, « Prothrombin time »

R : Temps de formation de caillot, « Clot activation time »

SER : Système endothéliale réticulaire

TAT : Thrombine-antithrombine

TEG® : Thrombélastographie

TEV : Thromboembolies veineuses

TFPI: Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, « Tissue factor pathway inhibitor »

TG : Génération de thrombine, « Thrombin generation »

TTPeak : Temps jusqu'au pic , « Time to peak »

UA : Urologie, « Urinalysis »

vWF : Facteur von Willebrand, « von Willebrand factor »

vWF Ag : Antigène du facteur von Willebrand, « von Willebrand factor antigen »

# Dédicace

*To my family (including the furry members!). Without your patience and encouragement, this would never have even started, much less ended!*

# Remerciements

À ma directrice Marilyn, je ne sais pas comment tu peux encore être si patiente avec moi. Ton esprit scientifique m'épate toujours – je ne sais pas d'où viennent toutes ces idées! Toujours prête à m'aider, dans ton bureau ou via ton iphone, autant présente pour discuter de coagulation que tout ce qui est Hollywood... J'ai eu de la chance de t'avoir comme directrice et maintenant comme amie.

À mon co-directeur Christian, qui m'a enfin fait comprendre la coagulation... tout un défi. Ton esprit analytique est un atout à tout projet de recherche. Merci pour toutes tes idées et tes révisions ainsi que toutes les analyses et le temps de tes résidentes.

Merci à Cathy Wagg, Virginie Allegret et Carolyn Gara-Boivin pour toutes les analyses de laboratoire. Sans vous, le projet n'existerait tout simplement pas.

Merci à Guy Beauchamp pour les analyses statistiques sans fin.

Merci à Marie-Pierre Normandeau et Charlotte Thorneloe pour les corrections.

Thank you to my parents, for the countless hours on the phone encouraging me and being proud of me.

Last, but not least, thank you Greg for making me finish this and sticking with me through it all. It's been a long haul and it's almost over. Thank you for putting up with me when I would yell at you and not the computer for not being able to do something. Thank you for the endless graphs, formatting and trouble-shooting, I have NO idea how I would have done this without you.



# **Introduction**

Le syndrome de Cushing (hyperadrénocorticisme ou HAC) est l'une des endocrinopathies les plus fréquentes chez le chien et une endocrinopathie relativement rare chez l'humain résultant d'une libération excessive de cortisol par les glandes surrénales.<sup>1</sup> Les chiens et les humains atteints de cette maladie sont à risque accru de développer des thromboembolies pulmonaires ou artérielles en association avec plusieurs facteurs prédisposants, tels que la stase veineuse, le dommage à l'endothélium vasculaire et le développement d'un état hypercoagulable.<sup>2</sup>

Il a déjà été démontré que c'est l'excès de cortisol circulant, soit secondaire à une surproduction endogène ou une administration exogène excessive, qui serait responsable de cet état d'hypercoagulabilité.<sup>3,4</sup> En fait, chez l'humain, il a été démontré que le syndrome de Cushing augmente le risque de thromboembolie par un facteur de quatre, lorsque comparé à la population en santé.<sup>3</sup> Malgré que le risque n'ait pas été établi chez le chien, plusieurs études ont su clairement démontré le lien entre l'HAC et la formation de thromboembolies. Dans une étude portant sur les thromboses iliaques et aortiques, l'HAC a été mis en cause chez 3 des 6 chiens évalués.<sup>5</sup>

Les mécanismes biochimiques responsables de cet état hypercoagulable restent nébuleux. Plusieurs mécanismes ont été proposés, la plupart utilisant un modèle multifactoriel. Une étude par Jacoby et al. (2001), évaluant 56 chiens atteints d'un HAC spontané, a mis en évidence une augmentation significative de l'activité des facteurs procoagulants II, V, VII, IX, X, XII et du facteur von Willebrand, une diminution de l'activité de l'antithrombine ainsi qu'une augmentation dans les complexes thrombines-antithrombines (TAT; un marqueur de la thrombose sous-clinique). Cela dit, toutes les études à ce sujet n'ont pas obtenu les mêmes résultats. L'étude de Jacoby n'a pas mis en évidence une augmentation de l'activité du facteur VIII, tel que démontré dans une étude importante chez des humains avec un HAC.<sup>6</sup> Aussi, dans une étude en 1986, Feldman a conclu que les patients ne sont pas tous hypercoagulables puisqu'il a démontré une diminution de l'activité de l'antithrombine chez 12 chiens atteint d'un HAC. D'autres études ont par la suite démontré que

l'antithrombine était plutôt une protéine de la phase réactive aiguë et ne serait donc pas un indicateur fiable de l'hypercoagulabilité.<sup>7</sup>

D'autres travaux suggèrent que les plaquettes, plus nombreuses et plus réactives que les facteurs de coagulation, contribueraient également à l'hypercoagulabilité. Aussi, une augmentation de la concentration de fibrinogène a été notée chez des chiens atteint d'HAC lorsque comparé à un groupe contrôle de chiens en santé.<sup>8</sup>

Les méthodes employées pour l'évaluation de l'hémostase ont été très variées. En fait, il y a peu de preuves que l'augmentation de l'activité des facteurs de coagulation se traduit par un état hypercoagulable et les tests de coagulation pratiqués de manière routinière tel que le PT et l'aPTT, ne permettent pas une évaluation de l'hypercoagulabilité.<sup>3,9</sup>

L'utilisation d'un modèle global pour expliquer la coagulation permet de mieux comprendre la complexité de la coagulation *in vivo*. Ce modèle met en évidence l'importance du rôle de la thrombine dans la coagulation. Ultimement, c'est l'équilibre entre la production et la dégradation de la thrombine qui détermine si un patient est hypo- ou hypercoagulable. Ce modèle permet également d'apprécier que l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque; fréquemment enseignés comme entités séparées, se produisent tous en synergie. C'est avec cette compréhension que nous pouvons estimer l'utilité de tests faisant l'analyse de la coagulation de manière globale.<sup>10</sup> La thrombélustographie (TEG®) et la génération de thrombine (GT) sont deux des technologies existantes pour l'évaluation globale de la coagulation.

La TEG® mesure la force et la rapidité avec lesquelles le caillot se forme dans un échantillon sanguin.<sup>9</sup> La technique a été validée récemment en médecine vétérinaire et sa capacité

d'identifier les états hypercoagulables chez les patients canins a été démontrée dans diverses études.<sup>11-14</sup>

La génération de thrombine est une technologie qui existe déjà depuis plusieurs années mais qui a repris de l'importance plus récemment avec des avancements technologiques facilitant son application. La thrombine est un enzyme essentiel résultant de la cascade de coagulation et qui détermine la coagulabilité. Un individu avec une quantité de thrombine insuffisante sera à risque de saigner tandis qu'un individu avec trop de thrombine sera prédisposé aux thromboses.<sup>15</sup> Le Thrombogramme calibré automatique ("Calibrated Automated Thrombogram", CAT) permet l'évaluation du potentiel endogène de thrombine sur divers types d'échantillon sanguin.<sup>16</sup>

La présente recherche a deux objectifs principaux :

1. La caractérisation du profil de coagulation chez des chiens avec un excès de cortisol (en premier lieu à la suite de l'administration de cortisol exogène sous forme de prednisone à des chiens en santé et en deuxième lieu à des patients atteints de la forme spontanée d'HAC) à l'aide de tests évaluant la coagulation de manière globale.
2. La familiarisation avec ces technologies.

Deux hypothèses sont émises pour cette étude :

1. L'administration de prednisone à des chiens en santé cause un état hypercoagulable et cet état est détectable par la TEG® et la génération de thrombine. Cet effet varie selon le dosage.
2. Les chiens atteints d'hyperadrénocorticisme sont hypercoagulables et cet état est détecté par la TEG® et la génération de thrombine.



# **Chapitre 1 : Recension des écrits**

# 1. Syndrome de Cushing canin (Hyperadrénocorticisme)

Le syndrome de Cushing ou l'hyperadrénocorticisme a été reconnu pour la première fois chez des patients humains en 1932 par le docteur Harvey Cushing. Dr Cushing avait noté un lien entre un ensemble de signes cliniques et l'exposition chronique aux glucocorticoïdes, autant endogènes, qu'exogènes. Depuis, ce syndrome est reconnu comme une des endocrinopathies les plus fréquentes chez le patient canin. <sup>2</sup>

## A. Pathophysiologie

Pour bien saisir la pathophysiologie du syndrome de Cushing, il est important de comprendre la sécrétion du cortisol endogène et ses mécanismes de contrôle. C'est au niveau des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique lisse du *zona fasciculata* et du *zona reticularis* des glandes surrénales que la synthèse du cortisol a lieu à partir de son précurseur, le cholestérol. À la suite d'un stimulus par l'hormone adrénocorticotrope (« Adrenocorticotropic hormone », ACTH), une hormone peptidique synthétisée et sécrétée par la portion antérieure de la pituitaire, les surrénales commencent rapidement à produire du cortisol. La sécrétion de l'ACTH par la glande pituitaire est contrôlée par l'hormone de libération de la corticotrophine (« corticotrophin-releasing hormone », CRH) produite par l'hypothalamus. La sécrétion de CRH et d'ACTH est supprimée par le cortisol (rétrocontrôle négatif). <sup>2</sup>

C'est un excès de cortisol qui mène aux signes cliniques associés avec l'HAC, peu importe que l'excès soit endogène ou exogène. La cause la plus fréquente d'excès de cortisol endogène est une surstimulation des surrénales par de l'ACTH produite en quantité excessive par une tumeur hypophysaire. Cette forme d'HAC (pituitaire-dépendent ou "PDH: pituitary-dependent HAC") est responsable de 80-85 % des cas d'HAC spontanés chez le chien. Anciennement, il était soutenu

que 75-85 % de ces tumeurs étaient des microadénomes bénins de moins de 10 mm de diamètre.<sup>2</sup> Par contre, la littérature récente suggère qu'entre 15 et 75 % de ces tumeurs deviendront des macroadénomes invasifs de grande taille.<sup>17</sup> De rares cas de carcinomes pituitaires et d'hyperplasie pituitaire sont rapportés.<sup>2</sup> Peu importe la cause, la production excessive d'ACTH mène à une hyperplasie des deux surrénales et une production excessive de cortisol. De plus, la tumeur au niveau de la pituitaire ne répond plus au rétrocontrôle négatif par le cortisol.<sup>2</sup>

Il existe aussi des tumeurs surrénaliennes qui produisent du cortisol indépendamment du contrôle pituitaire. Cette production excessive mène à une suppression éventuelle de la CRH et de l'ACTH par rétrocontrôle négatif chronique, une atrophie de la surrénale non-atteinte ainsi que des cellules normales de la surrénale atteinte.<sup>2</sup> Autant des adénomes que des carcinomes peuvent exister au niveau des surrénales et les deux peuvent être uni- ou bilatéraux. Par contre, en l'absence de métastases, il est difficile de distinguer entre les deux.<sup>18</sup> Un index histopathologique a été développé afin de distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. Il évalue la taille, le mode de croissance trabéculaire ainsi que la présence de fibrose en périphérie, d'invasion capsulaire, d'hémorragie, de nécrose, d'hématopoïèse, de thrombi de fibrine et de vacuolisation cytoplasmique. La même étude a montré l'intérêt de l'immunohistochimie; l'index de prolifération de Ki-67 est plus élevé lors de carcinome que d'adénome. Toutefois, il n'y a pas de différence entre l'index d'un adénome et d'une glande surrénale normale.<sup>18</sup>

D'autres causes de cortisolémie excessive ont été mises en évidence chez les humains, mais sont extrêmement rares chez le patient canin. Entre autres, elles incluent le syndrome d'ACTH ectopique où une tumeur autre que surrénalienne ou pituitaire est responsable de la sécrétion excessive de cortisol. Chez les humains, plusieurs tumeurs sont mises en cause, telles que le thymome, la tumeur des îlots pancréatiques et le carcinome pulmonaire à petites cellules. Par contre, un seul rapport de cas existe en médecine vétérinaire: un berger allemand avec une tumeur



abdominale sécrétant de l'ACTH<sup>19</sup>. Une hyperplasie nodulaire surrénalienne ACTH-indépendant a aussi été décrite chez les humains, mais pas encore chez les patients canins.<sup>2</sup>

Il existe aussi des cas de tumeurs surrénaliennes et pituitaires simultanées menant à un HAC, mais cette condition est très rare.<sup>2</sup>

Finalement, le syndrome de Cushing peut se développer à la suite d'une administration chronique de corticostéroïdes exogènes (Cushing iatrogène). Par contre, étant donné que ces patients ne seront pas inclus dans notre étude, ils ne seront pas discutés ici.<sup>2</sup>

## **B. Signalement et signes cliniques**

L'âge moyen du chien atteint d'HAC est de 11.4 années avec presque tous les patients ayant plus de 6 ans, peu importe la forme. Plus de la moitié des chiens sont des femelles et la maladie est reconnue chez presque toutes les races de chiens. La forme pituitaire de la maladie affecte surtout les chiens de moins de 20 kg, tandis que la majorité des chiens avec la forme surrénalienne ont plus de 20 kg.<sup>2</sup>

L'HAC est associé à plusieurs signes cliniques chroniques. La plupart de ceux-ci découle de l'effet direct des glucocorticoïdes et progresse lentement. Les effets principaux des glucocorticoïdes comprennent, entre autres, la gluconéogenèse, l'immunosuppression, un effet anti-inflammatoire, le catabolisme protéique et la lipolyse. Les signes cliniques les plus fréquents sont la polyurie, la polydipsie, la polyphagie, un abdomen penduleux, un poil clairsemé, le manque de repousse du poil, la peau mince, la pyodermite, l'halètement excessif, la faiblesse musculaire, l'atrophie musculaire et la léthargie. Moins fréquemment, on peut constater de l'intolérance à la chaleur, de la séborrhée, des comédons, du calcinose cutanée, des ecchymoses, de l'atrophie testiculaire, une absence du cycle œstral, une hypertrophie clitoridienne et de la paralysie faciale. Un chien peut développer un ou plusieurs de ces signes cliniques.<sup>20</sup>

Des signes cliniques plus rares peuvent apparaître à la suite de complications de la maladie ou suite au développement de maladies concomitantes. Une aggravation de maladies inflammatoires ou allergiques sous-cliniques (atopie, maladies articulaires dégénératives, etc.) et quelquefois, l'apparition de maladies à médiation immunitaire et néoplasiques, peuvent se manifester suite au retrait des corticostéroïdes. L'insulinorésistance causée par les glucocorticoïdes mène à un diabète mellitus chez moins de 10 % des patients atteints d'HAC. Le diagnostic des deux maladies concomitantes représente un défi, car les signes cliniques se chevauchent largement. Il a aussi été démontré que les patients atteints d'HAC sont à risque accru de développer une pancréatite aiguë.<sup>21</sup>

Plus rarement, le chien peut être atteint d'une macrotumeur pituitaire (macroadénome). Lorsque la tumeur dépasse 1 cm de diamètre, elle peut occasionner une compression du parenchyme nerveux et des déficits neurologiques secondaires chez le patient. L'incidence des macrotumeurs pituitaires est mal connue puisque peu de chiens avec un HAC subissent de l'imagerie avancée (tomodensitométrie ou résonnance magnétique) pour l'évaluation de la pituitaire. Par contre, il est estimé que 15-50 % des chiens avec un HAC pituitaire pourraient avoir des macrotumeurs et que 25 % de ces tumeurs seraient malignes. Les signes cliniques associés sont non-spécifiques et peuvent entre autres comprendre de la léthargie, de l'anorexie, une tétraparésie symétrique, de l'ataxie, du tournis et un changement de comportement.<sup>17</sup>

## **C. Anomalies clinicopathologiques les plus fréquentes**

### ***a. Hématologie***

Les anomalies les plus fréquentes à l'hématologie sont une lymphopénie, une neutrophilie mature, une monocytose ainsi qu'une éosinopénie. Ces changements sont directement reliés à l'excès de cortisol en circulation.<sup>2</sup> De même, l'hypercortisolémie stimule la production d'érythropoïétine et à l'occasion, les chiens peuvent présenter une légère polycythémie.<sup>22</sup>

Finalement, on observe régulièrement une thrombocytose, quoique le mécanisme responsable de ce changement n'ait pas été élucidé.<sup>2</sup>

### ***b. Glucose***

L'hypercortisolémie stimule la gluconéogénèse hépatique et une diminution de l'utilisation périphérique du glucose et, par conséquence, les patients avec un syndrome de Cushing présentent souvent une légère hyperglycémie. Chez le chien, ce changement est peu important et ne mène que rarement au diabète mellitus.<sup>23</sup>

### ***c. Alanine aminotransférase (ALT) et phosphatase alcaline (ALP)***

Classiquement on retrouve une augmentation des enzymes hépatiques. L'ALT augmente suite à un entreposage de glycogène dans les hépatocytes (hépatopathie vacuolaire). Ce changement est par contre moins important que l'élévation de l'ALP. L'ALP augmente secondairement à une induction enzymatique causée par les glucocorticoïdes, un phénomène spécifique aux chiens.<sup>23</sup> L'isoenzyme hépatique peut également augmentée suite à une choléstase occasionnée par des dépôts de glycogène et une vacuolisation cellulaire qui comprime alors le système biliaire. L'augmentation de l'ALP est le changement clinicopathologique le plus fréquent chez le patient atteint du syndrome de Cushing. Par contre, un faible pourcentage de chiens avec la pathologie aura une valeur d'ALP dans les limites de la normale.<sup>24</sup> Finalement, chez l'humain, comme chez le chien, un lien a été établi entre l'exposition chronique aux glucocorticoïdes et l'ostéopénie. À long terme, les glucocorticoïdes inhibent la réplication, la différenciation et la fonction des ostéoblastes. De plus, ils induisent l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes matures.<sup>25</sup> Ceci pourrait contribuer également à l'augmentation de l'isoenzyme osseuse de l'ALP.

### ***d. Cholestérol, triglycérides et lipémie***

L'excès des glucocorticoïdes provoque une lipolyse et conséquemment une augmentation des triglycérides et du cholestérol. Ceci mène à une lipémie qui peut interférer avec l'analyse de plusieurs autres paramètres hémato-biochimiques.<sup>2</sup>

### ***e. Analyse urinaire***

#### **I. Densité urinaire**

Jusqu'à 85 % des chiens atteints d'HAC ont une densité urinaire inférieure à <1.030.<sup>2</sup> Cette diminution de la capacité de concentration urinaire serait le résultat de plusieurs facteurs.

Premièrement, il y aurait une polyurie secondaire à un diabète insipide central; les glucocorticoïdes empêchant la libération d'hormone antidiurétique (ADH) par la glande pituitaire. Deuxièmement, les glucocorticoïdes bloqueraient l'action de l'ADH au niveau rénal en inhibant leur liaison aux récepteurs, menant donc à un diabète insipide néphrogénique et une polyurie primaire. Finalement, une polydipsie psychogénique pourrait être causée par un macroadénome pituitaire.<sup>26</sup>

#### **II. Protéinurie**

Les patients atteints d'HAC présente régulièrement une protéinurie. Quoique celle-ci puisse faire suite à une pyélonéphrite ou une hypertension glomérulaire, elle peut également être primaire. Les mécanismes derrière cette protéinurie primaire sont incomplètement compris. Une étude par Waters et al. a mis en évidence une protéinurie et des changements glomérulaires chez des chiens atteints d'HAC sans signe de maladie rénale préexistante.<sup>27</sup> D'autres études ont démontré que la valeur du ratio protéine: créatinine urinaire diminuait avec un contrôle adéquat de la maladie.<sup>28</sup> Une discussion plus complète de la protéinurie se retrouve dans la section « Complications possibles menant aux thromboembolies : maladies glomérulaires ».

### III. Infection

Jusqu'à 50 % des chiens atteints du syndrome de Cushing ont une infection du tractus urinaire. Par contre, compte tenu des effets anti-inflammatoires des corticostéroïdes, peu de ces chiens démontrent des signes cliniques et l'analyse du sédiment urinaire met rarement en évidence des cellules inflammatoires; l'infection est apparente seulement au niveau de la culture urinaire.<sup>2</sup>

### D. Diagnostic

Il n'y a malheureusement pas un seul test qui permet de poser un diagnostic d'hyperadrénocorticisme. Le diagnostic se fait à partir d'un ensemble de signes cliniques et de tests de laboratoire. De manière générale, dès que la maladie est soupçonnée, le diagnostic est fait en deux étapes. Premièrement, le diagnostic doit être confirmé à l'aide des tests de fonction de l'axe hypophysaire-surrénalien (tests de « dépistage »). Deuxièmement, l'origine (hypophysaire ou surrénalienne) est déterminée grâce à des tests de différentiation.<sup>29</sup> Une revue exhaustive de ces tests dépasse largement les objectifs de cette revue de littérature, mais voici un bref résumé des tests les plus fréquemment utilisés.

#### *a. Tests de dépistage*

##### I. Ratio cortisol : créatinine urinaire

Le cortisol et ses métabolites sont normalement excrétés dans l'urine proportionnellement à la cortisolémie. Ce test consiste à effectuer une mesure de cortisol dans l'urine et de faire un rapport avec la créatinine qui est excrétée de manière constante par les reins. Ceci permet de corriger pour les fluctuations journalières du volume et de la densité urinaire pourvu que la fonction rénale soit normale. Habituellement, ce test est fait sur la première urine du matin et la mesure reflète donc la sécrétion de cortisol sur toute la nuit. Il est recommandé de répéter le test deux à trois

fois et de faire la moyenne de ces valeurs. Ce test est hautement sensible (0.85-0.99), mais est faiblement spécifique et donne fréquemment de faux positifs. Ainsi, le ratio cortisol : créatinine urinaire est plutôt un test d'exclusion. Lorsque le ratio est normal, il y a très peu de chance que l'animal soit atteint d'HAC, alors qu'un patient ayant un ratio anormalement élevé nécessitera un autre test de dépistage.<sup>2,29</sup>

## II. Stimulation à l'ACTH (corticotropin)

Le patient atteint d'HAC d'origine pituitaire ou surrénalienne a une réserve importante de cortisol au niveau des surrénales et que suite à une stimulation par de l'ACTH exogène (corticotropin) cette réserve sera libérée. La cortisolémie est déterminée avant et 1 à 2 heures après l'administration d'ACTH synthétique (cosyntropin) ou naturel (gel).<sup>2,29</sup> Chez un chien normal, une dose supraphysiologique d'ACTH causera également une libération accrue de cortisol par les surrénales. Par contre, cette augmentation sera moins prononcée que chez le patient atteint d'hyperadrénocorticisme. De manière générale, après l'administration de l'ACTH, un patient en santé aura une cortisolémie d'environ 300 nmol/L, tandis que les chiens atteints d'HAC auront des valeurs qui dépassent généralement 600 nmol/L.<sup>29</sup>

Ce test est anormal dans 85-90 % des chiens avec un HAC d'origine pituitaire et chez 50 % des chiens avec une tumeur surrénalienne.<sup>30</sup> Certains chiens normaux et atteints de maladies autres que l'HAC peuvent avoir une cortisolémie post ACTH comparable à ceux qui souffrent d'HAC. La stimulation à l'ACTH devrait donc être faite seulement suite à la résolution des pathologies concomitantes et les résultats interprétés en fonction des signes cliniques.<sup>29</sup>

La stimulation à l'ACTH est le seul test permettant le diagnostic d'HAC iatrogénique (absence complète de libération de cortisol à la suite de l'administration d'ACTH) et est employé pour le suivi du traitement médical (voir section traitement).<sup>2,29</sup>

### III. Freinage à la dexaméthasone faible dose

Ce test est plus sensible que le test de stimulation à l'ACTH, permettant la détection de la grande majorité des HAC d'origine surrénalienne et 90-95 % des HAC d'origine pituitaire. Cependant, ce test est long à réalisé (8 heures) et ne permet pas le diagnostic de Cushing iatrogénique ni de faire le suivi des patients recevant un traitement médical.<sup>29,30</sup> Un sondage en 2002 a révélé que 55 % des internistes et des dermatologues interrogés l'utilisait comme test de dépistage.<sup>31</sup>

L'administration de corticostéroïdes exogènes cause une suppression de la sécrétion d'ACTH par la pituitaire et entraîne une diminution de la production de cortisol par les surrénales. Chez un patient en santé, cette suppression persiste pendant 24 à 48 heures alors que chez un patient atteint d'HAC, l'axe pituitaire-surrénalien est très résistant à cette suppression. La dexaméthasone est le corticostéroïde utilisée pour ce test, puisque, contrairement à la prednisone ou la prednisolone, elle n'est pas détectée dans le sang lors du dosage du cortisol.<sup>2,29</sup>

Plusieurs protocoles ont été établis. De manière générale, la cortisolémie est mesurée avant (temps 0) et 8 heures (temps 8) après l'administration d'une faible dose de dexaméthasone (0.01 mg/kg ou 0.015 mg/kg) par voie intraveineuse ou intramusculaire. Un manque de suppression à 8 heures, cortisol > 1.4 µg/dl (39 nmol/L), confirme le diagnostic d'hyperadrénocorticisme.<sup>2</sup> Seulement 5-10 % des chiens avec un HAC d'origine pituitaire auront une suppression de leur cortisol au temps 8. Le test a donc une très bonne sensibilité mais, la spécificité peut être faible puisque plusieurs chiens atteints de maladies autres que l'HAC peuvent ne pas montrer de suppression.<sup>29</sup>

Une mesure du cortisol sanguin au temps 4 peut parfois permettre de différencier un HAC d'origine surrénalienne d'un HAC pituitaire. 30% des chiens avec un HAC d'origine pituitaire

supprimeront au temps 4 (cortisolémie < 39 nmol/L ou 50 % de moins que la valeur initiale) et remonteront au temps 8, alors qu'aucun patient avec un HAC d'origine surrénalienne ne supprimera au temps 4 et un chien normal aura une suppression qui durera entre 24 et 48 heures. Cet échappement au temps 8 chez le patient avec une tumeur pituitaire résulte d'un métabolisme plus rapide de la dexaméthasone déjà démontré chez les patients atteints d'HAC.<sup>2,29</sup>

### ***b. Tests de différenciation***

Une fois le diagnostic posé, des tests de différenciation sont nécessaires afin de déterminer l'origine de l'hyperadrénocorticisme.

#### **I. Freinage à la dexaméthasone faible dose**

Tel que mentionné dans la section précédente, ce test peut parfois nous aider à distinguer entre les deux types d'hyperadrénocorticismes.

#### **II. Imagerie**

##### *i. Radiographie*

La majorité des changements radiographiques chez un patient atteint d'HAC sont non-spécifiques (hépatomégalie, calcinosis cutis, minéralisation dystrophique, etc.) et peuvent rarement aider à confirmer un diagnostic d'hyperadrénocorticisme. Par contre, un effet de masse dans la région de la glande surrénale est suggestif d'un HAC d'origine surrénalienne.<sup>29</sup> Cette masse devrait être distinguée des autres masses surrénaliennes ne menant pas à de l'HAC, telles que les phéochromocytomes, des maladies granulomateuses ou des métastases. Certains changements radiographiques (ou échographiques), tel que la minéralisation et l'augmentation de la taille de la surrénale, suggèrent une masse plutôt maligne. Le diagnostic définitif repose, par contre, sur l'histopathologie.<sup>32</sup>



## ii. *Échographie abdominale*

Cette modalité d'imagerie peut s'avérer très utile dans la différenciation d'HAC surrénalien ou pituitaire et permet parfois de dépister des métastases. Dans la majorité des HAC hypophysaires, les deux surrénales sont de dimensions normales à augmentées et de formes relativement comparables. Une surrénale normale ne devrait pas dépasser 7.4 mm de diamètre au niveau de son pôle crânial ou caudal. Par contre, certains chiens atteints de maladies chroniques non reliées à l'hyperadrénocorticisme peuvent avoir une augmentation de la taille des surrénales. De plus, certains patients avec l'HAC d'origine pituitaire peuvent avoir des surrénales de tailles inégales.<sup>33</sup>

L'HAC d'origine surrénalienne se manifeste à l'échographie par une seule surrénale augmentée de taille, déformée par une masse ou contenant un nodule. La surrénale controlatérale est habituellement diminuée de taille. Une surproduction de cortisol par la tumeur surrénalienne supprime la production d'ACTH par la glande pituitaire et par conséquent, la glande surrénale non atteinte s'atrophie. Cependant, la tumeur n'est pas toujours visible échographiquement. Aussi, il y a des rapports de cas de tumeurs bilatérales et d'HAC à la fois pituitaire et surrénalien.<sup>33</sup>

## iii. *Tomodensimétrie et résonance magnétique*

Ces modalités sont très utiles pour évaluer la taille des surrénales (voir la discussion sur la taille des surrénales dans la section précédente) ainsi que pour chercher des métastases, visualiser la pituitaire et mettre en évidence des micro- ou macrotumeurs.<sup>29</sup>

## III. **Freinage à la dexaméthasone forte dose**

Ce test nécessite l'administration d'une dose de 0.1 à 1 mg/kg de dexaméthasone (faible dose 0.01 mg/kg ou 0.015 mg/kg) IV ou IM. Lorsqu'une forte dose de dexaméthasone est donnée à un patient atteint d'un HAC d'origine pituitaire, une suppression de la production d'ACTH par la

pituitaire aura lieu, suivi d'une diminution de la production du cortisol par la surrénale. Ceci s'avère malgré la résistance de la pituitaire à la suppression par les corticostéroïdes. La suppression se manifeste par une diminution à moins de 40 nmol/L de la cortisolémie 8 heures suivant l'injection. Or, lorsque l'HAC est d'origine surrénalienne, la pituitaire est déjà constamment supprimée par l'excès de cortisol en circulation et aucune suppression aura lieu, même à une dose très élevée de dexaméthasone.<sup>29</sup>

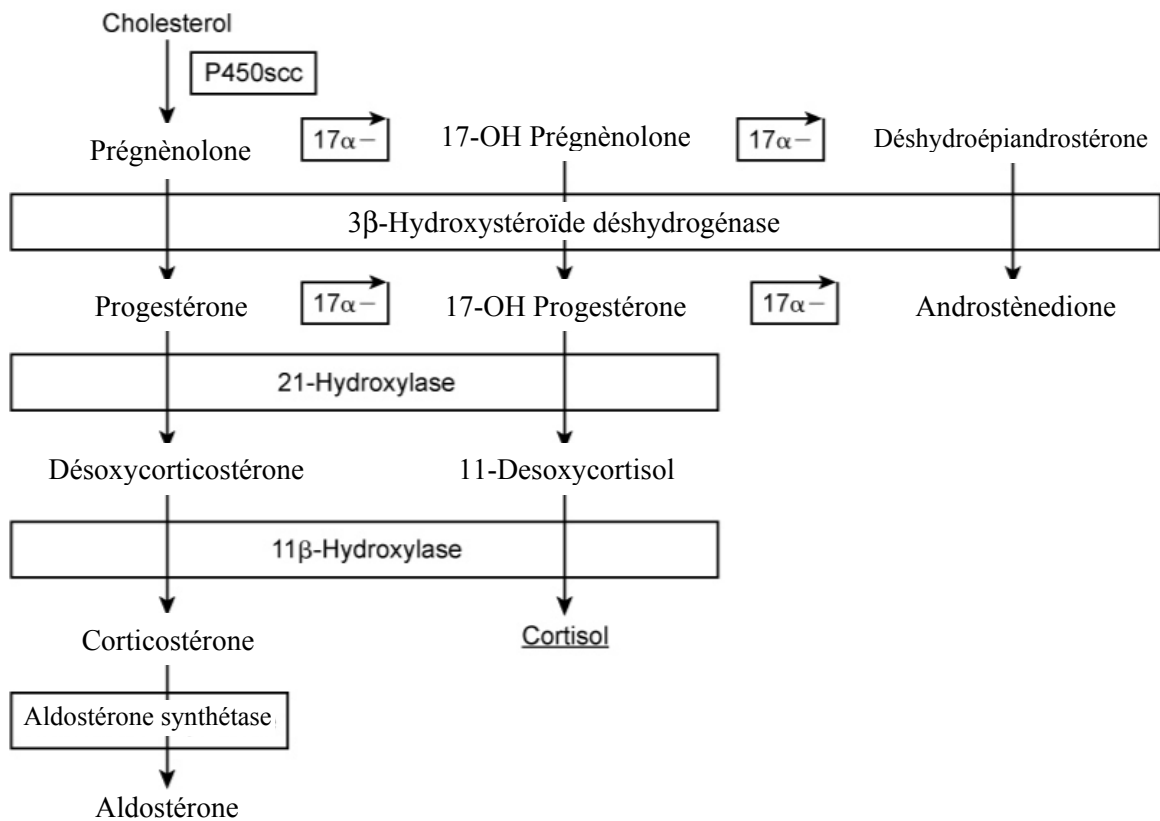
À la suite de l'administration de dexaméthasone, on considère qu'un chien a subi une suppression s'il satisfait à l'un des critères suivants : un cortisol plasmatique de moins de 50 % de la valeur de base 4 ou 8 heures après l'administration de la dexaméthasone à forte dose ou un cortisol plasmatique de moins de 40 nmol/L 4 ou 8 heures après l'administration. Environ 75 % des chiens avec un HAC d'origine pituitaire satisferont à l'un des 4 critères, tandis qu'aucun chien ayant un HAC d'origine surrénalienne aura une suppression.<sup>2</sup> La répartition des HAC surrénaliens et pituitaires est d'environ 50 :50 lorsque l'HAC a été confirmé mais que le patient n'a pas démontré de suppression avec le test de freinage à la dexaméthasone forte dose. D'autres tests devront alors être faits afin de trouver l'origine.<sup>29</sup>

#### **IV. ACTH endogène**

Lors d'une tumeur pituitaire, il y a une surproduction d'ACTH et, par conséquent, sa valeur sanguine augmente. Lors d'HAC d'origine surrénalienne, la pituitaire est chroniquement supprimée par l'excès de cortisol et l'ACTH diminue. Puisqu'il y a très peu de chevauchement entre les valeurs, ceci est un bon test de différenciation. Par contre, 20% des chiens auront une valeur dans une zone grise étant donné que la sécrétion d'ACTH peut varier dans la journée. Pour ces chiens, la mesure de l'ACTH peut être répétée ou un autre test diagnostique entrepris. L'ACTH est extrêmement labile et disparaît de l'échantillon rapidement, ce qui mène parfois à de faux résultats ou de faux diagnostics de tumeur surrénalienne.<sup>2,29</sup>

## E. Hyperadrénocorticisme atypique ou sous-clinique (excès d'hormones sexuelles)

Nous reconnaissons maintenant un syndrome clinique chez les chiens avec les mêmes signes cliniques que l'hyperadrénocorticisme, mais chez lesquels nous ne pouvons pas mettre en évidence un excès de cortisol. Ces chiens ont, par contre, un excès d'hormones sexuelles ou de minéralocorticoïdes. Toutes ces hormones ont comme précurseur le cholestérol et subissent une série de modifications enzymatiques au niveau de la surrénale (figure 2).



Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

**Figure 1 : Voies de synthèse des hormones au niveau surrénalien**

(Bonagura JD, Twedt DC. Kirk's Current Veterinary Therapy XIV; 2009:1388.)

Les raisons derrière l'absence d'hypercortisolémie chez ces patients ne sont pas claires. Le diagnostic se fait donc par la mesure des hormones surrénaliennes (sexuelles et minéralocorticoïdes) avant et après stimulation à l'ACTH.<sup>30</sup> Une étude publiée en 2005 a montré que certains patients

peuvent avoir une augmentation de seulement la 17-hydroxyprogestérone à la suite de l'administration d'ACTH et démontrer des signes cliniques d'HAC, car certains précurseurs ont des effets similaires au cortisol.<sup>34</sup>

## F. Traitements

Une fois que le diagnostic est confirmé, un traitement devrait être instauré afin de minimiser les signes cliniques de l'hyperadrénocorticisme. En règle générale, un patient devrait être traité seulement s'il démontre des signes cliniques ou des manifestations de la maladie (polyurie, polydipsie, polyphagie, hypertension, diabète mellitus, protéinurie, thromboembolie, etc.). Encore une fois, une revue exhaustive des traitements avec dosages et protocoles dépasse les objectifs de cette revue de littérature, mais voici un bref aperçu des traitements disponibles.

### a. Mitotane (*Lysodren®*, *o,p-DDD*)

Le mitotane est la molécule la plus fréquemment employée pour le traitement de l'hyperadrénocorticisme. Elle cause une nécrose du cortex surrénalien affectant plus particulièrement les *zonas fasciculata* et *reticularis*. La thérapie est normalement divisée en 2 phases: une phase d'induction et une phase de maintien. Les objectifs du traitement sont non seulement la résolution des signes cliniques mais le maintien d'une glande surrénale suffisamment fonctionnelle pour éviter un hypoadrénocorticisme iatrogénique. Malgré qu'un protocole de destruction complète de la surrénale par le mitotane existe, cette technique n'est plus préconisée. Le traitement avec le mitotane est plus efficace pour les HAC d'origine pituitaire. Il peut également être employé pour les HAC surrénaliens, quoique ceux-ci tendent à être plus résistants et nécessitent alors de plus fortes doses ainsi qu'une période d'induction plus longue. L'efficacité du traitement est évaluée avec une stimulation à l'ACTH.<sup>1,30</sup>

### **b. Trilostane (Vetoryl®)**

Le trilostane est un stéroïde synthétique qui inhibe l'enzyme 3 $\beta$ -hydroxy-stéroïde déshydrogénase. Il empêche la synthèse de l'aldostérone et du cortisol via une diminution de la production de progestérone qui est le précurseur de la majorité des stéroïdes.<sup>1,35,36</sup> La suppression de la synthèse de l'aldostérone est moins prononcée que la suppression du cortisol et mène rarement à des signes cliniques d'hypoaldostéronisme. Si le traitement est arrêté, la production des stéroïdes reprend. Ce traitement semble avoir une efficacité similaire au mitotane, mais il aurait moins d'effets secondaires puisqu'il est réversible. Plusieurs protocoles sont publiés à ce sujet.<sup>37</sup>

### **c. Kétoconazole**

Cet agent antifongique empêche la stéroïdogénèse en inhibant le cytochrome p450, enzyme responsable de la première et la dernière étape dans la production des androgènes et du cortisol.<sup>1</sup> Les effets de ce médicament sont similaires aux effets du trilostane. Par contre, il est hépatotoxique à des doses élevées.<sup>30</sup>

### **d. Sélégiline (L-Deprenyl)**

La sélégiline est approuvée pour le traitement de l'hyperadrénocorticisme pituitaire dans certains pays, y compris le Canada. Il est un inhibiteur de la monoamine-oxydase et augmente donc la concentration de dopamine au niveau du système nerveux central. La dopamine inhibe la sécrétion de l'ACTH de la *pars intermedia* de la pituitaire. Puisque 70 % des formes pituitaires de la maladie impliquent la *pars distalis*, la sélégiline n'aurait que peu d'effet.<sup>1</sup> Cependant, ce médicament est parfois associé avec une amélioration clinique sans amélioration de la stimulation à l'ACTH.<sup>30</sup>

### ***e. Hypophysectomie***

L'hypophysectomie est le seul traitement curatif chez les patients avec un HAC d'origine pituitaire. Puisque la localisation anatomique de la pituitaire rend l'approche chirurgicale particulièrement difficile, la procédure est souvent réservée aux chiens atteints de macrotumeurs et démontrant des signes neurologiques. Une évaluation par résonance magnétique ou tomodensitométrie avant la procédure est essentielle.<sup>1</sup>

### ***f. Surrénalectomie***

Tout comme l'hypophysectomie lors d'HAC d'origine pituitaire, la surrénalectomie offre une guérison permanente pour les patients ayant une masse surrénalienne bénigne ou maligne mais sans métastases. Elle représente donc le traitement de choix pour cette forme de la maladie. Des surrénalectomies bilatérales chez des chiens avec un HAC d'origine pituitaire sont décrites, quoique réalisées beaucoup moins fréquemment.<sup>1</sup> De plus, ces chiens nécessitent par la suite une supplémentation en minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes à vie.

### ***g. Radiation pituitaire***

La radiation pituitaire peut être considérée lors de micro- ou macroadénome pituitaire, mais les résultats sont mitigés, car plusieurs patients ont une persistance des signes cliniques d'HAC malgré une disparition de la masse.<sup>1</sup>

### ***h. Autres traitements***

Plusieurs autres traitements ont été tentés avec des résultats variables. Entre autres, nous pouvons énumérer la métyrapone (un inhibiteur de la stéroïdogénèse qui supprime aussi la sécrétion d'ACTH), l'aminoglutéthimide (un inhibiteur de l'enzyme P-450), la mifépristone (un analogue

stéroïdien qui déplacerait la progestérone et les glucocorticoïdes au niveau de leurs récepteurs), la bromocriptine (un agoniste de la dopamine) et la cyproheptadine (un sérotoninergique). Aucun de ces médicaments n'a démontré suffisamment d'efficacité pour être utilisé dans le traitement de la maladie.<sup>1</sup>

Plus récemment, des traitements à base d'acide rétinoïque, qui diminuerait la sécrétion d'ACTH<sup>38</sup> et de cabergoline, un agoniste dopaminergique,<sup>39</sup> ont démontré des effets intéressants, mais leur efficacité demeure à être prouvée. Finalement, la mélatonine est parfois recommandée pour le traitement des patients ayant des signes cliniques minimaux associés à une augmentation des hormones sexuelles, mais elle n'a pas été démontrée efficace dans les cas d'HAC atypique.<sup>30</sup>

## G. Pronostic

Étant donné les différentes étiologies, ainsi que la panoplie de traitements disponibles, le pronostic pour les chiens atteints d'hyperadrénocorticisme est difficile à établir. En ce moment, il n'y a aucune recherche qui compare la survie avec et sans traitement. Par contre, quelques études ont évalué la survie à la suite de certains traitements.

Lorsque nous regardons les études portant sur les traitements médicaux, une étude de 2007 démontrait que la survie médiane entre les patients traités avec le mitotane (708 (33-1399) jours) et le trilostane (662 (8-1971) jours) était très similaire.<sup>37</sup>

Les études sur les approches chirurgicales démontrent des survies comparables aux traitements médicaux. Une étude prospective sur 150 chiens ayant subi une hypophysectomie démontrait une survie médiane de 28 mois.<sup>40</sup> Lors d'une autre étude, le même groupe a trouvé 79% de survie 4 ans post-hypophysectomie.<sup>41</sup> Par ailleurs, une étude sur la surrénalectomie avait démontré une survie moyenne de 778 jours lorsque la surrénale retirée avait un carcinome. La

survie lors d'un adénome surrénalien n'a pas été établie, puisqu'aucun patient dans l'étude est mort suite à une surrénalectomie pour un adénome (survie >703 jours).<sup>42</sup>

Le pronostic est énormément influencé par le développement de certaines complications sérieuses de la maladie. La pancréatite, l'insuffisance cardiaque congestive, le diabète mellitus, la pyélonéphrite, les dysfonctions neurologiques et les événements thrombotiques étant les plus fréquentes.<sup>21</sup>

## **H. Les complications du syndrome de Cushing pouvant contribuer aux phénomènes thromboemboliques**

### ***a. Hypertension artérielle***

Plus de 50 % des chiens avec un HAC non traité souffrent d'hypertension artérielle. Les mécanismes sous-jacents sont complexes et mettent en jeu plusieurs facteurs dont le volume plasmatique, la résistance vasculaire périphérique et le débit cardiaque. Un article récent de la littérature humaine par Magiakou révisé les mécanismes impliqués :

1. Les glucocorticoïdes possèdent une activité minéralocorticoïde intrinsèque qui amène une réabsorption sodique accrue au niveau tubulaire et une augmentation du volume vasculaire.
2. L'activation du système rénine-angiotensine par plusieurs mécanismes; une composante clé dans le contrôle de la pression systémique.
3. Les glucocorticoïdes augmentent la sensibilité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et entraînent donc une augmentation du tonus vasculaire.
4. Les glucocorticoïdes induisent une suppression des vasodilateurs systémiques.<sup>22</sup>

D'autres études suggèrent que l'hyperaldostéronisme contribue aussi à l'hypertension. Peu importe le mécanisme impliqué, ils contribuent tous à une augmentation du volume plasmatique, de



la résistance vasculaire ainsi que du débit cardiaque. L'hypertension non contrôlée peut mener à certaines des complications les plus sévères associées au syndrome de Cushing, tel que la cécité soudaine (hémorragie intraoculaire et décollement de la rétine), les thromboembolies, l'hypertension intrarénale et la glomérulosclérose avec protéinurie, l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'insuffisance cardiaque congestive, ainsi que les thromboembolies pulmonaires.<sup>21</sup>

### ***b. Maladie glomérulaire***

L'administration de corticostéroïdes exogènes ainsi que l'HAC spontané ont déjà été associés à des maladies glomérulaires avec protéinurie secondaire. Quoiqu'une étude post-mortem chez des chiens avec un HAC a dévoilé que malgré que jusqu'à 75% des patients avec un HAC démontrent de la protéinurie seulement 15% des chiens avaient des lésions de glomérulonéphrite.<sup>21</sup>

Les mécanismes menant à la protéinurie induite par les glucocorticoïdes sont mal compris, mais peuvent inclure des effets immunosuppresseurs (favorise le dépôt de complexes immuns au niveau du glomérule) et des dommages glomérulaires secondaires à de l'hypertension (des études ont mis en évidence une augmentation du taux de filtration glomérulaire chez des chiens recevant des glucocorticoïdes). Cette protéinurie est caractérisée par une augmentation du ratio protéine : créatinine urinaire dépassant rarement 5.0 (> 1.0 étant anormal chez un chien non azotémique).<sup>27</sup>

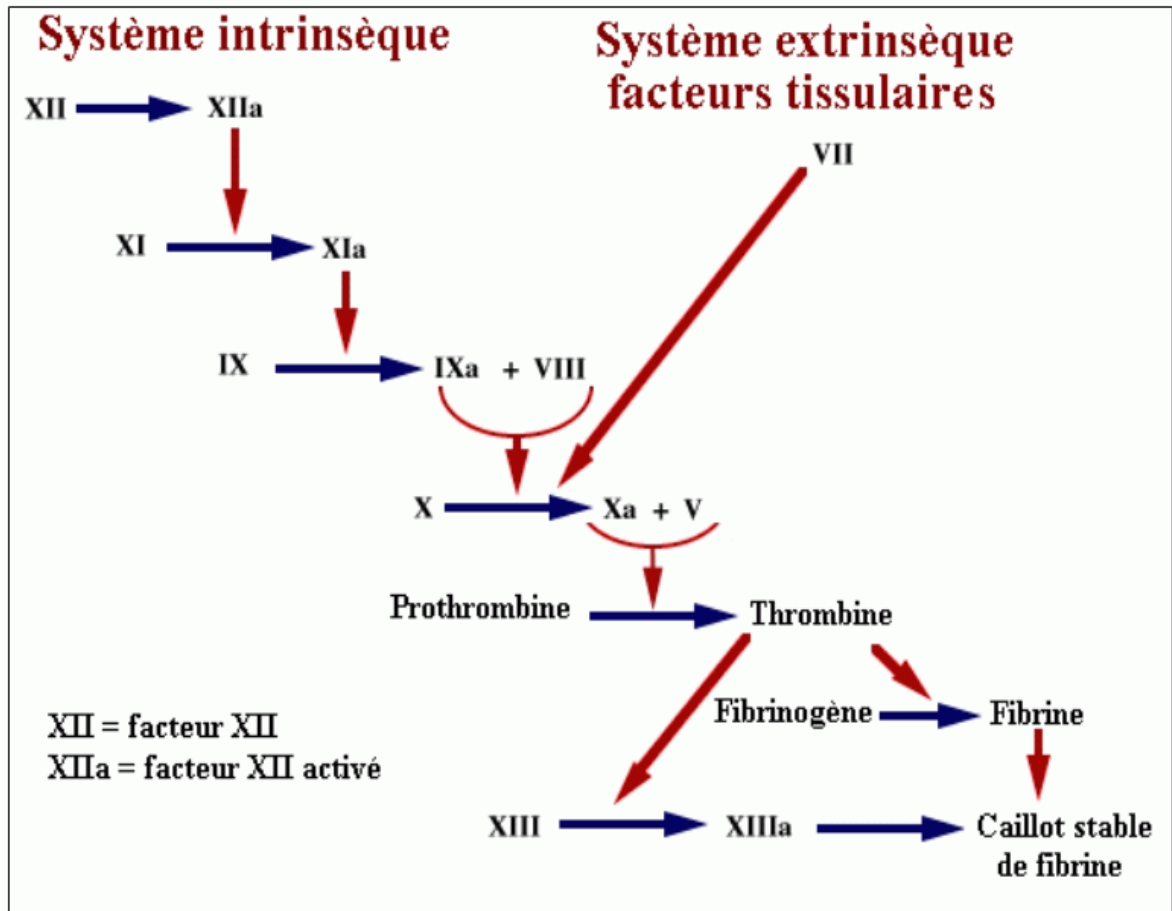
La protéinurie peut mener à des complications importantes. Vu son faible poids moléculaire, l'albumine est la principale protéine perdue par le rein quoiqu'une hypoalbuminémie secondaire soit rarement présente. Il y a une forte corrélation entre la perte d'albumine et une perte d'antithrombine par le rein puisque leurs poids moléculaires sont similaires.<sup>43</sup> Lors de syndrome de Cushing, une perte importante de l'antithrombine, une protéine importante pour la fibrinolyse, peut donc prédisposer l'animal à un état d'hypercoagulabilité. Finalement, les dommages rénaux occasionnés par les glucocorticoïdes peuvent contribuer au développement de l'hypertension.<sup>2</sup>

## 2. La coagulation

Les maladies thrombotiques et thromboemboliques sont parmi les causes les plus fréquentes de décès chez les humains. Ces maladies sont beaucoup moins fréquentes chez les animaux et font suite généralement à des maladies sous-jacentes. Toutefois, nous identifions de plus en plus d'animaux atteints de thromboembolies lors de nécropsie, suggérant que cette atteinte est plus fréquente que nous ne l'avions soupçonnée dans le passé.<sup>44</sup>

L'hémostase est traditionnellement divisée en 3 phases : l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse. Lors d'hémostase normale, il y a un équilibre entre la formation (coagulation) et la dégradation de caillots (fibrinolyse).<sup>44</sup>

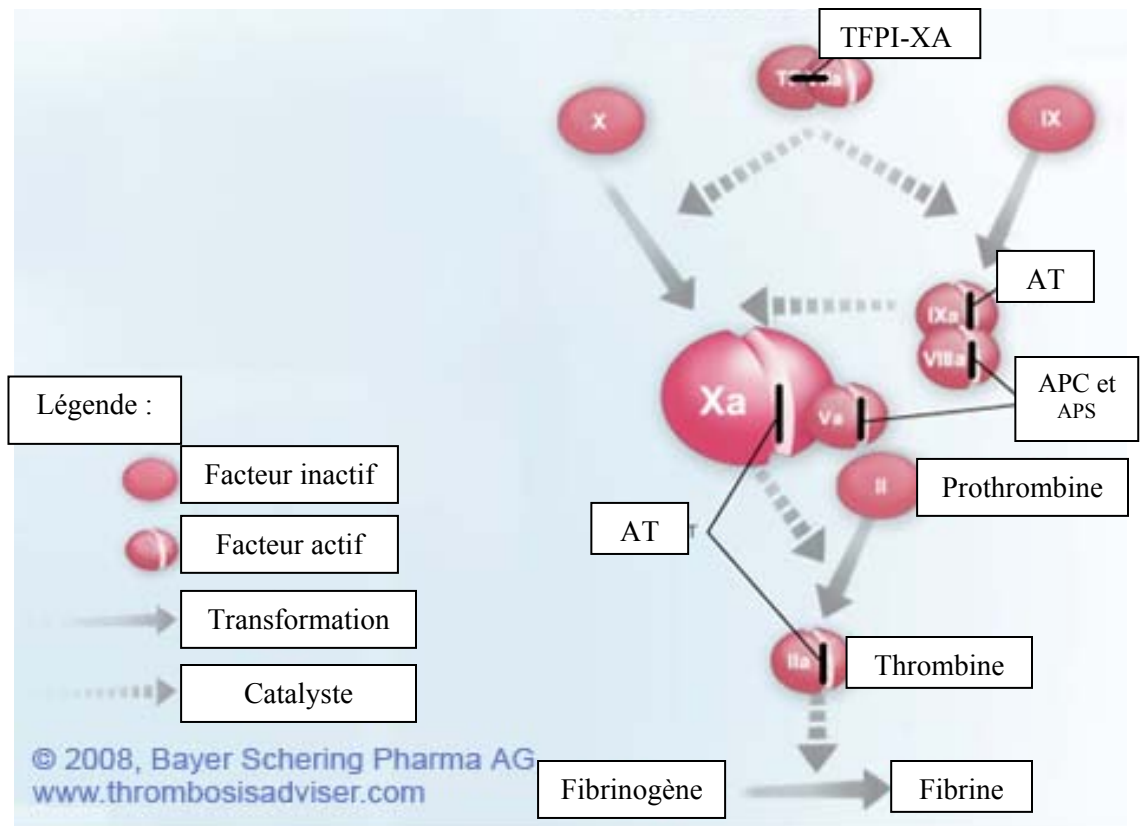
L'hémostase primaire implique les interactions entre les plaquettes, le facteur von Willebrand et l'endothélium vasculaire afin de former le bouchon plaquettaire. L'hémostase secondaire vient ensuite stabiliser ce bouchon plaquettaire en solidifiant les liens entre les plaquettes par l'entremise de la fibrine. Ceci est le résultat d'une cascade de coagulation composée de protéases synthétisées majoritairement par le foie et dont le but ultime est de transformer le fibrinogène en fibrine (figure 3). La thrombine est l'enzyme qui catalyse cette dernière transformation.<sup>20</sup>



**Figure 2 : La cascade de coagulation**

([http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot\\_05001/applications/indirecte.html](http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/applications/indirecte.html))

De plus, des inhibiteurs de la coagulation et des agents fibrinolytiques sont présents afin d'empêcher la généralisation de l'activation de l'hémostase. L'antithrombine est l'inhibiteur de coagulation le plus important. Celui-ci se lie à l'héparine et inactive rapidement la thrombine ainsi que les facteurs IXa, Xa (ainsi que le XIa et XIIa). Les protéines C et S participent aussi à l'inhibition de la coagulation en liant les facteurs VIIIa et Va.<sup>20</sup> L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (« Tissue factor pathway inhibitor » ou TFPI) est une protéine en circulation qui forme un lien avec le facteur Xa et inhibe son activité. Par la suite, le complexe TFPI-Xa lie le complexe VIIa-FT et l'inhibe.<sup>45</sup> (Figure 3)



**Figure 3: Les inhibiteurs naturels de la coagulation**

Enfin, la fibrinolyse, la dégradation de la fibrine par la plasmine, est responsable de la dissolution du caillot. La plasmine est formée par l'activation du plasminogène surtout via l'action de l'activateur tissulaire du plasminogène (« tissu plasminogen activator » ou t-PA). D'autres médiateurs, tels que l'urokinase, la bradykinine, la kallikréine et le facteur XII, peuvent contribuer à l'activation de la plasmine. La streptokinase produite par certaines bactéries peut aussi activer la plasminogène.<sup>44</sup>

Des recherches plus récentes suggèrent que ces événements se produisent simultanément plutôt qu'un à la suite de l'autre, avec une multitude d'interactions entre les différentes phases de la coagulation, les plaquettes et les cellules endothéliales. Ceci a mené au développement d'un nouveau modèle de la coagulation : le modèle cellulaire de la coagulation (« the cell-based model of coagulation »).<sup>10</sup> Ce modèle met en valeur le rôle du facteur tissulaire dans la coagulation et divise la coagulation en trois phases dynamiques : initiation, amplification et propagation.<sup>46</sup> Ce modèle

nous permet de comprendre certains phénomènes que la cascade de coagulation classique laisse non élucider. Par exemple, une déficience en facteur XII mène à une prolongation marquée du temps de coagulation activé sans pour autant être associée à des saignements cliniques chez les humains et les souris. De plus, certaines espèces n'ont pas de facteur XII (dauphins et baleines) et ne démontrent aucun problème de coagulation.<sup>47</sup>

## **A. Modèle cellulaire de la coagulation**

Tel que son nom le suggère, le modèle cellulaire de la coagulation (ou simplement, modèle cellulaire) repose sur des interactions entre cellules qui ont des récepteurs spécifiques pour les facteurs de coagulation, permettant ainsi une concentration de ces facteurs au site de la brèche vasculaire.<sup>47</sup> (Figure 4) Les cellules qui jouent un rôle dans la coagulation sont les globules rouges, les plaquettes, les leucocytes (granulocytes, monocytes et lymphocytes) et les cellules endothéliales.<sup>48</sup> Finalement, ce modèle reconnaît que ces mêmes facteurs de coagulation jouent aussi des rôles dans l'inflammation, l'intégrité vasculaire et la prolifération cellulaire.<sup>47</sup>

Le modèle cellulaire est divisé en trois étapes qui se superposent et qui se réalisent sur des surfaces cellulaires différentes : l'initiation a lieu sur des cellules exprimant le facteur tissulaire (FT), l'amplification implique les plaquettes et les cofacteurs et finalement la propagation survient à la surface des plaquettes et est responsable de la production d'une quantité importante de thrombine.<sup>49</sup>

### ***a. Initiation***

Tout comme dans le modèle traditionnel de la coagulation, la séquence d'événements de l'initiation débute par un dommage (trauma, inflammation) aux cellules qui expriment le FT (fibroblastes, cellules mononucléaires, macrophages ou cellules endothéliales). Cette étape peut

encore être considérée « extrinsèque » puisqu'elle se produit en dehors du réseau vasculaire et la coagulation progresse vers la formation d'un caillot seulement lorsque les plaquettes et protéines sortent de l'espace vasculaire.<sup>49</sup> Une fois le FT exposé, le facteur VIIa (FVIIa) se lie rapidement. Il est à noter que le FVIIa est le seul facteur qui circule sous sa forme active. Le complexe FT-VIIa active ensuite d'autres facteurs VII ainsi que les facteurs IX et X. Une faible quantité de FV est activée lentement par le FXa. Ensuite, le FXa et FVa s'agencent pour former le complexe prothrombinase qui clive la prothrombine pour former de la thrombine. Le FXa est confiné à la surface cellulaire et tout le FXa qui se détache est inactivé par l'antithrombine ou l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (« Tissue Factor Pathway Inhibitor » ou TFPI). Par contre, le facteur IXa peut se détacher et se fixer à la surface des plaquettes et cellules avoisinantes.<sup>47</sup>

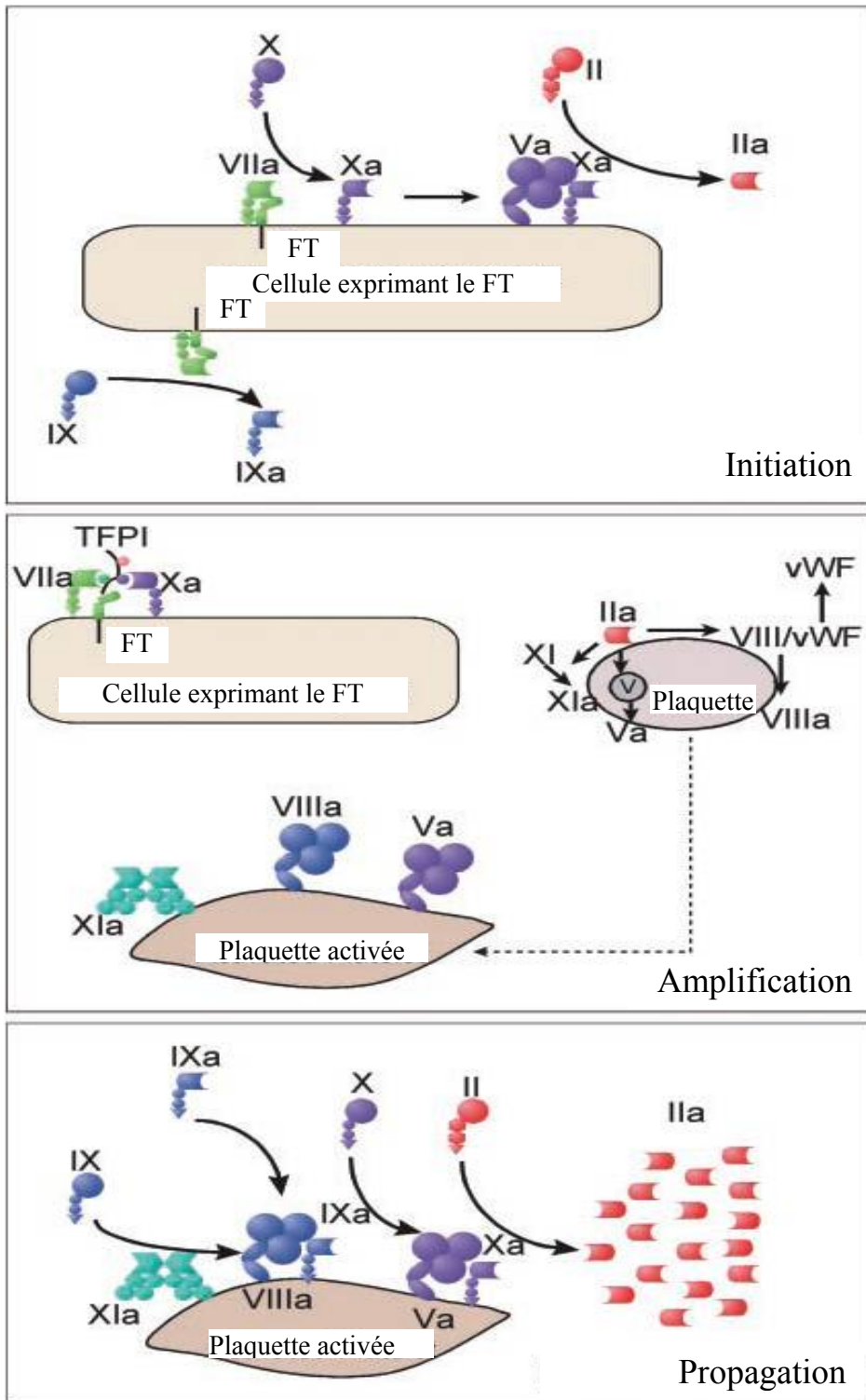
### ***b. Amplification***

Dès que la thrombine est générée à la surface des cellules exprimant le FT, elle se détache et devient disponible pour l'activation des plaquettes au site du dommage. La liaison de la thrombine à la surface plaquettaire cause un changement de conformation extrême, une migration des phospholipides (rendant ainsi la surface plaquettaire procoagulante) et une relâche de granules de protéines activatrices des plaquettes. De plus, la thrombine permet l'activation à la surface plaquettaire du FXI en FXIa et du FV en FVa et la séparation du FVIII et du facteur von Willebrand menant ainsi à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.<sup>47,49</sup>

### ***c. Propagation***

Lors de cette phase, les granules libérées par les plaquettes lors de l'amplification recrutent d'autres plaquettes. À la surface cellulaire de celles-ci, le FXIa se combine au FVIIa pour former le complexe tenase. La tenase active rapidement le FX en FXa, qui, comme dans la phase d'initiation, se combine au FVa pour former le complexe prothrombinase et pour convertir d'importantes

quantités de prothrombine en thrombine. Par la suite, la thrombine peut transformer le fibrinogène en fibrine, qui se polymérise spontanément afin de stabiliser le clou plaquettaire déjà en place.<sup>47,49</sup>



**Figure 4: Modèle cellulaire de la coagulation**

(Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Reviews 2003;17:S1-S5)



## B. Hypercoagulabilité

De manière générale, la pathophysiologie de la formation de thromboses est enseignée en utilisant le modèle de la « triade de Virchow » proposé en 1856. Ce dernier met en relation trois facteurs qui contribueraient à la formation de thromboses :

1. Anomalies de la structure ou de la fonction de l'endothélium;
2. Stase sanguine;
3. État hypercoagulable ou composition sanguine (soit une augmentation des facteurs procoagulants, une déficience des facteurs anticoagulants ou les deux).<sup>50</sup>

Malgré que ce modèle soit contesté et remis en question<sup>50,51</sup>, il permet de comprendre, du moins en partie, les maladies qui prédisposent à la formation de thromboembolies. La plupart des maladies qui prédisposent aux thromboses affectent plus d'une composante, mais la composition sanguine est de loin le facteur qui a été évalué le plus complètement<sup>44</sup>. Nous comprenons beaucoup moins bien les rôles de l'endothélium et de la stase sanguine.

Ce point est bien illustré lorsque nous regardons la différence entre un thrombus veineux et un thrombus artériel. Les thrombi artériels sont composés majoritairement de plaquettes et sont formés par des forces de cisaillement importantes. Alors que les thrombi veineux sont principalement composés de fibrine et de globules rouges et se forment à de faibles forces de cisaillement.<sup>45</sup> Nous voyons également une différence dans les facteurs qui initient la formation de ces deux thrombi. Tandis qu'il est bien reconnu que la formation d'un thrombus artériel fait souvent suite à un dommage endothélial permettant une exposition de facteurs adhésifs pour les plaquettes, les éléments déclenchant la formation d'un thrombus veineux sont moins bien connus. En fait, les thrombi veineux peuvent se former en absence de dommage à la membrane endothéliale.<sup>52</sup>

Plusieurs maladies sont associées au développement de thrombi/thromboembolies : les néoplasies, l'hyperadrénocorticisme, les maladies cardiaques, les maladies rénales, les maladies thyroïdiennes, l'anémie hémolytique à médiation immunitaire, la thrombocytopénie à médiation immunitaire, la septicémie, la coagulation intravasculaire disséminée, la pancréatite sévère, etc. Certaines de ces maladies causent clairement des dommages vasculaires endothéliaux (néoplasie, maladies cardiaques, maladies rénales), d'autres une stase sanguine (maladies cardiaques, néoplasie), tandis qu'encore d'autres sont responsables d'un changement de la composition sanguine occasionnant soit une augmentation des facteurs procoagulants soit une diminution des facteurs anticoagulants (maladies rénales).<sup>53</sup>

Pour mieux comprendre la triade de Virchow et comment une maladie peut affecter les trois éléments, utilisons l'exemple de la néoplasie. Chez les humains souffrant de cancer, il est estimé qu'au moins 20% auront un épisode de thromboembolie. Les tumeurs peuvent changer la composition sanguine en sécrétant directement des facteurs procoagulants ou via l'envoi de signaux à d'autres cellules pour qu'elles en synthétisent.<sup>52</sup> De plus, le cancer peut atteindre les vaisseaux et causer un dommage endothélial direct et prédisposer à une stase veineuse – soit par une diminution du niveau d'activité de l'individu associée aux effets systémiques du cancer, soit par l'accumulation de sang dans des vaisseaux anormaux.<sup>54</sup>

Le résultat de ces changements est la formation de thrombi (agrégation de plaquettes et autres composantes sanguines qui obstruent les vaisseaux). Les thrombi d'origine veineux peuvent se déloger, prendre la circulation sanguine, passer dans le cœur droit et s'installer dans la vascularisation pulmonaire pour former des thromboembolies pulmonaires.<sup>55</sup> Les thrombi et thromboembolies ont aussi été rapportés dans la veine porte, la veine cave, l'aorte, le cœur, les artères rénales et cérébrales, la veine fémorale et les vaisseaux de la microcirculation. Peu importe la localisation, l'absence d'apport sanguin dans les régions atteintes peut avoir des conséquences désastreuses.<sup>56</sup>

## C. Évaluation de l'hypercoagulabilité

Un des problèmes majeurs dans la prévention et le traitement des états d'hypercoagulabilités et des thrombi/thromboembolies qui en résultent est leur détection précoce. Parmi les tests diagnostiques utilisés en clinique de routine pour l'évaluation de la coagulation, il en existe peu qui permettent l'identification de condition hypercoagulable, surtout que ces tests n'évaluent qu'une partie de la coagulation et non le phénomène au complet.<sup>57</sup> Parmi ces tests, nous pouvons inclure le temps de prothrombine, le temps de thromboplastine partielle et le temps de coagulation activé (« Activated clotting time », ACT) qui évaluent certains facteurs de la cascade de coagulation. Malheureusement, ces tests sont insensibles pour la détection de maladies prédisposant aux thromboses.<sup>57,58</sup> De plus, ces tests utilisent comme point terminal la formation du caillot, ce qui se produit dès que 5% de la thrombine est générée<sup>59</sup>.

Une autre étude a démontré que l'utilisation de la mesure des produits de dégradation du fibrinogène (« Fibrinogen degradation products », FDP), qui résulte de la dégradation de la fibrine et du fibrinogène par la plasmine une fois que le caillot est formé, n'était pas utile pour le diagnostic de thromboembolies lorsque des chiens avec thromboembolies étaient comparés à des chiens en santé et des chiens avec des maladies autres que des thromboembolies. Par contre, la même étude soulignait que la mesure des D-dimères, produits de dégradation de la fibrine réticulée plus spécifique au processus de coagulation et de fibrinolyse, était utile pour identifier les chiens atteints de thromboembolies.<sup>58</sup> Néanmoins, aucune étude n'a évalué l'utilisation des D-dimères pour l'identification des chiens à risque de thromboembolies.<sup>58</sup> Finalement, certaines études démontrent que le dosage individuel de certains facteurs anticoagulants ou de fibrinolyse permettrait d'identifier des facteurs de risque pour le développement de thromboembolies. Entre autres, la diminution de la protéine C (facteur anticoagulant) serait associée au développement de thromboembolies chez des patients atteints de cirrhose hépatique.<sup>60</sup> L'antithrombine, quant à elle, serait associée avec la

progression de thromboses veineuses superficielles à profondes chez l'humain.<sup>61</sup> Par contre, il est aussi reconnu que les produits de dégradation de la fibrine (D-dimères et FDP), les peptides d'activation (fragment de prothrombine F1.2) et les complexes d'inhibiteurs enzymatiques (thrombine-antithrombine, TAT) sont influencés considérablement par des facteurs autres que la coagulation (élimination par le système endoplasmique réticulaire (SER) et le foie). En fait, ces facteurs seraient plus utiles pour la détection de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) que la détection d'un état prothrombotique.<sup>62</sup>

Tel qu'il a été mentionné, la formation de thromboses est le résultat de l'interaction entre plusieurs cellules, facteurs de coagulation et autres médiateurs autant procoagulants qu'anticoagulants. Des tests qui évaluent seulement une partie de la coagulation ne seront donc pas en mesure de détecter une augmentation du risque de thrombose (ou état hypercoagulable). Nous réalisons rapidement l'intérêt des méthodes diagnostiques qui permettent de rejoindre tous les éléments et toutes les étapes de la coagulation. Récemment, la thrombélastographie ainsi que la mesure de la génération de thrombine ont pris beaucoup d'importance en médecine humaine et en médecine vétérinaire puisqu'ils semblent estimer la coagulation d'une manière plus globale. Ces tests seront discutés en détail dans les prochaines sections.

### **3. L'hyperadrénocorticisme et les thromboembolies : une revue de la littérature humaine et canine**

Les chiens et les humains qui souffrent de la maladie de Cushing sont prédisposés aux thromboembolies. Chez les humains, le risque de mortalité suite à des thromboembolies est quatre fois plus important chez les patients atteints d'HAC que chez les individus en santé.<sup>3</sup> Chez les chiens, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les thromboembolies et l'hyperadrénocorticisme ou l'administration de glucocorticoïdes (tableau 1). Les complications

associées aux thromboembolies se manifestent surtout lors d'interventions chirurgicales pour le retrait de masses surrenaliennes.

**Tableau I: Études démontrant un lien entre l'hyperadrénocorticisme et le thromboembolies**

<i>Auteurs</i>	<i>Année</i>	<i>Localisation des embolies</i>	<i>Nombre total de chiens</i>	<i>Nombre de chiens atteints d'HAC</i>
<i>Burns et al.</i> <sup>63</sup>	1981	Poumons	3	3
<i>LaRue et al.</i> <sup>64</sup>	1990	Poumons	47	7
<i>Van Winkle et al.</i> <sup>53</sup>	1993	Aorte	36	2 confirmés 3 recevaient corticostéroïdes 1 suspecté
<i>Van Winkle et al.</i> <sup>65</sup>	1993	Veine porte	11	10 recevaient corticostéroïdes
<i>Hardie et al.</i> <sup>66</sup>	1995	Rate	16	5
<i>Johnson et al.</i> <sup>67</sup>	1999	Poumons	29	2
<i>Boswood et al.</i> <sup>5</sup>	2000	Aorte et artères iliaques	6	3 (1 pituitaire, 1 surrenalien et 1 iatrogénique)

Toutefois, la pathogénie de l'hypercoagulabilité lors d'HAC n'a pas été élucidée.

Plusieurs mécanismes ont été proposés, la plupart comprenant des modèles qui dépendent de facteurs multiples, mettant l'accent sur l'hypercoagulabilité. Une étude prospective chez le chien en 2001 menée par Jacoby et al. a révélé la présence d'une augmentation significative de plusieurs facteurs procoagulants (facteur II, V, VII, IX, X, XII et le facteur von Willebrand) en combinaison avec une diminution de l'antithrombine et une augmentation d'un indicateur de la thrombose sous-clinique, le TAT (thrombine-antithrombine) chez 56 chiens avec le syndrome de Cushing. De plus, l'étude de Feldman en 1986 sur 12 chiens atteints d'HAC a révélé une augmentation de l'antithrombine, ce qui est paradoxal, étant donné sa fonction anticoagulante. Ce n'est pas la seule étude qui démontre un tel changement, le tableau II résume plusieurs études humaines et canines qui ont étudié la question. Nous voyons que plusieurs d'entre elles se contredisent; aucun facteur n'est augmenté de manière constante lors de ces études. De plus, certaines études démontrent seulement une dysfonction de l'hémostase, tandis que d'autres mettent en évidence un problème de l'hémostase ainsi que de la fibrinolyse.

**Tableau II: Mécanismes misent en cause pour la formation de thromboses lors d'hyperadrénocorticisme ou d'administration de glucocorticoïdes**

<i>Auteurs</i>	<i>Humain ou Canin</i>	<i>Mécanismes mis en cause</i>
<i>Feldman, Rasedee et al. 1986<sup>68</sup></i>	Canin	Augmentation des facteurs V et X Augmentation du fibrinogène Augmentation de l'antithrombine III Augmentation de plasminogène
<i>Keyes, Rush et al. 1993<sup>55</sup></i>	Canin	Augmentation des facteurs V, X et fibrinogène Augmentation de plasminogène et d'antithrombine III Obésité, hypertension, hypercholestérolémie, polycythémie
<i>Ortega, Feldman et al. 1996<sup>69</sup></i>	Canin	Augmentation des facteurs II, VII, IX, X, V et vWF :Ag
<i>Jacoby, Owins et al. 2001<sup>3</sup></i>	Canin	Augmentation des facteurs II, V, VII, IX, X, XII et du fibrinogène Diminution d'antithrombine III Augmentation des complexes thrombine-antithrombine
<i>Boutelier et al. 2004<sup>8</sup></i>	Canin	Augmentation de l'activité plaquettaire Augmentation du comptage plaquettaire Augmentation du fibrinogène
<i>Isacson 1970<sup>70</sup></i>	Humain	Diminution de tPA
<i>Sjoberg, Blomback et al. 1976<sup>71</sup></i>	Humain	Augmentation des facteurs VIII et V Augmentation de la prothrombine
<i>Dal Bo Zanon et al. 1982<sup>6</sup></i>	Humain	Augmentation du facteur VIII
<i>Patrassi, Zanon et al. 1985<sup>72</sup></i>	Humain	Augmentation des facteurs XII, XI, IX et VIII Augmentation de plasminogène et d'alpha-2 antiplasmine
<i>Casonato, Pontara et al. 1999<sup>73</sup></i>	Humain	Augmentation de vWF, vWF anormal Augmentation du facteur VIII
<i>Fatti, Bottasso et al. 2000<sup>74</sup></i>	Humain	Augmentation du vWF Augmentation de l'activateur-inhibiteur de la plasmine Augmentation des complexes thrombine-antithrombine Augmentation des complexes plasmine-antiplasmine
<i>Ambrosi, Sartorio et al. 2000<sup>4</sup></i>	Humain	Augmentation du fibrinogène

Comme le tableau II le démontre, il y a un désaccord entre les diverses études. De plus, il est reconnu que les tests de coagulation traditionnels (comptage plaquettaire et temps de saignement buccal pour l'hémostase primaire; PT, aPTT et ACT pour l'hémostase secondaire; produits de dégradation comme les FDPs et D-dimères pour la fibrinolyse; dosages de protéines C et S pour l'évaluation de l'activité anticoagulante endogène) ne sont pas sensibles pour la détection des états hypercoagulables. Il est aussi important de noter que l'augmentation des facteurs de

coagulation en circulation n'indique pas forcément un état hypercoagulable, car les facteurs fibrinolytiques pourraient être augmentés en même temps. Finalement, il n'y a pas d'études longitudinales qui démontrent que les patients souffrant d'hyperadrénocorticisme et qui ont des changements dans leurs facteurs de coagulation développent des thromboembolies.<sup>46</sup>

## 4. Thrombélastographie

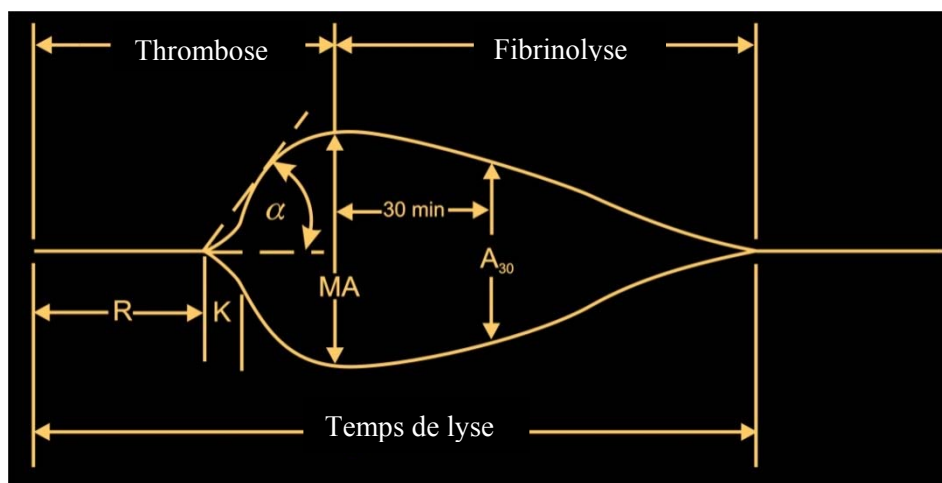
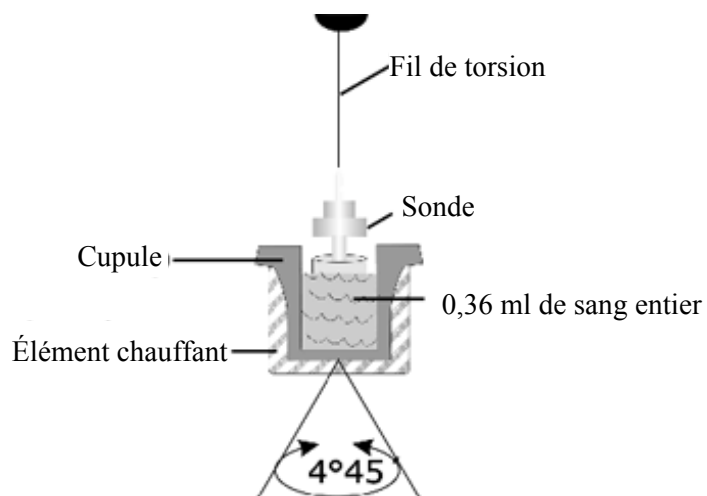
### A. Principes du test

La thrombélastographie (TEG® Haemoscope Corp.) est un test qui permet une évaluation globale de la coagulation sur du sang entier. Décrite pour la première fois en 1948 par Hartert, la TEG® mesure les propriétés viscoélastiques de la formation du caillot.<sup>75</sup> La TEG® évalue non seulement une portion de la coagulation, mais les phases d'initiation, d'amplification, de propagation ainsi que la fibrinolyse, tout en tenant compte du rôle des plaquettes et des facteurs de coagulation. Initialement, le sang entier était évalué immédiatement après le prélèvement sanguin. Puisque ceci était peu pratique, une technique a été développée pour l'usage de sang citraté qui est ensuite recalcifié.<sup>46</sup> Pour accélérer la formation du caillot, l'échantillon peut être activé avec de la céliste, de la thrombine, du facteur tissulaire ou d'autres substances.<sup>76</sup> Récemment, la TEG® activée par du facteur tissulaire recombinant humain a été validée chez les chiens en santé et chez le cheval.

<sup>77,78</sup>

La technique exacte de TEG® sera décrite dans les articles, cette section sert de description générale et d'interprétation de la procédure. En bref, du sang citraté est placé dans une cupule maintenue à 37°C (figure 4). Cette cupule oscille de 4°45' dans les deux directions. La coagulation est initiée en ajoutant du calcium et du facteur tissulaire. Le changement dans les propriétés viscoélastiques du sang est ensuite détecté par une sonde placée dans la coupole. Cette sonde

convertit le signal pour générer un tracé illustrant la formation du caillot (figure 5). Plusieurs valeurs sont ensuite mesurées et comparées à des valeurs de référence déjà établies. Le tableau III décrit celles-ci.



*Figure 5 : Schématisation de l'appareil et du tracé TEG®*

(<http://www.haemoscope.com>)



**Tableau III : Paramètres mesurés à partir du tracé de TEG®**

Paramètre	Description	Facteurs affectant la mesure	Interprétation
<b>Temps « R » (temps de réaction)</b>	Temps entre le placement du sang dans la coupole et le début de formation du caillot (amplitude de 2 mm)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Facteurs VIII, IX, XI et XII</li> </ul>	Évalue l'activation et la formation de fibrine
<b>Temps « K »</b>	Temps entre une amplitude de 2 mm et 20 mm	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Facteurs II, VIII</li> <li>•Comptage et fonction plaquettaire</li> <li>•Formation de thrombine</li> <li>•Concentration de fibrinogène</li> <li>•Hématocrite</li> </ul>	Évalue la rapidité de formation d'un caillot à une force prédéterminée
<b>Angle alpha (<math>\alpha</math>)</b>	Pente entre R et K	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Facteurs II, VIII</li> <li>•Comptage et fonction plaquettaire</li> <li>•Formation de thrombine</li> <li>•Concentration de fibrinogène</li> <li>•Hématocrite</li> </ul>	Évalue la rapidité de l'augmentation de la force du caillot
<b>MA (Maximum amplitude)</b>	Point d'amplitude maximale	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Fibrine</li> <li>•Fibrinogène</li> <li>•Comptage et fonction plaquettaire</li> <li>•Facteur XIII</li> <li>•Hématocrite</li> </ul>	Mesure la force maximale du caillot
<b>LY<sub>30</sub></b>	Degré de réduction d'amplitude (en pourcentage du MA) 30 minutes après le MA		Reflète la fibrinolyse

De manière générale, un tracé hypocoagulable est caractérisé par des temps R et K prolongés et une diminution de l'angle alpha et du MA.<sup>76</sup> Il a été suggéré que la TEG® serait une méthode plus précise que les tests de coagulation courants pour la détection des états hypercoagulables. Peu d'études existent pour démontrer un lien cause à effet entre un tracé TEG® hypercoagulable et le développement de thromboembolies.<sup>79</sup> Une étude prospective humaine a enquêté sur le lien entre les paramètres de la TEG® en période préopératoire et le risque de thromboembolies veineuses en postopératoire. L'étude a démontré qu'une augmentation du MA était sensible à 72% et spécifique à 69% pour prédire la formation de thromboembolies veineuses.<sup>80</sup> Une autre étude démontrait le même lien entre le MA et les thromboses suite à des chirurgies non-cardiaques majeures.<sup>81</sup>

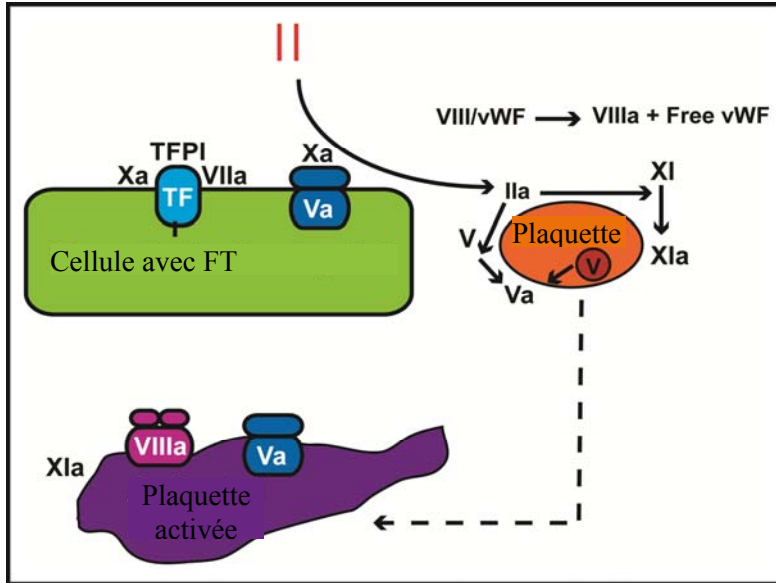
## B. Études antérieures chez le chien

Depuis quelques années, de plus en plus d'études canines utilisent la thrombélastographie pour évaluer les effets de diverses maladies sur la coagulation. Entre autres, la TEG® a mis en évidence un état hypercoagulable (augmentation de la valeur du MA) chez des patients avec des entérites à parvovirus<sup>11</sup> et diverses néoplasies,<sup>13</sup> ainsi que chez des patients hospitalisés aux soins intensifs<sup>14</sup>. De plus, la TEG® aiderait à déterminer quels patients seraient hypocoagulables et quels seraient hypercoagulables lors de coagulation intravasculaire disséminée.<sup>12</sup>

## 5. Génération de thrombine

### A. Thrombine

La thrombine joue un rôle central dans la coagulation et la fibrinolyse. La thrombine (aussi connu sous le nom de facteur II activé ou FIIa) est une molécule qui provient de l'activation de la prothrombine. Nous reconnaissons maintenant que la coagulation ne se déroule pas d'une manière séquentielle, par les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation, mais plutôt de manière simultanée avec une interaction avec toutes les composantes à la fois. Dans la phase d'initiation, l'exposition de facteur tissulaire à la surface endothéliale mène à la production d'une infime quantité de thrombine sur des surfaces composées de phospholipides. Par la suite, cette thrombine amplifie sa propre production en activant les facteurs V, VIII et XI (« thrombin burst »).<sup>16,59</sup> La majorité de la thrombine est produite à la surface des plaquettes.<sup>16</sup>



**Figure 6 : La production de thrombine (facteur II)**

(Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Reviews 2003;17:S1-S5)

Les effets de la thrombine sont multiples :

- La thrombine clive partiellement le fibrinogène soluble pour former la fibrine qui se polymérise spontanément et forme un caillot.
- La thrombine active le facteur XIII qui permet d'établir des liens covalents solides entre les domaines D de molécules de fibrine adjacentes et permet une stabilisation du caillot.
- La thrombine exerce un rétrocontrôle positif qui mène à la génération de FVa, FVIIa, FVIIIa et FXIa et donc à la production de plus de thrombine.
- La thrombine entraîne une vasoconstriction locale par ses effets sur les muscles lisses et les récepteurs adrénergiques.
- La thrombine joue aussi un rôle dans la fibrinolyse en activant la thrombomoduline. Le complexe thrombine-thrombomoduline empêche la dégradation du fibrinogène en fibrine, permet une activation de la protéine C (qui se lie à la protéine S pour

inactiver plusieurs facteurs de coagulation), et accélère la désactivation des facteurs Xa et IXa par l'antithrombine.<sup>82</sup>

- La thrombine est un puissant activateur plaquettaire.

La capacité de générer de la thrombine et l'action enzymatique de cette dernière déterminent la capacité du sang à coaguler. Il n'y a aucune hémostasie qui se produit en absence de thrombine.<sup>57</sup> Donc, la mesure de l'action enzymatique de la thrombine permettrait d'apprécier la somme de plusieurs facteurs de coagulation.<sup>16</sup> Ainsi, c'est le potentiel de travail de la thrombine que nous voulons mesurer, car cela nous permettrait de prédire le « potentiel » de coagulation d'un patient.<sup>16</sup> Il est suggéré que la mesure de ce potentiel permettrait d'avoir une meilleure évaluation de l'état d'hyper- ou d'hypocoagulabilité d'un patient.<sup>59</sup>

## **B. Mesure de la génération de thrombine**

Les tests de coagulation traditionnels (PT, PTT) évaluent seulement la première phase de la coagulation. Ces tests utilisent la formation d'un caillot comme point final. Puisque seulement 5% de la thrombine physiologique est générée à ce point, nous n'évaluons pas la pleine capacité de coagulation de l'individu. La mesure de la génération de thrombine constitue le résultat final de l'interaction entre les facteurs pro- et anticoagulants; elle représente plus adéquatement le potentiel thrombotique (augmentation de la génération de thrombine) ou hémorragique (diminution de la génération de thrombine) d'un patient.<sup>59</sup>

Pendant plusieurs années, la mesure de la génération de thrombine était lourde et non standardisée. Le test était fait en introduisant l'échantillon à une solution de fibrinogène à des intervalles déterminés afin de déterminer le temps de formation de caillot. Par la suite, une calibration avec une solution de thrombine à une concentration prédéterminée était faite. Ce test contenait plusieurs sources d'erreurs et était très imprécis.<sup>16</sup> C'est Hemker qui a proposé pour la

première fois la mesure en continu de la génération de thrombine avec une calibration automatique, rendant ainsi la mesure de la génération de thrombine plus standardisée et beaucoup plus accessible.

<sup>57</sup> La solution de fibrinogène a d'abord été remplacée par un substrat chromogénique et l'échantillon plasmatique défibriné, ce qui minimise l'erreur causée par la déplétion du substrat. De plus, le tout a été automatisé afin de réduire l'erreur associée au minutage. Par contre, cette procédure ne tient toujours pas compte de la dégradation de la thrombine. La thrombine est normalement neutralisée de deux manières : par l'antithrombine qui bloque le site actif et par l' $\alpha$ 2-macroglobuline qui bloque le site qui lie le substrat, mais pas le site actif. Ainsi, la thrombine qui est liée par l' $\alpha$ 2-macroglobuline peut encore cliver la thrombine dans l'analyse, ce qui surestime le potentiel de thrombine de l'échantillon. Seule la thrombine libre est active in vivo et un algorithme a été développé, mesurant le potentiel physiologique de la thrombine. Ce paramètre se nomme le potentiel endogène de thrombine (« endogenous thrombin potential » ou « ETP »). Finalement, le substrat chromogénique a été remplacé par un substrat fluorogénique à réaction lente qui n'est pas affecté par la turbidité. Il ne requiert donc pas la défibrination de l'échantillon. <sup>16</sup>

À la suite de toutes ces modifications, un test (« Calibrated Automated Thrombogram », CAT) a été développé et est maintenant employé dans plusieurs laboratoires. À l'aide d'un fluoromètre, une courbe est générée qui représente graphiquement la présence de thrombine dans le sang suite à une stimulation similaire à ce qui se produit physiologiquement. L'analyse peut se faire sur du plasma riche en plaquettes autant que sur du plasma pauvre en plaquettes. Une très faible concentration de facteur tissulaire est utilisée pour déclencher la réaction. Le terme « thrombinographie » s'applique aussi à cette mesure. Les détails techniques de l'analyse seront discutés dans la section dédiée aux matériaux et méthodes. Une courbe est générée (figure 8) et plusieurs paramètres sont retenus. Ceux-ci et leur interprétation se retrouvent dans le tableau IV.

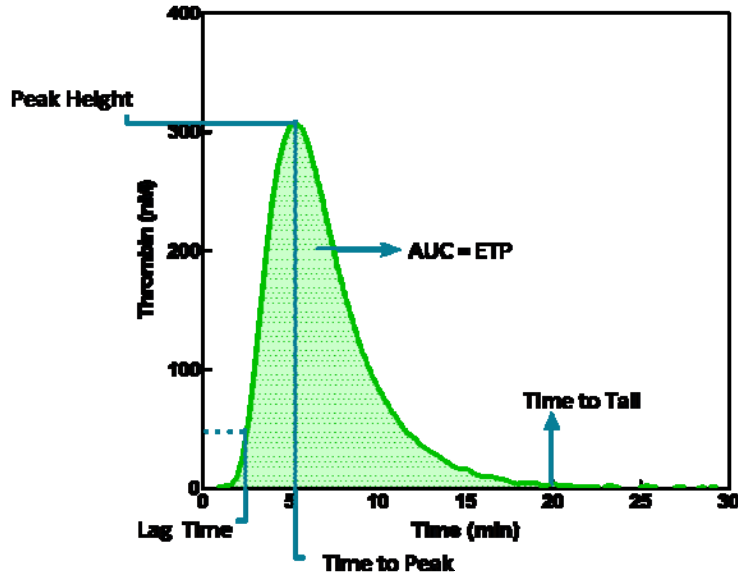


Figure 7 : Thrombogramme. AUC : Aire sous la courbe (“Area under the curve”), ETP:Potentiel endogène de thrombine (“Endogenous thrombin potential”). (Les paramètres sont décrits dans le tableau qui suite)

<http://www.thrombinoscope.com> (2009)

Tableau IV : Paramètres et interprétation du thrombogramme <sup>83,84</sup>

Paramètre	Description	Interprétation
« Exogenous thrombin potentiel » (ETP) ou potentiel de thrombine endogène	Aire sous la courbe exprimée en $\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$	Quantité globale de thrombine générée
« Lag time » : temps de latence	Temps en minutes jusqu’à la formation de 10 nM de thrombine	Représente le temps de coagulation et les phases d’initiation et amplification
« Peak height » : hauteur du pic	Hauteur maximale de la courbe en nM de thrombine	Concentration maximale de thrombine
« Time to peak » : temps jusqu’au pic	Temps auquel la concentration maximale de thrombine est atteinte (en minutes)	Durée totale de la phase fortement procoagulante de la réaction qui comprend l’initiation, l’amplification et la propagation
« Time to tail » : temps jusqu’à la queue	Temps au-delà duquel il n’y a plus de thrombine libre (en minutes)	Fin de la coagulation

### C. Études portant sur l'utilisation de la génération de thrombine pour évaluer la coagulation

À ce jour, il y a peu d'études publiées évaluant la génération de thrombine chez le chien. Par contre, le laboratoire de coagulation de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal vient de réaliser une étude d'évaluation des valeurs normales pour la génération de thrombine chez le chien, ainsi que l'effet de l'héparine sur ces paramètres.<sup>85</sup>

En médecine humaine, il existe une panoplie d'études depuis quelques années évaluant, entre autres, la variabilité de la génération de thrombine chez les humains en santé<sup>86</sup>, l'effet des plaquettes sur la génération de thrombine<sup>87</sup> et l'effet de déficiences de facteurs de coagulation sur la génération de thrombine<sup>88</sup>. De plus, un protocole a été développé pour l'évaluation de la génération de thrombine sur du plasma riche en plaquettes et du plasma pauvre en plaquettes chez la souris.<sup>89</sup> Il y a beaucoup d'intérêt pour l'utilisation de la génération de thrombine pour évaluer l'hypercoagulabilité et identifier les patients à risque de thrombose de même que pour le suivi des patients qui reçoivent des anticoagulants pour un épisode de thromboses. Pour ces raisons, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer s'il y a une corrélation entre une augmentation de la génération de thrombine et la formation de thromboses. Il est bien reconnu qu'il existe beaucoup de variabilité inter-laboratoire dans l'évaluation de la génération de thrombine. Ce manque de standardisation est le résultat de quelques facteurs : l'utilisation interchangeable de plasma pauvre en plaquettes, plasma riche en plaquettes et du plasma riche en plaquettes congelé-décongelé et l'utilisation de différentes concentrations de facteur tissulaire ou phospholipides pour l'activation de la GT.<sup>59</sup> Le tableau V est un résumé du tableau publié par van Vleen et al. qui est une excellente revue des études faites en médecine humaine évaluant l'effet de maladies thromboemboliques sur la génération de thrombine. En médecine humaine, il est connu que les contraceptifs oraux peuvent mener à des états hypercoagulables et donc ces patients ont souvent été inclus dans ces études.

Une seule étude évaluant la génération de thrombine chez le chien a été publiée à date. Les auteurs ont évalué l'effet de l'administration d'héparine non-fractionnée sur des beagles. Leurs conclusions étaient que la génération de thrombine est applicable chez le chien et que celle-ci permet un suivi de l'effet de l'héparine non-fractionnée.<sup>85</sup>

**Tableau V : Études évaluant la relation entre la génération de thrombine et les états hypercoagulables.<sup>59</sup>**

Étude	Patients	Résultats
<b>Van Hylekama Vlieg et al., 2007</b>	360 patients après premier épisode de TEV et 404 contrôles	Le rapport de cote est augmenté dans les groupes avec thromboembolies lorsque le PTE dépasse le 90 <sup>e</sup> percentile du groupe contrôle.
<b>Hron et al., 2006</b>	914 patients avec premiers TEV et 100 récurrences	Risque de récurrence de 6.5% si « pic » < 400 nmol/L et 20% si « pic » > 400 nmol/L.
<b>Dargaud et al., 2006c</b>	71 patients en santé, 11 femmes sur CO, 89 patients après premier épisode de TEV (50 avec thrombophilie héréditaire)	Un ETP > médiane + 2 écarts-types faisait augmenter le rapport de cote à 40.5 chez des patients avec une thrombophilie héréditaire.
<b>Liestol et al. 2007</b>	81 patients avec LA (52 APS, 34 sur warfarin) et 91 contrôles	La génération de thrombine dans le plasma LA augmente indépendamment de l'usage de warfarin et le degré d'APC et semble associée avec les événements de TEV.
<b>Castoldi et al., 2007</b>	302 individus n'ayant pas de liens de parenté 167 hétérozygotes pour une mutation augmentant le facteur II (39 ayant déjà eu un TEV), 3 homozygotes et 132 n'ayant pas de mutation (14 avec TEV)	La génération de thrombine augmente significativement avec une augmentation du facteur II suite à cette mutation.
<b>Tappenden et al., 2007</b>	50 patients avec TEV (56% idiopathique) et 31 contrôles	La génération de thrombine est augmentée chez les patients avec TEV seulement lorsque le sang entier est analysé.
<b>Andresen et al., 2004</b>	24 patients avec thrombophilie héréditaire, 24 contrôles	PTE moyen des patients > contrôles
<b>Luddington &amp; Baglin, 2004</b>	20 patients avec TEV idiopathique et 10 contrôles	Augmentation significative de la génération de thrombine lors de TEV

TEV : thromboembolie veineuse

PTE : potentiel de thrombine endogène

CO : contraceptifs oraux

LA : lupus anticoagulant

APS : anti-phospholipid syndrome



## **Chapitre 2 : Articles**

# 1. Article 1 :

Effect of prednisone administration on coagulation parameters in healthy beagles

Authors:

Lara Rose, DVM, Dipl. ACVIM, Hôpital Vétérinaire Rive-Sud, Montreal

Marilyn E. Dunn, DVM, MVSc, Dipl. ACVIM, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Virginie Allegret, DVM, Dipl. ACVP, Charles River, Senneville

Christian Bédard, DVM, MSc, Dipl. ACVP, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Université de Montréal

Short title: Coagulation and prednisone in beagles

Keywords: Corticosteroids; Hemostasis; TEG®; Thrombin Generation;

Abbreviations: TEG®: Thrombelastography, CBC: Complete blood cell count, UA: urinalysis, TG: Thrombin Generation, CS: Cushing's Syndrome, PPP: Platelet-poor plasma, PRP: Platelet-rich plasma

Corresponding author: Lara Rose, DVM, BSc. Agr., DES; Hôpital Vétérinaire Rive-Sud, 7415 boulevard Taschereau, Brossard, Québec, J4Y 1A2

This work was accomplished in the coagulation laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) of the University of Montreal in Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

This study was supported by the Fonds du Centenaire of the University of Montreal.

This paper was presented in part in the form of a research abstract at the 26<sup>th</sup> Annual ACVIM Forum in San Antonio, Texas.

## D. Abstract

**Background:** Long-term corticosteroid therapy has been associated with an increased risk of thrombotic disease in dogs.

**Objectives:** The purpose of this prospective study was to use thrombelastography (TEG®) and thrombin generation (TG) to detect the development of a hypercoagulable state in healthy beagles receiving oral prednisone. We hypothesized that the administration of corticosteroids would result in a hypercoagulable profile on TEG® tracings and an increase in TG.

**Methods:** Six healthy adult beagles from the University of Montreal's research colony were used to conduct a prospective longitudinal study whereby all dogs received 1 mg/kg of prednisone orally once daily for two weeks, followed by a 6-week washout period and then 4 mg/kg of prednisone orally once daily for two weeks. TEG® tracings on citrated whole blood and TG measurements on frozen-thawed PPP were obtained before prednisone administration (baseline), at the end of the washout period and at the end of both corticosteroid trials.

**Results:** Significant results as compared to baseline were obtained for K,  $\alpha$  and MA, with tracings compatible with a hypercoagulable profile following both corticosteroid trials. Thrombin generation resulted in a significant increase in endogenous thrombin potential after 1 mg/kg only.

**Conclusion and clinical importance:** The administration of prednisone to healthy beagles resulted in the development of hypercoagulable TEG® tracings, whereas the effect on TG appeared more variable. Further studies are needed to determine the underlying mechanisms of this hypercoagulability and its clinical impact.

## E. Introduction

Both dogs and humans receiving glucocorticoids are predisposed to the development of thrombotic disease.<sup>3</sup> In dogs, previous studies have linked the presence of thrombotic diseases to hyperadrenocorticism or the administration of glucocorticoids.<sup>5,53,63-67</sup> The anatomic location of these thromboemboli is variable and appears to be most commonly reported in the pulmonary arteries, aorta and splenic vein.<sup>5,53,63,65-67</sup> Despite these studies, the pathogenesis of the thrombotic disease that develop in these patients is poorly understood. Many mechanisms have been put forward, most of which use multifactorial models that place an emphasis on hypercoagulability. One prospective study evaluated the role of secondary hemostasis in 56 dogs with hyperadrenocorticism. This study revealed an increase in the activity of multiple coagulation factors (II, V, VII, IX, X, XII and von Willebrand). Furthermore, a decrease in antithrombin and an increase in thrombin-antithrombin complexes (TAT), an indicator of ongoing thrombin generation, were also detected.<sup>3</sup> Another study evaluating 12 dogs suffering from CS (Cushing's Syndrome) showed an increase in antithrombin alone.<sup>68</sup> Other similar studies have failed to show consistently increased or decreased activity of clotting factors.<sup>55, 69</sup>

Furthermore, some studies have implicated platelets as the main players in the development of thrombotic disease.<sup>90</sup> To further confuse the issue, human CS studies show various increases and decreases in procoagulant factor activity as well as changes in the fibrinolytic system.<sup>74</sup>

It is acknowledged that the traditional tests used to evaluate coagulation are not sensitive for the detection of hypercoagulable states. These tests include: platelet counts, buccal mucosal bleed times for primary hemostasis and PT (Prothrombin time), aPTT (activated partial thromboplastin time) and ACT (Activated clotting time) for secondary hemostasis, degradation products such as FDPs (Fibrinogen degradation products) and D-dimers for fibrinolysis and measurement of proteins C and S and antithrombin to evaluate endogenous anticoagulant

potential.<sup>46</sup> It is also known that alterations in circulating coagulation factors do not translate directly to a hypercoagulable state or that patients with thrombosis may not have abnormalities in coagulation factors.<sup>91</sup> Finally, there are no longitudinal studies that have showed that patients receiving long-term corticosteroid therapy have changes in coagulation factors that lead to the development of thrombotic disease.<sup>46</sup>

The use of the cell-based model of coagulation has allowed a much better understanding of the *in vivo* process of coagulation. It places emphasis on the role of thrombin in hemostasis and it is the balance of production and degradation of thrombin that determines if a patient is hypo- or hypercoagulable. It also allows us to understand that primary and secondary hemostasis as well as the intrinsic and extrinsic pathways must not be viewed as separate entities but as synergistic. It is with this understanding, that the importance of tests that evaluate global whole-blood hemostasis become apparent.<sup>47</sup>

Contrary to other techniques, TEG® provides an evaluation of all three phases of coagulation (initiation, amplification and propagation) as well as fibrinolysis, dependent on both coagulation factors as well as platelets and takes into account the importance of the contribution of the cellular component to coagulation.<sup>77</sup> Recent studies have used TEG® to detect hypercoagulable states in canine patients with parvoviral enteritis, disseminated intravascular coagulation, neoplasia and patients hospitalised in the ICU.<sup>11,13,14,92</sup>

The interest in measuring TG results from the theory that the amount of thrombin in the blood is the final result of the interaction of all the procoagulant and anticoagulant factors and an increase in TG would be the best indicator of a prothrombotic state.<sup>59</sup> The Calibrated Automated Thrombogram (CAT®) allows the measurement of endogenous thrombin potential in many different types of blood samples.<sup>16</sup> Although not widely used in veterinary patients, the technique has recently been validated by our laboratory in samples obtained from normal and sick dogs as

well as heparinised samples.<sup>93</sup> The technique has also been used in human patients to identify prothrombotic states associated with many different diseases predisposing to the development of thromboembolic complications.<sup>59</sup> The objective of the study was to use methods assessing overall coagulation to characterize changes in coagulation associated with the administration of prednisone to healthy beagles. Our hypothesis was that dogs receiving glucocorticosteroids would present a hypercoagulable TEG profile as well as an increase in the endogenous thrombin potential. We further hypothesized that the glucocorticoid dose would be directly correlated to the degree of hypercoagulability as assessed by these methods.

## F. Materials and Methods

This study was approved by the ethics committee of the Université de Montréal. The study was a prospective study conducted on 6 healthy adult research beagles: 3 castrated males and 3 intact females with a median weight of 11.7 kg (range 9.3-15.0 kg). All dogs were considered to be healthy based on medical records, complete physical examination, CBC and biochemistry profile. No dog had received any glucocorticoid, NSAID (non-steroidal anti-inflammatory) or other treatment that could influence coagulation in the 6 months prior to the beginning of the study. Throughout the study period, dogs were housed together in the research facility, were fed once daily, had daily access to the exercise yard and received no other medication. The dogs had a complete physical examination by an experienced veterinarian (LR) daily during the prednisone administration and weekly throughout the washout period.

### *d. Study design*

The study was divided into four time periods; samples were obtained for TEG® analysis and TG at each time period. The dogs were administered prednisone (Apo-Prednisone 5mg and 50 mg tablets, Apotex Inc., Toronto, Canada) at a dose of 1 mg/kg PO once a day from baseline for a total of 2 weeks. The dose was calculated based on estimated lean body weight and ranged between 0.91 and 1.07 mg/kg. After this, the dogs underwent a six-week wash-out period (8 weeks from the beginning of the study). Dogs were then administered prednisone at a dose of 4 mg/kg PO once a day for 2 weeks. Exact dose based on lean body weight ranged between 3.77 and 4.2 mg/kg. Samples were obtained at baseline, after 2 weeks of prednisone 1 mg/kg PO once a day, after a 6-week washout period and after 2 weeks of prednisone at 4 mg/kg PO once a day.

### ***e. Blood collection***

Blood was collected by clean stick jugular venipuncture with the dog in either dorsal or sternal recumbency. A 21G vacutainer needle was used. To clear possible tissue factor contamination from jugular trauma, 2.7 ml of blood was collected in a dry tube (3 ml dry tube, Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and then 4 citrated tubes (2.7 mL, 3.2% buffered sodium citrate (0.3 mL; 0.109M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) were filled in a blood to citrate ratio of 9:1. Two tubes were gently inverted 10 times and then left at room temperature for 30 minutes before running TEG® assays. The remaining tubes were centrifuged at 3300 g for 10 minutes at 7°C. The PPP was then collected, placed in plastic tubes (aliquots of 1 cc) and immediately placed in a freezer at -80°C until TG was run.

### ***f. Thrombelastography***

Thrombelastography studies were performed on whole blood (WB) 30 minutes after blood collection with a Thrombelastograph® Hemostasis Analyser 5000 (TEG®) (Haemoscope, Niles, USA). Coagulation was initiated using recombinant tissue factor (Innovin, Dade Behring, Marburg, Germany) diluted 1/100 in PBS (Phosphate buffered saline) solution containing 4% bovine serum albumin, pH 7.4. Briefly, TEG® assays were performed by adding to the reaction cup 10µL of tissue factor and 20µL of CaCl<sub>2</sub> (0.2M) mixed with 320µL of citrated whole blood. Tracings were run at 37 °C for 120 minutes in duplicate. Values for reaction time (R), clotting time (K), angle ( $\alpha$ ), and maximum amplitude (MA) were recorded.

### ***g. Fluorogenic thrombin generation***

All samples were run with the fluorogenic Calibrated Automated Thrombogram (CAT®) assay by Thrombinoscope® using the technique described by Hemker.<sup>84</sup> The CAT assay used a fluorogenic thrombin substrate and measured thrombin generation by comparing the fluorescence in



plasma during clotting after tissue factor activation to the fluorescence of a reference thrombin calibrator. Each experiment required two sets of readings, one from wells in which thrombin generation (TG) took place and one from wells in which the thrombin calibrator (Cal) was added. In each well, 80  $\mu$ l PPP was added to 20  $\mu$ l of the buffer solution containing the trigger solution in the TG wells or to 20  $\mu$ l of the thrombin calibrator in the Cal wells. The trigger solution contained a mixture of phospholipids and human recombinant tissue factor (provided by Thrombinoscope at a concentration of 5 pM). Thrombin generation was initiated by adding 20  $\mu$ l of a solution containing calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) in a Hepes buffer (pH 7.35) and the fluorescent substrate to the TG and Cal wells. The final solution contained 5pM of tissue factor and 4 $\mu$ M of phospholipids. Fluorescence was measured by an automated plate reader fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, Helsinki, Finland), using specific fluorescence plates (Immulon 2 HD, Thermolab) and dedicated software (Thrombinoscope BV). All analyses were performed in triplicate as recommended by the manufacturer. With the thrombin calibrator as a reference, the molar concentration of thrombin was calculated during the measurement by the Thrombinoscope® software. Values for lag time in minutes, Endogenous Thrombin Potential (ETP) in  $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$ , peak in nM of thrombin and time to peak (TTpeak) in minutes were recorded.

#### ***h. Statistical analysis***

Statistical analyses were performed using a repeated-measures analysis of variance. For each dependent variable, namely R, K,  $\alpha$ -angle and MA for TEG® and lag time, ETP, peak and TTpeak (for TG), contrasts were performed between mean values at baseline and after prednisone treatment at each dose (1 mg/kg and 4 mg/kg) and after washout and the other time points. Given the large number of comparisons, the sequential Bonferroni correction procedure was used to maintain a familywise error rate of 0.05. Analyses were carried out using SAS v.9.2 (Cary, N.C.). We are aware that the data have not been tested for normality. Normality tests require quite a large

sample size to attain minimum power and this was not the case here. Hence, we relied on the fact that Anova-type models are quite robust with respect to deviation from normality. Results are expressed as mean values as well as medians along with minimums and maximums included in parentheses (mean; median (min-max) ).

## G. Results

### *i. Thrombelastography*

#### V. R

No significant difference was found between the mean baseline value (1.39; 1.3 (1.2-1.8) min) and the mean after 1 mg/kg of prednisone (1.39; 1.4 (0.9-1.8) min) ( $p=0.893$ ), the mean after 4 mg/kg (1.42; 1.4 (1.3-1.7) min) ( $p=0.8573$ ), nor the mean after washout (1.40; 1.35 (1.2-1.8) min) ( $p=0.977$ ). Furthermore, no difference was found between 1 mg/kg and 4 mg/kg of prednisone ( $p=0.767$ ) or between 4 mg/kg and baseline ( $p = 0.892$ ). (Fig 1a)

#### VI. K

The values obtained after 1 mg/kg (1.10; 1.1 (0.8-1.5) min) and 4 mg/kg (0.93; 0.9 (0.8-1.3) min) of prednisone were significantly lower than the baseline K value (1.70; 1.6 (1.2-2.6) min) ( $p = 0.011$  and  $p < 0.0001$ ). There was no significant difference between the K value after washout (1.16; 1 (0.8-1.8) min) and after 4 mg/kg of prednisone ( $p=0.102$ ) nor was there a significant difference between the 1 mg/kg and 4 mg/kg values ( $p = 0.136$ ). Also, the mean value of K obtained after the six-week washout period was found to be significantly lower than the baseline value with a  $p = 0.010$ . (Fig 1b)

#### VII. $\alpha$

The mean values after 1 mg/kg (73.69; 73.65 (69-78.9) $^{\circ}$ ) and 4 mg/kg (75.82; 76.75 (70.1-77.9) $^{\circ}$ ) of prednisone were significantly higher than the mean value at baseline (66.96; 67.3 (57-75.8) $^{\circ}$ ) ( $p = 0.020$  and  $p = 0.0002$ ). There was no significant difference between the  $\alpha$  value at washout (73.20; 74.55(66-78.4) $^{\circ}$ ) and 4 mg/kg of prednisone ( $p=0.134$ ) nor was there a significant

difference between the 1 mg/kg and 4 mg/kg values ( $p = 0.175$ ). The mean value of  $\alpha$ -angle obtained after the six-week washout period was found to be significantly higher than the baseline value with a  $p = 0.022$ . (Fig 1c)

### **VIII. MA**

The values obtained after 1 mg/kg (63.38; 63.7 (58.6-66.8) mm) and 4 mg/kg (69.21; 70.35 (62.6-72.3) mm) of prednisone were significantly higher than the value at baseline (47.71; 47.8 (40.1-54.9) mm) ( $p=0.001$  and  $p < 0.0001$ ). The MA value obtained after 4 mg/kg was also higher than the value obtained after washout (57.64; 58.3 (49.8-65) mm) ( $p = 0.003$ ). This variable was also significantly higher after 4 mg/kg than 1 mg/kg of prednisone ( $p = 0.015$ ). Furthermore, the mean value of MA obtained after the six-week washout period was also significantly higher than the baseline value with a  $p=0.004$ . (Fig 1d)

### ***j. Thrombin generation***

### **IX. Lag time**

No significant difference was found between the mean baseline value (1.26; 1.33 (1-1.33) min) and the mean after 1 mg/kg of prednisone (1.23; 1.17 (1.17-1.5) min) ( $p=0.67$ ), nor the mean after washout (1.28; 1.33 (1-1.33) min) ( $p=0.78$ ). However, the value obtained after 4 mg/kg (0.87; 0.82 (0.82-1.17) min) was significantly lower than the values obtained after 1 mg/kg ( $p = 0.003$ ) and after the washout period ( $p=0.002$ ). (Fig. 2 a).

### **X. ETP**

The values obtained after 1 mg/kg of prednisone (494.70; 503.79 (418.9-554.79)) was significantly higher than the baseline value for ETP (305.67; 307.66 (262.86-359.3)) ( $p=0.0007$ ). The value obtained after the washout period (418.07; 413.76 (384.87-461.82)) was

also higher than the baseline value ( $p=0.003$ ). The value obtained after 4 mg/kg (329.09; 317.57 (232.51-509.5)) was lower than the value after washout ( $p=0.02$ ). Finally, the value obtained after 4 mg/kg was lower than the value after 1 mg/kg ( $p=0.0004$ ). (Fig 2b)

### **XI. Peak**

The values obtained after 1 mg/kg of prednisone (170.06; 174.62 (143.99-193.46)) was significantly higher than the baseline value for peak (118.69; 120.04 (92.94-144.67)) ( $p=0.0005$ ). The value obtained after the washout period (158.68; 158.38 (141.32-180.91)) was also higher than the baseline value ( $p=0.001$ ). The value obtained after 4 mg/kg (141.65; 138.46 (106.31-189.84)) was lower than the value after washout ( $p=0.05$ ). Finally, the value obtained after 4 mg/kg was lower than the value after 1 mg/kg ( $p=0.006$ ). (Fig 2c)

### **XII. Time to peak**

There was no difference between the baseline time to peak (TT<sub>peak</sub>) (2.96; 3 (2.67-3.33) min) and the values obtained after 1 mg/kg (3.06; 3.17 (2.84-3.51) min) ( $p=0.49$ ) or after the washout period (2.85; 3 (2.67-3) min) ( $p=0.19$ ). There was, however, a significant decrease between the values after 1 mg/kg and 4 mg/kg (2.42; 2.49 (2.16-2.84) min) ( $p=0.0003$ ), as well as between washout and after 4 mg/kg ( $p=0.02$ ). (Fig 2d)

## H. Discussion

A hypercoagulable TEG® tracing is characterised by a decrease in the R and K values (signifying an acceleration in clot formation) as well as an increase in the  $\alpha$ -angle and MA (associated with faster and stronger clot formation).<sup>76</sup> It has been suggested that TEG® is a more precise method to assess hypercoagulable states than the methods that are currently in use, such as the measurement of antithrombin, D-dimers, FDPs, etc. which allow only a partial evaluation of the overall hemostatic function in people.<sup>59</sup> The dogs in the study had changes in three of the four measured parameters (K,  $\alpha$ -angle and MA) consistent with a hypercoagulable tracing following the administration of both the low dose (1 mg/kg) and high dose (4 mg/kg) of prednisone. This indicated that the administration of prednisone at these doses for a two-week period lead to a hypercoagulable TEG® tracing.

CAT is a new technique developed to measure the production of thrombin. Using the technique developed by Hemker, a thrombogram is derived and multiple parameters are measured. The most important parameter measured by TG is the endogenous thrombin potential (ETP) which represents the amount of thrombin that appears in the sample over time and corresponds to the area under the thrombogram curve. An increase in ETP suggests an increase in thrombotic potential whereas a decrease in ETP suggests increased hypocoagulability.<sup>57</sup> The results of the study indicated that the administration of the low dose of prednisone (1 mg/kg PO q24H) for two weeks did in fact lead to a significant increase in ETP. However, the administration of the high dose of prednisone (4 mg/kg PO q24H) did not have the same effect. In fact, the mean value for ETP seen after this dose was the lowest observed, suggesting that the initial administration of prednisone increased thrombotic potential which then decreased with time. The exact same phenomenon was seen with the peak value, that is, the maximum amount of thrombin found in the sample throughout the analysis period, which suggested that there is more thrombin formed after initial exposure to

prednisone. The lag time represents the amount of time required to form 10 nM of thrombin. An individual with an increased thrombotic potential could have a decreased lag time. The only statistically significant change in lag time seen in this study was between the baseline values and the values at the end of the study. However, there is a trend observed that was not statistically significant: following the administration of both doses of prednisone, there was a decrease in lag time suggestive of a more rapid initial thrombin burst. When the time to peak (time until maximum thrombin concentration) was obtained only the high dose decreased this value, suggesting once again a more rapid thrombin burst. Overall, the TG results suggested that thrombotic potential increased with initial exposure to prednisone and then subsided with time.

The initial increase of TG after the administration of the low dose of prednisone corresponded well with what was seen on the TEG® tracings. However, the other results conflicted, with the TEG® showing a persistent hypercoagulability and the TG showing a decreased ETP. This may be explained by many factors.

First, it may have resulted from the use of PPP for the TG and not whole blood, as was used with the TEG®. A study has shown that there is a good correlation between TG and TEG®, but PRP was used and it was not Hemker's technique.<sup>94</sup> Furthermore, a study in young human stroke patients showed an increase in TG in PRP and not PPP suggesting that the platelets are responsible for the increase in thrombin generation.<sup>95</sup> Perhaps, when initially exposed to prednisone, there is an upregulation in the transcription and synthesis of the coagulation factors. The initial increase in production is supported by previous studies showing that dogs with hyperadrenocorticism had an elevation in the activity of factors II, V, VII, IX, X, XII, which may be reflected by a decrease in R and fibrinogen and an increase in MA.<sup>3</sup> This production may have led to increased thrombotic potential, as detected by both the TEG® and TG that then subsided over time. Whereas, changes to platelets, that may have persisted, would only be detected by the TEG® or TG on PRP. Although automated platelet counts were performed to ensure that platelet numbers were within normal

limits, manual platelet counts were not done and platelet counts were not analysed to determine if they increased with prednisone administration. Although there are examples of an increase in platelet concentration in thrombocytopenic patients following the administration of steroids, to the authors' knowledge there are no reports on the effects of steroids on patients with normal platelet counts and this would have been interesting to evaluate.<sup>96</sup> Furthermore, the contribution of fibrinogen is not taken into account by the thrombin generation but does play a role in TEG® analysis and therefore variations in its concentration may have led to discrepancies between the two results.<sup>97</sup> Platelet function testing and measurement of coagulation factor activity were not done as part of this study and therefore, direct correlations cannot be made.

A second possibility is an increase in the activity of the anticoagulant system in response to increased hemostasis that would only be detected by TG. Both assays detect the time from initiation of coagulation to completion of clot formation. It is here that the TEG® reached its endpoint in our study. TG, on the other hand, continues and determines the rate of inactivation and amount of residual TG in the sample.<sup>98</sup> It is also known that thrombin is responsible for the activation of many components of the fibrinolytic system.<sup>59</sup> If, with prolonged exposure to glucocorticoids, patients were to upregulate their anticoagulant system to counteract the hemostatic system, this would be more readily detected by TG than TEG®.

However, few studies exist that show a direct cause and effect relationship between a hypercoagulable TEG® tracing and the development of thrombotic disease.<sup>79</sup> A prospective human study investigated the link between pre-operative TEG® parameters and the risk of thromboembolism post-operatively and found that an increase in MA had a 72% sensitivity and 69% specificity for the prediction of venous thromboemboli.<sup>80</sup> An abstract by McGrath and his group showed the same tendency when evaluating major non-cardiac surgeries.<sup>81</sup> Although the literature is scarce in veterinary medicine, there are various human studies that support the use of TG in the detection of patients at risk for thrombotic disease.<sup>59</sup> No study has yet compared TEG®



and TG for the detection of thrombotic diseases. Longitudinal studies are needed in both human and veterinary medicine in order to further elucidate this relationship.

When the TEG® results were analyzed independently, it was found that, other than the MA (and therefore calculated G value) there was no difference in the TEG® tracings between the two doses of prednisone administered. This was a surprising finding, especially considering that the values did not return to baseline after the washout period and a cumulative effect would have been predicted. There are many possible explanations. First, it is possible that the study group was not large enough to detect a statistical difference between the two doses. This is supported by the trend toward a decrease in R and K observed in figures 1a and 1b. Second, it is possible that prednisone was not administered for a long-enough period of time to make a difference apparent. Third, it is possible that the protocol used for TEG® analysis did not allow the detection of slight variations in the R and K values. The protocol used a high concentration of tissue factor compared with certain other protocols resulting in a more explosive initiation of coagulation.<sup>77</sup> It is possible that a prolongation of R and K would have been detected using no tissue factor or a lesser concentration thus slowing coagulation. The protocol using this dose of tissue factor was used instead of other available protocols (for example, using kaolin) because it is the standard protocol in our coagulation laboratory and the one for which we had available reference values.

Another interesting finding was the lack of return to baseline values after a six-week washout period. We are unsure of why this occurred but we will offer a few possible explanations. To begin, the circulating half-life of prednisone in dogs is not well-known. In humans, it is approximately 60 minutes and this is used as an estimate of the half-life in dogs.<sup>99</sup> It was based on this value that the washout period was calculated. However, we know that steroids act on the cell nucleus to modify protein synthesis<sup>100</sup>. In this study, coagulation factor synthesis, induced by prednisone, may have persisted long after it was no longer in circulation. Also, it is known that long-term corticosteroid use leads to hypertension and possible damage to the vascular

endothelium.<sup>101</sup> These changes may lead to activation of the tissue-factor pathway of coagulation and thus hypercoagulability. Furthermore, we must recognize that the development of thrombotic disease is multifactorial and that factors not evaluated by TEG® and TG, such as hypertension and the activation of the endothelin system by glucocorticoids may play an important role. Studies have shown that dogs receiving corticosteroids do have an increase in endothelin-1 and that this same factor may protect against the development of thrombotic disease.<sup>97,98</sup> However, this was not evaluated in our study.

Finally, due to the lack of control group, it is possible that this finding was due to a day-to-day variation in individual TEG® and TG tracings. It would be interesting to have included a pilot study where the analyses were repeated at regular intervals to determine the length of time that was required for return to baseline values as well as to have included a control group in order to have measured individual variability.

The limitations of this study include the small sample size, the lack of comparison with other established coagulation parameters (fibrinogen-degradation products, D-dimers, PT, aPTT, measurement of coagulation factors) and the lack of serum measurement of prednisone levels. We opted to not conduct the study with a cross-over design as we were uncertain if the washout period for the 1 mg/kg and 4 mg/kg doses would be the same therefore interfering with the interpretation of the results.

In conclusion, we have shown that the administration of prednisone to healthy beagle dogs at both low and high doses leads to the development of hypercoagulable TEG® tracings, that this effect did not appear to be dose-dependent and that it persisted for longer than 8 weeks. We also showed that the ETP measured by TG only increased following low dose of prednisone with values that gradually returned to baseline over time. Further studies are needed to clarify the underlying

mechanisms responsible for the hypercoagulability associated with prednisone and to determine the clinical relevance of these findings.

Acknowledgments: Dr. Daniel Pang, Dr. Soren Boysen, Ania-Claude Lemaire and Martine Lamarre for their technical help, Dr. Guy Beauchamp for the statistics, Dr. Catherine Wagg and Dr. Carolyn Gara-Boivin for the laboratory analyses.

## I. References

1. Jacoby RC, Owins JT, Ortega T, et al. Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. *Archives of Surgery* 2001;136:1003-1007.
2. Burns M, Kelly A, Hornof W, et al. Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1981;178:388-393.
3. LaRue MJ, Murtaugh RJ. Pulmonary thromboembolism in dogs: 47 cases (1986-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990;197:1368-1372.
4. VanWinkle TJ, Bruce E. Thrombosis in the Portal Vein in Eleven Dogs. *Veterinary Pathology* 1993;30:28-35.
5. VanWinkle TJ, Liu SM, Hackner SG. Clinical and Pathological Features of Aortic Thromboembolism in 36 Dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 1993;3:13-21.
6. Hardie EM, Vaden SL, Spaulding K, et al. Splenic infarction in 16 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995;9:141-148.
7. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary Thromboembolism in 29 Dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999;13:338-345.
8. Boswood A, Lamb C, White R. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *Journal of Small Animal Practice* 2000;41:109-114.
9. Feldman BF, Rasedee A, Feldman EC. Haemostatic abnormalities in canine Cushing's syndrome. *Research in Veterinary Science* 1986;41:228-230.
10. Keyes ML, Rush JE, Knowles KE. Pulmonary Thromboembolism in Dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 1993;3:23-32.
11. Ortega T, Feldman E, Owings J. Hypercoagulability in dogs with hyperadrenocorticism. In: *ACVIM Forum 1996, San Antonio, Texas 1996*;185.
12. Carr AP. Hemostasis in Dogs with Hyperadrenocorticism. In: *ACVIM Forum 2006, Louisville, Kentucky 2006*.
13. Fatti L, Bottasso B, Invitti C, et al. Markers of activation of coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing's syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* 2000;23:145-150.
14. Kristensen A, Wiinberg B. New methods to evaluate dogs with hemostatic and thrombotic disorders. In: *2006 ACVIM Forum, Louisville, Kentucky 2006*.
15. Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2010;1-8.

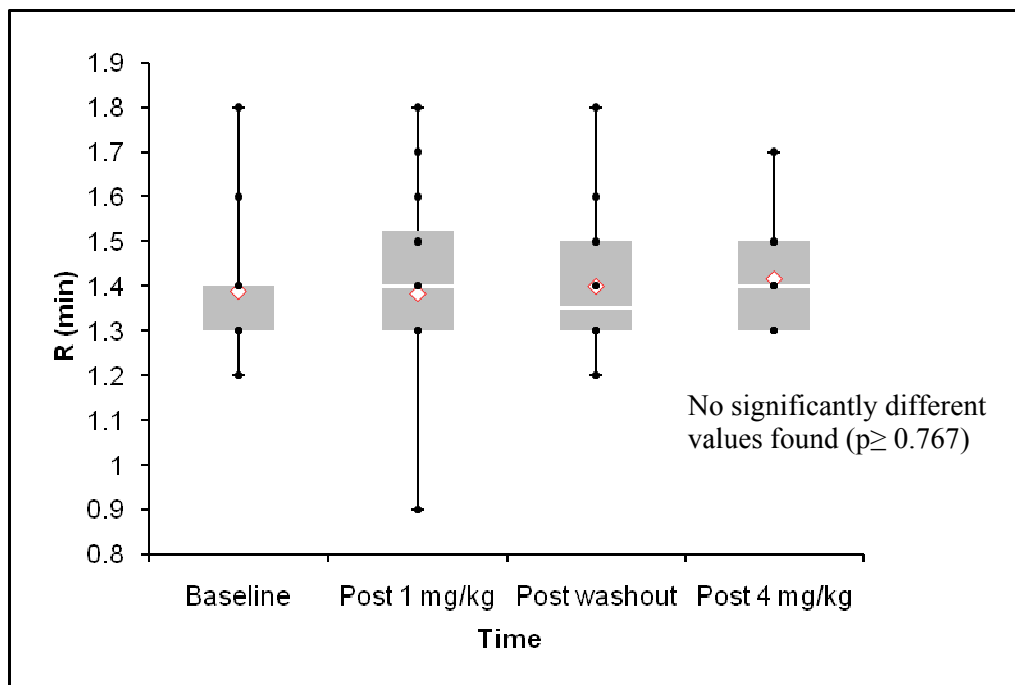
16. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009;19:3-10.
17. Wiinberg B, Jensen AL, Rojkaer R, et al. Validation of human recombinant tissue factor-activated thrombelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2005;34:389-393.
18. Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, et al. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the american veterinary medical association* 2000;217:1500-1504.
19. Wiinberg B, Jensen A, Johansson P, et al. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *Journal of veterinary internal medicine* 2008;22:357-365.
20. Kristensen AT, Wiinberg B, Jessen L, et al. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of veterinary internal medicine* 2008;22:140-147.
21. Wagg CR, Boysen SR, Bédard C. Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Veterinary Clinical Pathology* 2009.
22. van Veen J, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology* 2008;142:889-903.
23. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *British Journal of Haematology* 2005;130:653-661.
24. Allegret V, Bédard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs using thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* In press.
25. Giesen PL. The Thrombogram Guide. In: Outline of the method to measure the Calibrated Automated Thrombogram and a manual for the Thrombinoscope Program Thrombinoscope BV; 2005.
26. Salooja N, Perry DJ. Thrombelastography. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2001;12:327-336.
27. Hemker HC, Giesen P, Aldieri R, et al. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2002;32:249-253.
28. Rivard GE, Brummel-Ziedins KE, Mann KG, et al. Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:2039-2043.
29. Faber CG, Lodder J, Kessels F, et al. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2003;33:52-58.

30. Rozanski E, Callan M, Hughes D, et al. Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002;220:477-481.
31. Tanaka KA, Szlam F, Sun HY, et al. Thrombin Generation Assay and Viscoelastic Coagulation Monitors Demonstrate Differences in Mode of Thrombin Inhibition Between Unfractionated Heparin and Bivalirudin. *Anesthesia Analgesia* 2007;105:933-939.
32. Varadi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia* 2004;10:17-21.
33. Luddington R. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical and Laboratory Haematology* 2005;27:81-90.
34. Traverso C, Arcelus J, Gomez E, et al. Prospective assessment of the risk of deep vein thrombosis in elective abdominal surgery. Predictive role of thromboelastography. *Thrombotic and Haemorrhagic Disorders* 1993;71:9-15.
35. McGrath D, Cerboni E, Hirsh A, et al. Association of Thromboelastography (MA) and thrombotic complications after major non-cardiac surgery. In: 2003 annual meeting of the Society of Cardiovascular Anesthesiologists 2003.
36. Plumb D. *Veterinary Drug Handbook*. In, 5 ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2005.
37. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
38. Albiger N, Testa R, Almoto B, et al. Patients with Cushing's syndrome have increased intimal media thickness at different vascular levels: comparison with a population matched for similar cardiovascular risk factors. *Hormone and metabolic research* 2006;38:405-410.

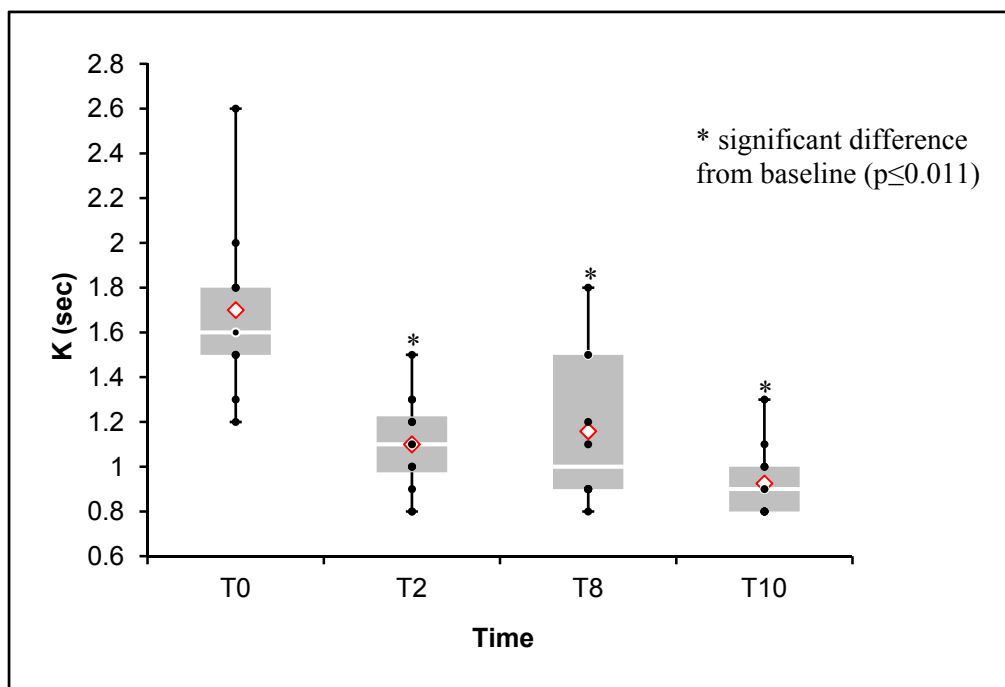
## J. Figures to accompany the article

Figure 1: Box plots of TEG® values at baseline, after the administration of 1 mg/kg of prednisone for 2 weeks, after a 6-week washout period and after the administration of 4 mg/kg of prednisone for 2 weeks to healthy beagles. (Whiskers represent the minimum and maximum values, the bottom and top of the boxes represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, respectively, the bands toward the middle of the box are the median values and the diamonds are the mean values). The individual data points are represented by black dots. \*Please note that some data points occurred more than once and therefore the black dots are superimposed giving the impression that there are less data points.

*Figure 1 a : R (minutes)*



**Figure 1 b : K (minutes)**



**Figure 1 c :  $\alpha$ -angle (degrees)**

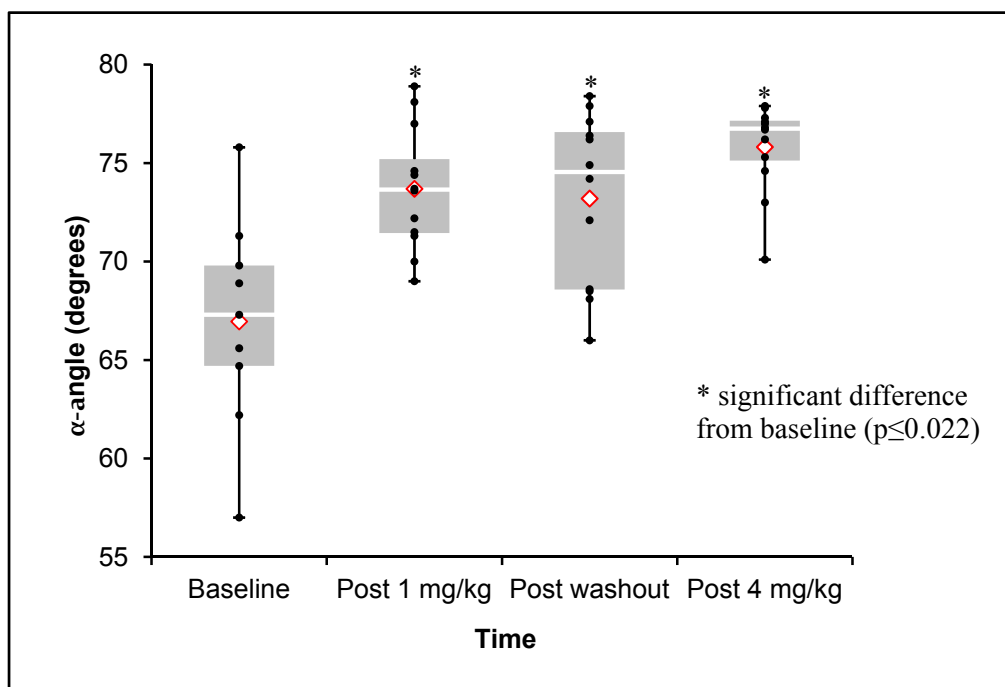




Figure 1 d : MA values (mm)

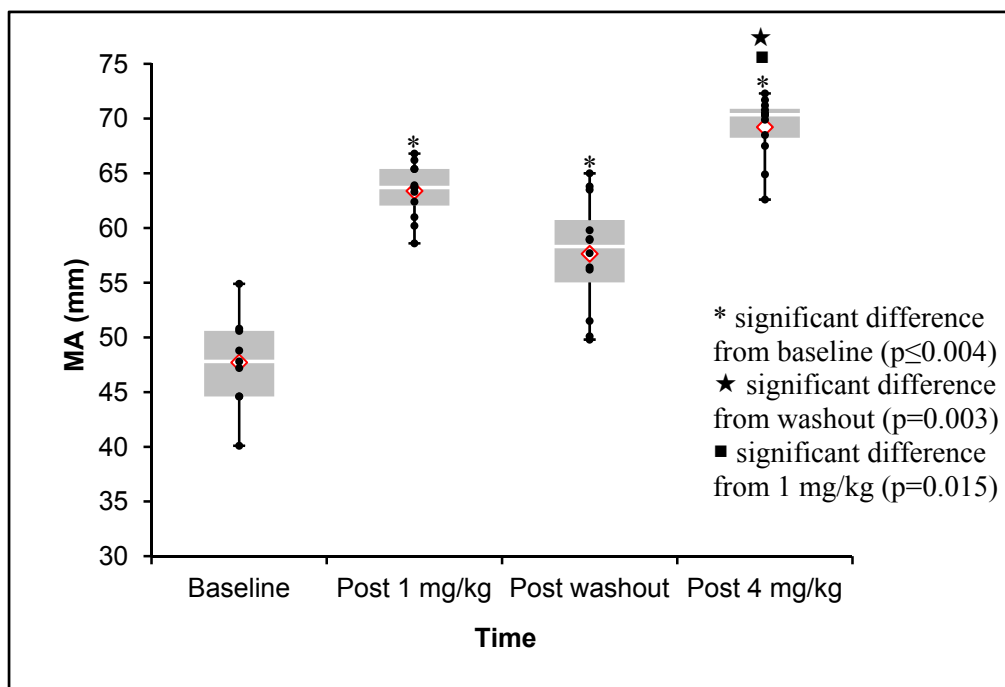
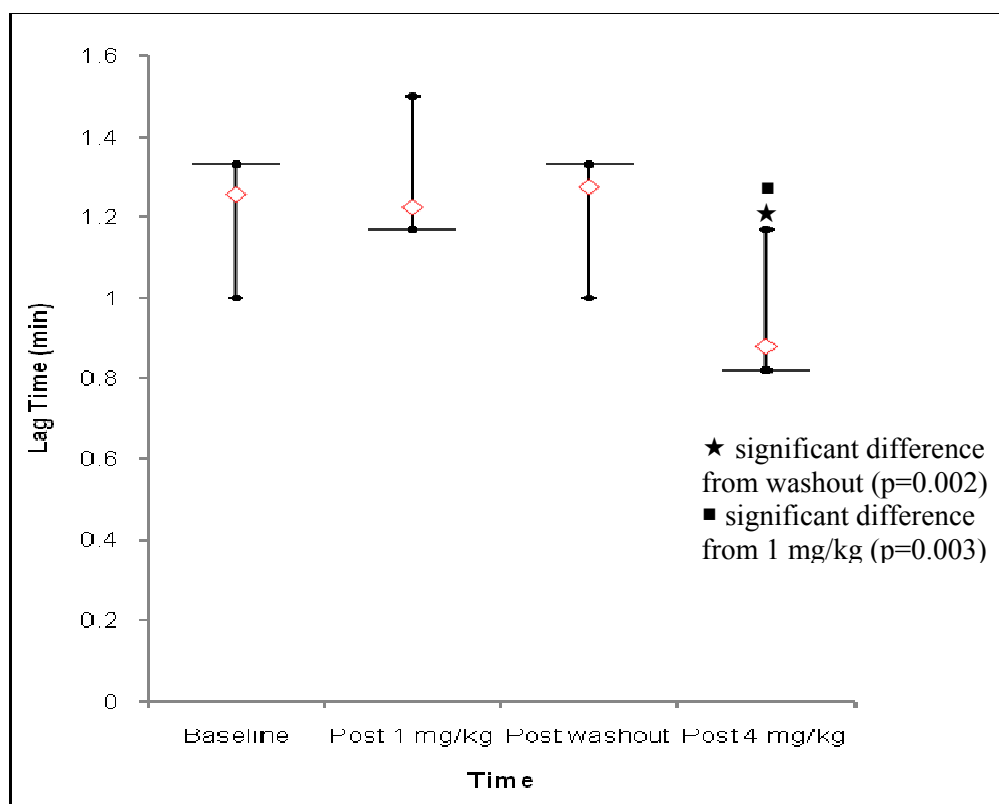
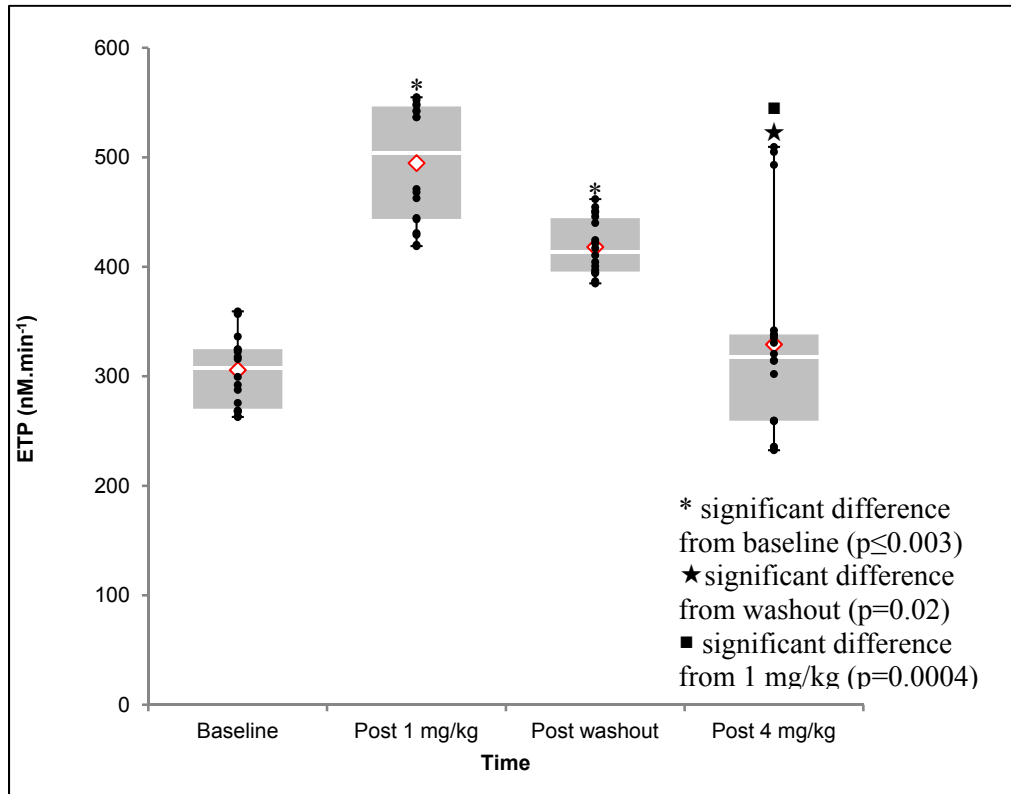


Figure 2. Box plots of thrombin generation values at baseline, after the administration of 1 mg/kg of prednisone for 2 weeks, after a 6-week washout period and after the administration of 4 mg/kg of prednisone for 2 weeks to healthy beagles. (Whiskers represent the minimum and maximum values, the bottom and top of the box represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles, respectively, the band toward the middle of the box is the median and the diamond is the mean). The individual data points are represented by black dots. \*Please note that some data points occurred more than once and therefore the black dots are superimposed giving the impression that there are less data points.

**Figure 2 a : Lag time values (min)**



**Figure 2 b : Endogenous Thrombin Potential values (nM.min<sup>-1</sup>)**



**Figure 2 c : Peak Height (nM)**

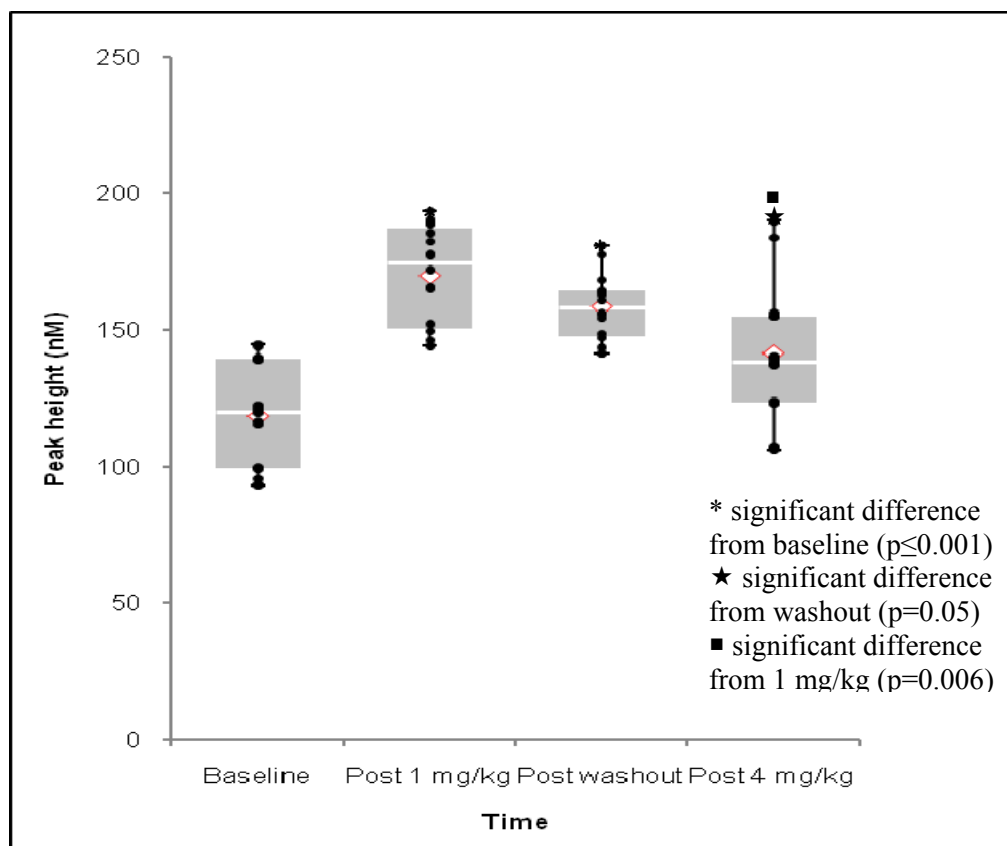
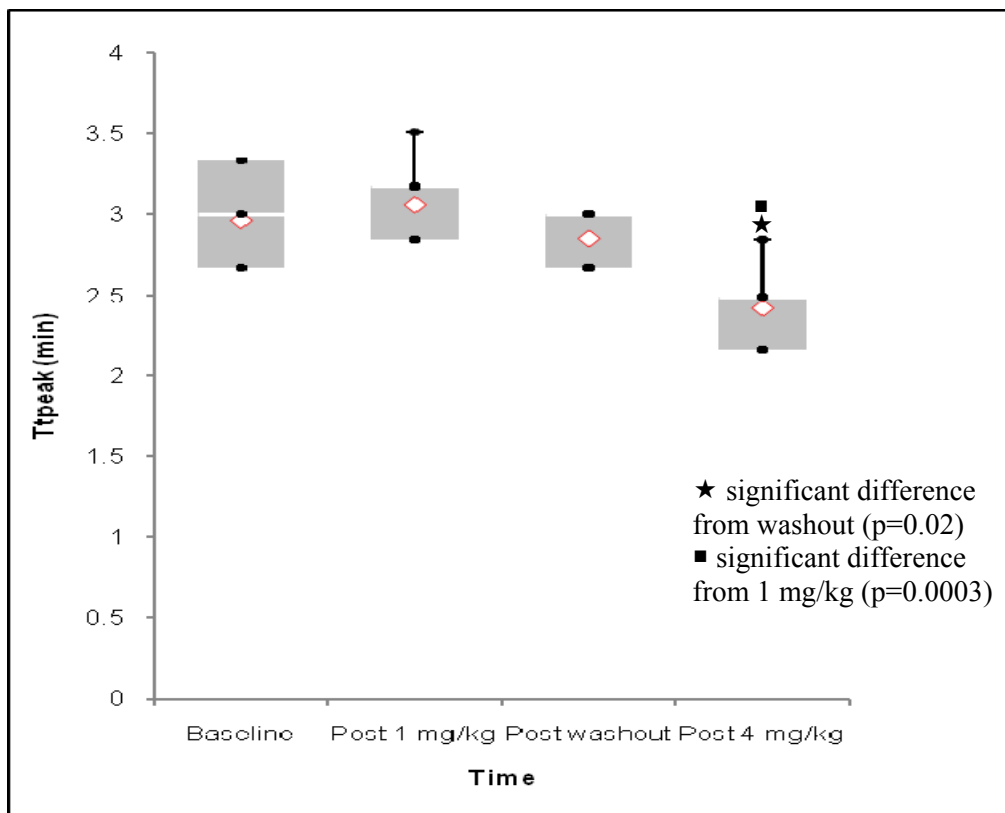


Figure 2 d : Time to Peak (minutes)



## 2. Article 2 :

Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters

Authors:

Lara Rose, DVM, Dipl. ACVIM

Marilyn E. Dunn, DVM, MVSc, Dipl. ACVIM

Christian Bédard, DVM, MSc, Dipl. ACVP

Université de Montréal

Short title: Coagulation and hyperadrenocorticism

Keywords: Hemostasis; TEG®; Thrombin Generation; Corticosteroids

Abbreviations: TEG®: Thrombelastography, CBC: Complete blood cell count, UA: urinalysis, TG: Thrombin Generation, CS: Cushing's Syndrome, PPP: Platelet-poor plasma, PRP: Platelet-rich plasma, HAC: hyperadrenocorticism

Corresponding author: Lara Rose, DVM, BSc. Agr., DES, Hôpital vétérinaire Rive-Sud, 7415 boulevard Taschereau, Brossard, Québec, J4Y 1A2

This work was accomplished in the coagulation laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) of the Université de Montréal in Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

This study was supported by the Association des médecins vétérinaires du Québec.

A portion of this paper was presented in part in the form of a research abstract at the 28<sup>th</sup> Annual ACVIM Forum in Montreal, Quebec.

Acknowledgments: Ania-Claude Lemaire and Martine Lamarre for their technical help, Dr. Guy Beauchamp and Greg Johnson for the statistics, Dr. Catherine Wagg, Dr. Virginie Allegret and Dr. Carolyn Gara-Boivin for the laboratory analyses.

## K. Abstract

**Background:** Hyperadrenocorticism (HAC) has been associated with an increased risk of thrombotic complications in dogs.

**Hypothesis:** The purpose of this prospective clinical study was to use thrombelastography (TEG®) and measurement of thrombin generation (TG) to detect the hypercoagulable state in canine patients with HAC. We hypothesized that the presence of HAC in dogs would result in a hypercoagulable profile on TEG® tracings and an increase in thrombin generation as measured by Endogenous Thrombin Potential (ETP).

**Animals:** Sixteen dogs suffering from HAC as diagnosed by ACTH stimulation test, low dose dexamethasone suppression test or complete adrenal profile were included.

**Methods:** TEG® tracings on citrated whole blood were obtained on 15 dogs before treatment and TG measurements on frozen-thawed PPP were obtained on 15 dogs before treatment.

**Results:** For the TEG® analysis, when individual dogs were compared to the normal reference range, 12/15 dogs had at least one parameter associated with hypercoagulability. Furthermore, when a paired t test for values with unequal variance was used to compare the population of HAC dogs to a population of healthy dogs, it was found that HAC dogs have hypercoagulable TEG® tracings. The same results were found when TG was used; when the HAC group was compared as a population to a population of normal dogs, the ETP indicated a hypercoagulable state. However, only 3/15 dogs had an ETP above normal range.

**Conclusion and clinical importance:** Groups of dogs with HAC have TEG® and TG values that tend toward a hypercoagulable state.



## L. Introduction

Cushing's syndrome (hyperadrenocorticism or HAC) is one of the most commonly recognized endocrine disorders of the dog and a rare endocrine disorder in people.<sup>1</sup> Dogs and humans that have Cushing's syndrome are at increased risk for pulmonary and arterial thrombi or thromboemboli which may result from blood stasis, damage to the vascular lining and the induction of a hypercoagulable state.<sup>2</sup>

It has previously been demonstrated that the excess blood cortisol, as found in Cushing's syndrome or with chronic exogenous administration of steroids, creates a hypercoagulable state that predisposes to pulmonary thromboembolism, splenic infarction, aortic and iliac thrombosis and increased mortality.<sup>3,4</sup> In humans, it is reported that Cushing's syndrome results in a four-fold increase in thromboembolic risk when compared to a healthy population.<sup>3</sup> One study looking at canine aortic and iliac thrombosis showed that 3 out of 6 dogs had hyperadrenocorticism.<sup>5</sup>

The biochemical basis of this hypercoagulable state remains unclear. A study by Jacoby et al. in 2001 of 56 dogs with naturally occurring Cushing's syndrome showed a significant elevation in procoagulation factors (factors II, V, VII, IX, X, XII and von Willebrand factor) in combination with a decrease in antithrombin and an elevation in TAT (thrombin-antithrombin complexes). However, this study did not reveal a significant elevation in factor VIII as seen in other work conducted in human patients.<sup>6</sup> Further confounding the issue is a study from 1986 by Feldman that showed an increase in antithrombin in 12 cases of canine Cushing's syndrome leading to the conclusion that not all patients are in a state predisposed to thrombosis.<sup>6,8</sup>

Some other work in dogs has shown that hyperadrenocorticism may be associated with increased platelet reactivity and counts as well as increased fibrinogen levels when compared to healthy dogs.<sup>8</sup>

The detection of hypercoagulability in dogs remains a challenge. There is very little work done to support the hypothesis that an increase in one or more coagulation factors leads to a hypercoagulability.<sup>3</sup> Current tests used to evaluate overall coagulation (PT, aPTT, etc.) are unable to detect a hypercoagulable state.<sup>9</sup>

The use of global models of coagulation has allowed a much better understanding of the in vivo process of coagulation. It places emphasis on the role of thrombin in hemostasis and it is the balance of production and degradation of thrombin that determines if a patient is hypo- or hypercoagulable. It also allows us to understand that primary and secondary hemostasis as well as the intrinsic and extrinsic pathways must not be viewed as separate entities but as synergistic. It is with this understanding, that the importance of tests that evaluate global whole-blood hemostasis become apparent.<sup>47</sup> Two methods used to evaluate whole-blood hemostasis are Thrombelastography (TEG®) and Thrombin Generation (TG).

Thrombin is the essential enzyme product of the blood coagulation cascade and it is the capacity to generate thrombin that determines blood coagulability. It has been shown that a reduction in the production of thrombin results in an increased tendency to bleed whereas an overproduction predisposes individuals to thrombosis.<sup>15</sup> Therefore, the development of automated assays measuring thrombin generation provides a global measurement of coagulation that can detect a hypocoagulable as well as hypercoagulable state. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT®) allows the measurement of endogenous thrombin potential in many different types of blood samples.<sup>16</sup> Although not widely used in veterinary patients, the technique has been validated by our laboratory in samples obtained from normal and sick dogs as well as from heparinised samples.<sup>85</sup> More recently, we have used the technique to evaluate the effect of prednisone on healthy beagles. The technique has also been used in human patients to identify prothrombotic states.<sup>59</sup>

Our hypothesis is that dogs suffering from HAC will present a hypercoagulable TEG profile as well as an increased endogenous thrombin potential (ETP).

## **M. Materials and Methods**

This study was approved by the ethics committee of the Université de Montréal. The study was a prospective clinical evaluation conducted on client-owned dogs presented to the internal medicine service of the CHUV (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire) and newly-diagnosed with HAC. Dogs were excluded if they were treated with exogenous corticosteroids (iatrogenic HAC), treated for their HAC or receiving non-steroidal anti-inflammatory medication. The diagnosis of HAC was made based on a combination of clinical signs and diagnostic tests (ACTH stimulation, low-dose dexamethasone suppression test or complete adrenal panel, as run by the University of Tennessee measuring cortisol, androstenedione, estradiol, progesterone, 17-OH-progesterone and aldosterone both before and after administration of ACTH). Additional tests were performed as needed to determine if the patient's HAC was pituitary or adrenal in origin and included: high-dose dexamethasone suppression test and abdominal ultrasound.

The values used as normal for TEG® were obtained from a control group of 31 healthy adult dogs (12 beagles and 19 dogs of a variety of breeds – 5 Labrador Retrievers, 3 Boxers, 3 mixed breed dogs, and 1 of each of the following breeds: Bernese Mountain Dog, Saint-Bernard, Doberman, Bull Mastiff, Leonberger, Golden Retriever, German Shepherd and Labernois). The values used as normal for TG were obtained from a control group of 20 healthy adult beagle dogs.

### ***k. Study design***

Samples were obtained for TEG® analysis and TG at the time of diagnosis of each patient.

### ***l. Blood collection***

Blood was collected by clean stick jugular venipuncture with the dog in either lateral or sternal recumbency. A 21G vacutainer needle was used. To clear possible tissue factor contamination from jugular trauma, 2.7 ml of blood were collected in a dry tube (3 ml dry tube, Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and then 4 citrated tubes (2.7 mL, 3.2% buffered sodium citrate (0.3 mL; 0.109M) Vacutainer, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) were filled in a blood to citrate ratio of 9:1. Two tubes were gently inverted 10 times and then left at room temperature for 30 minutes before running TEG® assays. The remaining tubes were centrifuged at 3300 g for 10 minutes at 7°C. The platelet poor plasma (PPP) was then collected, placed in plastic tubes (aliquots of 1 cc) and immediately placed in a freezer at -80°C until TG was run. The longest the samples were kept stored was 17 months.

### ***m. Thrombelastography***

Thrombelastography studies were performed on whole blood (WB) 30 minutes after blood collection with a Thrombelastograph® Hemostasis Analyser 5000 (TEG®) (Haemoscope, Niles, USA). Coagulation was initiated using recombinant tissue factor (Innovin, Dade Behring, Marburg, Germany) diluted 1/100 in PBS (Phosphate buffered saline) solution containing 4% bovine serum albumin, pH 7.4. Briefly, TEG® assays were performed by adding to the reaction cup 10µL of tissue factor and 20µL of CaCl<sub>2</sub> (0.2M) mixed with 320µL of citrated whole blood. Tracings were run at 37 °C for 120 minutes in duplicate. Values for global clot strength (G), reaction time (R), clotting time (K), angle ( $\alpha$ ), maximum amplitude (MA) and LY30 values were recorded. Dogs were identified as having abnormal TEG® tracings when 1 or more of the TEG® results fell outside of the minimum and maximum values obtained for control dogs. Dogs were considered to have hypercoagulable tracings when there was an increased MA, decreased K, decreased  $\alpha$ , or a combination thereof.

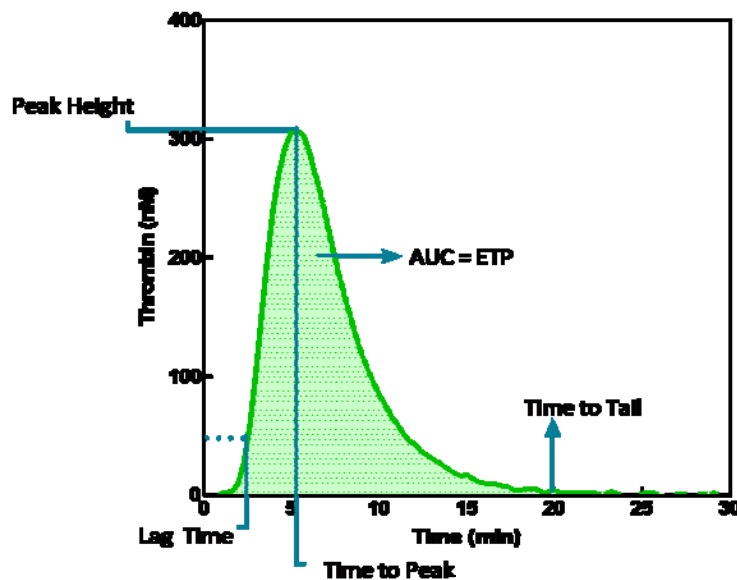
### ***n. Calibrated Automated Thrombogram***

All samples were run with the fluorogenic Calibrated Automated Thrombogram (CAT®) assay by Thrombinoscope® using the technique described by Hemker.<sup>84</sup> The CAT assay used a fluorogenic thrombin substrate and measured thrombin generation by comparing the fluorescence in plasma during clotting after tissue factor activation to the fluorescence of a reference thrombin calibrator. Each experiment required two sets of readings, one from wells in which thrombin generation (TG) took place and one from wells in which the thrombin calibrator (Cal) was added. In each well, 80 µl PPP was added to 20µl of the buffer solution containing the trigger solution in the TG wells or to 20 µl of the thrombin calibrator in the Cal wells. The trigger solution contained a mixture of phospholipids and human recombinant tissue factor (provided by Thrombinoscope). Thrombin generation was initiated by adding 20 µl of a solution containing calcium (CaCl<sub>2</sub>) in a HEPES buffer (pH 7.35) and the fluorescent substrate to the TG and Cal wells. The final solution contained 5pM of tissue factor and 4µM of phospholipids. Fluorescence was measured by an automated plate reader fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, Helsinki, Finland), using specific fluorescence plates (Immulon 2 HD, Thermolab) and dedicated software (Thrombinoscope BV). All analyses were performed in triplicate as recommended by the manufacturer. With the thrombin calibrator as a reference, the molar concentration of thrombin was calculated during the measurement by the Thrombinoscope® software. Values for lag time in minutes, Endogenous Thrombin Potential (ETP) in nM.min<sup>-1</sup>, peak in nM of thrombin and time to peak (TTpeak) in minutes were recorded (figure 1).

The most important parameter measured by TG is the endogenous thrombin potential (ETP) which represents the amount of thrombin that appears in the sample over time and corresponds to the area under the thrombogram curve. An increase in ETP suggests an increase in thrombotic potential whereas a decrease in ETP suggests hypocoagulability. The lag time represents the

amount of time required to form 10 nM of thrombin. An individual with an increased thrombotic potential could have a decreased lag time. The time to peak (time until maximum thrombin concentration) will be decreased in a patient who is hypercoagulable and increased in a patient with hypocoagulability. Finally, the peak value indicates the maximum amount of thrombin found in the sample and will be increased in hypercoagulable patients and decreased in hypocoagulable patients.<sup>57</sup>

*Figure 1.1.a : Thrombogram (AUC : area under the curve, ETP: endogenous thrombin potential).*



#### *o. Statistical analysis*

The mean of the duplicatas for each individual dog was compared to established reference values for all parameters for TEG® (R, K,  $\alpha$ , MA and LY30) and TG (ETP, lag time, peak and TTpeak). Values outside of the reference range were determined to be abnormal. The reference range was that which is used by our coagulation laboratory. Platelet counts were evaluated retrospectively, using the date available at the time of diagnosis and as no smears were assessed to determine absolute counts, a comparison to normal values was made, but no statistical analyses

were performed. Then, paired t tests for unequal variance were used to compare mean values obtained from the HAC dogs to the mean values of the reference dogs for both TEG® (R, K,  $\alpha$ , MA and LY30) and TG (lag time, ETP, peak and TTpeak). Normality of these two groups was tested by an Anderson-Darling analysis that did not indicate significant deviation from normal. Statistical significance was set at  $P < 0.05$  for all values.

## N. Results

Sixteen dogs were included in the study: 10 spayed females and 6 neutered males with a mean weight of 18.20 kg (range 4.75 – 53.60 kg) and a mean age of 10.5 years (6-13.5 years). The breeds represented were: Labrador Retriever (1), Maltese (1), Mixed breed (4), Miniature Poodle (2), Boston Terrier (2), Yorkshire Terrier (1), American Cocker Spaniel (2), Bichon Frise (1), Miniature Schnauzer (1) and Rottweiler (1). Of these dogs, 13 had pituitary HAC, 2 had adrenal HAC and 1 was of unknown origin. Of these 16 dogs, 15 had TEG® analysis and 15 had TG analysis before treatment. No dog showed any sign of thromboembolism during the study period.

### *p. Individual dogs*

#### XIII. Thrombelastography

When the mean TEG® values of individual dogs were compared to the reference values used in our coagulation laboratory (R (minutes) 0.70 - 2.44; K (minutes) 0.85-5.15; Alpha (degrees) 41.73-81.2; MA (mm) 38.72-64.28; LY30 (%) 0.00-9.30), the following results were found: no dog had an R value outside of the reference range, 10/15 dogs had a K value lower than the reference range, 1/15 dogs had an alpha value above the reference range, 11/15 dogs had an MA above the reference range and all dogs had LY30 values within the reference range. Therefore, 12/15 dogs had at least one parameter that indicated hypercoagulability (table Ii).

#### XIV. Thrombin generation

When the mean TG values of individual dogs were compared to the reference values established by our coagulation laboratory (ETP (nM.min<sup>-1</sup>) 216-465; Lagtime (min) 0.84-1.67; Peak (nM) 79.93-178.73; Time to peak (min) 2.2-4.22), the following results were found: 3/15 had an ETP above the reference range, 2/15 had a lagtime outside of reference range (1 above and 1



below reference values); 4/15 had a peak above reference values and no dog had a time to peak outside of reference values. Overall, 5/15 dogs had a TG value outside of reference values, 4 of which were compatible with hypercoagulability.

## XV. Platelets

When platelet counts were evaluated, 12/16 patients had platelet counts above the reference range. No patient was considered to have a platelet count below the reference values.

**Table II: Mean values of TEG® parameters of individual dogs compared to reference values (values in bold are abnormal).**

	R (min)	K (min)	Alpha (degrees)	MA (mm)	LY30 (%)
Reference range	0.70-2.44	0.85-5.15	41.73-81.2	38.72-64.28	0.00-9.30
1	1.2	<b>0.8</b>	76.75	56.6	3.4
2	1.2	<b>0.8</b>	80.3	<b>75.4</b>	0.05
3	1.15	<b>0.8</b>	78.6	<b>71.45</b>	0.05
4	1.1	<b>0.8</b>	77.9	<b>69.05</b>	0
5	1.15	0.95	75.1	<b>65.8</b>	0
6	1.05	1.3	72.1	62.85	0
7	1.75	2.2	61.05	60.8	0
8	1.3	1.85	65.6	62.35	0.35
9	1.2	0.9	77.2	<b>76.05</b>	0
10	1.2	<b>0.8</b>	77.6	<b>70.5</b>	0.1
11	1.05	<b>0.8</b>	<b>81.65</b>	63.6	1.4
12	1.05	<b>0.8</b>	77.85	<b>69.7</b>	0
13	1	<b>0.8</b>	78.55	<b>68.75</b>	1.3
14	1.1	1.15	73.05	<b>66.35</b>	0
16	1.2	<b>0.8</b>	77.5	<b>75.4</b>	0

**Table Iii: Mean values of TG parameters of individual dogs compared to reference values (values in bold are abnormal).**

	ETP (nM.min-1)	Lagtime (min)	Peak (nM)	Time to peak (min)
Reference range	<b>216-465</b>	<b>0.84-1.67</b>	<b>79.93-178.73</b>	<b>2.2-4.22</b>
1	405.41	1.56	139.75	3.33
2	379.80	1.47	147.55	3.03
3	368.62	1.14	147.96	2.58
4	348.19	1.25	132.10	3.03
5	378.26	1.33	148.85	8.39
6	411.17	<b>0.72</b>	<b>183.90</b>	2.39
7	419.04	1.67	132.64	4.00
8	<b>512.07</b>	1.22	<b>180.24</b>	2.89
9	<b>485.01</b>	1.47	<b>182.08</b>	3.14
10	417.58	1.05	142.63	3.06
11	420.06	1.33	165.07	3.00
12	402.98	1.00	165.73	2.56
13	<b>606.30</b>	1.44	<b>223.37</b>	3.00
14	361.25	<b>1.81</b>	96.92	4.14
15	444.96	1.39	143.62	3.39

**Table Iiii: Automated platelet counts at the time of diagnosis of HAC compared to reference values**

	Platelet count (x10E9/L)
Reference range	<b>143-400</b>
1	210
2	<b>645</b>
3	<b>465</b>
4	<b>522</b>
5	Clumps
6	391
7	33 + clumps
8	<b>479</b>
9	<b>432</b>
10	<b>728</b>
11	<b>600</b>
12	<b>604</b>
13	<b>443</b>
14	143
15	<b>545</b>
16	<b>474</b>
17	<b>443</b>

### q. Group comparison

#### XVI. Thrombelastography

Mean values for TEG® and standard deviations are presented in table 2. When the HAC mean values (pre-treatment) were compared to the mean normal values, it was found that in the HAC patients, R was significantly decreased ( $p < 0.001$ ), K was significantly decreased ( $p < 0.001$ ),  $\alpha$  was significantly increased ( $p < 0.001$ ), MA was significantly increased ( $p < 0.001$ ) and there was no change in LY30 ( $p = 0.06$ ).

#### XVII. Thrombin generation

Mean values for TG and standard deviations are presented in table 22. When the HAC means were compared to the normal means, the values for ETP ( $p = 0.0008$ ) and TTpeak ( $p = 0.01$ ) were significantly higher in the HAC population. Whereas there was no difference seen in the means obtained for peak ( $p = 0.12$ ) and lag time ( $p = 0.08$ ).

*Table Iiv: Mean HAC values and mean normal values for TEG® and TG parameters*

Value	HAC	Normal	p
<b>TEG®</b>			
<b>R (min)</b>	1.1594±0.19	1.5710±0.43	< 0.0001
<b>K (min)</b>	1.0219±0.42	2.3565±1.32	< 0.0001
<b>Alpha (degrees)</b>	75.728±5.52	61.473±9.88	< 0.0001
<b>MA</b>	68.109±5.86	51.502±6.39	< 0.0001
<b>LY30</b>	0.5469±0.999	1.4742±2.31	0.06
<b>Thrombin generation</b>			
<b>ETP (nM.min<sup>-1</sup>)</b>	424.07±67.12	340.35±63.09	0.0008
<b>Peak (nM)</b>	155.29±29.52	140.90±19.94	0.12
<b>TTpeak (minutes)</b>	3.0953±0.48	2.7083±0.30	0.01
<b>Lag (minutes)</b>	1.3233±0.28	1.1713±0.20	0.08

## O. Discussion

In general, it is accepted that a hypercoagulable TEG® tracing is characterised by a decrease in the R and K values (signifying an acceleration in clot formation) as well as an increase in the  $\alpha$ -angle and MA (associated with increased clot strength).<sup>76</sup> When the means of the HAC group were compared to the means of the control group, this is exactly what was found, implying that the prevalence of hypercoagulability in canine patients with HAC is high, compatible with previous findings.<sup>3</sup>

Notwithstanding, there are no universally accepted criteria for the interpretation of TEG® values in individual patients. Certain studies have applied a coagulation index taking into consideration all measured parameters<sup>102</sup>, others have used the calculated G value to determine hypercoagulability<sup>12</sup> and yet others have based a hypercoagulable tracing on the abnormality of any one parameter.<sup>14</sup> In our study we defined hypercoagulability as the abnormality of any one parameter and this enabled us to identify 12/15 patients as hypercoagulable. However, throughout the study period, no dog showed any signs compatible with thrombosis. This may be the result of the criteria used or simply a reflection of the actual prevalence of thrombosis in HAC patients which is reported to be quite variable in humans and is unknown in dogs. A review of 46 studies on the hypercoagulable state seen in human Cushing's syndrome performed in 2009 by the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism found that patients with Cushing's syndrome had a risk of venous thrombosis not provoked by surgery between 1.9-2.5%, whereas postoperative VTE varied between 0-5.6 % (one outlier study showed 20% prevalence). Finally, they also identified VTE as the cause of death in 0-1.9% of Cushing's syndrome patients.<sup>103</sup> The same information is not available in canine patients; however, many studies have identified HAC, to varying degrees, as an underlying cause of thrombotic events.<sup>5,53,63,65-67,104</sup> As no patient in our study has a thrombotic event, we were unable to evaluate the TEG® profile in this subclass of patients.

Furthermore, few studies exist that show a direct cause and effect relationship between a hypercoagulable TEG® tracing and the development of thrombotic events, regardless of the underlying cause.<sup>79</sup> Further studies are needed that follow patients with diseases that place them at risk for hypercoagulability to determine the coagulation profiles of those that do have embolic events versus those that do not.

Also, perhaps the criteria that are used to establish a “hypercoagulable TEG® profile” are too strict. It is thought by some that the MA is actually the most important element of the TEG® parameters evaluated and that its elevation alone may be enough to determine that a patient is hypercoagulable.<sup>80,81</sup> If this truly is the case, then our study would have identified 11/15 patients as having an abnormal MA. Also, in humans, a threshold MA value of > 70 mm is used to determine hypercoagulability and this is a value that would be interesting to establish for canine patients.<sup>11</sup>

CAT is a relatively new technique developed to measure the potential of thrombin generation. It has recently been used by our laboratory to evaluate the effect of heparin and prednisone on hemostasis in healthy dogs.<sup>85</sup> It has also been used in human medicine to identify hypercoagulability associated with several disease conditions, such as type 2 diabetes mellitus<sup>91</sup>, idiopathic pulmonary arterial hypertension<sup>105</sup> and deep-vein thrombosis<sup>106</sup>.

It is sometimes recognized that ETP is the best marker of hypercoagulable states.<sup>107</sup> When our results were evaluated as a group, they support the TEG® findings in that the study population of HAC dogs had an increased ETP when compared to the healthy population. However, none of the other parameters (lagtime, time to peak and peak height) were compatible with increased thrombotic potential and when the individual dogs were assessed, only 4 dogs showed hypercoagulable TG profiles: 3 with increased ETP and peak and 1 with decreased lag time and increased peak. One dog even had a prolonged lagtime that would be more suggestive of

hypercoagulability. Furthermore, the individuals identified as hypercoagulable by TG profiles were not all the same as the individuals identified via TEG® profiles.

The discrepancies between the techniques and another reason for the lack of identification of a hypercoagulable state in individual patients may have been the protocol used. We used PPP and not PRP or whole blood for the measurement of TG. Therefore the effect of platelets on TG was not assessed. It is recognized that platelet activation occurs in the lag phase of TG and their absence would explain the lack of difference in the lagtime value between the HAC and the healthy population.<sup>83</sup> Furthermore, the effect of the vascular endothelium was not assessed. In humans, chronic steroid exposure is thought to cause endothelial changes predisposing to thrombosis, this may also be true for our canine patients.<sup>108</sup>

Unfortunately, platelet counts were only evaluated retrospectively and only counts that were low were evaluated by blood smear to determine if they were within normal limits or not. Notwithstanding, when the automated counts available were evaluated, a majority of dogs had platelet counts above the reference range, supporting the hypothesis that the discrepancies between the two techniques may be the result of the different types of samples used. Furthermore, this also supports previous work suggesting that increased platelet counts and activity contribute to the increased thrombotic potential in HAC patients.<sup>8</sup> Further work is necessary to elaborate the contribution of platelets to the thrombotic state seen in some HAC patients.

When the patients were evaluated as a group, this study showed a good correlation between the TEG® findings and the TG findings in that they both detected a hypercoagulable state in HAC patients reflected by an increase in MA and ETP. This is not surprising, as the ETP reflects the total thrombin potential and the MA is greatly affected by the quantity of fibrin/fibrinogen in the sample which is the result of the enzymatic action of thrombin.<sup>109</sup> Few studies in human literature have compared the results of TEG® and TG. One study that directly compared the two techniques

found a good correlation. However, the technique used for TG was not the same as our protocol.<sup>94</sup> Another study on stored human platelets showed a good correlation between the changes in TG and TEG® this time using Hemker's technique.<sup>110</sup> To the author's knowledge, there are no studies that compare the two techniques in dogs nor in the evaluation of a hypercoagulable state.

Our study did have many limitations which included: lack of age and weight matched control groups, the lack of comparison with other established coagulation parameters (fibrinogen-degradation products, D-dimers, PT, aPTT, dosage of coagulation factors) and the mixture of both pituitary and adrenal patients that were included in the study. Also, it would have been interesting to assess the effect of treatment on the TEG® and TF parameters. This was not possible due to a lack of follow-up, a high level of mortality before the end of the study and the small initial study group. We were able to evaluate a small subset of patients (4) whose TEG® and TG were repeated once there was a normalisation of the ACTH stimulation and improvement of clinical signs (an average of 52 days after initiation of treatment). The values obtained did not differ significantly from the initial values suggesting that treatment does not affect the short term coagulation status of these patients (on average the TEG® and GT were performed 52 days after the initiation of treatment). However, further studies are needed to be able to support this preliminary finding.

In conclusion, the primary objective of this study was to use new methods for evaluating overall coagulation to characterise the reported hemostatic dysfunction associated with canine hyperadrenocorticism. Our study was able to show that both TEG® and TG are able to identify groups of dogs with a hypercoagulable profile but that the identification of individual dogs at risk of hypercoagulability is more difficult. Further studies are needed to identify patients at risk for thromboemboli as well as to assess the efficacy of prophylactic treatment in these patients. Furthermore, additional evaluation is needed to determine if treating the underlying cause will reverse the hypercoagulable state in HAC patients. Finally, additional factors that may influence

coagulation need to be assessed in these patients (for example, coagulation factors and blood pressure).



## P. References

1. Brown CG, Graves TK. Hyperadrenocorticism: Treating Dogs. *Compendium of continuing education for the practising veterinarian* 2007;132-145.
2. Feldman EC, Nelson RW. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd ed. St. Louis: Elsevier; 2004;252-393.
3. Jacoby RC, Owins JT, Ortega T, et al. Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. *Archives of Surgery* 2001;136:1003-1007.
4. Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, et al. Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Experimental and clinical endocrinology and diabetes* 2000;108:294-298.
5. Boswood A, Lamb C, White R. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *Journal of small animal practice* 2000;41:109-114.
6. Dal Bo Zanon R, Fornasiero L, Boscaro M, et al. Increased factor VIII associated with activities in Cushing's syndrome: a probable hypercoagulable state. *NA* 1982;47:116-117.
7. Feldman BF, Rasedee A, Feldman EC. Haemostatic abnormalities in canine Cushing's syndrome. *Research in Veterinary Science* 1986;41:228-230.
8. Boutelier P, al. e. Whole-blood platelet aggregation (and fibrinogen levels) in dogs with hyperadrenocorticism before and after ACE-inhibitor therapy. In: 2004 ACVIM Forum 2004.
9. Carr ME, Martin EJ. Evolving techniques for monitoring clotting in plasma and whole blood samples. *Clinical Laboratory* 2004;50:539-549.
10. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009;19:3-10.
11. Butenas S, Veer CVt, Mann KG. "Normal" Thrombin Generation. *Blood* 1999;94:2169-2178.
12. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *British Journal of Haematology* 2005;130:653-661.
13. Allegret V, Dunn M, Bédard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* 2011;40:24-31.
14. van Veen J, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology* 2008;142:889-903.
15. Giesen PL. The Thrombogram Guide. In: *Outline of the method to measure the Calibrated Automated Thrombogram and a manual for the Thrombinoscope Program* Thrombinoscope BV; 2005.

16. Hemker HC, Giesen P, Aldieri R, et al. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2002;32:249-253.
17. Salooja N, Perry DJ. Thrombelastography. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2001;12:327-336.
18. Sinnott VB, Otto CM. Use of thromboelastography in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 39 cases (2000–2008). *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009;19:484-488.
19. Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al. Thromboelastographic Evaluation of Hemostatic Function in Dogs with Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of veterinary internal medicine* 2008;22:357-365.
20. Wagg CR, Boysen SR, Bédard C. Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Veterinary Clinical Pathology* 2009.
21. Zaane BV, Nur E, Squizzato A, et al. Hypercoagulable State in Cushing's Syndrome: A Systematic Review. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:2743-2750.
22. Burns M, Kelly A, Hornof W, et al. Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the american veterinary medical association* 1981;178:388-393.
23. VanWinkle TJ, Bruce E. Thrombosis in the Portal Vein in Eleven Dogs. *Veterinary Pathology* 1993;30:28-35.
24. VanWinkle TJ, Liu SM, Hackner SG. Clinical and Pathological Features of Aortic Thromboembolism in 36 Dogs. *Journal of veterinary emergency and critical care* 1993;3:13-21.
25. Hardie EM, Vaden SL, Spaulding K, et al. Splenic infarction in 16 dogs: a retrospective study. *Journal of veterinary internal medicine* 1995;9:141-148.
26. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary Thromboembolism in 29 Dogs: 1985-1995. *Journal of veterinary internal medicine* 1999;13:338-345.
27. Laurenson MP, Hopper K, Herrera MA, et al. Concurrent Diseases and Conditions in Dogs with Splenic Vein Thrombosis. *Journal of veterinary internal medicine* 2010;24:1298-1304.
28. Luddington R. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical and Laboratory Haematology* 2005;27:81-90.
29. Traverso C, Arcelus J, Gomez E, et al. Prospective assessment of the risk of deep vein thrombosis in elective abdominal surgery. Predictive role of thromboelastography. *Thrombotic and Haemorrhagic Disorders* 1993;71:9-15.
30. McGrath D, Cerboni E, Hirsh A, et al. Association of Thromboelastography (MA) and thrombotic complications after major non-cardiac surgery. In: 2003 annual meeting of the Society of Cardiovascular Anesthesiologists 2003.

31. Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, et al. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000;217:1500-1504.
32. Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2010;1-8.
33. Tournier A, Wahl D, Chaouat A, et al. Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thrombosis Research* 2010;126:e418-e422.
34. Cate-Hoek At, Dielis A, Spronk H, et al. Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2008;100:240-245.
35. Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, et al. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010;16:85-92.
36. Wolberg AS. Thrombin generation assays: Understanding how the method influences the results. *Thrombosis Research* 2007;119:663-665.
37. Fantidis P. The role of the stress-related anti-inflammatory hormones ACTH and cortisol in atherosclerosis. *Current vascular pharmacology* 2010;8:517-525.
38. Moganasundram S, Hunt BJ, Sykes K, et al. The Relationship Among Thrombelastography, Hemostatic Variables, and Bleeding After Cardiopulmonary Bypass in Children. *Anesthesia Analgesia* 2010;110:995-1002.
39. Rivard GE, Brummel-Ziedins KE, Mann KG, et al. Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:2039-2043.
40. Johansson PI, Svendsen MS, Salado J, et al. Investigation of the thrombin-generating capacity, evaluated by thrombogram, and clot formation evaluated by thrombelastography of platelets stored in the blood bank for up to 7 days. *Vox Sanguinis* 2008;94:113-118.

## **Chapitre 3 : Discussion**

Il est établi qu'un tracé de TEG® hypercoagulable est caractérisé par une diminution des valeurs R et K (accélération de la formation du caillot) ainsi qu'une augmentation de l'angle- $\alpha$  et du MA (associés avec la formation plus rapide d'un caillot et un caillot plus fort).<sup>76</sup> Il est aussi suggéré que la TEG® est une méthode plus précise chez l'humain pour l'identification des états hypercoagulables que les tests de coagulation traditionnels (mesure de l'antithrombine, des D-dimères, des FDPs, etc.) qui n'évaluent qu'une portion de la coagulation.<sup>59</sup>

Avec l'utilisation de la génération de thrombine, c'est l'ETP qui est la valeur la plus importante. Cette valeur indique la quantité de thrombine qui apparaît dans un échantillon sanguin dans le temps et est calculée à partir de l'aire sous la courbe du thrombogramme. Une augmentation de l'ETP est compatible avec un état hypercoagulable.<sup>57</sup> Le temps de latence représente le temps nécessaire pour la formation de 10 nM de thrombine et pourrait être diminué lors d'état hypercoagulable. Le temps jusqu'au pic est aussi réduit lors d'hypercoagulabilité. Celui-ci représente le temps nécessaire pour atteindre un maximum de thrombine dans l'échantillon. Finalement, la valeur du pic représente la quantité maximale de thrombine dans l'échantillon et pourrait être élevée lors d'hypercoagulabilité. Il n'y a aucune étude en médecine vétérinaire qui évalue l'utilité de la GT dans l'identification de l'hypercoagulabilité en présence de maladies à potentiel thrombotique. Par contre, la génération de thrombine a été employée en médecine humaine pour évaluer l'hypercoagulabilité en présence, entre autres, du diabète mellitus type II<sup>91</sup>, de l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique<sup>105</sup> et de thromboses veineuses profondes<sup>106</sup>. De plus, cette technique a été validée récemment par le laboratoire de coagulation du CHUV de l'Université de Montréal chez des chiens recevant de l'héparine<sup>85</sup>.

Lors de l'étude pilote, nous avons trouvé un changement significatif dans 3 des 4 paramètres de TEG® (une diminution de K, une augmentation de l'angle- $\alpha$  et une augmentation du MA) à la suite de l'administration de 1 mg/kg par jour de prednisone pendant 2 semaines et à la suite de l'administration de 4 mg/kg par jour pendant 2 semaines. Ceci indique que l'administration

de la prednisone à ces doses pendant 2 semaines mène à un tracé de TEG® hypercoagulable. Ces résultats supportent notre hypothèse ainsi que ce qui est rapporté dans la littérature.

Les résultats obtenus avec la génération de thrombine sont plus difficiles à interpréter. L'administration de prednisone à raison de 1 mg/kg par jour pendant 2 semaines a causé une augmentation de l'ETP de manière significative, compatible avec les résultats de la TEG®. Par contre, l'administration de 4 mg/kg par jour pendant 2 semaines n'a causé aucune augmentation de la génération de thrombine et a même donné les valeurs les plus faibles de l'étude. Ceci suggère que l'exposition initiale à la prednisone mène à une augmentation du potentiel thrombotique suivie d'une diminution et d'une normalisation dans le temps. Ce phénomène n'a pas seulement été observé avec l'ETP, mais aussi avec le pic qui représente la quantité maximale de thrombine présente dans l'échantillon. Celui-ci avait atteint son maximum suite à l'administration de la prednisone à raison de 1 mg/kg. Il est par la suite retourné à la normale après la dose de 4 mg/kg. La seule variation dans le temps de latence a été observée entre la valeur de base et la valeur suivant les 2 semaines de prednisone à la dose de 4 mg/kg/jour. Bien que non statistiquement significative, une tendance vers une diminution du temps de latence a été notée (appréciable dans les diagrammes de quartiles) à la suite de l'administration des deux posologies de prednisone, suggérant que l'activation initiale de la thrombine se fait plus rapidement. Seulement la plus forte dose de prednisone a fait diminuer le temps de latence, suggérant encore une fois que la prednisone pourrait accélérer l'activation initiale de la thrombine. Globalement, ces résultats indiquent que le potentiel thrombotique augmente à la suite d'une exposition initiale à la prednisone mais diminue par la suite.

Les résultats de la TEG® et de la génération de thrombine, à la suite de l'administration de 1 mg/kg de prednisone, étaient concordants. Par contre, les résultats subséquents étaient contradictoires : la TEG® démontrait une hypercoagulabilité persistante tandis que la génération de thrombine se normalisait. Le même problème est survenu lorsque les chiens avec un HAC ont été

évalués : les deux techniques n'ont pas permis de mettre évidence un état d'hypercoagulabilité chez les mêmes individus.

Peu d'études existent qui comparent directement la génération de thrombine avec la TEG®. Une étude qui visait la comparaison des deux méthodes a trouvé que la corrélation était bonne. Par contre, cette étude a été réalisée sur du plasma riche en plaquettes (notre étude a été faite sur du plasma pauvre en plaquettes) et n'a pas employé la technique décrite par Hemker tel que nous l'avons fait.<sup>94</sup> Une autre étude sur l'effet de l'entreposage des plaquettes a montré une bonne corrélation entre la TEG® et le CAT. Cette étude a aussi appliqué la technique décrite par Hemker. Par contre, elle a utilisé des concentrés de plaquettes.<sup>110</sup> Plus récemment, une étude sur l'effet de l'entreposage du plasma sur la génération de trombine a été effectuée. Dans cette étude, le plasma a été obtenu à partir de sang entier qui avait été entreposé pour une période de 24 heures avant sa séparation. L'étude a employé la technique de Hemker sur du plasma pauvre en plaquettes et a également réalisé de la thrombélustographie. Les résultats ont démontré une bonne corrélation entre la génération de thrombine et la thrombélustographie. Par contre, l'étude ne cherchaient pas à identifier une pathologie (ni une hyper ou hypocoagulabilité), mais plutôt une absence d'effet suite à l'entreposage.<sup>111</sup>

Lorsque nous avons cherché des études sur la corrélation entre la TEG® et la génération de thrombine en présence de pathologies, les résultats étaient variables. Une étude sur l'hémophilie a trouvé que le CAT pouvait distinguer entre les patients normaux et les patients hémophiles (c'est-à-dire, mettre en évidence un état hypocoagulable), tandis que la thrombélustographie était moins sensible pour faire la différence.<sup>112</sup> Par contre, lorsque des patients atteints de thalassémie ont été évalués à l'aide de la TEG® et du CAT sur du plasma pauvre en plaquettes, seulement la TEG® montrait un profil hypercoagulable. Ceci a mené à la conclusion que ce sont les éléments cellulaires (plaquettes, leucocytes, globules rouges, cellules endothéliales, etc.) qui contribuent le

plus à l'hypercoagulabilité que les éléments enzymatiques (facteurs de coagulation).<sup>113</sup>

Actuellement, il n'y a aucune étude vétérinaire qui met en comparaison les deux techniques.

Il est possible que la discordance de nos résultats soit reliée à une mauvaise corrélation entre les tests ou à la technique employée. Lors de nos analyses, la GT a été faite sur du plasma pauvre en plaquettes tandis que la TEG® a été faite sur du sang entier. Les différences entre les résultats obtenus pourraient indiquer que ce sont les éléments cellulaires (en particulier les plaquettes) qui contribuent à l'hypercoagulabilité plus que les éléments enzymatiques, comme il a été précisé dans l'article sur les patients thalassémiques.<sup>113</sup> De plus, quelques études qui comparaient l'utilisation de PPP (plasma pauvre en plaquettes) à celle de PRP (plasma riche en plaquettes), ont démontré que le type d'échantillon utilisé pouvait influencer le résultat. Une étude sur des humains atteints de cirrhose hépatique a démontré une diminution de l'ETP avec le PRP, mais aucun changement lorsque le PPP était analysé.<sup>114</sup> Une autre étude a démontré une augmentation de la GT dans le PRP, mais pas dans le PPP chez de jeunes patients ayant subi des accidents cérébrovasculaires.<sup>95</sup>

L'augmentation initiale de la génération de thrombine suivie d'un retour à la normale est difficile à interpréter. Il est possible que l'exposition initiale à la prednisone cause une régulation à la hausse de la transcription et de la synthèse des facteurs de coagulation. Cette augmentation des facteurs de coagulation est soutenue par des études antérieures qui démontraient que les chiens avec un HAC avaient une augmentation de l'activité des facteurs II, V, VII, IX, X et XII qui se manifeste par une diminution du R et une augmentation de la MA avec la TEG®.<sup>3</sup> Cette augmentation pourrait mener à l'augmentation du potentiel thrombotique, tel que décelé par la TEG® et la génération de thrombine, pour ensuite s'estomper avec le temps. Par contre, les changements aux plaquettes ou à d'autres éléments cellulaires, qui persisteraient dans le temps, seraient seulement détectés par la TEG® et non par la GT sur le PPP. Des comptages plaquettaires par l'appareil à hématologie ont été faits sur tous les échantillons afin de s'assurer qu'ils étaient dans les limites de



la normale. Par contre, des comptages manuels n'ont pas été faits et donc, chez certains patients, des valeurs numériques n'ont pas été obtenues. Cette lacune a empêché la réalisation d'une analyse statistique sur les comptages plaquettaires. Malgré que d'autres études ont constaté une augmentation du comptage plaquettaire suite à l'administration de corticostéroïdes chez des patients thrombocytopeniques, selon l'auteur l'effet des corticostéroïdes sur les plaquettes d'individus en santé reste non-évalué.<sup>96</sup> De plus, le fibrinogène n'influencerait pas la génération de thrombine, mais aurait un rôle important dans la TEG®.<sup>97</sup> Des variations dans sa concentration pourraient expliquer certaines disparités entre les résultats des deux analyses. Aucune conclusion ne peut être tirée sur le rôle des plaquettes et des facteurs de coagulation lors de notre étude car ni la fonction plaquettaire, ni la mesure de l'activité des facteurs de coagulation n'ont été réalisées.

Il est aussi possible que ce que notre étude a évalué soit une augmentation de l'activité anticoagulante en réponse à l'augmentation du potentiel thrombotique détectable uniquement par la génération de thrombine. Les deux tests (TEG® et GT) mesurent le temps à partir de l'initiation de la coagulation jusqu'à la fin de la formation du caillot. La GT détermine également le taux d'inactivation de la thrombine ainsi que la quantité résiduelle dans l'échantillon.<sup>98</sup> Puisque la thrombine est aussi responsable de l'activation de plusieurs éléments du système fibrinolytique, il est possible que les patients ayant reçu des glucocorticoïdes à long terme aient une régulation à la hausse du système fibrinolytique pour contrer l'hypercoagulabilité. Ce changement au système fibrinolytique serait détectée uniquement par la GT et non la TEG®.<sup>59</sup>

De plus, il existe peu d'études qui démontrent un lien de cause à effet entre un résultat de TEG® hypercoagulable et le développement de maladie thrombotique.<sup>79</sup> Une revue de la littérature humaine faite en 2009 a cherché à répondre à cette question. Ils ont regardé 10 études avec un total de 1056 patients, tous prédisposés à faire des thromboses ou embolies postopératoires. Ils ont trouvé qu'une augmentation du MA était le meilleur indicateur d'un état d'hypercoagulabilité et le paramètre qui prédisait le mieux le risque thromboembolique. Ils ont également repéré énormément

de variabilité dans les études ainsi que dans la définition d'un tracé hypercoagulable. Ils ont conclu que, pour l'instant, la capacité de la TEG® de prédire des évènements thromboemboliques est très variable et que d'autres études prospectives sont nécessaires.<sup>115</sup> Il n'y a pas d'étude en médecine vétérinaire qui soutient l'utilisation de la génération de thrombine pour prédire le risque de maladie thrombotique, par contre, quelques études humaines en démontrent l'utilité.<sup>59</sup> Il n'y a aucune étude qui compare directement la TEG® à la GT pour l'identification des patients à risque de maladies thrombotiques. Des études prospectives longitudinales sont nécessaires autant en médecine humaine que vétérinaire afin d'éclairer cette relation.

Lors de l'analyse indépendante des résultats de la TEG®, aucune différence n'a été trouvée entre les deux dosages de prednisone administrés (1 mg/kg et 4 mg/kg). Cette trouvaille est surprenante, surtout lorsqu'on considère que les valeurs ne sont pas retournées aux valeurs de base à la suite de la période d'épuration et qu'un effet cumulatif était attendu. Il existe plusieurs explications possibles. Premièrement, il est possible que le groupe étude ne fût pas suffisamment important pour détecter une différence statistiquement significative entre les deux doses. Ceci est supporté par la tendance à la baisse des valeurs de R et de K notée dans les figures incluses dans l'article 1. Deuxièmement, il est possible que la prednisone n'ait pas été administrée pendant une période de temps assez longue afin de mettre en évidence cette différence. Troisièmement, le protocole que nous avons employé ne permettait possiblement pas la détection de variations mineures des valeurs de R et de K. Notre protocole utilisait une concentration élevée en facteur tissulaire, en comparaison avec d'autres protocoles, ce qui mène à une initiation plus explosive de la coagulation.<sup>77</sup> Ainsi, si le facteur tissulaire n'avait pas été utilisé ou s'il avait été utilisé à plus faible concentration, une prolongation du R et du K aurait possiblement été détectée. Alors que d'autres protocoles ont déjà été établis (kaolin), nous avons choisi d'utiliser celui du laboratoire de coagulation du CHUV puisque que les valeurs de références sont bien connus. Un autre résultat intéressant lors de cette étude était l'absence de retour aux valeurs de base à la suite de la période

d'épuration de 6 semaines. Malgré nos incertitudes, nous proposons quelques explications. Pour commencer, la demi-vie de la prednisone chez le chien n'est pas bien connue. Elle a donc été extrapolée de la demi-vie chez les humains qui est d'environ 60 minutes.<sup>99</sup> La période d'épuration de notre étude a donc été calculée à partir de cette valeur. Cependant, nous savons que les stéroïdes agissent au niveau du noyau cellulaire et modifient la synthèse de protéines.<sup>100</sup> Donc, il est possible que l'effet des stéroïdes sur la synthèse des facteurs de coagulation puisse persister longtemps après que la substance ne se retrouve plus dans la circulation. De plus, l'usage à long terme des corticostéroïdes mène à l'hypertension et possiblement à des dommages de l'endothélium vasculaire.<sup>101</sup> Ces changements pourraient causer l'activation de la cascade de coagulation via le facteur tissulaire et donc de l'hypercoagulabilité. Finalement, nous devons reconnaître que l'origine des maladies thrombotiques est multifactorielle et que certains facteurs, tels que l'hypertension, le statut reproducteur, etc. ne sont pas évalués par la TEG® ou la GT. Ces facteurs n'ont pas été évalués lors de notre étude.

Finalement, vu l'absence d'un groupe contrôle, il est possible que nos résultats reflètent la variation quotidienne normale des tracés de TEG® et de GT. Une étude pilote (avec un groupe contrôle pour l'évaluation de la variabilité individuelle) dans laquelle les analyses auraient été répétées à intervalles réguliers afin de déterminer le temps nécessaire pour le retour aux valeurs basales, aurait été intéressante.

Regardons maintenant les résultats obtenus lors de notre étude clinique, c'est-à-dire l'évaluation de la coagulation chez les chiens avec un HAC spontané. Lorsque les moyennes des tracés de TEG® du groupe avec HAC ont été comparées aux moyennes du groupe contrôle, les chiens atteints d'HAC avaient des tracés hypercoagulables avec une diminution des valeurs de R et de K ainsi qu'une augmentation des valeurs du MA et du  $\alpha$ . Ceci est compatible avec ce qui est déjà accepté.<sup>3</sup> Par contre, lorsqu'on comparait les chiens individuellement aux valeurs de référence, aucun d'entre eux était hypercoagulable, ou à risque de maladies thrombotiques puisqu'aucun ne

répondait aux 4 critères (diminution du R et du K et augmentation du MA et du  $\alpha$ ). Ceci coïncide avec ce qui a été vu cliniquement : aucun chien n'a démontré des signes compatibles avec une maladie thrombotique au courant de l'étude. Ceci est peu surprenant considérant la variabilité de la prévalence de maladies thrombotiques chez des patients avec un HAC. Une revue de la littérature humaine (46 études) faite en 2009 par le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, qui évaluait l'état d'hypercoagulabilité associé au syndrome de Cushing, a trouvé que le risque de thromboembolie veineuse en absence de chirurgie variait entre 1.9-2.5%; tandis que post-chirurgicalement, cette valeur était de 0-5.6% avec une étude démontrant une incidence allant jusqu'à 20%. Ils ont aussi identifié que les thromboembolies veineuses étaient la cause de mortalité chez seulement 0-1.9% des patients avec un HAC.<sup>103</sup> Ce type de revue de littérature n'existe pas chez les chiens; par contre, plusieurs études ont identifié l'HAC comme cause sous-jacente de maladies thrombotiques avec des incidences variables.<sup>5,53,63,65-67,104</sup> Il serait intéressant d'évaluer le profil de coagulation chez un patient atteint d'HAC avec un thrombus ou un thromboembolie.

Tel que discuté dans la section sur les résultats de notre étude pilote, il y a très peu d'études qui confirment la valeur prédictive d'un tracé de TEG® hypercoagulable pour un événement thrombotique.

Il est aussi possible que les critères utilisés pour établir « un profil de TEG® hypercoagulable » (augmentation du MA et de l'angle- $\alpha$  avec diminution du K et du R) soient exagérés. Plusieurs croient que la valeur du MA est le paramètre le plus important dans l'évaluation de la TEG® et qu'une augmentation de ce seul paramètre pourrait se traduire en un état hypercoagulable.<sup>80,81,115</sup> Onze des 16 chiens évalués par la TEG® dans notre étude avaient un MA augmenté. Donc, à la lumière de cette hypothèse, près de 70% de nos patients étaient hypercoagulables. Chez les humains, une valeur de MA de >70 mm est indicative d'hypercoagulabilité, peu importe les autres paramètres.<sup>11</sup> Cette valeur n'est pas connue chez le chien et serait intéressante à établir.

D'ailleurs, si nous élargissons davantage nos critères et que nous disons qu'un chien ayant seulement 1 paramètre compatible (diminution du R ou du K ou augmentation du alpha ou du MA) serait hypercoagulable, 13/16 chiens auraient été qualifiés d'hypercoagulables.

Les résultats de la GT dans notre étude supportent les résultats de la TEG® : lorsque comparée à la population de chiens normaux, la population de chiens avec un HAC avait une augmentation de l'ETP. Cependant, aucune autre valeur (temps de latence, temps jusqu'au pic ou pic) ne démontrait une différence significative entre les deux groupes. Il est souvent reconnu que l'ETP seul est le meilleur indicateur d'état hypercoagulable.<sup>107</sup> À la lumière de cet énoncé, les résultats de GT suggèrent que la population de chiens atteint d'un HAC a un potentiel thrombotique plus élevé que la population de chiens en santé.

Par contre, lorsque la GT de chaque était comparée aux valeurs de référence, seulement 3/15 chiens avaient un ETP augmenté et ces mêmes chiens n'avaient pas nécessairement une augmentation du MA. Encore une fois, il est possible que ce désaccord soit relié au fait qu'aucun patient a eu un évènement thromboembolique. La mesure de la GT chez cette sous-classe de patient pourrait alors être intéressante.

Il est aussi possible que le protocole utilisé pour la génération de thrombine ait influencé la capacité de détection d'états hypercoagulables. Nous avons utilisé du plasma pauvre en plaquettes (PPP) plutôt que du plasma riche en plaquettes (PRP) et donc l'effet des plaquettes sur la GT n'a pas été évalué. La majorité de l'effet des plaquettes sur la GT a lieu durant le temps de latence. Leur absence expliquerait donc l'absence de différence dans ce paramètre entre les chiens avec un HAC et les chiens du groupe contrôle.<sup>83</sup> Ceci est en partie soutenu dans notre étude par les comptages plaquettaires. Quoique les comptages plaquettaires n'aient pas été évalués statistiquement, nous voyons une tendance des patients avec un HAC à avoir un comptage plaquettaire plus élevé que la normale. Cette augmentation serait détectée uniquement par la TEG®.

Par contre, lors des comparaisons de groupe, notre étude a établi une bonne corrélation entre le TEG® et la GT : l'augmentation du MA et de l'ETP permettrait dans les deux cas d'identifier des états hypercoagulables. Ceci n'était pas inattendu, puisque l'ETP reflète la quantité totale de thrombine dans l'échantillon et que le MA est grandement modifié par la quantité de fibrine/fibrinogène dans l'échantillon qui elle découle directement de l'activité enzymatique de la thrombine.<sup>109</sup> Tel que déjà mentionné, il y a très peu d'études qui font une comparaison directe entre la TEG® et la GT. À la connaissance de l'auteur, notre étude est la première à comparer les deux techniques pour l'identification de l'hypercoagulabilité chez le chien.

À la demande du Jury de révision de maîtrise, le tableau suivant a été rajouté au mémoire de maîtrise mais n'apparaît pas dans l'article scientifique. La discussion qui suit s'applique à ce tableau.

**Tableau VI : Données sur les patients HAC.**

No patient	Race	Age	Pituitaire (P) ou Surrénalien (S)	Traitement	Date	MA (38.72-64.28)	ETP (nM.min <sup>-1</sup> ) (216-465)	Comptage plaquettaire (x10E9/L) (143-400)
1	Labrador	6a11m	P	Mitotane	2007-05-28 2007-06-18	56.6 51.6	405.41 367.07	210
2	Bichon Maltais	13a7m	P	Trilostane	2007-11-07	75.4	379.80	645
3	Croisé	13a4m	P	Trilostane	2007-11-07	71.45	368.62	465
4	Caniche miniature	12a6m	P	Trilostane	2008-04-14 2008-09-03	69.05 62.75	348.19 322.49	522
5	Boston terrier	7a7m	P	Trilostane	2008-10-22	65.8	378.26	Amas
6	Yorkshire terrier	10a6m	P	Mitotane	2008-11-19	62.85	411.17	391
7	Croisé	9a7m	P	Mitotane	2008-09-17 2008-10-22	60.8 62.05	419.04 305.02	33 + amas
8	Cocker américain	10a2m	P	Mitotane	2008-09-26	62.35	512.07	479
9	Croisé	13a7m	P	Aucun	2008-09-24	76.05	485.01	432
10	Bichon frisé	11a11m	P	Mitotane	2008-10-24	70.5	417.58	728
11	Cocker américain	12a4m	P	Trilostane	2007-06-26 2007-07-04	63.6 65.1	420.06 437.29	600
12	Croisé	11a11m	Inconnu	Aucun	2008-02-21	69.7	402.98	604
13	Boston terrier	9a1m	S	Surrénalectomie	2007-08-23 2008-01-23	68.75 75.1	606.30 463.01	443
14	Caniche miniature	11a11m	P	Trilostane	2007-09-28	66.35	361.25	143

<b>No patient</b>	<b>Race</b>	<b>Age</b>	<b>Pituitaire (P) ou Surrénalien (S)</b>	<b>Traitement</b>	<b>Date</b>	<b>MA (38.72-64.28)</b>	<b>ETP (nM.min<sup>-1</sup>) (216-465)</b>	<b>Comptage plaquettaire (x10E9/L) (143-400)</b>
15	Rottweiler	8a8m	S	Mitotane	2008-12-04		444.96	545
16	Schnauzer miniature	7a7m	P	Hypophysectomie	2008-04-07	75.4		474



Tel que nous pouvons voir dans de tableau VI seulement 5 patients ont eu une évaluation par TEG® et GT après traitement. Quatre de ces patients avaient la forme pituitaire de la maladie et un avait la forme surrénalienne. Deux patients ont été traités avec le mitotane, deux avec le trilostane et un par surrénalectomie. Lorsque nous regardons le MA de la TEG®, deux patients ont eu une légère baisse du MA, tandis que 3 ont eu une légère augmentation. Par contre, mis à part un patient, tous ont eu une diminution de l'ETP suite au traitement. La réduction la plus marquée a été notée chez un patient avec un ETP plus élevé que la normale et à qui le traitement a permis une normalisation de l'ETP. Ce même patient a eu une augmentation du MA. D'une façon intéressante, ce patient a été le seul à subir une surrénalectomie. Ces résultats sont difficilement analysables vu le faible échantillon, mais aussi puisqu'aucun patient n'a souffert d'un événement thromboembolique au courant de l'étude. Ces résultats suggèrent que le traitement médical influencerait très peu l'hypercoagulabilité de ces patients mais que le traitement chirurgical pourrait potentiellement être bénéfique. De plus, les résultats divergents entre la TEG® et la GT indiquent que des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux identifier les patients avec un risque thrombotique plus élevé.

Nos études avaient plusieurs limites. Dans l'étude pilote, nous soulignons l'absence de groupe contrôle, la petite taille du groupe, le stade reproducteur inconnu des femelles intactes dans le groupe d'étude et l'absence du dosage de la concentration de prednisone sanguine. Dans l'étude clinique, nous reconnaissons l'absence de groupe contrôle apparié pour âge et le poids, et le mélange des deux formes d'HAC (pituitaire et surrénalien). Dans les deux études, il aurait été intéressant d'apprécier d'autres paramètres de coagulation déjà établis : produits de dégradation du fibrinogène, D-dimères, PT, aPTT et dosage de l'activité des facteurs de coagulation, afin de réaliser des corrélations avec les tests globaux de coagulation utilisés. De plus, l'évaluation de facteurs autres que l'HAC pouvant avoir un effet sur la coagulation tels que les plaquettes, la

pression artérielle et la présence d'autres anomalies hémato-biochimiques, aurait été intéressante afin d'identifier des corrélations.

Nous aurons aussi aimé pouvoir tirer des conclusions sur l'effet du contrôle de la maladie sur le profil de coagulation. Ceci n'était pas possible dû au taux élevé de mortalité, le manque de suivi, le refus de traitement de la part des propriétaires et du petit groupe d'étude à la base. Cependant, 5 chiens ont pu être évalués par TEG® et GT suite à la normalisation de la stimulation à l'ACTH et à l'amélioration de leurs signes cliniques. Ces chiens ont eu une deuxième évaluation par TEG® et GT en moyenne 72 jours (intervalle : 8-153 jours) après l'initiation du traitement. Parmi les 5 chiens, 4 avaient la forme hypophysaire de la maladie et 1 avait la forme surrénalienne. Deux chiens ont été traités avec le mitotane, 2 avec le trilostane et 1 par surrénalectomie. Les valeurs obtenues autant pour la TEG® que la GT n'étaient pas significativement différentes des valeurs au moment du diagnostic. Ceci suggère que le traitement n'affecte pas le profil hémostatique, mais d'autres études seraient nécessaires pour le confirmer.

## **Conclusion**

Un des objectifs initiaux de la présente recherche était l'application de nouvelles méthodes d'évaluations de la coagulation globale dans la caractérisation du dysfonctionnement hémostatique décrit suite à l'administration de glucocorticoïdes ou secondaire à l'hyperadrénocorticisme. Nos deux études ont démontré que ces deux techniques peuvent être appliquées chez le chien. Notre étude pilote nous a permis d'illustrer que l'administration de prednisone à des chiens en santé menait à des tracés de TEG® compatibles avec un état hypercoagulable et que la GT démontrait une augmentation de l'ETP uniquement suite à l'administration de 1 mg/kg/jour de prednisone. Notre étude clinique a mis en évidence que la TEG® et la GT pouvaient identifier l'hypercoagulabilité chez une population de chiens avec un HAC lorsque comparés à des chiens normaux, mais que l'identification de chiens individuels avec un profil hypercoagulable était plus difficile (basé sur l'analyse par TEG® uniquement).

Lorsque nous avons comparé l'étude pilote à l'étude clinique, nous avons vu que, mises à part les variations déjà discutées, les résultats étaient similaires : les chiens recevant des corticostéroïdes exogènes et les chiens atteints de la forme naturelle de l'HAC avaient des profils hypercoagulables détectables par la TEG® et la génération de thrombine.

Cela dit, nous croyons que de plus amples études sont nécessaires afin de mieux caractériser l'état hypercoagulable de ces deux groupes de patients (recevant des corticostéroïdes et atteints d'HAC) pour ainsi déterminer les patients à risque de complications thrombotiques qui bénéficieraient alors de traitements à base d'antithrombotiques.

## **Sources documentaires**

1. Brown CG, Graves TK. Hyperadrenocorticism: Treating Dogs. *Compendium of continuing education for the practising veterinarian* 2007;132-145.
2. Feldman EC, Nelson RW. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd ed. St. Louis: Elsevier; 2004;252-393.
3. Jacoby RC, Owins JT, Ortega T, et al. Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome. *Archives of Surgery* 2001;136:1003-1007.
4. Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, et al. Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Experimental and clinical endocrinology and diabetes* 2000;108:294-298.
5. Boswood A, Lamb C, White R. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *Journal of small animal practice* 2000;41:109-114.
6. Dal Bo Zanon R, Fornasiero L, Boscaro M, et al. Increased factor VIII associated with activities in Cushing's syndrome: a probable hypercoagulable state. *NA* 1982;47:116-117.
7. Welles E, Boudreaux M, Crager C, et al. Platelet function and antithrombin, plasminogen, and fibrinolytic activities in cats with heart disease. *American journal of veterinary research* 1994;55:619-627.
8. Boutelier P, al. e. Whole-blood platelet aggregation (and fibrinogen levels) in dogs with hyperadrenocorticism before and after ACE-inhibitor therapy. In: 2004 ACVIM Forum 2004.
9. Carr ME, Martin EJ. Evolving techniques for monitoring clotting in plasma and whole blood samples. *Clinical Laboratory* 2004;50:539-549.

10. Smith SA. The New Cell-Based Model of Coagulation. In: ACVIM Forum 2008, San Antonio, Texas 2008.
11. Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, et al. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000;217:1500-1504.
12. Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al. Thromboelastographic Evaluation of Hemostatic Function in Dogs with Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22:357-365.
13. Kristensen AT, Wiinberg B, Jessen L, et al. Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22:140-147.
14. Wagg CR, Boysen SR, Bédard C. Thromboelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Veterinary Clinical Pathology* 2009.
15. Butenas S, Veer CVt, Mann KG. "Normal" Thrombin Generation. *Blood* 1999;94:2169-2178.
16. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *British Journal of Haematology* 2005;130:653-661.
17. Moore SA, O'Brien D. Canine Pituitary Macrotumors. *Compendium of Continuing Education for Veterinarians* 2008;30:33-41.
18. Labelle P, Kyles A, Farver T, et al. Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Veterinary Pathology* 2004;41:490-497.

19. Galac S, Kooistra H, Voorhout G, et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domestic Animal Endocrinology* 2005;28:338-348.
20. Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6 ed. St. Louis: Saunders; 2005;1991.
21. Nichols R. Complications and concurrent disease associated with diabetes mellitus. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1997;12:263-267.
22. Magiakou MA, Smyrnaki P, Chrousos GP. Hypertension in Cushing's syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;20:467-482.
23. Guptill L, Scott-Moncrieff J, Widmer W. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 1997;27:215-235.
24. Teske E, Rothuisen J, de Bruijne J, et al. Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *Veterinary Record* 1989;125:12-14.
25. Mazziotti G, Giustina A, Canalis E, et al. Glucocorticoid-Induced osteoporosis: clinical and therapeutic aspects. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2007;51:1404-1412.
26. Lunn K, James K. An In-Depth Look: Normal and Abnormal Water Balance: Polyuria and Polydipsia. *Compendium of continuing education for the practising veterinarian* 2007;2007:612-624.
27. Waters CB, Adams LG, Scott-Moncrieff JC, et al. Effects of Glucocorticoid Therapy on Urine Protein-to-Creatinine Ratios and Renal Morphology in Dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 1997;11:172-177.



28. Hurley J, Vaden S. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1998;212:369-373.
29. Peterson ME. Diagnosis of Hyperadrenocorticism in Dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2007;22:2-11.
30. Bonagura JD, Twedt DC. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. In, XIV ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009:1388.
31. Behrend EN, Kemppainen RJ, Clark TP, et al. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: a survey of internists and dermatologists. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002;220:1643-1649.
32. Bonagura JD. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII*. In. Philadelphia: Saunders; 2000:1308.
33. Penninck D, d'Anjou M-A. *Atlas of Small Animal Ultrasonography*, 1st ed. Ames: Blackwell Publishing; 2008;520.
34. Benitah N, Feldman E, Kass P, et al. Evaluation of serum 17-hydroxyprogesterone concentration after administration of ACTH in dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005;227:1095-1101.
35. Sieber-Ruckstuhl NS BF, Wenger M, Maser-Gluth C, Reusch CE. Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Domestic Animal Endocrinology* 2006;31:63-75.

36. Wenger M, Sieber-Ruckstuhl N, Müller C, et al. Effect of trilostane on serum concentrations of aldosterone, cortisol, and potassium in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *American journal of veterinary research* 2004;65:1245-1250.
37. Reine NJ. Medical Management of Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism: Mitotane versus Trilostane. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2007;22:18-25.
38. Castillo V, Giacomini D, Paez-Pereda M, et al. Retinoic Acid as a Novel Medical Therapy for Cushing's Disease in Dogs. *Endocrinology* 2006;147:4438-4444.
39. Castillo VA, Go´mez NV, Lalia JC, et al. Cushing's disease in dogs: Cabergoline treatment. *Research in Veterinary Science* 2008;85:26-34.
40. Hanson J, 't Hv, Voorhout G, et al. Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of veterinary internal medicine* 2005;19:687-694.
41. Hanson JM, Teske E, Voorhout G, et al. Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Journal of neurosurgery* 2007;107:830-840.
42. Anderson C, Birchard S, Powers B, et al. Surgical treatment of adrenocortical tumors: 21 cases (1990-1996). *Journal of the american animal hospital association* 2001;37:93-97.
43. Mischke R. Changes in hemostasis in dogs with chronic renal insufficiency. *Berliner und Münchener tierrärztliche Wochenschrift* 1997;110:445-450.

44. Good LI, Manning AM. Thromboembolic Disease: Physiology of Hemostasis and Pathophysiology of Thrombosis. Compendium of continuing education for the practising veterinarian 2003;25:650-659.
45. Hoffman R, Jr. EJB, Shattil SJ, et al. Hematology: Basic Principles and Practice. Philadelphia: Elsevier; 2005.
46. Kristensen A, Wiinberg B. New methods to evaluate dogs with hemostatic and thrombotic disorders. In: 2006 ACVIM Forum, Louisville, Kentucky 2006.
47. Smith SA. The cell-based model of coagulation. Journal of veterinary emergency and critical care 2009;19:3-10.
48. Furie B, Furie BC. *In vivo* thrombus formation. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2007;5:12-17.
49. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Reviews 2003;17:S1-S5.
50. Kyrle PA, Eichinger S. Is Virchow's triad complete? Blood 2009;114:1138-1139.
51. Malone P, Agutter P. Is "Virchow's triad" useful? British Journal of Haematology 2009;145:839.
52. Lopez J, Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis. Thrombosis Research 2009;123:S30-34.
53. VanWinkle TJ, Liu SM, Hackner SG. Clinical and Pathological Features of Aortic Thromboembolism in 36 Dogs. Journal of veterinary emergency and critical care 1993;3:13-21.

54. Lee A, Levine M. Venous thromboembolism and cancer: Risks and outcome. *Circulation* 2003;107:I17-I21.
55. Keyes ML, Rush JE, Knowles KE. Pulmonary Thromboembolism in Dogs. *Journal of veterinary emergency and critical care* 1993;3:23-32.
56. Good LI, Manning AM. Thromboembolic Disease: Predispositions and Clinical Management. *Compendium of continuing education for the practising veterinarian* 2003;25:660-675.
57. Hemker HC, Giesen P, Aldieri R, et al. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2002;32:249-253.
58. Nelson OL, Andreasen C. The Utility of Plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 2003;17:830-834.
59. van Veen J, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology* 2008;142:889-903.
60. Zhang D, Hao J, Yang N. Protein C and D-dimer are related to portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2009;Epub.
61. Milio G SS, Malato A, Grimaudo S, Pinto A. Superficial venous thrombosis: role of inherited deficiency of natural anticoagulants in extension to deep veins. *International Angiology* 2009;28:298-302.
62. Boisclair M, Ireland H, Lane D. Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. *Blood Reviews* 1990;4:25-40.

63. Burns M, Kelly A, Hornof W, et al. Pulmonary artery thrombosis in three dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1981;178:388-393.
64. LaRue MJ, Murtaugh RJ. Pulmonary thromboembolism in dogs: 47 cases (1986-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990;197:1368-1372.
65. VanWinkle TJ, Bruce E. Thrombosis in the Portal Vein in Eleven Dogs. *Veterinary Pathology* 1993;30:28-35.
66. Hardie EM, Vaden SL, Spaulding K, et al. Splenic infarction in 16 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995;9:141-148.
67. Johnson LR, Lappin MR, Baker DC. Pulmonary Thromboembolism in 29 Dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999;13:338-345.
68. Feldman BF, Rasedee A, Feldman EC. Haemostatic abnormalities in canine Cushing's syndrome. *Research in Veterinary Science* 1986;41:228-230.
69. Ortega T, Feldman E, Owings J. Hypercoagulability in dogs with hyperadrenocorticism. In: *ACVIM Forum 1996, San Antonio, Texas 1996*;185.
70. Isacson S. Effect of prednisone on the coagulation and fibrinolytic systems. *Scandinavian Journal of Haematology* 1970;7:212-216.
71. Sjoberg H, Blomback M, Granberg P. Thromboembolic complications, heparin treatment in increase in coagulation factors in Cushing's syndrome. *Acta Med Scandinavia* 1976;199:95-98.
72. Patrassi G, Zanon RDB, Boscaro M, et al. Further studies on the hypercoagulable state of patients with Cushing's syndrome. *NA* 1985;54:518-520.

73. Casonato A, Pontara E, Boscaro M, et al. Abnormalities of von Willebrand factor are also part of the prothrombotic state of Cushing's syndrome. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1999;10:145-152.
74. Fatti L, Bottasso B, Invitti C, et al. Markers of activation of coagulation and fibrinolysis in patients with Cushing's syndrome. *Journal of endocrinological investigation* 2000;23:145-150.
75. Whitten CW, Greilich PE. Thrombelastography: Past, Present and Future. *Anesthesiology* 2000;92:1223-1225.
76. Salooja N, Perry DJ. Thrombelastography. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2001;12:327-336.
77. Wiinberg B, Jensen AL, Rojkjaer R, et al. Validation of human recombinant tissue factor-activated thrombelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2005;34:389-393.
78. Leclere M, Lavoie JP, Dunn M, et al. Evaluation of a modified thrombelastography assay initiated with recombinant human tissue factor in clinically healthy horses *Veterinary Clinical Pathology* 2009.
79. Luddington R. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical and Laboratory Haematology* 2005;27:81-90.
80. Traverso C, Arcelus J, Gomez E, et al. Prospective assessment of the risk of deep vein thrombosis in elective abdominal surgery. Predictive role of thromboelastography. *Thrombotic and Haemorrhagic Disorders* 1993;71:9-15.

81. McGrath D, Cerboni E, Hirsh A, et al. Association of Thromboelastography (MA) and thrombotic complications after major non-cardiac surgery. In: 2003 annual meeting of the Society of Cardiovascular Anesthesiologists 2003.
82. Licari LG, Kovaic JP. Thrombin physiology and pathophysiology. *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009;19:11-22.
83. Wolberg AS. Thrombin generation assays: Understanding how the method influences the results. *Thrombosis Research* 2007;119:663-665.
84. Giesen PL. The Thrombogram Guide. In: Outline of the method to measure the Calibrated Automated Thrombogram and a manual for the Thrombinoscope Program Thrombinoscope BV; 2005.
85. Allegret V, Dunn M, Bédard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* 2011;40:24-31.
86. Brummel-Ziedins K, Vossen CY, Rosendaal FR, et al. The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004;3:1472-1481.
87. Dargaud Y, Luddington R, Baglin T. Platelet-dependent thrombography: a method for diagnostic laboratories. *British Journal of Haematology* 2006;134:323-325.
88. Giansily-Blaizot M ADR, Schved JF. Thrombin generation measurement in factor VII-depleted plasmas compared to inherited factor VII-deficient plasmas. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2003;33:36-42.

89. Tchaikovski SN, Vlijmen BJMV, J. Rosing GT. Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;5:2079-2086.
90. Carr AP. Hemostasis in Dogs with Hyperadrenocorticism. In: *ACVIM Forum 2006*, Louisville, Kentucky 2006.
91. Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2010:1-8.
92. Wiinberg B, Jensen A, Johansson P, et al. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *Journal of veterinary internal medicine* 2008;22:357-365.
93. Allegret V, Bédard C. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs using thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* In press.
94. Rivard GE, Brummel-Ziedins KE, Mann KG, et al. Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:2039-2043.
95. Faber CG, Lodder J, Kessels F, et al. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2003;33:52-58.
96. Rozanski E, Callan M, Hughes D, et al. Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated



- thrombocytopenia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002;220:477-481.
97. Tanaka KA, Szlam F, Sun HY, et al. Thrombin Generation Assay and Viscoelastic Coagulation Monitors Demonstrate Differences in Mode of Thrombin Inhibition Between Unfractionated Heparin and Bivalirudin. *Anesthesia Analgesia* 2007;105:933-939.
98. Varadi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia* 2004;10:17-21.
99. Plumb D. *Veterinary Drug Handbook*. In, 5 ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2005.
100. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
101. Albiger N, Testa R, Almoto B, et al. Patients with Cushing's syndrome have increased intimal media thickness at different vascular levels: comparison with a population matched for similar cardiovascular risk factors. *Hormone and metabolic research* 2006;38:405-410.
102. Sinnott VB, Otto CM. Use of thromboelastography in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 39 cases (2000–2008). *Journal of veterinary emergency and critical care* 2009;19:484-488.
103. Zaane BV, Nur E, Squizzato A, et al. Hypercoagulable State in Cushing's Syndrome: A Systematic Review. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:2743-2750.
104. Laurenson MP, Hopper K, Herrera MA, et al. Concurrent Diseases and Conditions in Dogs with Splenic Vein Thrombosis. *Journal of veterinary internal medicine* 2010;24:1298-1304.

105. Tournier A, Wahl D, Chaouat A, et al. Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thrombosis Research* 2010;126:e418-e422.
106. Cate-Hoek At, Dielis A, Spronk H, et al. Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2008;100:240-245.
107. Nair SC, Dargaud Y, Chitlur M, et al. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010;16:85-92.
108. Fantidis P. The role of the stress-related anti-inflammatory hormones ACTH and cortisol in atherosclerosis. *Current vascular pharmacology* 2010;8:517-525.
109. Moganasundram S, Hunt BJ, Sykes K, et al. The Relationship Among Thrombelastography, Hemostatic Variables, and Bleeding After Cardiopulmonary Bypass in Children. *Anesthesia Analgesia* 2010;110:995-1002.
110. Johansson PI, Svendsen MS, Salado J, et al. Investigation of the thrombin-generating capacity, evaluated by thrombogram, and clot formation evaluated by thrombelastography of platelets stored in the blood bank for up to 7 days. *Vox Sanguinis* 2008;94:113-118.
111. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, et al. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood stored for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion* 2011;51:50S-57S.
112. van Veen J, Gatt A, Bowyer A, et al. Calibrated automated thrombin generation and modified thromboelastometry in haemophilia A. *Thrombosis Research* 2009;123:895-901.

113. Tripodi A, Cappellini MD, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability in splenectomized thalassemic patients detected by whole-blood thrombelastometry, but not by thrombin generation in platelet-poor plasma. *Haematologica* 2009;94:1520-1527.
114. Tripodi A, Primignani PM, Clerici C, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology* 2006;44:440-445.
115. Dai Y, Lee A, Critchley LAH, et al. Does Thromboelastography Predict Postoperative Thromboembolic Events? A Systematic Review of the Literature. *Anesthesia & Analgesia* 2009;108:734-742.