

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA HIPOPLASIA SANGUÍNEA E QUANTIFICAÇÃO  
IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS CD45<sup>+</sup> NO SANGUE E NA  
MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Sofia Borin**  
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA HIPOPLASIA SANGUÍNEA E QUANTIFICAÇÃO  
IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS CD45<sup>+</sup> NO SANGUE E NA  
MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Sofia Borin**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**  
**Co-orientadora: Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (área de concentração em Clínica Médica Veterinária)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

B734e Borin, Sofia  
Estudo da hipoplasia sanguínea e quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> no sangue e na medula óssea de cães com doença renal crônica / Sofia Borin. -- Jaboticabal, 2011  
xiv, 71 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011  
Orientador: Aureo Evangelista Santana  
Co-orientadora: Marileda Bonafim Carvalho  
Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Márcia Mery Kogika  
Bibliografia

1. Cão. 2. Doença renal crônica. 3. Hipoplasia sanguínea. I. Título.  
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.15:636.7

**Ficha catalográfica** elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL**

### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** ESTUDO DA HIPOPLASIA SANGÜÍNEA E QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS CD45<sup>+</sup> NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

**AUTORA:** SOFIA BORIN

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MÁRCIA MERY KOGIKA

Departamento de Clínica Veterinária / Universidade de Sao Paulo / São Paulo/SP

Data da realização: 23 de fevereiro de 2011.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SOFIA BORIN** – nascida em 29 de junho de 1983 na cidade de Lençóis Paulista, SP, filha de Luiz Anselmo Borin e Regina Maria de Souza Borin. Em 2006 graduou-se Médica Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG. Nos anos de 2007 a 2009 participou do programa de residência em Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Jaboticabal, SP. Ingressou em 2009 no curso de mestrado na área de Clínica Médica do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP, câmpus de Jaboticabal, SP, e desde então, realiza atendimento médico veterinário nos Serviços de Oncologia e Patologia Clínica Veterinária.

***“Respeitar os animais é dever de todos,  
amá-los, é privilégio de poucos...”  
(Autor desconhecido)***

*Dedico  
Ao meu eterno amor Leandro,  
e às grandes mulheres da minha vida, Regina e Adelina.*

## ***Agradecimentos***

Primeiramente a Deus, por me dar força, discernimento e paciência nos momentos de dificuldade, e por permitir mais esta vitória.

Ao meu noivo Leandro, meu colega de profissão, meu amigo de longa data, meu “revisor” favorito, meu parceiro de estrada, amor da minha vida. Muito obrigada por compartilhar comigo sua vida e seus sonhos.

À minha amada mãe, meu espelho, minha guia. As reviravoltas da vida me mostram que o maior bem do mundo, é o de se ter o amor de sua mãe.

Aos meus anjos do céu, meu pai Luiz e minha avó Lina. Sinto e agradeço a presença de vocês em todos os momentos da minha vida.

À minha querida família. Vó Helena, tio Paulo, tia Iva, Pati, Carmen, Vi, tio Gue, tia Lúcia, Vinícius, Fabiano, tio Ricardo, tia Julia, Gú e Marcelo. Obrigada pelo apoio e torcida, que mesmo distantes, fazem muita diferença.

À minha nova família. Eliana, Bando, Julia e Rafael. Muito obrigada por inicialmente me aceitarem, depois me acolherem, me apoiarem e me considerarem parte da família.

Aos meus incríveis e vitaminados irmãos de república. Tathiana, Alexandre e Mariana. Conviver, conversar, discutir, sorrir, chorar, trabalhar, cozinhar, beber e, simplesmente viver ao lado de vocês, foi e será sempre um prazer.

À Professora Dra. Mirela Tinucci Costa e aos meus colegas do Serviço de Oncologia do HVGLN da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Letícia, Thiago, Érika e Sabryna. Muito obrigada por compartilharem comigo conhecimento e a dádiva de proporcionar e dar esperanças.

Aos queridos amigos do Laboratório de Patologia Clínica do HVGLN da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Geninho, Mônica e Matheus. Muito obrigada pelo apoio, paciência e imensa ajuda na execução prática deste trabalho.

À Mariana Miotto, Aline, Cesaltina, Marcy, Carol Franchi, Franco, Sabrina, Fábio Gava, Daniel, Evandro, Sandra, Marcelo e Fabrício, pela amizade e



confiança em mim depositadas. Saibam que o apoio de vocês sempre foi muito importante.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa.

Aos professores, pós-graduandos, funcionários, residentes e estagiários da FCAV e do HVGLN da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, por participarem direta e indiretamente deste projeto.

À Professora Dra. Ana Paula Massae Nakage Canesin e a Professora Dra. Mirela Tinucci Costa pela composição da banca de qualificação e pela contribuição com suas considerações.

À Fabiana Moreira, técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, campus de Ribeirão Preto, por toda atenção, paciência, boas risadas e serviços “citométricos” prestados.

À Professora Dra. Marileda Bonafim Carvalho, por me co-orientar e disponibilizar a estrutura e os pacientes do Serviço de Nefrologia e Urologia do HVGLN da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Aos pós-graduandos Guadalupe e Javier e aos alunos de IC Gabriel, Vitor e Caroline pela grande colaboração e amizade.

Aos queridos pacientes e seus proprietários, aos cães do canil do HV e da Nefrologia. Agradeço por confiarem em mim e tornarem este experimento possível.

Aos animais inesquecíveis da minha vida, Laide, Elvinho, Ikky, Mili, Hannah, Manola, Morgana, Tedy e Sadan; e aos amados “agregados” Pitica, Inês Maria (Nega), Negão, Simba, Hugo, Lua, Kyra, Milu e Lila. Alguns foram a razão de eu querer se veterinária, e os outros, mantêm-na viva.

E por último, mas de indiscutível importância, ao meu querido orientador Professor Dr. Aureo Evangelista Santana, por me receber por sua orientada, me apoiar, me motivar, me ensinar e me ajudar a galgar e conquistar mais esta etapa da minha vida,

***Agradeço.***

## SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas.....	viii
Lista de figuras.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Hematopoiese.....	4
Hipoplasias Medulares.....	5
Doença Renal Crônica Canina.....	7
Hipoplasia Sanguínea na DRC.....	9
Avaliação da Medula Óssea.....	11
Citometria de Fluxo e Imunofenotipagem Celular.....	12
III. OBJETIVOS.....	16
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
Animais e Grupos Experimentais.....	18
Obtenção das Amostras.....	20
Avaliação quantitativa de células CD45 <sup>+</sup> periféricas e centrais.....	21
Avaliação do Quadro Hematológico.....	24
Hemograma.....	24
Reticulocitometria.....	24
Mielograma.....	25
Bioquímica Sérica e Urinária.....	25
Urinálise.....	26
Aferição da Pressão Arterial Sistólica.....	26
Análise Estatística.....	27
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
VI. CONCLUSÕES.....	54
VII. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	67

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Estadiamento da doença renal crônica canina segundo a <i>International Renal Interest Society</i> (IRIS), 2006.....	19
<b>Tabela 2.</b> Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a <i>International Renal Interest Society</i> (IRIS), 2006.....	19
<b>Tabela 3.</b> Subestadiamento dos cães do grupo de doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4) segundo a classificação da IRIS (IRIS, 2006).....	29
<b>Tabela 4.</b> Estatística descritiva (média ± erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da densidade específica urinária (DEU), razão proteína creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistólica (PAS) dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.....	30
<b>Tabela 5.</b> Estatística descritiva (média ± erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da concentração de creatinina, ureia, fósforo e cálcio séricos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.....	33
<b>Tabela 6.</b> Estatística descritiva (média ± erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da concentração de proteína total e albumina séricos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.....	33
<b>Tabela 7.</b> Estatística descritiva (média ± erro padrão da média, valores mínimo e máximo) do hematócrito, hemácias, hemoglobina e reticulócitos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.....	38

- Tabela 8.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> no sangue periférico dos cães controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011..... 40
- Tabela 9.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) das porcentagens das séries granulocítica e eritróide, linfócitos, megacariócitos, bem como da relação mielóide eritróide (M/E) dos cães doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011..... 45
- Tabela 10.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos/macrófagos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> na medula óssea dos cães controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011..... 48

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ilustração do procedimento adotado para a coleta de medula óssea. <b>(1A)</b> Posicionamento adequado para a coleta. <b>(1B)</b> Após realização de tricotomia e anti-sepsia com algodão embebido em álcool 70°, realizou-se a anestesia local com solução de lidocaína 0,2%. <b>(1C)</b> Introdução da agulha hipodérmica 0,12 x 40 mm no osso esterno. <b>(1D)</b> Obtenção da amostra de medula óssea. Jaboticabal, 2011.....	21
<b>Figura 2.</b> Representações gráficas da citometria de fluxo de sangue periférico de um cão do grupo controle (FSC vs. SSC) e distribuições das populações de células CD45 <sup>+</sup> . Observa-se marcação celular CD45 <sup>+</sup> nos <i>gates</i> das populações de granulócitos ( <i>gates</i> verde e azul) monócitos ( <i>gate</i> roxo) <b>(2A)</b> e linfócitos ( <i>gate</i> vermelho) <b>(2B)</b> . Jaboticabal, 2011.....	23
<b>Figura 3.</b> Representações gráficas da citometria de fluxo de medula óssea de um cão do grupo controle (FSC vs. SSC) e distribuições das populações de células CD45 <sup>+</sup> . Observa-se marcação celular CD45 <sup>+</sup> nos <i>gates</i> das populações de granulócitos ( <i>gate</i> verde) monócitos/macrófagos ( <i>gate</i> azul) <b>(2A)</b> e linfócitos ( <i>gate</i> vermelho) <b>(2B)</b> . Jaboticabal, 2011.....	23
<b>Figura 4.</b> Razão proteína creatinina urinária (UP/C), densidade específica urinária (DEU) e Pressão arterial sistólica (PAS) dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa <i>GraphPad Prisma</i> ). Jaboticabal, 2011.....	31
<b>Figura 5.</b> Concentrações séricas de creatinina, ureia, fósforo e cálcio dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa <i>GraphPad Prisma</i> ). Jaboticabal, 2011.....	34

- Figura 6.** Valores de hematócrito, taxa de hemoglobina, contagem global de hemácias e contagem absoluta de reticulócitos dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 37
- Figura 7.** Quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> no sangue dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 41
- Figura 8.** Porcentagem dos precursores granulocitários e eritróides, linfócitos medulares, e relação mielóide eritróide (M/E) dos cães doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011. (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 45
- Figura 9.** Porcentagem de granulócitos; monócitos/macrófagos e linfócitos CD45<sup>+</sup> na medula óssea dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 47
- Figura 10.** Representação gráfica das correlações da creatinina sérica com os parâmetros eritrocitários hematócrito, hemoglobina, hemácias, reticulócitos e precursores eritrocitários dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul, vermelha e verde, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos, mínimos e a média de referência para a espécie canina, para as variáveis analisadas. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 50

- Figura 11.** Representação gráfica das correlações da creatinina sérica com os parâmetros bioquímicos fósforo e ureia séricos, UP/C, pressão arterial sistólica e relação M/E dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul, vermelha e verde, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos, mínimos e a média de referência para a espécie canina, para as variáveis analisadas. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 51
- Figura 12.** Representação gráfica das correlações do fósforo sérico com os parâmetros eritrocitários hematócrito, hemoglobina, hemácias e reticulócitos dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul e vermelha, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos e mínimos de referência para a espécie canina, para cada variável analisada. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011..... 53

## **ESTUDO DA HIPOPLASIA SANGUÍNEA E QUANTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS CD45<sup>+</sup> NO SANGUE E NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**RESUMO** - objetivou-se avaliar a celularidade, bem como quantificar imunofenotipicamente as células sanguíneas CD45<sup>+</sup> periféricas e centrais, em cães portadores de DRC nos diversos estádios da doença. O grupo controle foi composto de 11 cães saudáveis, de qualquer gênero e raça, com idade acima de cinco anos. O grupo DRC composto de 29 cães, de qualquer gênero, raça e idade, com diagnóstico de DRC, classificados segundo a IRIS em um dos estádios 2, 3 e 4 da doença, para a instituição dos subgrupos DRC2 (9), DRC3 (10) e DRC4 (10). Destes foram obtidas amostras de sangue periférico, medula óssea e urina, para realização de hemograma, reticulocitometria, avaliações bioquímicas séricas e urinárias, mielograma, imunofenotipagem de células CD45<sup>+</sup> periféricas e centrais e urinálise. Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os cães em estágio 2 da DRC não apresentam hipoplasia sanguínea, e a resposta medular mantém-se regenerativa. Crê-se que a anemia normocítica normocrômica do estágio 3, apresenta-se correlacionada à azotemia e à hiperfosfatemia. O estágio 4 da DRC é marcado por significativa linfopenia e severa anemia não regenerativa e hipoplasia da série eritróide. Diante das correlações encontradas, pode-se concluir quanto maiores forem as concentrações séricas de creatinina e fósforo, mais severa a anemia e menor a resposta eritropoiética, e que, o fósforo e a ureia, assim como a UP/C e pressão arterial sistólica se prestam como bons indicadores da progressão da DRC. A utilização de aquisição linear para quantificação das células CD45<sup>+</sup> permitiu verificar com precisão a linfopenia nos DRC4, entretanto desaconselha-se o uso desta técnica em substituição ao mielograma, a menos que se altere a forma de aquisição ou se faça uso de anticorpos específicos para as linhagens hematopoiéticas.

**Palavras-chave:** Cão, doença renal crônica, hipoplasia sanguínea.



## **STUDY OF BLOOD HYPOPLASIA AND IMMUNPHENOTYPING QUANTIFICATION OF BLOOD AND BONE MARROW CD45<sup>+</sup> CELLS IN DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

**SUMMARY** – this trial aimed to evaluate the cellular and quantify immunophenotypically blood CD45<sup>+</sup> cells in peripheral blood and central in dogs with CKD at various stages of the disease. The control group included 11 healthy dogs, of any gender and race, aged five years. The CRF group consisted of 29 dogs, of any gender, race and age with CKD were classified according to IRIS in one of stages 2, 3 and 4 of the disease, and subsequent establishment of subgroups CKD2 (9), CKD3 ( 10) and CKD4 (10). Samples were collected from peripheral blood, bone marrow and urine, to perform complete blood count, reticulocytes, biochemical assessments of blood and urine, bone marrow, immunophenotyping of CD45<sup>+</sup> cells in peripheral blood and central and urinalysis. Based on these results, we conclude that dogs with stage 2 CKD do not exhibit hypoplasia of blood and bone marrow response remains regenerative. It is believed that the normocytic normochromic stage 3, it appears correlated with azotemia and hyperphosphatemia. The fourth stage of CKD is characterized by significant lymphopenia, severe non-regenerative anemia and hypoplasia of the erythroid series. Given the correlations, one can conclude that higher serum concentrations of creatinine and phosphorus, more severe anemia and lower the erythropoietic response, and that the phosphorus and urea, as well as the ratio UP/C and blood pressure lend themselves as good indicators of the progression of CKD. The use of acquisition linear quantification of CD45<sup>+</sup> cells has shown precisely the lymphopenia in CKD4, however warns against the use of the above technique to replace the myelogram, unless you change the form of acquisition or use is made of specific antibodies hematopoietic lineages.

**Keywords:** Dog, chronic kidney disease, blood hipoplasia.

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da FCAV-UNESP em 22 de abril de 2009 (protocolo nº 006137-09).**

## I. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a celularidade do tecido sanguíneo, representada pelos componentes eritrocitário, leucocitário e plaquetário, é mantida dentro de estreitos limites de variação. A manutenção deste estado de equilíbrio só é possível graças ao perfeito balanço entre a produção, exportação e morte dos supracitados componentes celulares, graças à ação de mecanismos de feed-back positivos e negativos, bem como àquela de glicoproteínas regulatórias da comunicação intercelular, inclusive dos estimuladores de colônia (CSF). De outra parte, alterações no referido estado de equilíbrio podem ser traduzidas clínica e patologicamente por redução no número de eritrócitos, como na hemorragia aguda ou hemolítica; ou por aumento na utilização ou destruição de neutrófilos, como nas respostas aos processos inflamatórios; ou ainda, por destruição aumentada das plaquetas, como nos casos de trombopenia imunomediada. Em tais situações os centros hematopoiéticos são estimulados a incrementar a produção, diferenciação e liberação dos supracitados componentes celulares.

O estado de hipoplasia sanguínea tem se revelado como condição perturbadora associada ao aumento da morbimortalidade dos pacientes com doença renal crônica (DRC), visto serem os rins importantes sítios de produção da eritropoietina nos cães. No entanto, sua etiologia é considerada multifatorial, agravada pelas inúmeras lesões causadas no trato gastrointestinal em decorrência da uremia, pela modificação da proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana dos eritrócitos,

aumentando sua fragilidade e reduzindo seu tempo de vida, além das evidências de que o paratormônio, liberado nos casos em que já é patente o quadro de hiperparatireoidismo secundário renal, inibe a proliferação de precursores eritróides na medula óssea. Ademais, estudos em humanos e caninos, com diversos graus de doença renal crônica, têm demonstrado imunossupressão traduzida por maior grau de infecções, doenças cardiovasculares secundárias e desnutrição.

O diagnóstico e caracterização exata das diversas modalidades de hipoplasia sanguínea associadas à doença renal crônica são pouco seguros, primeiramente porque a obtenção e análise de amostras de medula óssea, com vistas ao mielograma, ainda apresenta certa resistência por parte da maioria dos clínicos e proprietários de pequenos animais e, segundo, porque as técnicas de avaliação quantitativa e qualitativa dos precursores sanguíneos requerem treinamento especializado.

Por outro lado, a imunofenotipagem por intermédio da técnica de citometria de fluxo, recurso emergente na Medicina Veterinária, permite análise rápida, objetiva e qualiquantitativa de células em suspensão, incluindo a identificação de precursores hematopoiéticos, contagens celulares diferenciais da medula óssea e dos leucócitos do sangue. O CD45<sup>+</sup>, antígeno comum e expresso sob diferentes intensidades na superfície das células sanguíneas, permite avaliação segura tanto dos precursores hematopoiéticos medulares quanto das células maduras do sangue periférico, com exceção das hemácias.

Nos casos de hipoplasia sanguínea em cães doentes renais, diversos fármacos e tratamentos têm sido propostos, na tentativa, geralmente frustrada, de se restabelecer, principalmente, o volume globular adequado, ou pelo menos mantê-lo em níveis aceitáveis. De maneira geral, os cães que apresentam hipoplasia(s) medular(es) podem ficar dependentes de transfusões sanguíneas seqüenciais, e comumente vêm a óbito em decorrência principalmente do comprometimento dos seus mecanismos de defesa inespecífica ou inata e específica ou adquirida, além de transtornos da coagulação. Acredita-se, portanto, que toda a dificuldade na padronização de protocolos eficazes deva-se, principalmente, à falta de caracterização dos tipos e graus da(s) hipoplasia(s) sanguínea(s) em cada estágio da DRC.

O Grupo de Pesquisa do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal (SP), em estreita colaboração com o Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e o Centro de Terapia Celular da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (SP), vem desenvolvendo com sucesso, ensaios para a quantificação imunofenotípica de células sanguíneas utilizando-se da citometria de fluxo desde 2000. Neste sentido, e buscando contribuir para um melhor entendimento das hipoplasias sanguíneas em cães com DRC, idealizou-se este ensaio com a expectativa de se obter resultados que possam dar sustentação à utilização de protocolos terapêuticos mais eficazes, na recomposição da celularidade sanguínea, diante dos estados de hipoplasia medular conseqüente à doença renal crônica em cães.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### Hematopoiese

Durante a vida intrauterina, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) são encontradas ao nível do saco vitelínico embrionário e, posteriormente, deslocam-se, por meio do sangue, para o fígado, baço, timo e linfonodos do feto e, desta forma, expandem os locais de produção, maturação e liberação das células sanguíneas. Nos mamíferos, no primeiro terço da vida intrauterina, o fígado fetal assume papel principal na produção e maturação das células sanguíneas, seguido, na medida em que o tempo evolui, pelo baço. Por volta do terço médio da vida intrauterina, as cavidades medulares já se acham bem estabelecidas no interior dos ossos longos e chatos e a atividade hematopoiética passa a se desenvolver no seio da medula óssea. Ao final do período da vida intrauterina, a medula óssea torna-se o principal sítio de atividade hematopoiética e produz granulócitos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e alguns linfócitos (SANTANA, 2000).

Após o nascimento, no início do período de vida extrauterina, a atividade hematopoiética medular encontra-se bem expandida, distribuindo-se pelas cavidades medulares dos ossos longos dos membros torácicos e pélvicos. Na medida em que o indivíduo amadurece sexualmente, a atividade hematopoiética sofre um deslocamento centrotroncular, limitando-se às cavidades medulares dos ossos chatos da pelve, costelas e esterno e, finalmente, na senilidade a hematopoiese se restringe às cavidades medulares das costelas e esterno (SANTANA, 2000).

A hematopoiese pós-natal é, portanto, realizada essencialmente no seio da medula óssea, cuja celularidade inclui células-tronco hematopoiéticas (CTHs), células precursoras (blastos), células sanguíneas morfofuncionalmente maduras e tecido de sustentação da hematopoiese (meiomicroambiente hematopoiético), localizado nas cavidades medulares dos ossos (SANTANA, 2000). A diferenciação das CTH pluripotenciais em células progenitoras unipotenciais “comprometidas”, e estas últimas em precursores clonais morfológicamente reconhecíveis e suas progênes, é influenciada por uma variedade de fatores regulatórios, agindo em diferentes níveis do desenvolvimento celular, caracterizando a teoria monofilética da origem do sangue (SANTANA, 1988; DIAS, 1997; SOBREIRA, 1999; OLIVEIRA, 2000).

Com o intuito de dar uma dimensão aproximada da amplificação nos processos de produção e desenvolvimento das células do tecido sanguíneo, Loutit (1967) propõe a existência de pelo menos uma CTH para cada mil células hematopoiéticas medulares e, pelo menos, cem mil células sanguíneas circulantes.

A proliferação das CTH é regulada por fatores microambientais e extramedulares e pela ação de diversos fatores humorais de crescimento. Dentro de um contexto geral, fatores de crescimento multiespecíficos, tais como a interleucina-3 (IL-3), estimulam células progenitoras mais jovens, não comprometidas, enquanto que fatores monoespecíficos como a eritropoietina, atuam na diferenciação de células progenitoras unipotenciais, comprometidas, e seus descendentes. Vale lembrar, entretanto, que estes dois tipos de fatores de crescimento podem, muitas vezes, atuar conjuntamente e produzir um efeito sinérgico (SANTANA, 2000; NAKAGE et al., 2006; CAPUA et al., 2009).

### **Hipoplasias Medulares**

As hipoplasias sanguíneas são de natureza muito diversificada e se caracterizam por citopenias associadas a graus variados de hipocelularidade medular, sem evidência de infiltração neoplásica e/ou síndrome mieloproliferativa. Podem ser

seletivas ou generalizadas, envolvendo os três setores da hematopoiese, originando-se de uma desordem adquirida ou constitucional (PASQUINI, 2000; PEREZ et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais a hipoplasia sanguínea se desenvolve não estão perfeitamente esclarecidos. Consideram-se, basicamente, três possíveis mecanismos que incluem - 1) lesão intrínseca das células progenitoras hematopoiéticas, 2) transtornos de natureza imune desencadeando citopenias e 3) perturbações do meiomicroambiente que dá sustentação à hematopoiese (YOUNG, 2000). Pasquini (2000) refere que tais mecanismos têm como pano de fundo diversos insultos perpetrados por agentes físicos e químicos, fármacos e agentes virais e bacterianos e, inclusive, um componente imunológico.

A expressão da citopenia seletiva poderá ser, inicialmente, mais preponderante, seguida de um quadro citopênico generalizado, ensejando uma tradução clínica que pode variar de manifestações isoladas, menos freqüentes, à sobreposições de anemia, neutropenia e trombocitopenia. A seqüência do declínio numérico das células sanguíneas está relacionada à vida média das referidas células no sangue. Devido à meia-vida curta dos neutrófilos, a neutropenia é a primeira a ser observada, seguida por trombocitopenia, e, finalmente, anemia (GOSSET, 2000; PASQUINI, 2000).

Diversos protocolos terapêuticos têm sido propostos na tentativa de se conseguir reverter os quadros de hipoplasias medulares. A nandrolona, andrógeno sintético com ação anabolizante, e recomendada na regeneração de diversos tecidos, inclusive sanguíneo (WEISER, 1997), tem sido utilizada nas hipoplasias medulares leves decorrentes do tratamento quimioterápico com vincristina (HUCKE, 2005). Outros fármacos tais como o ácido all-trans-retinóico, oximetazona e timomodulina, são empregados como estimuladores da celularidade medular em animais (GALE et al., 1981). Fatores estimuladores de colônia de granulócitos e de granulócitos-monócitos-macrófagos como G-CSF e GM-CSF, respectivamente (GELLER & WOLFF, 2005; LUCIDI & TAKAHIRA, 2007) são empregados nas hipoplasias granulocíticas e monocíticas por aumentarem o número de mitoses, diminuir o tempo de maturação e aumentarem a liberação de granulócitos para o sangue circulante. De acordo com



Randolph et al. (2004), benefícios também podem ser alcançados com o uso de eritropoietina recombinante humana (rh-EPO) em pacientes com anemia decorrente de doença renal crônica.

O transplante de medula óssea - TMO é citado por diversos autores como a única modalidade terapêutica efetiva para a recuperação da celularidade sanguínea em pacientes com aplasia ou hipoplasia medular (PASQUINI, 2000). O referido TMO é capaz de promover a reconstituição da celularidade sanguínea devido às habilidades de autorrenovação e diferenciação das CTH multipotenciais em CTH unipotenciais, e estas em células precursoras sanguíneas (LU et al., 1996; NAKAGE & SANTANA, 2006).

O transplante autólogo de CTH, que envolve a remoção temporária das CTH do próprio receptor, tem surtido efeito após terapia mieloablativa, doenças malignas e na mielossupressão química e radiologicamente induzida em cães (CAPUA et al., 2009; NAKAGE et al., 2009). No entanto, tal modalidade de transplante não se aplica aos casos de hipoplasias medulares já instaladas, se decorrentes de defeitos das células-tronco hematopoiéticas do referido receptor, quaisquer que sejam as causas, devido à baixa viabilidade das células progenitoras da medula óssea deste paciente/receptor. Neste caso, cujo paciente já apresenta hipoplasia medular instalada, o mais indicado será o transplante alogênico de medula óssea, que consiste na infusão de CTH de um indivíduo da mesma espécie e imunologicamente compatível, a fim de se evitar a doença do enxerto contra o hospedeiro (GASPER & THRALL, 2000; REIS & VISENTAINER, 2004).

### **Doença Renal Crônica Canina**

A doença renal crônica (DRC), principal afecção renal dos cães (FINCO, 1995; POLZIN & OSBORNE, 1995), reflete-se na perda da capacidade excretora e concentradora dos rins, com redução da filtração glomerular e conseqüente aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias que são, normalmente, eliminadas (POLZIN et al., 2004).

Do ponto de vista diagnóstico, tanto para fins clínicos quanto experimentais, a classificação do paciente com DRC sem os sinais clínicos de uremia é um desafio para os pesquisadores da área. A *International Renal Interest Society* (IRIS), instituiu um estadiamento para a DRC, caracterizando-a em 4 estádios: 1 – ausência de azotemia, 2 – azotemia leve, 3 – azotemia moderada e 4 – azotemia severa. Além disso, fixou subestadiamentos para a DRC, de acordo com a avaliação da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistólica.

O acúmulo de substâncias que deveriam ser normalmente eliminadas pelos rins é traduzido, clinicamente, por uma constelação de sinais clínicos conhecida como síndrome urêmica, que incluem o desequilíbrio hídrico e natrêmico, anemia, intolerância a carboidratos, distúrbios neurológicos, distúrbios gastrintestinais, osteodistrofias (FINCO, 1995), deficiência imunológica, acidose metabólica e processos inflamatórios que predisõem à fibrose e esclerose renais (OTS et al., 2000).

Os distúrbios glomerulares primários são reconhecidos como as principais causas de DRC em cães (GRAUER, 2005), porém amiloidose (RAVID et al., 1982), pielonefrite, urolitíase, displasia renal, nefrotoxinas, doença renal policística, hipercalcemia, linfoma, doenças autoimunes e imunemediadas e leptospirose (POLZIN et al., 2004; PRESSLER & VADEN, 2003) também são referidos na etiologia da doença.

Entretanto, trata-se de uma doença progressiva que, independentemente da causa, leva à destruição lenta de uma porção dos néfrons, enquanto os néfrons ílesos remanescentes sofrem hipertrofia compensatória, por um determinado tempo. Quando a DRC se instala, os néfrons hipertrofiados podem não conseguir mais manter a função renal, mesmo quando retirada a causa ou instituída a terapia adequada (POLZIN & OSBORNE, 1995).

## Hipoplasia Sanguínea na DRC

O estado anêmico, de origem multifatorial, invariavelmente compõe o quadro do binômio morbidade-mortalidade, evidenciado no plano clínico-patológico por pacientes caninos portadores de DRC (WALLNER et al., 1976). Os rins são os principais sítios de produção da eritropoietina nos cães (MORITZ et al., 1997) e, ademais, já em 1976 WALLNER et al. haviam demonstrado que as chamadas “toxinas urêmicas” presentes no soro de pacientes com DRC são capazes de inibir a eritropoiese in vitro.

A síndrome anêmica pode ser agravada pelas inúmeras lesões do trato gastrointestinal, decorrentes da uremia, e que levam à hematêmese, melena e hematoquesia (POLZIN & OSBORNE, 1995) que, por sua vez, são agravadas pelo defeito na adesão plaquetária ao subendotélio vascular, em decorrência tanto das alterações plaquetárias quanto plasmáticas (CASTILLO et al., 1986). A doença renal crônica pode modificar a proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana dos eritrócitos, aumentando sua fragilidade osmótica e diminuindo seu tempo de vida (AKMAL et al., 1985; SILVA, 2006), bem como diminuir a capacidade de deformabilidade eritrocitária, o que contribui com a tendência hemorrágica por reduzir a disponibilidade plaquetária aos vasos lesionados (CASTILLO et al., 1986).

A produção excessiva do PTH também contribui para o comprometimento da eritropoiese. Há evidências de que o referido hormônio inibe a proliferação de precursores eritrocitários na medula óssea. Por outro lado, as poliaminas também têm sido incriminadas como toxinas urêmicas envolvidas na gênese da anemia. Tais aminas, dentre elas a espermina, espermidina, putrescina e cadaverina, desempenham papel inibitório na proliferação e diferenciação de células eritrocíticas e são conhecidas por se acumularem no plasma de doentes com DRC. Acredita-se que atuem antagonizando a ação da eritropoietina (MACDOUGALL, 2001).

Outras toxinas urêmicas que têm papel relevante no desenvolvimento da anemia são as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1, fator de necrose

tumoral- $\alpha$  e interferon- $\alpha$ , que causam efeitos supressores da eritropoiese (MACDOUGALL, 2001).

Na década de setenta, foram encetados estudos sobre o perfil imunológico de pacientes urêmicos humanos, os quais apresentaram resultados que variaram consideravelmente, e cuja função das células linfocitárias mostrou-se reduzida, em alguns casos (QUADRACCI et al., 1976; KAUFFMAN et al., 1975), normal (DANIELS et al., 1971; BOULTON-JONES et al., 1973; BIRKELAND, 1976) e aumentada em outros (NAKHLA & GOGGIN, 1973). De acordo com Miller & Stewart (1980), tais contradições derivam de dois fatores relevantes. O primeiro guarda relação com o fato dos grupos estudados estarem inseridos em programas de diálise ou terem sido transplantados, pois a necessidade de se manter o tratamento farmacológico ou cirúrgico impossibilitou a avaliação do estado urêmico por si só. O segundo decorre possivelmente da forma como os experimentos foram conduzidos. Alguns pesquisadores utilizaram-se de suspensões de isolados de linfócitos (*in vitro*), enquanto outros trabalharam com testes *in vivo*.

No ano de 1980, em dois importantes experimentos nos quais foram utilizados cultivos celulares, foi demonstrada marcante influência da uremia, experimentalmente induzida e controlada, na imunidade celular em ratos (MILLER & STEWART, 1980; STEWART & MILLER, 1980). Em ensaios realizados em pacientes humanos em hemodiálise, observou-se que o plasma de pacientes urêmicos contém fatores inibitórios capazes de influenciar a resposta linfocitária *in vitro* (RASKA et al., 1980), além de causar anormalidades das funções granulocitárias de aderência, fagocitose e quimiotaxia (CHARPENTIER et al., 1983).

A partir dos ensaios e resultados referidos precedentemente, os estudos se verticalizaram e, mais recentemente, por intermédio de técnicas de citometria de fluxo, obtiveram-se resultados que indicam baixa resposta imunológica associada à significativa redução de linfócitos circulantes nos estádios mais avançados da doença renal crônica humana (NAIRN et al., 2005; PAHL et al., 2010).

Presentemente, há grande interesse no estudo do leucograma de pacientes com DRC, também na medicina veterinária de pequenos animais. Assim, utilizando-se

da imunofenotipagem celular, KRALOVA et al. (2010) verificaram, após agruparem caninos doentes renais pela sintomatologia clínica, marcante linfopenia nos cães severamente azotêmicos e clinicamente comprometidos, sem concomitante alteração nas contagens global dos leucócitos e absolutas de neutrófilos e monócitos, achados também verificados em ensaios com humanos.

### **Avaliação da Medula Óssea**

O atual avanço nas pesquisas com células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais da medula óssea (MO) impõe a necessidade de aprofundamento dos conhecimentos básicos no que diz respeito às suas fontes de obtenção, enriquecimento, e aplicação terapêutica (MÜLLER et al., 2009).

A avaliação da celularidade medular, de forma quali-quantitativa (mielograma) é um procedimento essencial na elucidação de transtornos do sangue e dos órgãos formadores do sangue, bem como nos estudos preliminares da toxicidade de terapias anticancerígenas e agentes imunossupressores (WEISS, 1986). Evidentemente, é imperativo que o estudo e interpretação do mielograma sejam conduzidos à luz dos achados do hemograma (PEREZ et al., 2005).

Com relação aos valores do mielograma, a partir de preparações microscópicas coradas e obtidas por citoaspiração da medula óssea, tem sido reportado por vários autores que para cães saudáveis, adultos, machos ou fêmeas, o total de células eritróides situa-se em torno de 38,48% e, ademais, que os precursores da referida série eritróide distribuem-se de acordo com os seguintes valores médios percentuais: pró-eritroblastos – 0 a 3,4%, eritroblastos basofílicos – 0,4 a 11,6%, eritroblastos policromatófilicos – 3,5 a 27,0% e eritroblastos ortocromáticos – 0 a 25,8%. Além disso, que as células granulocitárias totais perfazem cerca de 54,55% da celularidade medular e que os precursores granulocitários estão distribuídos de acordo com os valores médios percentuais que se seguem: mieloblastos – 0 a 5,1%, pró-granulócitos – 0 a 5,8%, mielócitos neutrofilicos – 0 a 15,0%, metamielócitos neutrofilicos – 0 a 24,4%,

neutrófilos bastonetes – 6,8 a 62,9%, neutrófilos segmentados – 0 a 44,2%, mielócitos eosinofílicos – 0 a 4,2%, metamielócitos eosinofílicos – 0,4 a 3,7%, eosinófilos bastonetes – 0,9 a 2,4%, eosinófilos segmentados – 0 a 6,8%, e basófilos – 0 a 1,3%. Também tem sido reportado valores para linfócitos de 0 a 15,1%, plasmócitos de 0 a 4,3%, monócitos de 0 a 0,4%, megacariócitos de 0 a 1,0% e, finalmente, relação mielóide:eritróide (M:E) normal é de aproximadamente 1,25:1,0 (JAIN, 1993).

Nos diversos graus de hipoplasia sanguínea podem-se observar, no material aspirado, espículas de medula óssea nas quais há substituição de células hematopoiéticas por gordura, visibilizando-se poucas células residuais hematopoiéticas. Além disso, a celularidade revela-se bizarramente constituída por células do estroma, macrófagos contendo pigmento férrico, linfócitos, plasmócitos e raríssimos elementos das linhagens granulocítica, eritrocítica e megacariocítica (PASQUINI, 2000).

Ensaio citomorfológicos e citoquímicos são métodos clássicos para caracterizar e classificar células hematopoéticas (JAIN, 1993), porém técnicas de imunocitoquímica e imunofenotipagem (anticorpos monoclonais) têm promovido um avanço na definição e classificação de células sanguíneas e seus progenitores/precusores, particularmente aqueles de baixo grau de diferenciação. Os anticorpos monoclonais conjugados com compostos fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), podem ser incubados com as células a serem analisadas, permitindo a identificação e quantificação citofluorométrica das mesmas (GRINDEM, 1996).

### **Citometria de Fluxo e Imunofenotipagem Celular**

A citometria de fluxo é uma importante ferramenta no apoio diagnóstico que vem sendo amplamente utilizada na medicina e, mais recentemente, na medicina veterinária (COMAZZI et al., 2006).

Trata-se de uma tecnologia baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes e recursos de informática e utilizada

para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas em suspensão, incluindo inúmeros tipos celulares, protozoários, bactérias (NGUYEN et al., 2007), citocinas, quimiocinas e marcadores de apoptose e proliferação celular. É um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite uma análise rápida, objetiva, qualitativa e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001; NAKAGE et al., 2005). Tem ampla aplicação na hematologia veterinária, especialmente na identificação de precursores hematopoéticos, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritoparasitas, detecção de anticorpos antieritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas (WEISS, 2004a, 2004b; NAKAGE et al., 2005).

A técnica de classificação celular por intermédio da citometria de fluxo se baseia na ativação do citômetro por imunofluorescência (FACS – “*Fluorescence Activated Cell Sorter*”), o que propicia a identificação e quantificação de células com base em seu tamanho (“*Forward scatter*” – FSC), granularidade (“*Side Scatter*” – SSC) e intensidade de fluorescência. A avaliação de FSC x SSC, permite a classificação, por exemplo, dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996).

Amostras ou aspirados com agulhas finas de linfonodos ou outros tecidos, inclusive tecido sanguíneo periférico ou central, podem ser facilmente analisados pela citometria de fluxo (NAKAGE et al.; 2005). Os leucócitos, elementos celulares do sangue mais estudados por citometria, podem ser analisados no sangue total com anticoagulante ou podem ser isolados pelo uso da centrifugação por gradiente de densidade. Nas coletas das amostras de sangue para citometria de fluxo, o anticoagulante recomendado é o ácido etilenodiaminotetracético dipotássico ( $K_2$ .EDTA), o qual apresenta vantagens sobre os demais, pois proporciona uma boa separação das distintas populações leucocitárias e permite que as amostras possam ser analisadas satisfatoriamente dentro de um período de 24 horas (PAXTON et al., 1989).

A imunofenotipagem celular consiste na separação de distintas populações de células, cujos antígenos de superfície são marcados com anticorpos específicos (ROITT et al., 2003). Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido à sua

especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). Pelo fato de serem os anticorpos monoclonais desenvolvidos por diversos laboratórios, em várias partes do mundo, utiliza-se o termo CD (*“Cluster of Differentiation”* = denominação de grupamento) para os anticorpos monoclonais contra antígenos leucocitários humanos (ROITT, 2003).

Alguns “workshops” foram recentemente organizados para classificar os anticorpos monoclonais, com um número do CD correspondente à nomenclatura humana, de diversos animais domésticos incluindo os cães (COBBOLD & METCALFE, 1994), suínos (SAALMULLER, 1996), eqüinos (LU et al., 1996) e ruminantes (NAESSENS et al., 1997). Anticorpos monoclonais também já foram identificados e classificados em felinos (ACKLEY et al., 1990; WILLETT et al., 1994; WOO & MOORE, 1997). Sendo assim, presentemente, alguns anticorpos monoclonais específicos para cães e gatos estão disponíveis comercialmente (BYRNE et al., 2000). O gradual aumento no número destes anticorpos desenvolvidos para fins diagnósticos tem permitido a determinação de diversas linhagens celulares em diversas condições patológicas (COMAZZI et al., 2006).

O anticorpo anti-CD45 é geralmente utilizado em hematologia veterinária para classificação celular e, em especial, para qualificação e quantificação de variedades leucocitárias (WEISS, 2004a). Trata-se o CD45 de antígeno que se expressa com diferentes intensidades na superfície das células sanguíneas (GRINDEM, 1996; WEISS, 2004a) e configura-se como uma família de glicoproteínas de 190 a 220kDa, encontrada em todas as células hematopoiéticas, exceto nas hemácias maduras (TIZARD, 1998). De acordo com WEISS (2004a, 2004b) o CD45 pode ser útil na avaliação de desordens envolvendo a medula óssea, e possibilita a quantificação de granulócitos, inclusive mieloblastos, precursores eritrocitários e linfócitos em cães.

Segundo COMAZZI et al. (2006), quanto maior o grau de maturação dos leucócitos, maior a expressão de CD45. Ademais, quando consideradas variáveis morfológicas com base na complexidade interna (SSC), o anticorpo monoclonal anti-CD45 é, usualmente, utilizado para confecção de “*gates*” para diferenciar os leucócitos de eritrócitos e debris celulares, sendo possível fazer-se um “mielograma” por



intermédio da citometria de fluxo, de tal forma a separar, assim, diferentes linhagens, podendo-se estudá-las individualmente quanto ao seu perfil de expressão antigênica (COMAZZI et al., 2006).

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Neste ensaio, diante das controvérsias bibliográficas concernentes à fisiopatogenia das hipoplasias sanguíneas de caninos doentes renais crônicos, traduzida muitas vezes pelo quadro de anemia normocítica normocrômica associada ou não a manifestações de ordem imunológica específica e/ou inespecífica, objetivou-se avaliar a celularidade, bem como quantificar imunofenotipicamente as células sanguíneas CD45<sup>+</sup> periféricas e centrais, em cães portadores de DRC nos diversos estádios da doença, atendidos junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

#### Objetivos específicos

Após instituição de três grupos de doentes renais crônicos, estadiados de acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS, 2009) nos estádios 2, 3 e 4 da doença, sejam levemente, moderadamente e severamente azotêmicos, respectivamente, propôs-se:

- Análise epidemiológica da população amostral,
- Avaliar as alterações bioquímico-séricas,
- Caracterizar a celularidade eritrocitária,

- Caracterizar a resposta reticulocitária,
- Quantificar as células CD45<sup>+</sup> totais e subpopulações leucocitárias no sangue periférico,
- Caracterizar o mielograma;
- Quantificar as células CD45<sup>+</sup> precursoras hematopoiéticas da medula óssea,
- Correlacionar as concentrações de creatinina sérica às variáveis eritrocitárias periféricas e centrais, bioquímicas séricas e urinárias,
- Correlacionar as concentrações de fósforo séricas às variáveis eritrocitárias periféricas e centrais.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### ***Animais e grupos experimentais***

Ao final do estudo foram avaliados pontualmente 40 cães adultos, atendidos junto ao Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais e Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, distribuídos em dois grupos experimentais, como a seguir:

- **Grupo Controle (GC):** o grupo controle constituiu-se de 11 cães adultos, sadios, de qualquer gênero, de qualquer raça e com idade superior a cinco anos, cujo bom estado de saúde foi aquilatado com base em exames clínicos gerais, laboratoriais de rotina e pela estimativa da taxa de filtração pelo *clearance* de creatinina endógena de 24 horas.
  
- **Grupos de Doentes Renais Crônicos (DRC):** o grupo de doentes renais crônicos compôs-se de 29 cães, de qualquer gênero, raça e idade, com diagnóstico de DRC e sem histórico ou alterações clínicas e clínico-patológicas de outras doenças. Tais cães foram alocados, segundo a classificação da IRIS para DRC em um dos estádios 2, 3 ou 4 (Tabela 1) (IRIS, 2009), o que propiciou a instituição dos subgrupos DRC2 (9 cães), DRC3 (10 cães) e DRC4 (10 cães).

Como critério de inclusão para o grupo DRC, foram levadas em consideração a evolução clínica de mais de 15 dias, valores de creatinina sérica superiores à 1,4 mg/dL após devida hidratação do paciente, obtida em dois ou três momentos diferentes ao longo de algumas semanas.

Ainda, na classificação proposta pela IRIS (2009), os pacientes foram subestadiados quanto à proteinúria renal e à hipertensão arterial sistólica (Tabela 2). A categorização do paciente como proteinúrico, foi realizada somente após a exclusão de fatores pré e pós-renais de perda urinária de proteína e, ainda, a confirmação de sua persistência pela determinação do valor da razão proteína creatinina urinária (UP/C) em diferentes momentos ou atendimentos clínicos (duas a três ocasiões com intervalo mínimo de 15 dias). Da mesma maneira, os valores da pressão arterial sistólica foram confirmados após três aferições realizadas em momentos ou atendimentos diferentes.

**Tabela 1.** Estadiamento da doença renal crônica canina segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS), 2009.

ESTÁDIO	CREATININA (mg/dL)
1 – Não azotêmico	<1,4
2 – Levemente azotêmico	1,4 – 2,0
3 – Moderadamente azotêmico	2,1 – 5,0
4 – Severamente azotêmico	>5,0

\* Adaptada de IRIS, (2009).

**Tabela 2.** Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS), 2009.

SUBESTÁDIOS	VALOR DE UP/C
Não proteinúrico (NP)	<0,2
Proteinúria limítrofe (PL)	0,2 – 0,5
Proteinúrico (P)	>0,5
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)	
Risco mínimo (0)	<150
Baixo risco (1)	150 – 159
Risco Moderado (2)	160 – 179
Alto risco (3)	≥180

\* Adaptada de IRIS, (2009).

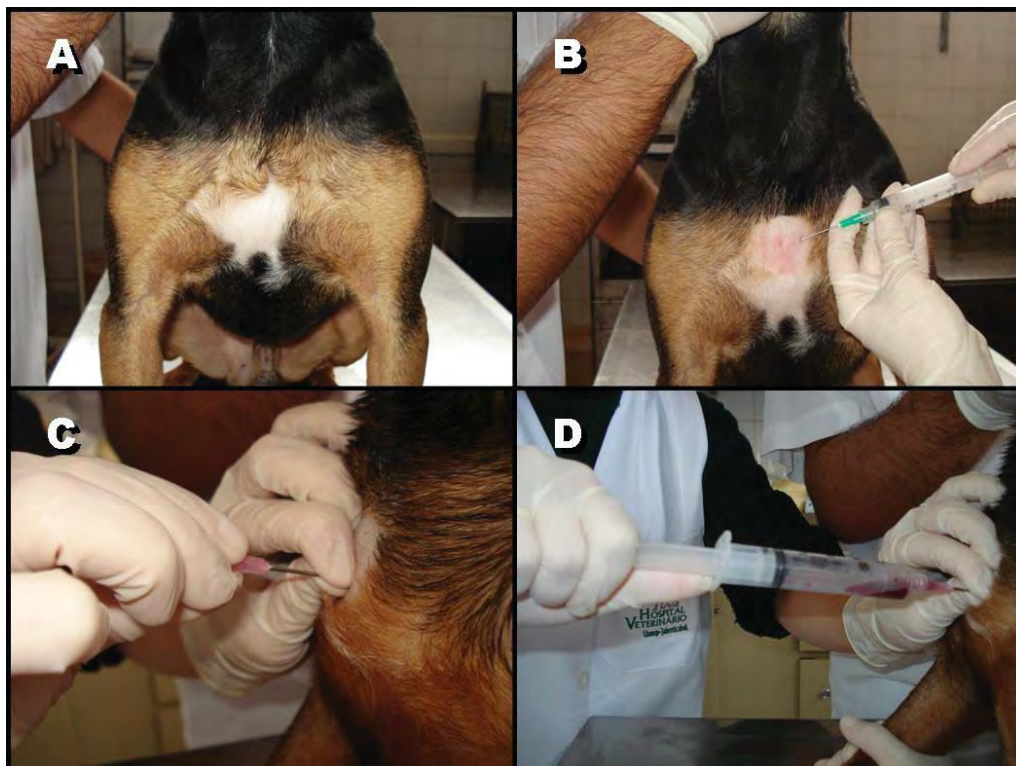
Cabe ressaltar que, diante da dificuldade em se diagnosticar a DRC em pacientes não azotêmicos pela ausência de sinais clínicos e pela necessidade da

realização de exames que comprovassem a redução da taxa de filtração glomerular, o grupo de pacientes DRC estágio 1 não fez parte deste delineamento experimental. Dando seguimento às dificuldades diagnósticas dos estádios precoces da DRC, diante do fato de os pacientes DRC estágio 2 não apresentarem sinais clínicos relacionados a disfunção renal, à exceção da poliúria e polidipsia, e estas serem manifestações comuns à diversas doenças, realizaram-se avaliação ultrassonográfica dos rins e mensuração da excreção fracionada de sódio afim de confirmar a presença de DRC nestes pacientes.

Além disso, não foram incluídos no grupo/subgrupos de doentes renais crônicos, pacientes que já tivessem sido submetidos a transfusões sanguíneas ou ao tratamento com quaisquer fármacos indutores de hematopoiese (Nandrolona, rhG-CSF, Timomodulina e/ou Eritropoietina).

### ***Obtenção das amostras***

As amostras de sangue periférico foram obtidas por venipunção jugular e foram envasadas em tubos a vácuo contendo K<sub>2</sub>-EDTA. Após anestesia local (lidocaína a 0,2%), sem vasoconstritor, amostras de 1,0 mL medula óssea foram obtidas, por intermédio de punção aspirativa do esterno com auxílio de agulhas hipodérmicas (25x8, 30x10 ou 40x12 mm), de acordo com o porte do animal, recolhidas em seringas contendo K<sub>2</sub>-EDTA (Figura 1). Após a coleta, as amostras de medula óssea foram envasadas e mantidas sob refrigeração até a realização dos procedimentos para citometria de fluxo.



**FIGURA 1.** Ilustração do procedimento adotado para a coleta de medula óssea. **(1A)** Posicionamento adequado para a coleta. **(1B)** Após realização de tricotomia e anti-sepsia com algodão embebido em álcool 70°, realizou-se a anestesia local com solução de lidocaína 0,2%. **(1C)** Introdução da agulha hipodérmica 0,12 x 40 mm no osso esterno. **(1D)** Obtenção da amostra de medula óssea. Jaboticabal, 2011.

As amostras de urina foram obtidas por micção espontânea ou cateterização vesical, com auxílio de sondas uretrais de tamanhos apropriados para cada animal.

### ***Avaliação quantitativa de células CD45<sup>+</sup> periféricas e centrais***

A preparação das amostras para os estudos citométricos foi realizada num prazo máximo de 24 horas após as coletas, e as respectivas leituras em no máximo 72 horas após a marcação celular. Para tanto, alíquotas do sangue periférico e da medula óssea foram encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, SP. A metodologia para a avaliação citométrica consistiu, inicialmente, na identificação de três tubos estéreis para cada

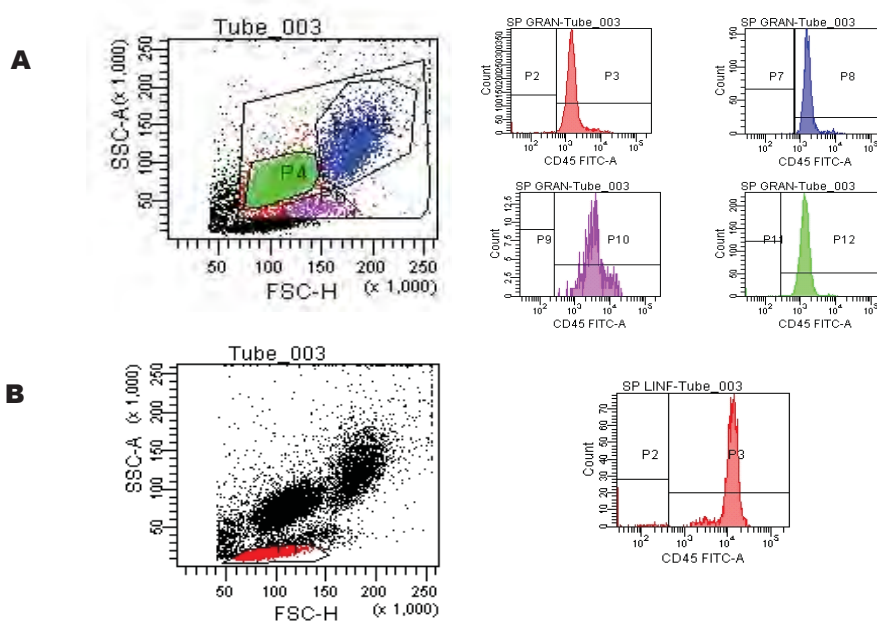
amostra (tubo 1 – só células, tubo 2 – IgG2bFITC e tubo 3 - CD45FITC). Foram adicionados 100  $\mu$ L de amostra (sangue periférico ou medula óssea) e dois  $\mu$ L de IgG2bFITC (MCA1212F, Serotec, USA) no tubo 2; e anti-CD45<sup>+</sup> conjugado com FITC (MCA1042F, Serotec, USA) no tubo 3.

Os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Um mL de tampão de lise de hemácias (*FACS Lysing Solution* – Becton Dickinson) foi adicionado a cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por dez minutos à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, realizam-se lavagens da suspensão de células com solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (PBS), por três vezes, cujo procedimento consistiu na centrifugação a 1800 G por três minutos, desprezo do sobrenadante e adição de 2,0 mL de PBS.

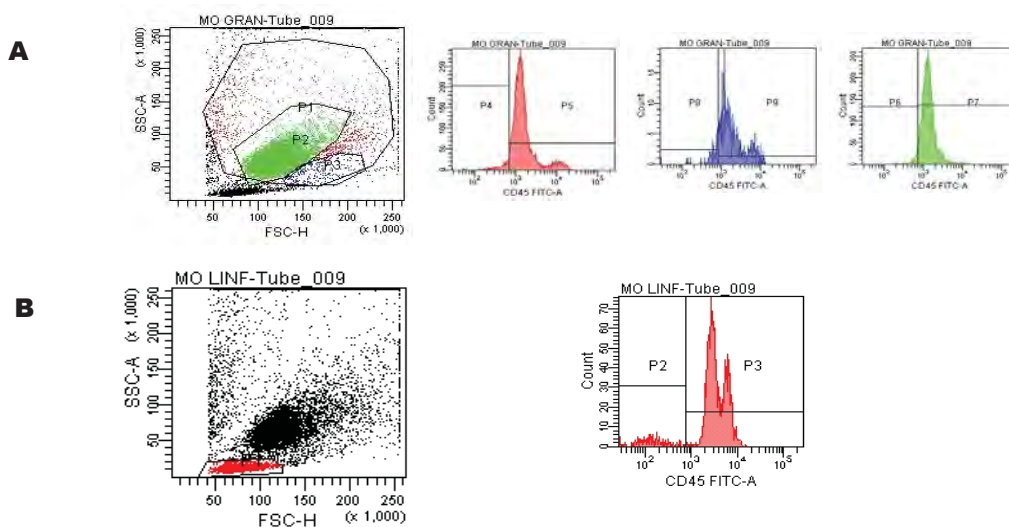
Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 500  $\mu$ L de PBS com formol à 1% nos três tubos para preservação do material. As amostras foram mantidas sob refrigeração. Após transporte adequado ao supracitado Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto, SP, foram submetidas à análise no citofluorômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA) com vistas à contagem das células CD45<sup>+</sup>.

O modo de aquisição linear foi utilizado tanto para as avaliações do sangue periférico, quanto da medula óssea. As análises das populações das células CD45<sup>+</sup> foram realizadas por profissional treinado e experiente, na forma de estudo cego. Foram obtidos 10000 eventos, para identificação e quantificação das células CD45<sup>+</sup>, no sangue periférico (Figura 2) e na medula óssea (Figura 3) utilizando-se do programa FACSDiva (BD). O cálculo dos valores absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico foi realizado multiplicando-se os valores percentuais das referidas células pela contagem global de leucócitos. Para as células CD45<sup>+</sup> da medula óssea foram obtidos somente os valores relativos, uma vez que a contagem global de células nucleadas na mesma não é um método preciso.





**Figura 2.** Representações gráficas da citometria de fluxo de sangue periférico de um cão do grupo controle (FSC vs. SSC) e distribuições das populações de células CD45<sup>+</sup>. Observa-se marcação celular CD45<sup>+</sup> nos *gates* das populações de granulócitos (*gates* verde e azul) monócitos (*gate* roxo)(2A) e linfócitos (*gate* vermelho) (2B). Jaboticabal, 2011.



**Figura 3.** Representações gráficas da citometria de fluxo de medula óssea de um cão do grupo controle (FSC vs. SSC) e distribuições das populações de células CD45<sup>+</sup>. Observa-se marcação celular CD45<sup>+</sup> nos *gates* das populações de granulócitos (*gate* verde) monócitos/macrófagos (*gate* azul) (2A) e linfócitos (*gate* vermelho) (2B). Jaboticabal, 2011.

### ***Avaliação do Quadro Hematológico***

Todas as análises laboratoriais pertinentes à avaliação do quadro hematológico dos pacientes foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

#### ***Hemograma***

As contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, taxa de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos com o auxílio de um contador automático de células (ABC Vet - HORIBA ABX – São Paulo/Brasil).

#### ***Reticulocitometria***

Alíquotas de sangue total (100 µL) foram incubadas com igual quantidade de Azul Brilhante Cresil, em banho-maria, à 37°C, por 15 minutos. Após a incubação confeccionaram-se esfregaços sangüíneos, que foram contracorados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa. As avaliações das populações reticulocitárias foram, então, conduzidas em ensaio cego, por profissional treinado e experiente. Com auxílio de microscópio, objetiva de imersão (100X), foram realizadas contagens de hemácias maduras e de reticulócitos em 20 campos uniformemente distribuídos. A quantidade de reticulócitos foi expressa em porcentagem e para obtenção do valor corrigido pelo hematócrito, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ reticulócitos corrigida} = \left( \frac{\text{Hematócrito}}{45} \right) \times \% \text{ de reticulócitos}$$

A fórmula reticulocitária absoluta foi obtida a partir da contagem global de hemácias por uma regra de três direta.

### ***Mielograma***

As preparações citoscópicas de medula óssea, devidamente fixadas e coradas, foram avaliadas em ensaio cego, por profissional treinado e experiente. Subjetivamente, ao microscópio, objetiva seca (10X), foram analisadas de acordo com sua celularidade (normo, hiper ou hipocelular) e quantidade de gordura (normal, aumentada ou diminuída). Objetivamente, foram enumerados os megacariócitos em cada preparação citoscópica de medula óssea (objetiva de 10X) e procedidas às contagens absolutas de 300 precursores celulares das séries mielóide e eritróide, de outras células diferenciadas (linfócitos, plasmócitos e monócitos) e seus precursores em objetiva de imersão (100X) e, por fim, estabelecimento das contagens relativas e da relação mielóide eritróide (M/E).

### ***Bioquímica Sérica e Urinária***

As provas bioquímicas dos pacientes, assim como as avaliações hematológicas, foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “GLN” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

As amostras de soro foram processadas para determinação de concentrações de creatinina (método Jaffé modificado), uréia (método enzimático), alanino aminotransferase (método Reitman e Frankel), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), cálcio (reação cromogênica com cresolftaleína complexona), fósforo (método de Daly e Ertingshausen modificado). Utilizou-se o sistema Labtest para diagnóstico e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático para provas bioquímicas.

Nas amostras de urina foram determinadas as concentrações de creatinina (método Jaffé modificado) e proteína (método vermelho de pirogalol). Da mesma maneira que para as provas bioquímicas séricas, utilizou-se o sistema Labtest para

diagnóstico e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático.

Para os cálculos da razão proteínas/creatinina-UP/C urinária utilizou-se a fórmula:

$$UP/C = \frac{U_{Pt} \text{ (mg/dL)}}{U_{Cr} \text{ (mg/dL)}}$$

\* Sendo: UP/C a razão proteínas creatinina urinária,  $U_{Pt}$  a concentração urinária de proteínas e  $U_{Cr}$  a concentração urinária de creatinina.

### **Urinálise**

O exame físico da urina foi realizado por meio da observação macroscópica. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital<sup>1</sup>. Para a sedimentoscopia as amostras foram centrifugadas a 800 G durante cinco minutos, sendo o sobrenadante reservado para análise do UP/C e o sedimento para confecção da lâmina. O material foi analisado a fresco empregando-se objetiva seca com aumento de 10 a 40X em microscópio, para realização das contagens de cada tipo de elemento figurado por campo.

### ***Aferição da Pressão Arterial Sistólica***

A pressão arterial sistólica sanguínea foi aferida no Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital Veterinário “GLN” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, por método ultrassônico com Doppler vascular (Microem<sup>®</sup> - Ribeirão Preto, SP, Brasil), conectado a um manguito de oclusão e a um esfigmomanômetro (Latex Pri<sup>®</sup>). Após aclimação do paciente, foram realizadas cinco aferições seqüenciais, das quais foram descartados o maior e menor valor, obtendo-se a média das três pressões restantes.

---

<sup>1</sup> Refratômetro de Mesa – UGI (1,000 – 1,050) - Atago - Tóquio – Japão

### ***Análise Estatística***

Os dados foram avaliados pela análise de variância de via única seguida pelo *post hoc* teste de Tukey. Para cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média, erro padrão da média, valores mínimo e máximo. As correlações entre creatinina e fósforo sérico e os demais parâmetros, foram obtidas pelo teste de Pearson. Sempre que necessário considerou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Dados clínico-laboratoriais e epidemiológicos da população amostral*

O grupo controle compôs-se de três fêmeas (27,28%) e oito machos (72,72%), todos sem raça definida. Apresentaram idades que variaram de seis a 12 anos, sendo que 73% dos animais encontraram-se na faixa etária de seis a nove anos. Salienta-se que se adotou a idade acima de cinco anos para os animais do grupo controle, no sentido de se buscar homogeneidade e validação dos achados hematológicos e medulares, pois embora não haja predileção racial e etária (POLZIN et al., 2004), sabe-se que a morbidade é predominante nos pacientes caninos com DRC em idade mais avançada (LEES, 2004), além de a medula óssea sofrer alterações em sua composição com o envelhecimento (SANTANA, 2000). Os exames laboratoriais realizados neste grupo, que serviram de base para aquilatar seu estado de saúde satisfatório, encontram-se explicitados no apêndice A.

O grupo de doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2) compôs-se de três fêmeas (33,33%) e seis machos (66,64%), com idades entre oito e 15 anos, sendo 44,45% situado na faixa etária entre oito e 10 anos. Destes, três animais (33,34%) sem raça definida, e os demais das raças Poodle (2), Cocker Spaniel (2), Maltês (1) e Boxer (1).

Dos doentes renais crônicos classificados no estágio 3 (DRC3) incluíram-se cinco fêmeas (50%) e cinco machos (50%), com idades variando entre dois e 15 anos, sendo que 50% deles encontravam-se na faixa etária de 10 a 15 anos. Destes, dois (20%) eram da raça Poodle, dois (20%) Weimaraner, e outros dois (20%) sem raça definida. Os quatro cães remanescentes distribuíram-se nas raças ShihTzu (1), São Bernardo (1), Fox Terrier (1) e Chow Chow (1).

Os cães doentes renais crônicos classificados no estágio 4 (DRC4) perfizeram três fêmeas (30%) e sete machos (70%), com idades variando entre dois e 16 anos, sendo 50% situado na faixa etária de nove a 16 anos. Sete cães (70%) não apresentaram definição racial e os demais eram das raças Poodle (2) e Labrador (1).

Na avaliação geral dos grupos observou-se que a maioria dos cães com DRC era macho (62%), entretanto, tal dado torna-se irrelevante, dito que não há predominância entre os gêneros sexuais na ocorrência da doença e estes, exercerem pequeno ou nenhum efeito sobre a concentração plasmática de creatinina nos cães (MATSUZAWA et al., 1993).

Quando avaliados em conjunto, verificou-se que os grupos de DRC eram compostos de cães, em sua maioria, acima dos sete anos de idade (69%), idade esta, referenciada por diversos autores como média do diagnóstico da doença para cães (POLZIN e OSBORN, 1995; POLZIN et al., 2004; LEES, 2004). Polzin et al. (2004) relataram que este dado tem se mantido estável desde os anos 80, e que embora cães de qualquer idade possam ser afetados, a prevalência de DRC aumenta com o aumento da idade, como verificado neste trabalho.

Os dados referentes ao substadiamento dos animais portadores de DRC encontram-se explicitados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Substadiamento dos cães do grupo de doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4) segundo a classificação da IRIS (IRIS, 2009).

<b>ESTÁDIO</b>	<b>SUBESTÁDIO RELACIONADO À PERDA URINÁRIA DE PROTEÍNA (UP/C)</b>	<b>SUBESTÁDIO RELACIONADO AO RISCO DE COMPLICAÇÕES DECORRENTES DE HIPERTENSÃO (PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA – MMHG)</b>
<b>DRC2</b>	Não Proteinúrico (0,12)	Alto risco (185)
	Proteinúria limítrofe (0,42)	Risco moderado (170)
	Proteinúria limítrofe (0,47)	Alto risco (180)
	Proteinúria limítrofe (0,30)	Baixo risco (150)
	Proteinúria limítrofe (0,51)	Risco moderado (160)
	Proteinúrico (1,28)	Risco moderado (175)
	Proteinúrico (2,00)	Risco moderado (170)
	Proteinúrico (1,10)	Alto risco (180)
	Proteinúrico (2,20)	Alto risco (190)
<b>DRC3</b>	Não proteinúrico (0,17)	Risco moderado (160)
	Não proteinúrico (0,16)	Risco moderado (175)
	Proteinúria limítrofe (0,45)	Alto risco (200)

	Proteinúria limítrofe (0,32)	Alto risco (200)
	Proteinúrico (0,77)	Risco mínimo (140)
	Proteinúrico (1,56)	Risco moderado (170)
	Proteinúrico (1,35)	Risco moderado (200)
	Proteinúrico (1,38)	Alto risco (180)
	Proteinúrico (3,96)	Alto risco (220)
	Proteinúrico (2,73)	Alto risco (230)
<b>DRC4</b>	Proteinúria limítrofe (0,43)	Alto risco (220)
	Proteinúrico (1,69)	Risco mínimo (140)
	Proteinúrico (0,92)	Risco moderado (170)
	Proteinúrico (0,76)	Alto risco (185)
	Proteinúrico (1,09)	Alto risco (210)
	Proteinúrico (1,88)	Alto risco (180)
	Proteinúrico (1,41)	Alto risco (220)
	Proteinúrico (2,61)	Alto risco (240)
	Proteinúrico (1,33)	Alto risco (180)
	Proteinúrico (2,15)	Alto risco (210)

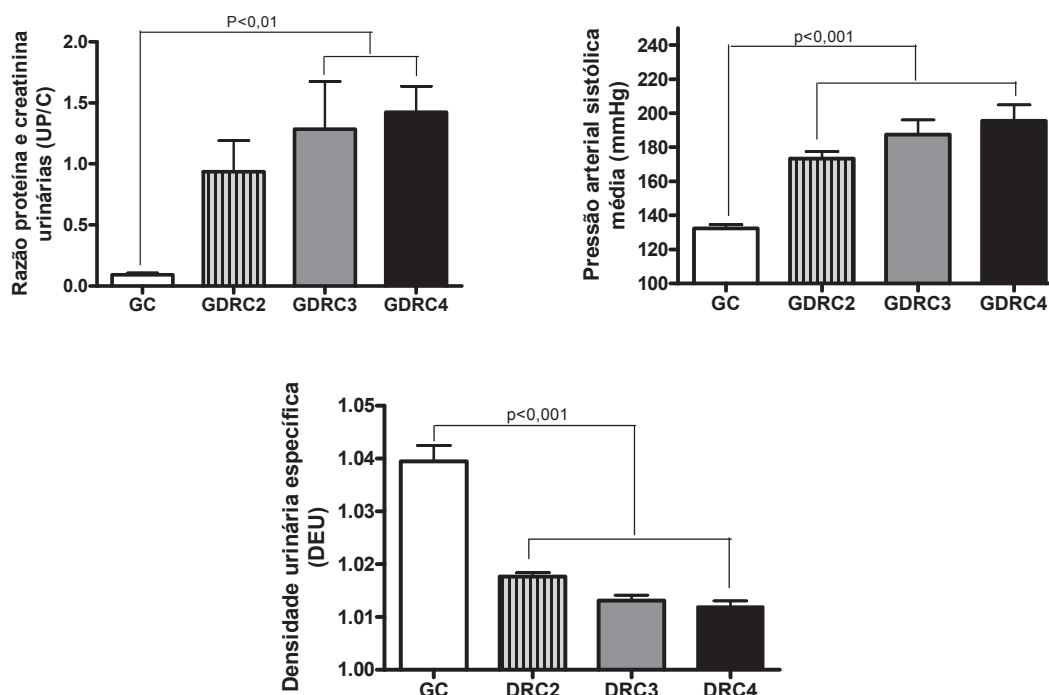
A sedimentoscopia urinária dos DRC revelou-se predominantemente inativa, apresentando apenas pequena quantidade de células epiteliais de transição. Não ocorreram hematuria nem leucocitúria significativa em nenhum animal.

Observou-se haver diferença significativa entre os grupos estudados no que concerne à densidade específica urinária (DEU), pressão arterial sistólica (PAS) e UP/C, conforme Tabela e Figura 4.

**Tabela 4.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da densidade específica urinária (DEU), razão proteína creatinina urinária (UP/C) e pressão arterial sistólica (PAS) dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	DEU	PAS (mmHg)	UP/C
<b>GC</b>	1,039 $\pm$ 0,003 (1,020-1,050)	132,3 $\pm$ 2,46 (120-140)	0,09 $\pm$ 0,01 (0,03-0,2)
<b>DRC2</b>	1,018 $\pm$ 0,0007 (1,015-1,021)	173,3 $\pm$ 4,17 (150-190)	0,93 $\pm$ 0,25 (0,12-2,22)
<b>DRC3</b>	1,013 $\pm$ 0,001 (1,009-1,017)	187,5 $\pm$ 8,73 (140-230)	1,28 $\pm$ 0,39 (0,16-3,96)
<b>DRC4</b>	1,012 $\pm$ 0,001 (1,008-1,019)	195,5 $\pm$ 9,32 (140-240)	1,42 $\pm$ 0,21 (0,43-2,61)





**Figura 4.** Razão proteína creatinina urinária (UP/C), densidade específica urinária (DEU) e Pressão arterial sistólica (PAS) dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

A densidade específica urinária dos DRC apresentou-se, conforme esperado, significativamente inferior à normalidade para a espécie canina (BUSH, 2004; POLZIN et al., 2004), e o fato de não haver diferença entre os estádios da DRC, demonstra que a DEU tem serventia para o diagnóstico da doença, mas não para caracterização de seus estádios.

Após cuidadosa análise do subestadiamento dos doentes renais crônicos, pode-se observar que a proteinúria esteve presente nos três estádios estudados, apresentando crescente prevalência com o avançar da doença, ocorrendo em 55,55%, 60% e 90% dos grupos DRC2, DRC3 e DRC4, respectivamente. Tais dados tornam-se relevantes levando-se em consideração que há evidências de que a filtração excessiva de proteínas, além de promover inflamação intersticial, induza apoptose das células

renais. Apesar da apoptose atuar de forma positiva na remodelação tecidual renal após lesão, também esta implicada na substituição de tecido funcional por tecido cicatricial na DRC (HUGHES, 2001). Assim, a proteinúria está associada à progressão das lesões renais que resultam em diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e estabelecimento de insuficiência renal (TRYGGVASON & PETTERSSON, 2003; GRAUER, 2005), aumentando o risco de crises urêmicas e de morte nos pacientes com DRC (JACOB et al., 2005).

De acordo com Polzin et al. (2007), a terapia para proteinúria nos cães azotêmicos deve ser instituída quando os valores de UP/C forem superiores a 0,5. Refletindo sobre isso, os dados aqui apresentados demonstram que mesmo os animais nos estádios precoces da DRC apresentam grandes chances de serem proteinúricos, e, portanto, a monitoração constante desta variável é de grande valia para o tratamento e controle da doença.

Dados de literatura dão conta de que cerca de 50 a 93% dos cães doentes renais crônicos apresentam hipertensão, e que, para não haver danos aos tecidos e órgãos, a pressão arterial sistólica (PAS), destes pacientes, deve ser mantida abaixo de 160 mmHg (POLZIN et al., 2004). Neste contexto, percebeu-se que os pacientes DRC, em sua maioria, possuem de moderado a alto risco de sofrerem complicações decorrentes da hipertensão arterial, visto que 88,9% dos DRC2 e 90% dos DRC3 e DRC4 apresentaram PAS superior ou igual à 160 mmHg. Saliencia-se que os próprios rins são susceptíveis à injúria hipertensiva, pois o mecanismo de proteção renal é pouco responsivo neste grupo de pacientes, e toda mudança na pressão acaba sendo transmitida diretamente para os rins (BURANAKARL et al., 2007), causando aumento da pressão glomerular e consequente glomeruloesclerose (LEES, 2004).

Na presença de tais resultados, considera-se apropriada a aferição da PAS, bem como a avaliação da UP/C, em todos os animais que apresentarem alteração nos níveis séricos de creatinina, pois, embora sejam variáveis que podem se manifestar individualmente, interferem no prognóstico. De acordo com pesquisas recentes, se manifestadas concomitantemente, causam rápida progressão e maior perda da massa renal, mesmo nos estádios iniciais da doença (POLZIN, 2011).

## Bioquímica sérica

Os valores de estatística descritiva das variáveis bioquímico-sélicas encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

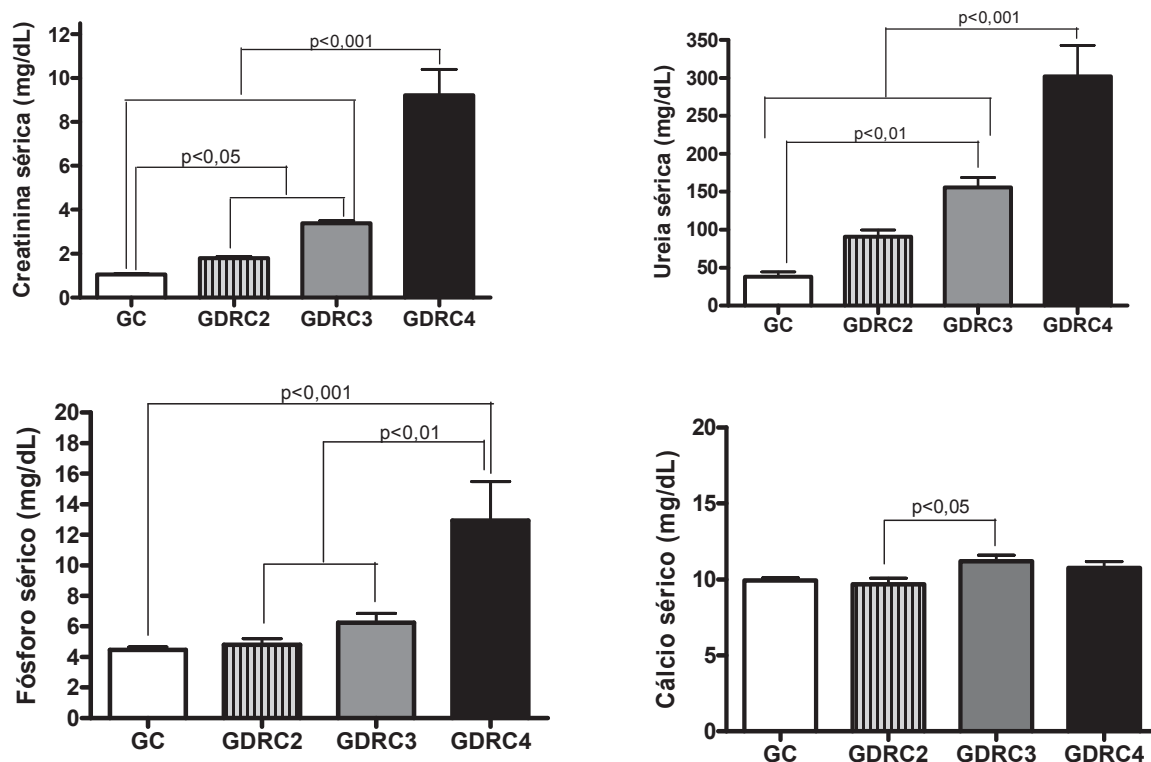
**Tabela 5.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da concentração de creatinina, ureia, fósforo e cálcio séricos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	CREATININA (mg/dL)	UREIA (mg/dL)	FÓSFORO (mg/dL)	CÁLCIO (mg/dL)
GC	1,04 $\pm$ 0,03 (0,92-1,21)	38,05 $\pm$ 6,21 (17,50-92,02)	4,46 $\pm$ 0,18 (3,70-5,40)	9,92 $\pm$ 0,18 (9,40-11,40)
DRC2	1,79 $\pm$ 0,07 (1,60-2,16)	90,91 $\pm$ 8,78 (41,56-127,3)	4,76 $\pm$ 0,41 (2,57-6,90)	9,67 $\pm$ 0,39 (8,70-12,10)
DRC3	3,37 $\pm$ 0,12 (2,78-4,05)	156,0 $\pm$ 12,59 (107,20-218,40)	6,23 $\pm$ 0,61 (4,30-11,00)	11,19 $\pm$ 0,41 (9,80-14,00)
DRC4	9,12 $\pm$ 1,18 (4,98-4,71)	302,1 $\pm$ 40,90 (158,20-546,60)	12,92 $\pm$ 2,56 (3,80-28,40)	10,75 $\pm$ 0,41 (7,90-12,10)

**Tabela 6.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da concentração de proteína total e albumina séricos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	PROTEÍNA TOTAL (mg/dL)	ALBUMINA (mg/dL)
GC	7,252 $\pm$ 0,16 (6,6-8,2)	3,118 $\pm$ 0,13 (2,6-4,2)
DRC2	7,522 $\pm$ 0,83 (5,8-13,7)	2,279 $\pm$ 0,09 (1,8-2,7)
DRC3	6,357 $\pm$ 0,18 (5,6-7,4)	2,540 $\pm$ 0,15 (1,9-3,2)
DRC4	6,285 $\pm$ 0,27 (4,2-7,5)	2,598 $\pm$ 0,12 (2,0-3,3)

A obtenção, interpretação e cotejamento das variáveis bioquímico-sélicas pertinentes à função renal, permitiram verificar diferenças significativas entre os grupos estudados no que diz respeito à creatinina, uréia, cálcio e fósforo (Figura 5). Por outro lado, apesar de não ter havido diferenças significativas com relação às concentrações sélicas de proteína total ( $p=0,107$ ), verificou-se significativa redução da concentração de albumina nos animais DRC2 ( $p<0,001$ ), DRC3 e DRC4 ( $p<0,05$ ) quando comparada àquela dos animais controle.



**Figura 5.** Concentrações séricas de creatinina, ureia, fósforo e cálcio dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

A análise das variáveis bioquímico-séricas, permitiu constatar aumentos gradativos e significativos de creatinina, ureia e fósforo séricos, acompanhados de redução significativa nas concentrações de albumina com a progressão da doença.

Cem por cento e 96,55% dos cães do grupo DRC apresentaram aumentos de creatinina e ureia séricas, respectivamente. Observou-se que a azotemia apresentou elevações crescentes e superiores a normalidade desde o estágio 2, e, portanto, tal parâmetro continua sendo considerado importante marcador de lesão renal, e indispensável no diagnóstico e estadiamento da DRC (POLZIN & OSBORN, 1995).

A análise do fósforo sérico nos permitiu apurar que 48,27% dos DRC apresentaram hiperfosfatemia ( $> 6,2$  mg/dL), sendo 11,11% (1) do grupo DRC2, 60% (6) do DRC3 e 70% (7) do DRC4. Estudos anteriores de cães doentes renais crônicos azotêmicos reportaram a prevalência da hiperfosfatemia de 60,9% (SCHENCK & CHEW, 2003), 92 % (KOGIKA et al., 2006) e 94,9% (GERBER et al., 2003). Todavia, existe uma grande dificuldade nas comparações destes resultados devido a grande heterogeneidade das populações estudadas. Em contrapartida, apesar das populações estudadas por Cortadellas et al. (2009) serem portadoras de Leishmaniose Visceral Canina, verificou-se grande semelhança com os resultados aqui encontrados, visto tais autores terem identificado 44,2% de caninos doentes renais crônicos hiperfosfatêmicos.

Diferentemente da azotemia, a hiperfosfatemia foi identificada a partir do estágio 3 da DRC. Devido os rins serem a rota primária da excreção de fósforo, o declínio de suas funções resulta na retenção deste íon e na manifestação de suas complicações. Nos pacientes DRC estágio 1 e 2, as concentrações de fósforo geralmente são mantidas dentro do intervalo de normalidade, pois os néfrons remanescentes são capazes de aumentar a fosfatúria, através da redução da reabsorção do fósforo. Considera-se, portanto, que os pacientes em estágio 3, por apresentarem maior comprometimento das funções renais, não são capazes de evitar a hiperfosfatemia (POLZIN, 2011).

Apesar do estágio mais precoce avaliado neste estudo não ter apresentado hiperfosfatemia significativa, os cuidados e monitoramento do fósforo devem ser mantidos constantemente, pois a ativação do mecanismo compensatório de hiperfosfatúria decorre do aumento da liberação de paratormônio sérico (PTH) já nos estágios iniciais da doença e determinam a ocorrência do hiperparatireoidismo secundário renal (ROMÃO JUNIOR et al., 2004; CORTADELLAS et al., 2009; POLZIN, 2011).

O excesso de paratormônio sérico (PTH), considerado atualmente como a principal toxina urêmica (POLZIN, 2011), pode conduzir a graves alterações sistêmicas, incluindo osteodistrofia renal (CHEW & DIBARTOLA, 1992), calcificações de tecidos

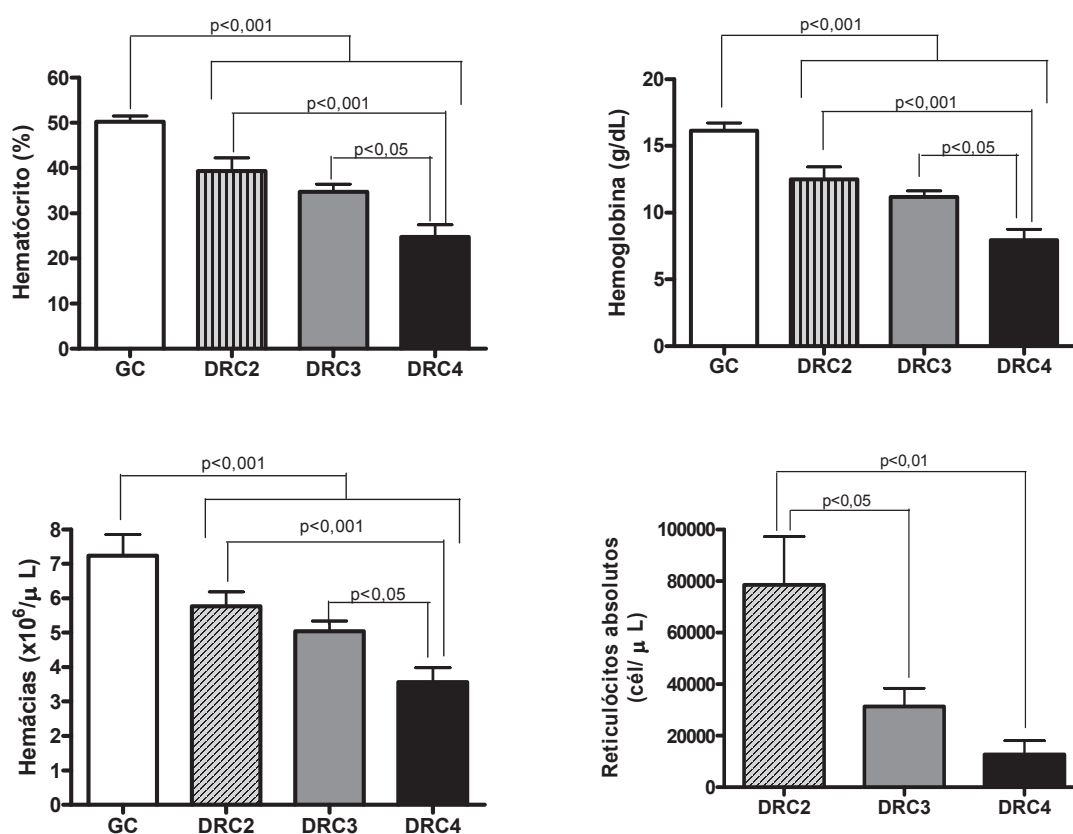
moles, anemia, hemorragias, intolerância a glicose, prurido, hiperlipidemia, entre outras (MASSRY & GOLDSTEIN, 1979). Perante tais complicações, e do fato de apenas um animal do DRC2 ter apresentado a concentração de fósforo dentro do limite de normalidade, especula-se sobre a necessidade de serem mantidas abaixo de 4,5 mg/dL as concentrações de fósforo séricas já no estágio 2 da DRC (ELLIOTT, 2006; CORTADELLAS et al., 2009; POLZIN, 2011).

A hipercalcemia foi verificada em 31% dos cães com DRC, ocorrendo em 22,22%, 30% e 40% dos animais dos grupos DRC2, DRC3 e DRC4, respectivamente. Somente um cão do DRC2 (11,11%) e um do DRC4 (10%) apresentaram concentração sérica de cálcio total abaixo do valor de normalidade. Apesar das médias do estágio 2 e 3 terem diferido significativamente, tais dados devem ser analisados com muito cuidado, pois não foram mensuradas as concentrações de cálcio ionizado, parte do cálcio total que deve ser utilizada para confirmação da hipercalcemia (CORTADELLAS et al., 2009; POLZIN, 2011).

Embora tenha sido mantida dentro do intervalo considerado normal para a espécie canina, observou-se redução significativa da concentração de albumina nos doentes renais crônicos. Reconhece-se que a desnutrição é a maior causa de morbidade e mortalidade em cães com DRC nos estágios 3 e 4, pois com o progredir da doença, há comprometimento gradativo da condição corporal e do peso, disorexia, anorexia e perda da qualidade de vida como reflexos da uremia (ELLIOTT, 2006; POLZIN, 2011).

## Eritrograma

Após a realização das avaliações das variáveis eritrocitárias, verificou-se haver diferença significativa entre os grupos estudados no que concerne ao hematócrito, taxa de hemoglobina, contagem global de hemácias e contagem absoluta de reticulócitos, o que pode ser visibilizado na Figura 6. Os valores de volume corpuscular médio (VCM) ( $p=0,53$ ) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $p=0,76$ ) não variaram entre os grupos.



**Figura 6.** Valores de hematócrito, taxa de hemoglobina, contagem global de hemácias e contagem absoluta de reticulócitos dos animais do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

Os valores de estatística descritiva das variáveis acima citadas podem ser visibilizadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) do hematócrito, hemácias, hemoglobina e reticulócitos dos cães do grupo controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	HEMATÓCRITO (%)	HEMÁCIAS ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	HEMOGLOBINA (mg/dL)	RETICULÓCITOS (cél/s/ $\mu\text{L}$ )
GC	50,25 $\pm$ 1,26 (43,30 - 59,10)	7,23 $\pm$ 0,18 (6,29 - 8,52)	16,14 $\pm$ 0,56 (13,20 - 20,00)	-
DRC2	39,33 $\pm$ 2,94 (26,10 - 53,60)	5,77 $\pm$ 0,41 (4,01 - 7,87)	12,51 $\pm$ 0,92 (8,40 - 16,60)	78.555 $\pm$ 18.738 (16.794 - 168.877)
DRC3	34,7 $\pm$ 1,77 (27,00 - 45,00)	5,04 $\pm$ 0,30 (3,61 - 6,92)	11,17 $\pm$ 0,47 (8,60 - 13,90)	31.375 $\pm$ 7.063 (1.607 - 84.058)
DRC4	24,79 $\pm$ 2,69 (9,20 - 37,1)	3,56 $\pm$ 0,42 (1,25 - 5,95)	7,95 $\pm$ 0,81 (3,20 - 11,60)	12.763 $\pm$ 5.361 (256 - 56.971)

Assim como descrito na literatura, a avaliação das médias obtidas para hematócrito, hemácias e hemoglobina, permitiu constatar a ocorrência de anemia nos cães doentes renais crônicos estágio 3 (70%) e 4 (100%) (POLZIN & OSBORN, 1995; POLZIN, 2011). Além disso, foi possível constatar que quanto mais avançado o estágio da doença, mais severa a anemia apresentada.

Deve ser relatado que três cães do estágio 2 (33,33%) também apresentavam anemia e as médias eritrocitárias do grupo aproximaram-se dos valores inferiores de normalidade e, portanto, ressalta-se a necessidade da avaliação pormenorizada das variáveis eritrocitárias em qualquer estágio da doença, visto a anemia da DRC ser habitualmente assintomática e de instalação lenta, permitindo a adaptação do paciente aos níveis decrescentes de hemoglobina, muitas vezes sem uma adequada intervenção. O diagnóstico preciso e a abordagem terapêutica precoce são cruciais para que os conhecidos efeitos deletérios da anemia sobre os sistemas cardiovascular e nervoso e, talvez, sobre a progressão da doença renal, possam ser prevenidos (RIBEIRO-ALVES & GORDAN, 2007).

De outra parte, os índices eritrométricos VCM e CHCM apresentaram-se dentro da estreita faixa de normalidade reportada por autores universalmente reconhecidos,



reforçando o quadro de anemia normocítica normocrômica habitualmente encontrado em doentes renais crônicos (POLZIN & OSBORNE, 1995; POLZIN et al., 2004; RIBEIRO-ALVES & GORDAN, 2006, POLZIN, 2011).

Na avaliação individual de cada estágio da doença, houve prevalência de anemia normocítica normocrômica, verificando-se a ocorrência de anemia normocítica hipocrômica em um (11,11%) cão do grupo DRC2 e outros dois (20%) cães dos DRC3 e DRC4. A anemia normocítica normocrômica da DRC é atribuída, parcialmente, a um déficit relativo de eritropoietina em decorrência das perdas de tecido funcional renal, porém, a ocorrência de anemias hipocrômicas pode ser justificada pelo fato do quadro anêmico ser agravado pelos sangramentos decorrentes da síndrome urêmica e pela deficiência de ferro, derivada da ingestão inadequada e/ou absorção prejudicada deste íon no intestino destes pacientes (CARVALHO et al., 2006, RIBEIRO-ALVES & GORDAN, 2006).

No que concerne à resposta eritropoiética medular, pôde-se observar que a contagem absoluta de reticulócitos obtida para os DRC2 alcançou níveis suficientes à caracterização de um estado regenerativo, enquanto que os animais DRC3 e DRC4 cursaram um quadro de anemia não regenerativa, com valores inferiores a 60.000 reticulócitos/  $\mu$ L de sangue (JAIN, 1993; BUSH, 2004; THRALL et al., 2004). Enfatiza-se que nenhum cão do DRC4 e que apenas um cão do DRC3 apresentou anemia do tipo regenerativa.

A anemia não regenerativa, também dita hipoproliferativa, enfaticamente descrita nos doentes renais crônicos, resulta da combinação entre diminuição na produção de eritropoietina, redução do tempo de vida das hemácias, perda de sangue pelo trato gastrointestinal e dos efeitos das toxinas urêmicas, como o PTH, sobre a eritropoiese (MACDOUGALL, 2001). O momento exato em que estes fatores atuam isoladamente ou em conjunto não está bem estabelecido, entretanto, os resultados aqui obtidos permitem cogitar a hipótese de que nem todos os fatores envolvidos na gênese da anemia da DRC já estão atuantes no estágio 2.

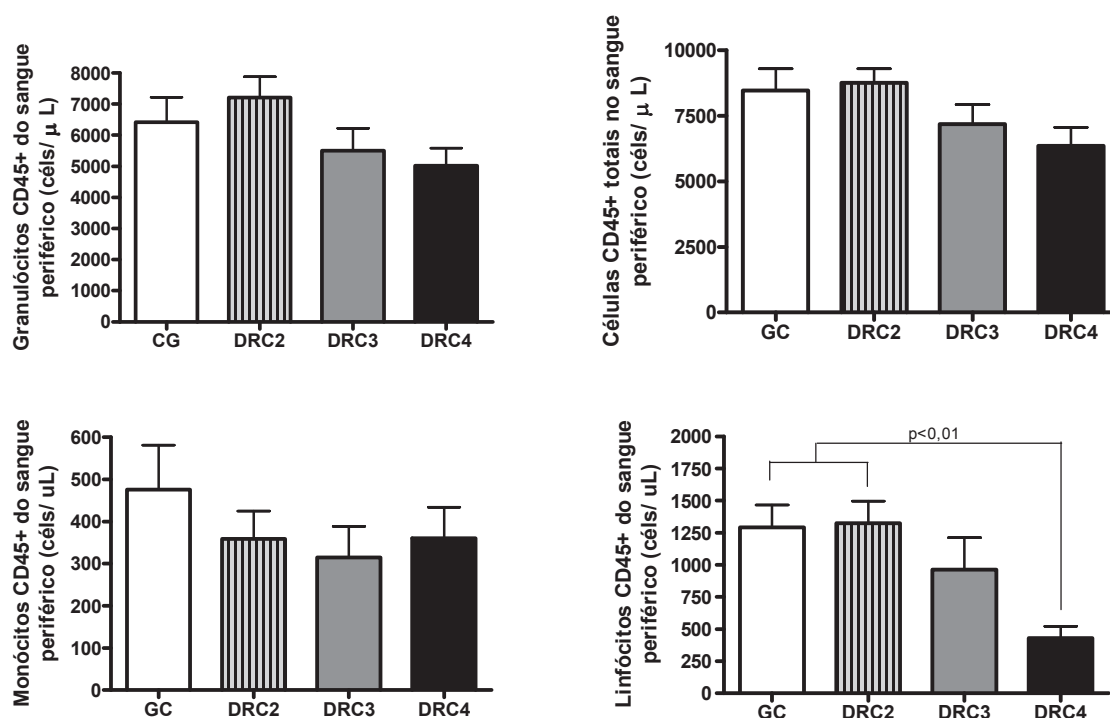
### Quantificação das células CD45<sup>+</sup> totais e subpopulações leucocitárias no sangue periférico

Os valores de estatística descritiva das quantificações imunofenotípicas das células CD45<sup>+</sup> e subpopulações leucocitárias encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> no sangue periférico dos cães controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	CD45 <sup>+</sup> TOTAIS (cél/s/ $\mu$ L)	MONÓCITOS CD45 <sup>+</sup> (cél/s/ $\mu$ L)	GRANULÓCITOS CD45 <sup>+</sup> (cél/s/ $\mu$ L)	LINFÓCITOS CD45 <sup>+</sup> (cél/s/ $\mu$ L)
GC	7.749 $\pm$ 833,5 (5.904 – 13.262)	367,0 $\pm$ 105,3 (192,0 – 1.020)	5.365 $\pm$ 803,3 (4.086 – 10.503)	1.293 $\pm$ 173,7 (624,0 – 2.192)
DRC2	8.786 $\pm$ 540,6 (6.732 – 13.882)	346,0 $\pm$ 66,16 (107,0 – 715,0)	7.105 $\pm$ 656,0 (4.481 – 1.1765)	1.325 $\pm$ 172,2 (650,0 – 2.144)
DRC3	7.987 $\pm$ 735,2 (2.762 – 11.085)	226,0 $\pm$ 74,25 (39,00 – 730,0)	5.594 $\pm$ 719,7 (2.124 – 8.680)	963,4 $\pm$ 249,0 (133,0 – 1.965)
DRC4	6.613 $\pm$ 704,9 (2.511 – 8.840)	392,0 $\pm$ 73,55 (64,00 – 728,0)	5.031 $\pm$ 564,7 (2.117 – 7.108)	428,7 $\pm$ 93,52 (134,0 – 931,0)

Relativamente à quantificação total de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico não foram verificadas diferenças significativas entre animais controle e doentes renais crônicos, distribuídos nos três subestádios ( $p=0,09$ ), assim como monócitos ( $p=0,54$ ) e granulócitos ( $p=0,13$ ) CD45<sup>+</sup>. Entretanto, verificou-se redução significativa dos linfócitos CD45<sup>+</sup> no grupo DRC4 (Figura 7).



**Figura 7.** Quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> no sangue dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

Quando foram obtidos e analisados estatisticamente os resultados parciais deste trabalho, já havia sido constatado não haver leucopenia em nenhum estágio da DRC (BORIN et al., 2010a) e cogitado a tendência a linfopenia nos cães severamente azotêmicos (BORIN et al., 2010b). Assim como suspeitava-se, a linfopenia dos DRC4 foi concretizada com a integralização do número das parcelas experimentais.

Na década de 50, Jenson (1958) e Riis & Stougaard (1959) sugeriram, segundo revisão feita por Nakhla & Goggin (1973), haver um desequilíbrio na resposta imunológica de humanos doentes renais crônicos, manifestada principalmente por deficiência na contagem absoluta de linfócitos circulantes. Cerca de 10 anos após tais suposições, pesquisadores demonstraram que o plasma de humanos doentes renais crônicos possui fatores inibitórios da transformação de linfócitos *in vitro* (NAKHLA & GOGGIN, 1973).

Desde então, muito já se estudou a respeito das alterações nas subpopulações leucocitárias decorrentes da doença renal crônica em humanos, o que recentemente tem sido realizado por intermédio da citometria de fluxo. Resultados revelam baixa resposta imunológica associada à significativa redução no número de linfócitos circulantes nos estágios mais avançados da doença, alguns autores destacando a redução e alterações funcionais dos linfócitos B (SMOGORZEWSKI & MASSRY, 2001; BOUTS et al., 2004; PAHL et al., 2010) e de linfócitos T (NAIRN et al., 2005).

Bouts et al. (2004) concluíram que crianças com DRC pré-dialítica apresentavam baixa resposta imunológica em decorrência da quantidade insuficiente de linfócitos B, imunofenotipicamente identificados (CD45<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>).

De forma semelhante à concepção deste trabalho, as subpopulações leucocitárias de caninos doentes renais crônicos também foram avaliadas através de imunofenotipagem. Corroborando os resultados aqui descritos, Kralova et al. (2010) apontaram não haver diferença significativa na contagem total de leucócitos, monócitos e granulócitos, porém marcante linfopenia no estágio final da doença. Cabe ressaltar que, embora tais autores não tenham utilizado a classificação segundo a IRIS (2009), o cotejamento dos resultados foi possível, pois no estadiamento utilizado, os animais que apresentaram linfopenia, eram detentores de valores médios de creatinina sérica superiores a 10,99.

## **Mielograma**

Na maioria dos casos, aspirados medulares são suficientes para avaliação da resposta medular frente à doenças e terapias. A realização de biopsia de medula óssea é desejável em algumas situações, especialmente quando se faz necessária informações sobre topografia, celularidade absoluta e distribuição relativa das células hematopoiéticas. Entretanto, a biopsia de MO requer anestesia geral por ser um procedimento invasivo, sendo oportuno ressaltar que, os cães com DRC são considerados ASA 4 pela *American Society of Anaesthesiologists*, ou seja, pacientes

com alteração sistêmica grave que representa risco à vida e mortalidade perioperatória ao redor de 7,8 a 23%, o que desaconselha a realização de anestesia geral (FLEISHER, 2005). Diante de tais ponderações, considera-se, o mielograma uma ferramenta útil na avaliação da celularidade medular dos pacientes com DRC.

Subjetivamente, os mielogramas dos animais controle apresentaram-se com padrão de hipocelularidade leve (88,88%) a normocelular (22,22%) e quantidade de gordura considerada normal em 88,88%. Quanto às mesmas análises dos animais do grupo DRC, pode-se observar que houve predomínio de medulas hipocelulares em todos os grupos, sendo 88,88% nos DRC2, 60% nos DRC3 e 100% nos DRC4. Destaca-se que embora a quantidade de cães do DRC3 que apresentaram hipocelularidade foi inferior àquela dos DRC2 e DRC4, estas se apresentavam predominantemente acentuadas, enquanto as do DRC2 eram leves e as do DRC4, severas.

A ocorrência de predominante hipocelularidade do tipo leve nos cães do grupo controle, enfatiza a necessidade e a importância deste grupo ter sido composto por animais idosos. Sendo assim, conjectura-se que parte da hipocelularidade apresentada pelos cães com DRC apresenta alto índice de derivarem do processo natural do envelhecimento (SANTANA, 2000).

Sendo a celularidade medular normal geralmente composta de 50% de adipócitos e 50% de células hematopoéticas e outras (YAWATA, 1998; THRALL et al., 2004), verificou-se que a quantidade adipócitos apresentou-se predominantemente normal nos DRC2 (55,55%), variável nos DRC3 (40% aumentada e 40% reduzida) e reduzida nos DRC4 (60%).

Com referência à contagem de megacariócitos, observou-se não haver diferença significativa entre os grupos analisados ( $p=0,096$ ), apesar do estágio 4 ter apresentado forte tendência a hipoplasia megacariocítica. Em verdade, vale reafirmar, que a média de megacariócitos encontrada nos animais do grupo controle apresentou-se em concordância às referidas por Santana (2000) e Sobreira (2003), os quais avaliaram o eixo megacariocítico-plaquetário canino, prévia e posteriormente, à administração de sulfato de vincristina (Tabela 9).

Diante do fato da interpretação da atividade megacariocitopoiética ser possível somente à luz do quadro plaquetário verificado no sangue periférico (THRALL et al., 2004), tal variável hematológica foi avaliada nos grupos estudados, resultando em trombocitemia significativa no grupo DRC2 ( $p < 0,05$ ) quando comparada às contagens, consideradas normais, dos grupos DRC3 e DRC4.

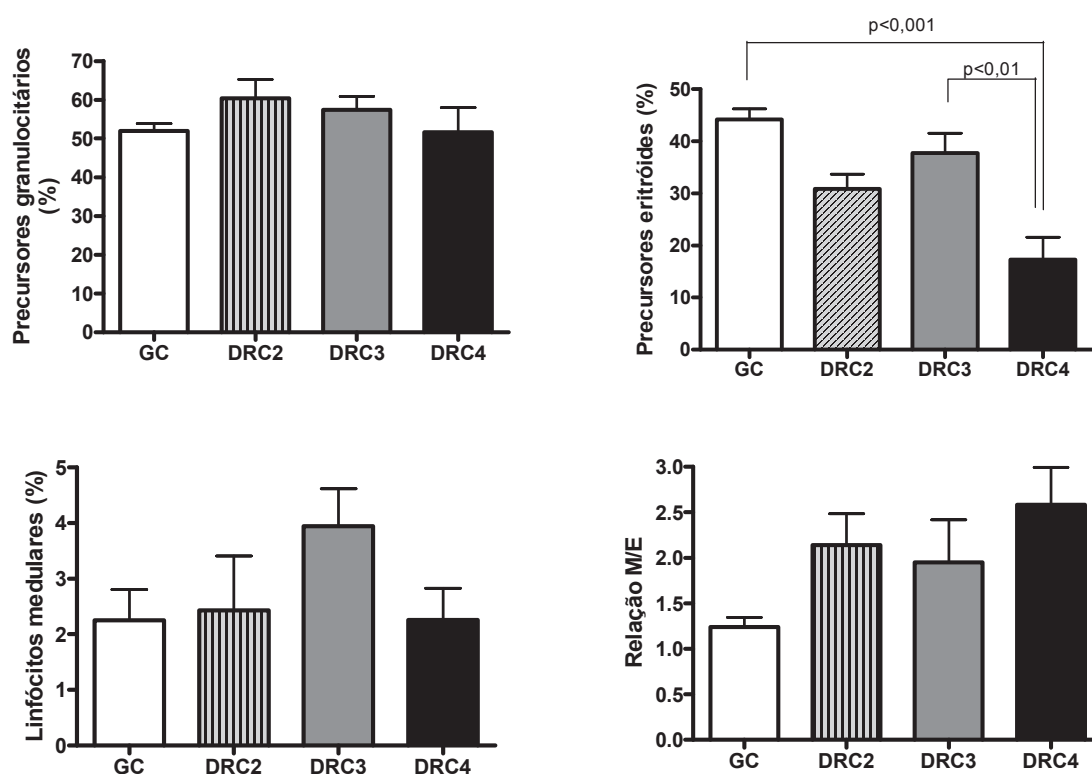
De acordo com Riesman (1907), Morgagni, no início do século XVIII, descreveu uma mulher que apresentava hálito urêmico, hematoquesia e epistaxe. Desde então, inúmeros estudos buscam associar a uremia à tendência hemorrágica de pacientes doentes renais crônicos e agudos. Em 1956, Larrain & Adelson verificaram, em concordância com os achados do presente estudo, que poucos casos apresentavam trombopenia associada à hemorragia, em pacientes com uremia. Enfim, com o progredir das pesquisas, constatou-se que grande parte das ocorrências hemorrágicas dos DRC deve-se, em parte, a trombopatia urêmica, um defeito hemostático primário (REBELINK et al., 1994), que agregada à resposta vascular inflamatória, resultam em complicações trombóticas associadas às significantes morbidade e mortalidade (LIBBY et al., 2002).

Grindem et al. (2009) destacam que os roteiros para estimar o número de megacariócitos são muito variáveis. Entretanto, respeitados hematologistas veterinários consideram menos de três ou cinco megacariócitos por lâmina sugestivo de hipoplasia megacariocítica (JAIN, 1993; TRALL et al., 2004; GRINDEM et al., 2009). Levando-se esses dados em consideração, cogita-se a possibilidade de que a tendência à hipoplasia megacariocítica encontrada nos cães do estágio 4 da DRC, deva-se, em parte, à exaustão da medula óssea frente ao constante estímulo decorrente da tendência hemorrágica apresentada por este grupo de pacientes (MEZZANO et al., 1997).

No que concerne aos dados referentes às quantificações das células hematopoiéticas, observou-se haver diferença significativa entre as porcentagens de precursores da série eritróide dos grupos de DRC. Ademais, que não houve diferenças significativas entre as porcentagens de precursores da série granulocítica ( $p=0,43$ ), linfócitos medulares ( $p=0,26$ ) e relação M/E ( $p=0,08$ ) (Tabela 9, Figura 8).

**Tabela 9.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) das porcentagens das séries granulocítica e eritróide, linfócitos, megacariócitos, bem como da relação mielóide eritróide (M/E) dos cães doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	SÉRIE GRANULOCÍTICA (%)	SÉRIE ERITRÓIDE (%)	LINFÓCITOS (%)	MEGACARIÓCITOS (Céls/esfregaço)	RELAÇÃO M/E
GC	51,90 $\pm$ 1,90 (43,27-62,99)	44,20 $\pm$ 2,02 (4,36-17,67)	2,25 $\pm$ 0,56 (0,00-5,61)	169,0 $\pm$ 53,10 (35-570)	1,24 $\pm$ 0,10 (0,78-1,95)
DRC2	60,41 $\pm$ 4,82 (81,07-29,72)	30,85 $\pm$ 2,89 (17,67-44,36)	2,47 $\pm$ 0,98 (0,31-9,26)	101,6 $\pm$ 25,52 (30-250)	2,14 $\pm$ 0,34 (1,17-4,59)
DRC3	57,40 $\pm$ 3,48 (36,60-78,30)	37,74 $\pm$ 3,84 (13,20-57,93)	3,94 $\pm$ 0,68 (1,08-7,92)	138,4 $\pm$ 42,43 (1-409)	1,94 $\pm$ 0,47 (0,93-5,96)
DRC4	51,58 $\pm$ 6,45 (29,33-95,63)	17,33 $\pm$ 4,26 (0,87-41,89)	2,26 $\pm$ 0,57 (0,00-5,00)	36,7 $\pm$ 11,11 (3-108)	2,58 $\pm$ 0,41 (1,32-5,00)



**Figura 8.** Porcentagem dos precursores granulocitários e eritróides, linfócitos medulares, e relação mielóide eritróide (M/E) dos cães doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011. (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

Considera-se a avaliação da medula óssea uma parte imprescindível neste trabalho, diante da importância em se avaliar um determinado quadro patológico como

um todo (YAWATA, 1998) e das controvérsias bibliográficas referentes à gênese da hipoplasia sanguínea na DRC.

O estado de uremia é capaz de inibir a eritropoiese *in vitro*, entretanto, o exato mecanismo desses efeitos ainda se mantém obscuros. Diversos fatores têm sido propostos, e dentre eles se destaca a ação do PTH, das citocinas inflamatórias e das poliaminas, além é claro, da deficiência da produção da eritropoietina (MACDOLGALL, 2001). Esta última, além de estimular a produção de pró-eritroblastos a partir das células tronco hematopoiéticas, é capaz de aumentar a velocidade de divisão e maturação dos diversos estádios eritroblásticos em relação ao processo normal (ERSLEV & BESARAB, 1997). Perante tais informações, o achado significativo de hipoplasia da série eritróide no estágio 4 da DRC constituiu-se importante ferramenta para avaliação da causa da anemia destes pacientes. Sendo assim, considera-se que o quadro de hipoplasia sanguínea em doentes renais crônicos decorra de uma ação sinérgica entre as toxinas urêmicas e inibição da eritropoiese, *in vivo*.

O aumento da relação mielóide eritróide (M/E) é, geralmente, um indicativo de hiperplasia mielóide, hipoplasia eritróide, ou ambas (THRALL et al., 2004). Apesar da relação M/E não ter se apresentado significativamente diferente nos três estádios da doença, pode-se observar forte tendência ao seu aumento no grupo DRC4, decorrente de hipoplasia eritróide. Isso fica claramente explicitado quando se analisam as parcelas experimentais individualmente dentro dos grupos. Noventa por cento dos animais do DRC4 apresentaram aumento da relação M/E decorrente de hipoplasia da série eritróide, contra aproximadamente 30% dos DRC3 e DRC2.

Hipoplasia da série eritróide na doença renal crônica canina foi constatada por Jain (1993) e Randolph et al., (2004), ao verificarem relação M/E de 6,89:1 e entre 1,90:1 e 19,0:1, respectivamente, em suas parcelas experimentais. Infelizmente, o delineamento experimental utilizado por tais autores não cotejaram os diferentes estádios da doença, impossibilitando a comparação entre as populações hematopoéticas, distintamente.

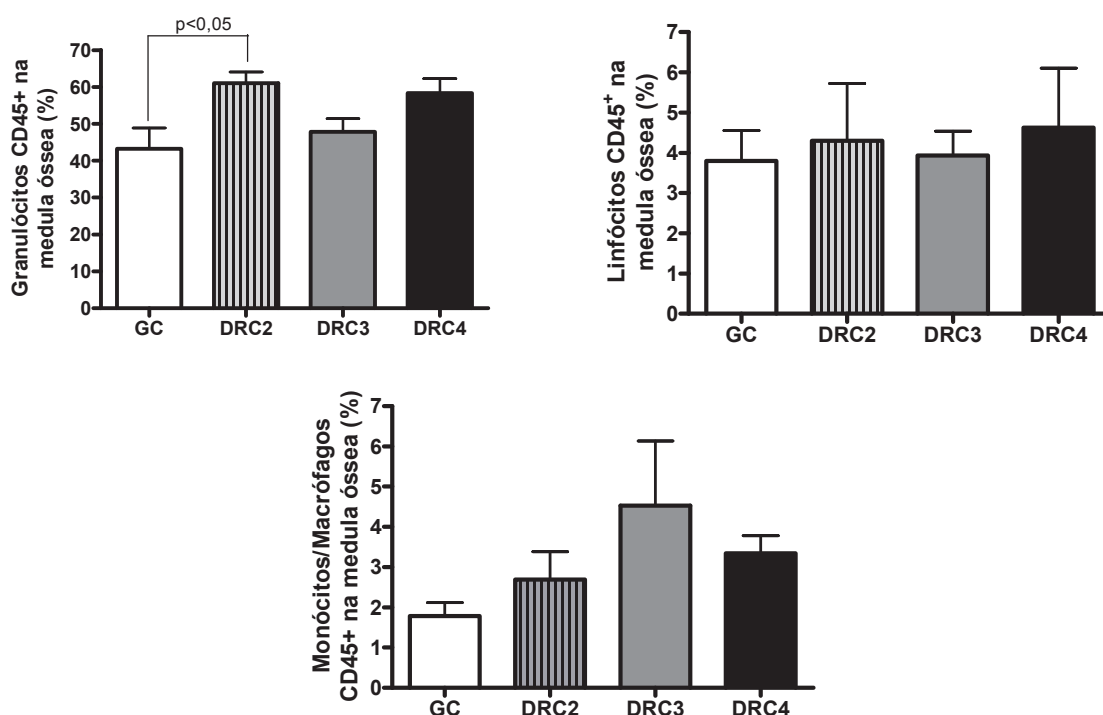
Esse mesmo tipo de análise permitiu averiguar que o aumento da relação M/E nos DRC2 deveu-se, principalmente, a hiperplasia granulocítica associada à leve



hipoplasia eritróide (55,55%). Esse resultado corrobora os achados de reticulocitemia deste grupo, por elucidar que este estágio, por não apresentar comprometimento severo da eritropoiese, ainda mantém resposta medular regenerativa diante do quadro inicial de anemia.

### Quantificação das populações de granulócitos, monócitos/macrófagos e linfócitos CD45<sup>+</sup> na medula óssea

Relativamente à quantificação de células CD45<sup>+</sup> da medula óssea, verificou-se que não houve diferença significativa entre as porcentagens de monócitos/macrófagos ( $p=0,161$ ) e linfócitos CD45<sup>+</sup> ( $p=0,952$ ) dos animais do grupo controle e DRC. Os granulócitos diferiram entre os animais do GC e do DRC2 (Figura 9, Tabela 10).



**Figura 9.** Porcentagem de granulócitos; monócitos/macrófagos e linfócitos CD45<sup>+</sup> na medula óssea dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). (One-way ANOVA e Teste de Tukey para variáveis paramétricas, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

**Tabela 10.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos/macrófagos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> na medula óssea dos cães controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). Jaboticabal, 2011.

GRUPOS	MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS CD45 <sup>+</sup> (%)	GRANULÓCITOS CD45 <sup>+</sup> (%)	LINFÓCITOS CD45 <sup>+</sup> (%)
GC	1,79 $\pm$ 0,33 (0,50-3,10)	43,28 $\pm$ 5,59 (14,50-70,40)	3,80 $\pm$ 0,75 (1,30-9,70)
DRC2	2,69 $\pm$ 0,70 (0,60-6,60)	60,98 $\pm$ 3,02 (45,40-72,70)	4,30 $\pm$ 1,42 (0,60-15)
DRC3	4,52 $\pm$ 1,61 (1,20-16,60)	47,81 $\pm$ 3,58 (30,80-60,50)	3,93 $\pm$ 0,60 (1,90-6,80)
DRC4	3,34 $\pm$ 0,43 (1,50-5,50)	58,34 $\pm$ 3,84 (38,70-80,80)	4,63 $\pm$ 1,47 (1,00-16,70)

A análise bidimensional da expressão do antígeno CD45 considerando o tamanho e granularidade celulares (FSC vs. SSC) tem sido utilizada para determinar contagens celulares diferenciais de medula óssea através da citometria de fluxo em cães. Após aquisição em escala logarítmica, os *gates* foram capazes de identificar granulócitos, mieloblastos, linfócitos, monócitos/macrófagos e precursores eritróides nucleados da mesma forma que a técnica de contagem manual (WEISS, 2004b). No presente experimento, identificaram-se pela técnica de citometria, apenas as populações de linfócitos, granulócitos e monócitos/macrófagos, devido a forma como foi realizada a aquisição das amostras.

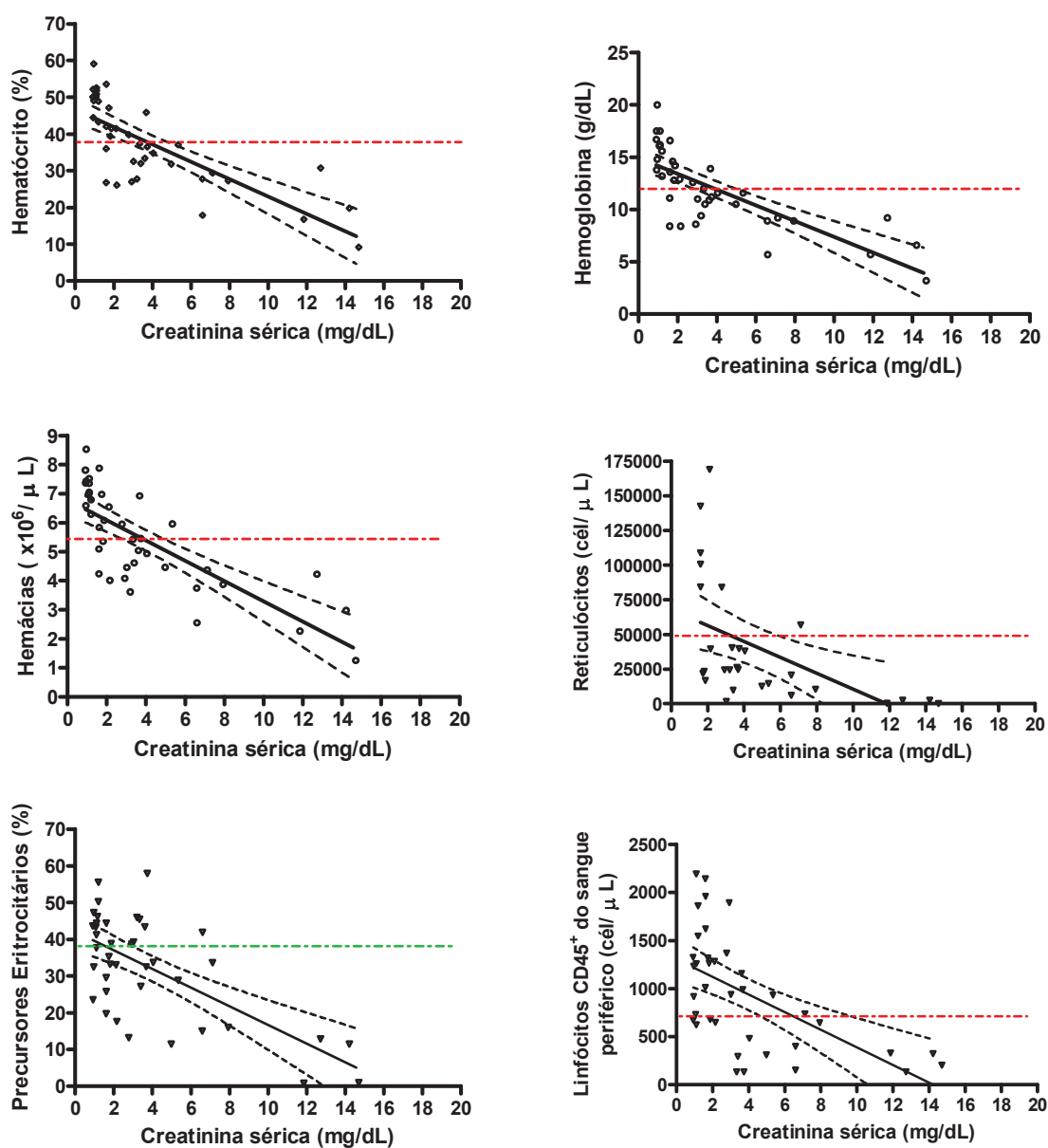
A comparação entre os dados do mielograma e as populações identificadas pela citometria permite supor que, a imunofenotipagem com o anticorpo CD45 superestimou as populações de linfócitos e monócitos/macrófagos. As explicações para tais ocorrências residem, muito provavelmente, em três principais pontos; na forma de aquisição, na morfologia das células hematopoiéticas e na inespecificidade do anticorpo CD45.

De acordo com Grindem et al. (2009), os pequenos linfócitos podem ser facilmente confundidos com eritrócitos nucleados, e os promonócitos são morfologicamente semelhantes aos mielócitos e metamielócitos neutrofílicos.

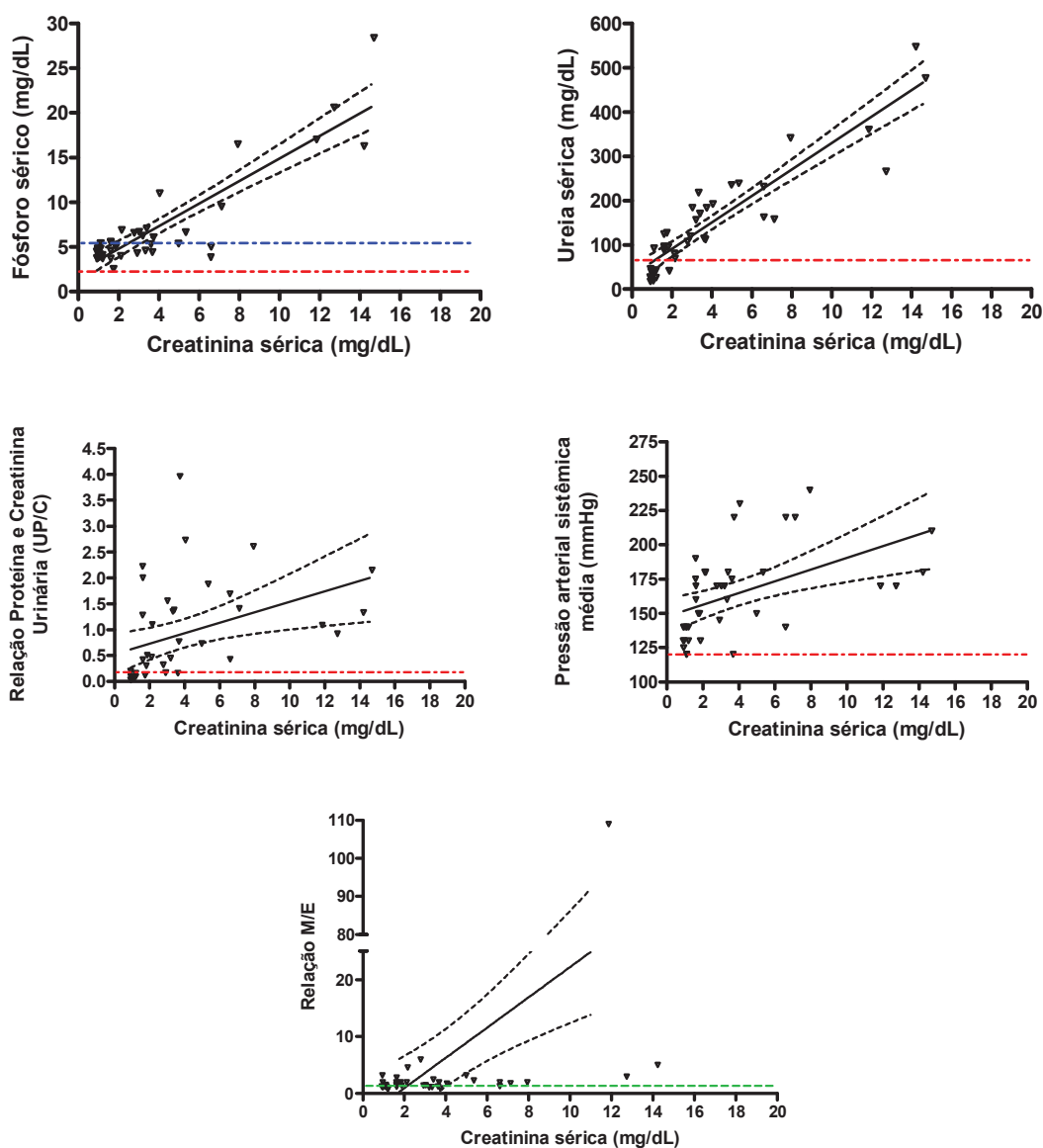
Associando-se as semelhanças morfológicas ao fato do CD45 estar presente na membrana celular tanto de precursores granulocitários quanto eritróides nucleados pressupõe-se que, o *gate* de linfócitos acaba incluindo alguns precursores eritróides, bem como o *gate* de monócitos/macrófagos inclui também precursores neutrofílicos primitivos. Considera-se ainda que a aquisição linear não propiciou a ampliação da escala da mesma forma que a aquisição logarítmica, utilizada por WEISS (2004b), o que, por conseguinte, inviabilizou a quantificação dos precursores eritróides e auxiliou na superestimação das populações de linfócitos e monócitos/macrófagos.

### **Correlação do nível de creatinina sérica com outras variáveis**

Sendo o nível de creatinina sérica o pré-requisito para classificação dos cães em diferentes estádios da doença renal crônica, verificou-se que algumas outras variáveis estão positivamente ou negativamente correlacionadas com a referida creatinina sérica. Neste senso, como pode ser observada mais adiante nas Figuras 10 e 11, a creatinina sérica correlacionou-se negativamente com as variáveis eritrocitárias hematócrito ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,76$ ), hemoglobina ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,76$ ), hemácias ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,76$ ) e reticulócitos ( $p = 0,0001$ ,  $r = -0,50$ ), bem como os precursores eritróides ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,61$ ) e linfócitos CD45+ ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,58$ ); e positivamente com as variáveis bioquímico-séricas fósforo ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,88$ ) e ureia ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,91$ ), bem como a UP/C ( $p = 0,0093$ ,  $r = 0,40$ ), a pressão arterial sistólica ( $p = 0,0007$ ,  $r = 0,49$ ) e a relação M/E ( $p = 0,0004$ ,  $r = 0,53$ ).



**Figura 10.** Representação gráfica das correlações da creatinina sérica com os parâmetros eritrocitários hematócrito, hemoglobina, hemácias, reticulócitos e precursores eritrocitários dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul, vermelha e verde, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos, mínimos e a média de referência para a espécie canina, para as variáveis analisadas. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

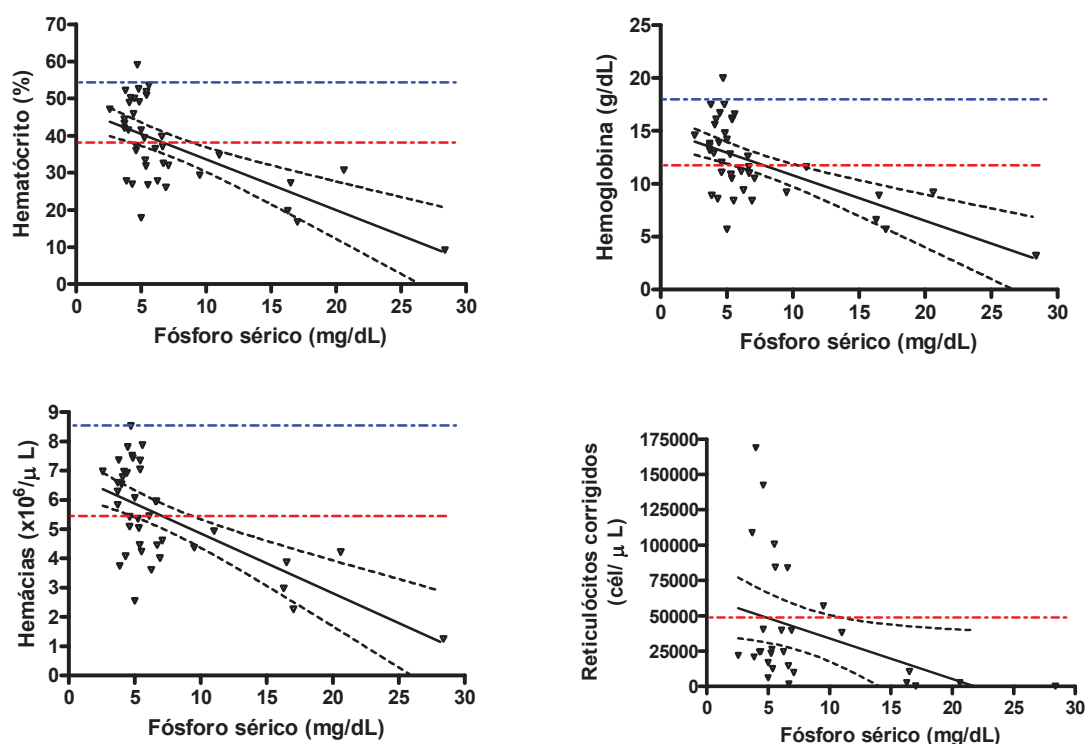


**Figura 11.** Representação gráfica das correlações da creatinina sérica com os parâmetros bioquímicos fósforo e ureia séricos, UP/C, pressão arterial sistólica e relação M/E dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul, vermelha e verde, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos, mínimos e a média de referência para a espécie canina, para as variáveis analisadas. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

Estudos recentes, que procuraram verificar as correlações das variáveis eritrocitárias com a creatinina sérica em cães com DRC, tais como aqueles de King et al. (1992), não foram encontrados na literatura consultada. Entretanto, neste ensaio, a proposta de se correlacionar a severidade da anemia com os estádios da DRC, em cães, mostrou-se alvissareira e promissora, visto que praticamente todos os estudos e revisões da doença renal crônica canina, referem maior severidade da anemia na medida da progressão da doença (POLZIN & OSBORN, 1995; POLZIN et al., 2004; RANDOLPH et al., 2004; BROWN, 2005; WAKI et al., 2010; POLZIN, 2011). O mesmo raciocínio pode ser empregado no caso da marcante linfopenia encontrada no estágio 4 da DRC, e sua estreita correlação com a creatinina sérica aqui descrita, pois, embora não tenham sido realizados estudos de correlação, a linfopenia descrita por Nakhla & Goggin (1973), Bouts et al. (2004), Nairn et al. (2005), Kralova et al. (2010) e Pahl et al. (2010) foi encontrada em pacientes no estágio final da doença.

Recentemente, um ensaio no qual foram avaliados caninos portadores de DRC nos diversos estádios da doença, segundo a classificação da IRIS, demonstrou, assim como o experimento em tela, correlações positivas entre creatinina e as variáveis bioquímico-séricas fósforo e uréia (CORTADELLAS et al., 2009). Além da verificação das mesmas correlações supracitadas, Mizoi et al., (2008) demonstraram haver correlação positiva entre creatinina e pressão arterial sistêmica, em pacientes humanos nefropatas crônicos instalados em unidades de terapia intensiva.

Considerando-se o fato de que, nas condições desse ensaio, o fósforo sérico apresentou-se significativamente elevado nos animais em estádios mais avançados da doença renal crônica e, ademais, pelo fato da hiperfosfatemia ser um indicativo direto do desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário a DRC, procurou-se correlacionar também a taxa de fósforo às variáveis eritrocitárias. Assim procedendo, verificou-se que o fósforo sérico correlaciona-se negativamente com o hematócrito ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,63$ ), hemoglobina ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,62$ ), hemácias ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,40$ ) e reticulócitos ( $p = 0,0342$ ,  $r = -0,40$ ), como ilustrado na Figura 12.



**Figura 12.** Representação gráfica das correlações do fósforo sérico com os parâmetros eritrocitários hematócrito, hemoglobina, hemácias e reticulócitos dos animais controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), doentes renais crônicos estágio 3 (DRC3) e doentes renais crônicos estágio 4 (DRC4). As linhas azul e vermelha, tracejadas, indicam, respectivamente, os valores máximos e mínimos de referência para a espécie canina, para cada variável analisada. (Teste de correlação de Pearson, Programa *GraphPad Prisma*). Jaboticabal, 2011.

Diversos autores têm buscado associar a concentração de PTH às variáveis bioquímico-séricas de pacientes com doença renal crônica (ROMÃO JUNIOR, 2004; KOGIKA et al., 2006; MACHADO & MOUTINHO, 2008; CORTADELLAS et al., 2009); mas não às eritrocitárias, tal qual neste trabalho. Considerando-se os resultados aqui encontrados, bem como a importância da influência do PTH na eritropoiese e nas condições de sobrevivência das hemácias na circulação periférica (MACDOLGALL, 2001), e o fato do PTH e do fósforo séricos apresentarem estreita correlação em pacientes com DRC (ROMÃO JUNIOR, 2004; KOGIKA et al., 2006; MACHADO & MOUTINHO, 2008), infere-se que a monitoração da influência do hiperparatireoidismo secundário renal na gravidade do quadro anêmico pode e deve ser acompanhada por intermédio do estudo dos níveis séricos do fósforo.

## VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os cães em estágio 2 da DRC não apresentam hipoplasia sanguínea, e a resposta medular, frente as agressões impostas pela azotemia, mantém-se regenerativa. Crê-se que a anemia normocítica normocrômica, inicialmente manifestada no estágio 3, apresente-se correlacionada à azotemia e à hiperfosfatemia, já que não foram verificadas alterações significativas na eritropoiese deste grupo. O estágio 4 da doença renal crônica é marcado por significativa linfopenia e severa anemia não regenerativa, sendo esta última, provavelmente, agravada pela hipoplasia da série eritróide. Ademais, com a progressão da doença aumentam-se os riscos às complicações decorrentes de hiperfosfatemia, proteinúria e hipertensão arterial sistólica.

Diante das correlações encontradas, pode-se concluir que a creatinina e o fósforo séricos correlacionam-se negativamente com as variáveis eritrocitárias, ou seja, quanto maiores forem as concentrações séricas dessas duas variáveis, mais severa a anemia e menor a resposta eritropoiética. Além do mais, perante as correlações séricas positivas entre a creatinina, e o fósforo e a ureia, assim como a UP/C e pressão arterial, infere-se que tais variáveis aumentam gradativamente com a progressão da DRC, e se prestam como bons indicadores de tal condição.

A utilização de aquisição linear para quantificação das células CD45<sup>+</sup> permitiu verificar com precisão o estado de linfopenia nos DRC estágio 4, sem no entanto se mostrar útil na avaliação da medula óssea, visto não ter sido capaz de quantificar os precursores eritróides, a relação M/E e ter superestimado as populações de linfócitos e monócitos/macrófagos medulares. Sendo assim, a substituição do mielograma pela imunofenotipagem das células CD45<sup>+</sup> centrais deve ser evitada, a menos que se altere



a forma de aquisição ou se faça uso de anticorpos específicos para as linhagens hematopoiéticas.

## VII. REFERÊNCIAS

ACKLEY, C. D.; HOOVER, E. A; COOPER M. D. Identification of a CD4 homologue in the cat. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 92-98, 1990.

AKMAL, M.; TELFER, N.; ANSARI, A. N.; MASSRY, S. G. Erythrocyte survival in chronic renal failure role of secondary hyperparathyroidism. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 76, p. 1695-1698, 1985.

BIRKELAND, S.A. Uremia as a state of immune deficiency. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 5, p. 107-115, 1976.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; PEDRAZA, L. N.; MIOTTO, M. R.; CHAVES, M.R.S.; CAMPOS FILHO, E.; MORAIS, F. R.; CARVALHO, M. B.; SANTANA, A. E. Inmunofenotipage de células CD45<sup>+</sup> en el estudio de la hipoplasia sanguínea de perros con enfermedad renal crónica - resultados preliminares. **Anais...** In: LATIN AMERICAN VETERINARY CONFERENCE 2010, Lima, Perú.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; PEDRAZA, L. N.; MIOTTO, M. R.; CHAVES, M.R.S.; CAMPOS FILHO, E.; MORAIS, F. R.; CARVALHO, M. B.; SANTANA, A. E. Uso de la citometria de flujo para análisis de las sub poblaciones leucocitárias de perros con diferentes estádios de la enfermedad renal crónica - Resultados preliminares. **Anais...**In: LATIN AMERICAN VETERINARY CONFERENCE 2010, Lima, Perú.

BOULTON-JONES, J. M.; VICK. R.; CAMERON, J. S.; BLACK, P. J. Immune responses in uraemia. **Clinical Nephrology**, Munchen, v. 1, p. 351-360, 1973.

BOUTS, A. H. M.; DAVIN, J. C.; KREDIET, R. T.; MONNENS, L. A. H.; NAUTA, J.; SCHRÖDER, C. H.; VAN, R. A. W. Children with chronic failure have reduced numbers of memory B cells. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 137, p. 589-594, 2004.

BROWN, S. A. Stage and management of chronic renal failure. **Proceeding...** In: North American Veterinary Conference, 2005, Orlando, Florida, Estados Unidos da América.

BURANAKARL, C.; ANKANAPORN, K.; THAMMACHAROEN, S.; TRISIRIROJ, M.; MALLERATMONGKOL, T.; THONGCHAI, P.; PANASJAROEN, S. Relationships between degree of azotaemia and blood pressure, urinary protein:creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 31, p. 245-257, 2007.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

BUSH, B. M. Nutrientes e metabólitos. In: \_\_\_\_\_. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 167-223.

CAPUA, M. L. B.; COLETA, F. E. D.; MIOTTO, M. R.; CALAZANS, S. G.; GODOY, A. V.; NAKAGE, A. P. M.; LISBÃO, C. B. S.; DALECK, C. R.; SANTANA, A. E. Autologous bone marrow transplantation in a dog with lymphoma: a clinical study. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 580-584, 2009.

CARVALHO, M. C; BARACAT, E. C. E.; SGARBIERI, V. C. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo do ferro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 13, p. 54-63, 2006.

CASTILLO, R.; LOZANO, T., ESSCOLA, G., LOPEZ, L. R. J.; ORDINAS, A. defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. **Blood**, New York, v. 68, n. 2, p. 337-342, 1986.

CHARPENTIER, B.; LANG, P. H.; MARTIN, B.; NOURY, J; MATHIEU, D.; FRIES, D. Depressed polymorphonuclear leukocyte functions associated with normal cytotoxic functions of T and natural killer cells during chronic hemodialysis. **Clinical Nephrology**, Munchen, v. 19, p. 288-294, 1983.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: ETTINGER, E. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Monole, 1992. Cap. 107, p. 1975-2046.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 137-154, 1994.

COMAZZI, S.; GELAIN, M. E.; SPAGNOLO, V.; RIONDATO, F.; GUGLIELMINO, R.; SARTORELLI, P. Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v.35, n. 1, p. 47-54, 2006.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ-DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. **The Veterinary Record**, London, v. 164, p. 487-490, 2009.

DANIELS, J. C., SAKAI, H., REMMERS, A. R., SARLES JUNIOR, H. E., FISH, J. C., COBB, E. K., LEVIN, W. C; RITZMANN, S. E. In vitro reactivity of human lymphocytes in chronic uraemia: analysis and interpretation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 8, p. 213-227, 1971.

DIAS, M. A.; SANTANA, A. E.; DAL FARRA, M. C. T.; CAMACHO, A. A. Study of the central and peripheral hematologic profile in normal dogs treated with doxorubicin (Adriablastine). **Brazilian Journal of Morphology Science**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 235-241, 1997.

ELLIOTT, D.; LEFEBVRE, H. Chronic renal disease: the importance of nutrition. In: PIBOT, P.; BIOUG, V.; ELLIOTT, D. **Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition**. France: Aniwa SAS on behalf of Royal Canin, 2006. p. 252-282.

ERSLEV, A. J.; BESARAB, A. Erythropoietin in the pathogenesis and treatment of the anemia of chronic renal failure. **Kidney International**, New York, v. 51, n. 3, p. 622-630, 1997.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

- FINCO, D. R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Williams e Wilkins. 1995, p. 29-46.
- FLEISHER, L. A. Preoperative assessment of the patient with cardiac disease. **American Society of Anesthesiologists**, Park Ridge, v. 33, p. 77-88, 2005.
- GALE, R. P.; CHAMPLIN, K. E.; FEIG, S. A.; FITCHN, J. H. Aplastic anemia: biology and treatment. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 95, n. 4, p. 477-494, 1981.
- GASPER, P. W.; THRALL, M. A. Hemopoietic stem cell transplantation. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap.17, p. 97-101.
- GELLER, M.; WOLFF, P. G. Urticária e angiodema associados a fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos recombinante humano (rhuGM-CSF) em portador de melanoma metastático. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, p. 637-638, 2005.
- GERBER, B., HÄSSIG, M.; REUSCH, C. E. Serum concentrations of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in clinically normal dogs and dogs with acute and chronic renal failure. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, p. 1161-1166, 2003.
- GOSSET, K. A. Anemias associated with drugs and chemicals. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 185-189.
- GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria e treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 46, p. 469-478, 2005.
- GRINDEM, C.B. Blood cell markers. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 5, p. 1043-1065, 1996.
- GRINDEM, C. B.; TYLER, R. D.; COWELL, R. L. A medula óssea. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: MedVet, 2009. Cap. 27, p.423-450.
- HUCKE, E. E. T. S. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre os parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com

depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®).

**Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 589-595, 2005

HUGHES, J. Life and death in the kidney: prospects for future therapy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, Berlim, v. 16, p. 879-882, 2001.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS) - **staging system for chronic kidney disease (CKD)**, 2009. Disponível em <[http:// www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)>. Acessado em 08 mar 2009.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap. 1, p. 1-18.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; NEATON, J. D.; KIRK, C. A.; ALLEN, T. A.; SWANSON, L. L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 226, n. 3, p. 393-400, 2005.

KAUFFMAN, C. A., MANZLER, A. D.; PHAIR, J. P. Cell-mediated immunity in patients on longterm haemodialysis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 22, p. 54-61, 1975.

KING, L. G; GIGER, U.; DISERENS, D.; NAGODE, L. A. Anemia of chronic renal failure in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 6, p. 264-270, 1992.

KOGIKA, M. M., LUSTOZA, M. D., NOTOMI, M. K., WIRTHL, V. A. B. F., MIRANDOLA, R. M. S.; HAGIWARA, M. K. Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. **Veterinary Clinical Pathology/ American Society for Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 35, p. 441-445, 2006.

KRALOVA, S.; LENKA, L.; MIROSLAV, T. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 74, p. 124-129, 2010.

LARRAIN, C.; ADELSON, E. The hemostatic defect of uremia. I. Clinical investigation of three patients with acute post-traumatic renal insufficiency. **Blood**, New York, v. 11, n. 12, p. 1059-1066, 1956.

- LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **The Veterinary Clinics of North America**. Small animal practice, Philadelphia, v. 34, p.867, 2004.
- LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, Dallas, v. 105, p. 1135-1143, 2002.
- LUCIDI, C. A.; TAKAHIRA, R. K. Uso do estimulador de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 915-920, 2007.
- LU, L.; SHEN, R. N.; BROXMEYER, H. E. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 22, p. 61-78, 1996.
- MACDOUGALL, I. C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney International**, New York, v. 59, n. 78, p. 67-72, 2001.
- MACHADO, L. H. A.; MOUTINHO, F. Q. Avaliação da correlação dos níveis séricos de paratormônio com os parâmetros bioquímicos em cães com Insuficiência renal crônica. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 2, p.370-379, 2008.
- MASSRY, S. G.; GOLDSTEIN, D. A. The search for uremic toxin(s) "X" "X"=PTH. **Clinical Nephrology**, New York, v. 11, p. 181-189, 1979.
- MATSUZAWA, T.; NOMURA, M.; UNNO, T. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. **The Journal of Veterinary Medical Science/ the Japanese Society of Veterinary Science**, Tokyo, v. 55, p. 351-362, 1993.
- MEZZANO, D.; TAGLE, R.; PAIS, E.; PANES, O.; PÉREZ, M.; DOWNEYZ, P.; MUFIOZ, B.; ARANDAL, E. BARJA, P.; THAMBO, S.; GONZÁLEZ, F.; MEZZANO, S.; PEREIRA, J. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 88, p. 465-472, 1997.
- MILLER, T. E.; STEWART, E. Host immune status in uraemia - 1. Cell-mediated immune mechanisms. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 41, p. 155-122, 1980.
- MIZOI, C. S.; DEZOTI, C.; VATTIMO, M. F. F. Função renal de pacientes de unidade de terapia intensiva: creatinina plasmática e proteína carreadora do retinol urinário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 385-393, 2008.

MORITZ, K. M.; GIK, B. L.; WINTROUR, E. M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. **American Physiology Society**, Bethesda, v. 273, n. 6, p. 1829-1844, 1997.

MÜLLER, D. C. M.; PIPPI, N. L.; BASSO, P. C.; OLSSON, D. C.; SANTOS JUNIOR, E. B.; GUERRA, A. C.O. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2243-2251, 2009.

NAESSENS, J.; HOWARD, C. J.; HOPKINS, J. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 365-368, 1997.

NAKHLA, L.S.; GOGGIN, M. Lymphocyte transformation in chronic renal failure. **Immunology**, Oxford, v. 24, p. 229-235, 1973.

NAIRN, J.; GREG HODGE, P. H.; HENNING, P. Changes in leukocyte subsets: clinical implications for children with chronic renal failure. **Pediatric Nephrology: Journal of the International Pediatric Nephrology Association**, Berlim, v. 20, p. 190-196, 2005.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CAPUA, M. L. B; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-976, 2005.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematológicas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CAPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34<sup>+</sup> no sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 434-441, 2009.

NGUYEN, D. T.; DIAMOND, L. W.; BRAYLAN, R. C. **Flow cytometry in hematopathology: a visual approach to data analysis and interpretation**. New York: Humana Press, 2007. 220p.

KING, L. G.; GIGER, U.; DISERENS, D.; NAGODE, L. A. Anemia of chronic failure in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine/ American College of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 264-270, 1992.

KRALOVA, S.; LEVA, L.; TOMAN, M. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Canadian Journal of Veterinary**



**Research** = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire, Ottawa, v. 74, p. 124-129, 2010.

OLIVEIRA, V. F. **Estudo das alterações hematológicas e dos perfis funcionais hepático e renal induzidas por methotrexate em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)**. Jaboticabal, 2000. 63f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2000.

OTS, M.; PECHTER, U.; TAMM, A. Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**; International Journal of Clinical Chemistry, Amsterdam. v. 297, p. 29-41, 2000.

PAHL, M. V.; GOLLAPUDI, S. G.; PAVAN, L. S.; ELAHIMEHR, R.; VAZIRI, N. D. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte Subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. **Nephrology, Dialysis, Transplantation** : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, Berlim, v. 25, p. 205-212, 2010.

PASQUINI, R. Transplante de medula óssea em anemias aplásticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, n. 33, p. 219-231, 2000.

PAXTON, H.; KIDD, P.; LANDAY, A.; GIORGI, J.; FLOMENBERG, N. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 52, n. 1, p. 68-84, 1989.

PERES, R. R.; LOBO e SILVA, M. A. M.; VARZIM, F. L. S. B.; OLIVEIRA, S. B.; POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **The Veterinary Clinics of North America**. Small Animal Practice, Philadelphia, v. 41, p. 15-30, 2011.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**, Baltimore: Williams e Wilkins. 1995, p. 335-367.

POLZIN, D. J.; OSBORN, C. A.; BARTGRS, J. W.; JAMES, K. M.; CHURCHILL, J. A. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.1721-1749.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L. Managing renal amyloidosis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v. 98, n. 4, p.320-333, 2003.

QUADRACCI, L. J.; RINGDEN, O.; KRZYMANSKI, M. The effect of uraemia and transplantation on lymphocyte subpopulations. **Kidney International**, New York, v. 10, p. 179-184, 1976.

RANDOLPH, J. F.; SCARLETT, J.; STOKOL, T.; MACLEOD, J. N. Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 81-89, 2004.

RASKA, K.; MORRISON, A. B.; RASKOVA, J. Humoral inhibitors of the immune response in uremia: III. The immunosuppressive factor of uremic rat serum is a very low density lipoprotein. **Laboratory Investigation**; A Journal of Technical Methods and Pathology, New York, v. 42, p. 636-642, 1980.

RAVID, M.; SHAPIRA, J.; LANG, R.; KEDAR, I. Prolonged dimethylsulphoxide treatment in 13 patients with systemic amyloidosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 41, p. 587-592, 1982.

REBELINK, T. J.; ZWAGINGA, J. J.; KOOMANS, H. A.; SIXMA, J. Thrombosis and hemostasis in renal disease. **Kidney International**, New York, v. 46, p. 287-296, 1994.

REIS, M. A. L.; VISENTAINER, J. E. L. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 212-217, 2004.

RIBEIRO-ALVES, M. A.; GORDON, P. A. Diagnóstico de anemia em pacientes portadores de doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 4-6, 2007.

RIESMAN, D. Hemorrhages in the course of Bright's disease with special reference to the occurrence of a hemorrhagic datehis of nephritic origin. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 134, p. 709-715, 1907.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 2003. 481p.

ROMÃO JUNIOR, J. E.; HAIASHI, A. R.; ELIAS, R. M.; LUDERS, C.; FERRABOLI, R.; CASTRO, M. C. M.; ABENSUR, H.; MARCONDES, M. Alterações de cálcio e fósforo

séricos e hiperparatireoidismo na insuficiência renal crônica incidente. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 6-11, 2004.

SAALMULLER, A. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 352-354, 1996.

SANTANA, A. E. **Benzenismo experimental: desenvolvimento da medula óssea ectópica**. Ribeirão Preto, 1988, 69f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1988.

SANTANA, A. E. **Efeitos hematotóxicos de dois diferentes níveis de dosagens de sulfato de vincristina (Oncovin) em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) sadios**. Jaboticabal, 2000, 106f. Tese (Livre-Docência em Patologia Clínica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2000.

SCHENCK, P. A.; CHEW, D. J. Determination of calcium fractionation in dogs with chronic renal failure. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, p. 1181-1184, 2003.

SILVA, S. R. R. **Determinação da atividade sérica da enzima conversora da angiotensina por método enzimático simplificado – valores de referência para cães sadios e avaliação em insuficientes renais crônicos**. 2006, 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, 2006.

SOBREIRA, M. F. R. **Estudo das alterações hematológicas e das provas funcionais hepática e renal em cães (*Canis familiaris*) sadios expostos ao sulfato de vincristina (Oncovin)**. 1999, 113f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1999.

SOBREIRA, M. F. R. **Estudo ultra-estrutural, quantitativo e funcional dos elementos do eixo megacariocítico-plaquetário de cães sadios tratados com dois diferentes níveis de dosagem de sulfato de vincristina**. 2003, 73f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

SMOGORZEWSKI, M.; MASSRY, S. Defects in B-cell function and metabolism in uremia: role of parathyroid hormone. **Kidney International**, New York, v. 59, p. 186-189, 2001.

STEWART, E.; MILLER, T. E. Host immune status in uraemia – II Serum factors and lymphocyte transformation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 41, p. 123-129, 1980.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5 ed. São Paulo: Roca, 1998. p.531.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. ; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. G.; LASSEN, E. D.; REBAR, A. H.; WEISER, M. G. **Veterinary Hematology & Clinical Chemistry**. 1 ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2004. 544p.

TRYGGVASON, K.; PETTERSSON, E. Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. **Journal of Internal Medicine**, Oxford. v. 253, p. 216-224, 2003.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, 2010.

WALLNER, S. F.; KURNICK, J. E.; WARD, H. P.; VAUTRIN, R.; ALFREY, A. C. The anemia of chronic renal failure and chronic diseases: in vitro studies of erythropoiesis. **Blood**, New York, v. 47, n. 4, p. 561-569, 1976.

WEISER, M. G. Respostas e distúrbios eritrocitários. In: ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 2608-2610.

WEISS, D. J. Histopathology of canine bone marrow. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, Santa Barbara, n.15, p. 7-11, 1986.

WEISS, D.J. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, Santa Barbara, v. 33, n. 2, p. 96-101, 2004a.

WEISS, D. J. Evaluation of canine bone marrow proliferative disorders by use of flow cytometric analysis of CD45 expression and intracytoplasmic complexity. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 13, p. 51-58, 2004b.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J.; JARRETT, O.; NEIL, J. C. Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. **Immunology**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 228-233, 1994.

WOO, J.C.; MOORE, P.F. A feline homologue of CD1 is defined using a feline specific monoclonal antibody. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.49, n.3, p.244-251, 1997.

YAWATA, Y. Tecidos hematopoiéticos: uma visão geral. In:\_\_\_\_\_ **Atlas de Doenças Hematológicas – Citologia e Histologia**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 1, p. 2-12.

YOUNG, N. S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired anemia. **Seminars in Hematology**, Philadelphia, v. 37, p. 3-14, 2000.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Exames laboratoriais adicionais realizados em animais do grupo controle.

**Tabela A1.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) das variáveis densidade *clearance* de creatinina de 24 horas, específica urinária (DEU), razão proteína creatinina urinária (UP/C), excreção fracionada de sódio ( $EF_{Na}$ ), alanino aminotransferase (ALT), proteína total (PT), albumina e pressão arterial sistólica (PAS) dos cães controle (GC). Jaboticabal, 2011.

PARÂMETROS	VALORES
<b>Clearance de creatinina</b> (24 horas)	2,38 $\pm$ 0,5 (1,64-2,77)
<b>DEU</b>	1,039 $\pm$ 0,003 (1,020-1,050)
<b>UP/C</b>	0,1 $\pm$ 0,03 (0,03-0,16)
<b><math>EF_{Na}</math></b> (%)	0,4 $\pm$ 0,17 (0,21-0,74)
<b>ALT</b> (mg/dL)	65,9 $\pm$ 12,66 (57,78-86,67)
<b>PT</b> (mg/dL)	7,00 $\pm$ 0,54 (6,6-8,2)
<b>Albumina</b> (mg/dL)	3,35 $\pm$ 0,5 (2,65-4,23)
<b>PAS</b> (mmHg)	132 $\pm$ 8,17 (120-140)

**APÊNDICE B.** Valores de referência para o hemograma canino.**Tabela B1.** Parâmetros eritro-leucométricos e plaquetários de referência para a espécie canina.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALORES</b>
<b>Hemácias</b> (x10 <sup>6</sup> /μL)	5,5 - 8,0
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	12,0 - 18,0
<b>Hematócrito</b> (%)	37 - 55
<b>VCM</b> (fL)	60 - 77
<b>CHCM</b> (g/dL)	31 - 34
<b>Plaquetas</b> (cél/s/μL)	18.0000 – 400.000
<b>Leucócitos totais</b> (cél/s/μL)	6.000 – 18.000
<b>Basófilos</b> (cél/s/μL)	0
<b>Eosinófilos</b> (cél/s/μL)	120 – 1.800
<b>Bastonetes</b> (cél/s/μL)	0 - 500
<b>Segmentados</b> (cél/s/μL)	3.600 – 13.800
<b>Linfócitos</b> (cél/s/μL)	720 – 5.400
<b>Monócitos</b> (cél/s/μL)	180 – 1.800

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do HVGLN, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.



**APÊNDICE C.** Valores bioquímicos de referência para a espécie canina.**Tabela C1.** Parâmetros bioquímicos de referência para a espécie canina.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALORES</b>
<b>CREATININA</b> (mg/dL)	0,5 – 1,5
<b>UREIA</b> (mg/dL)	15 – 65
<b>PROTEÍNA TOTAL</b> (mg/dL)	5,8 – 7,9
<b>ALBUMINA</b> (mg/dL)	2,6 – 4,0
<b>CÁLCIO</b> (mg/dL)	8,6 – 11,2
<b>FÓSFORO</b> (mg/dL)	2,2 – 5,5
<b>ALT</b> (mg/dL)	10 – 88

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do HVGLN, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.