

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE
ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE NAS VARIÁVEIS
HEMATOLÓGICAS DE CÃES PORTADORES DE
ENFERMIDADE RENAL CRÔNICA

Pós-Graduando: Jordano De Paula Dorigam
Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

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 (Patologia Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JORDANO DE PAULA DORIGAM - nasceu em Jaboticabal, no dia 16 de Dezembro de 1986. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – Câmpus de Jaboticabal no início de 2004, concluindo-o em Dezembro de 2008. Iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária - Área de Patologia Animal em Março de 2009, vindo a concluí-lo em Junho de 2011.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, que desde a graduação me auxiliou e acreditou em mim, e pacientemente me guiou até o fim dessa etapa da minha vida.
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.
- ❖ À Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, que me deu conselhos não apenas para enriquecer esta dissertação, mas também para a minha vida.
- ❖ Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, Eugênio e Matheus, que me ajudaram muito com o trabalho.
- ❖ Aos colegas, Sofia, Leandro, Letícia, Andressa, e à Prof. Dr. Paula Rosato, que me deram várias idéias no decorrer do meu mestrado e me ajudaram a desenvolver essa dissertação.
- ❖ Ao meu pai José Carlos e meu irmão Juliano, que sempre me apoiaram e conversaram muito comigo, nos momentos de preocupação e nos momentos de distração.
- ❖ Aos meus amigos Ed, Syao, Bne-chan, Akadsuki, Bahamaut e Muon, que me mostraram que não importa a distância, é possível formar laços tão unidos quanto uma família.
- ❖ Aos meus amigos de Jaboticabal, Hideo e Leandro, os quais eu conheço a tantos anos, me ajudaram a distrair de tantas preocupações.
- ❖ A todos os cães, que para mim sempre foram inspiração de companheirismo e lealdade.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Importância do hemograma na avaliação clínica do paciente.....	2
2.1.1 Eritrograma.....	2
2.1.1.1 Contagem Global de Eritrócitos, Concentração de Hemoglobina e Hematócrito.....	2
2.1.1.2 Índices Eritrocíticos	3
2.1.1.3 Reticulócitos.....	4
2.1.2 Leucograma.....	5
2.1.2.1 Contagens Global e Diferencial dos Leucócitos	5
2.1.2.2 Aspectos Morfofuncionais e Bioquímicos dos Leucócitos.....	6
2.1.2.2.1 Granulócitos.....	6
2.1.2.2.2 Agranulócitos.....	7
2.1.3 Trombograma.....	8
2.2 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas variáveis eritrocitárias.....	9
2.3 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas variáveis leucocitárias.....	11
2.4 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas características plaquetárias.....	11
2.5 Doença Renal Crônica.....	12
2.6 Reflexos da Doença Renal Crônica no sangue.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Animais.....	15
4.2 Hemograma.....	15
4.3 Grupos.....	16
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	17
6. RESULTADOS.....	18
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	19
7.1 Hemácias.....	19
7.2 Reticulócitos.....	20
7.3 Hemoglobina	20
7.4 Hematócrito.....	21
7.5 Volume Corpuscular Médio (VCM).....	21
7.6 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM).....	22

7.7 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).....	22
7.8 Leucócitos.....	22
7.9 Plaquetas.....	23
8. CONCLUSÕES.....	25
9. REFERÊNCIAS.....	26
Apêndices.....	30

LISTA DE APÊNDICES

- 1 - Valores mínimos significativos (valor de p^{α}) do teste F da ANOVA (Delineamento inteiramente casualizado) para as variáveis Hemácias, Reticulócitos, Hemoglobina, Hematócrito, Volume corpuscular médio, Hemoglobina corpuscular média, Concentração de hemoglobina corpuscular média, Leucócitos, Basófilos, Eosinófilos, Neutrófilos Bastonete, Neutrófilos Segmentados, Linfócitos, Monócitos e Plaquetas.....30
- 2 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem global de Hemácias ($He\ 10^3/mm^3$) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....31
- 3 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem de Reticulócitos (Ret/mm^3) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....32
- 4 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Hemoglobina (Hb g %) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....33
- 5 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Hematócrito (Ht %) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....34

6 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Volume Corpuscular médio (fm^3) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....35

7 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para Hemoglobina Corpuscular Média (pg) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....36

8 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Concentração de Hemoglobina Corpuscular média (g/dl) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....37

9 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem global de Leucócitos (Le/mm^3) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....38

10 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem de Plaquetas (Pl/mm^3) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue.....39

INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE SANGUE NAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DE CÃES PORTADORES DE ENFERMIDADE RENAL CRÔNICA

RESUMO

O hemograma, amplamente utilizado na medicina veterinária por apresentar praticidade e baixo custo, é rotineiramente solicitado para o diagnóstico de diversas enfermidades que acometem os animais de companhia, bem como para o acompanhamento destes pacientes. Faltam estudos que reflitam a realidade que os laboratórios enfrentam: as amostras recebidas, pertencentes a animais enfermos, nem sempre podem ser processadas na hora, podendo ficar armazenada por horas. Paralelamente a essa situação, a doença renal crônica é a afecção renal mais comum em cães e gatos, que acabam necessitando de acompanhamento clínico e, para tanto, o hemograma é uma das ferramentas utilizadas. Além disso, a DRC possui consequências diretas no sangue do paciente. Diante deste problema, realizou-se este ensaio com o fito de analisar a estabilidade de alguns dos parâmetros do hemograma, de amostras retiradas de pacientes em diferentes estágios de doença renal crônica, e estocadas a diferentes temperaturas e tempos. Foram utilizados 24 animais da rotina clínica. O sangue foi coletado, processado e então armazenado para posteriores contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como a determinação do volume globular, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem diferencial de leucócitos em esfregaços sanguíneos e contagem de reticulócitos. Desta forma, o sangue foi distribuído em duas frações, armazenadas a 4°C e a 25°C e analisadas logo após a coleta, e então passadas quatro, oito, vinte e quatro, quarenta e oito e setenta e duas horas. Os resultados corroboraram com experimentos anteriores realizados com cães hígidos. Foi possível observar que, apesar do sangue urêmico provocar menor viabilidade celular in vivo, os resultados não foram significativamente

diferentes dos trabalhos realizados com animais saudáveis, permanecendo assim o tempo ideal de estocagem para a realização dos exames laboratoriais de até oito horas em temperatura ambiente (25°C) e de até quarenta e oito horas sob temperatura de refrigeração (4°C).

Palavras-chave: Hemograma, Conservação, Cão, Temperatura, Doença Renal Crônica.

INFLUENCE OF THE TIME AND TEMPERATURE OF STORAGE OF BLOOD SAMPLES IN HEMATOLOGICAL VARIABLES OF DOGS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

SUMMARY

The complete blood count, widely used in veterinary medicine by presenting practicality and low cost, is routinely requested for diagnosis of various diseases that affect pets, as well as monitoring these patients. There is a lack of studies that reflect the reality that laboratories face: the samples, deriving from sick animals, can't always be processed as they are received, and may be stored for hours. Parallel to this, chronic kidney disease is the most common kidney illness in dogs and cats that end up needing clinical follow-up and, therefore, the CBC is one of the tools used. In addition, the CKD has direct consequences on the patient's blood. Faced with this problem, this test was carried out with the aim of analyzing the stability of some of the parameters of the CBC, in samples taken from patients at different stages of chronic kidney disease, and stored at different temperatures and times. 24 animals from the clinical routine were used. Blood was collected, processed and then stored for later counts of red blood cells, white cells and platelets, as well as packed cell volume, hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, leukocyte count in blood smears, and reticulocyte count. Thus, the blood was distributed in two fractions, stored at 4°C and 25°C and analyzed immediately after collection, and then after four, eight, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours. The results corroborate previous experiments carried out on healthy dogs. It was observed that despite that uremic blood lead to lower cell viability *in vivo*, the results were not significantly different from works carried out on healthy animals, thereby remaining the ideal time of storage to carry out laboratory tests up to eight hours at room temperature (25°C) and up to forty eight hours under refrigeration temperature (4°C).

Keywords: Complete Blood Count, Conservation, Dog, Temperature, Chronic Kidney Disease.

1. INTRODUÇÃO

O hemograma é um procedimento laboratorial amplamente utilizado na medicina veterinária (FURLANELLO et al., 2006), porém, a estabilidade dos constituintes hematológicos é pouco documentada (MÉDAILLE et al., 2006).

Em muitos casos, corre-se o risco de obtenção de resultados não confiáveis, uma vez que as amostras colhidas na rotina clínica de pequenos animais, na maioria das vezes, têm que ser enviadas aos laboratórios. O tempo até a análise pode ser longo, principalmente quando as amostras são colhidas no final de semana e feriados e, uma vez que faltam laboratórios que funcionem em regime de plantão, as amostras serão analisadas somente no próximo dia útil.

O cão é hoje o principal animal de companhia no Brasil, a espécie mais atendida nas clínicas do país e, conseqüentemente, a maior parte das amostras de sangue enviada aos laboratórios é da espécie canina. Entretanto, existem poucos estudos sobre estocagem de sangue periférico de cães, todos utilizando-se apenas de animais hígidos, ou seja, que não apresentavam alterações em seus parâmetros hematológicos e não possuíam sinais clínicos. Sabe-se que essa não é a realidade com o qual os laboratórios se deparam no dia a dia. A maioria das amostras é colhida em cães enfermos que apresentam alterações, tais como contagem global leucocitária baixa, cuja causa dessa alteração pode ser um tempo de vida médio reduzido poderá, no lapso de tempo entre a colheita e processamento da amostra, redundar em resultados subestimados e, conseqüentemente, em interpretações equivocadas.

Visando este problema, esse trabalho possui o objetivo de avaliar a estabilidade das características hematológicas das amostras do sangue de cães enfermos, estocadas por até setenta e duas horas, sob diferentes temperaturas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do hemograma na avaliação clínica do paciente.

O hemograma, que compreende fundamentalmente o eritrograma, o leucograma e o trombograma, é o exame de sangue mais solicitado na rotina laboratorial, por apresentar baixo custo, praticidade e utilidade na prática clínica (KERR, 2003). Tal exame é um importante meio de diagnóstico, que reflete o estado de saúde do animal no momento da colheita do sangue. Contagens globais de células sanguíneas são rotineiramente utilizadas por veterinários para a avaliação pré-cirúrgica e, cada vez mais, como parte dos cuidados gerais pós-operatórios dos animais. A realização do hemograma pode ser uma boa atitude subsidiária ao exame físico geral, mas hemogramas sequenciais devem, sempre que possível, ser realizados para se acompanhar a evolução do quadro clínico e recuperação do paciente (JAIN, 1993).

2.1.1 Eritrograma

O eritrograma inclui a contagem global de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, o hematócrito ou volume globular e os índices eritrocitários volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (JAIN, 1993).

2.1.1.1 Contagem Global de Eritrócitos, Concentração de Hemoglobina e Hematócrito

A contagem global de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito são medidas de eritron e da capacidade de carrear oxigênio no sangue (REBAR, 1998). O estudo laboratorial de tais parâmetros permite colocar em evidência estados de normalidade da crase eritrocitária assim como anemia e eritrocitose, uma vez que a anemia é definida como diminuição na contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, abaixo dos valores de referência, e

eritrocitose como sendo um aumento dos referidos valores, relativa ou absolutamente (JAIN, 1993; FELDMAN et al, 2000; FIGHERA, 2001; KERR, 2003).

A anemia pode ser relativa ou absoluta, que é clinicamente importante e merece ampla investigação (JAIN, 1993). Na sua expressão absoluta, a anemia pode ser classificada de acordo com o volume e conteúdo hemoglobínico dos eritrócitos, os mecanismos patogênicos e a resposta eritróide da medula óssea (JAIN, 1993; MEYER et al., 1995; FIGHERA, 2001). Dentre as causas da anemia absoluta, podem-se observar, com frequência, doenças inflamatórias, que resultam em uma redução na produção eritrocitária, e redução do tempo de vida dos eritrócitos. Alguns fármacos e outros compostos químicos também resultam em diminuição da sobrevivência ou da produção eritrocitária (FELDMAN et al., 2000).

A eritrocitose também é classificada como relativa ou absoluta. A eritrocitose relativa é a forma mais comumente observada em cães e ocorre como resultado da redução do volume plasmático, determinada por desidratação ou desvios de líquidos, ou ainda por aumento transitório da massa de células vermelhas no sangue circulante, especialmente nas condições em que se verifica contração esplênica (JAIN, 1993; REBAR, 1998; FELDMAN, 2000; THRALL et al., 2004). A eritrocitose absoluta é a elevação do número de eritrócitos circulantes decorrente do aumento na produção dessas células, sem que haja aumento correspondente do volume plasmático. A eritrocitose absoluta pode ainda ser classificada como primária, quando ocorre desordem mieloproliferativa caracterizada por proliferação exacerbada de células eritróides, ou secundária, quando ocorre aumento da eritropoetina (JAIN, 1993; FELDMAN, 2000).

2.1.1.2 Índices Eritrocíticos

O VCM e o CHCM são índices eritrocitários muito utilizados clinicamente pois possibilitam a classificação morfológica das anemias, levando-se em consideração o tamanho e a saturação de hemoglobina das hemácias. Estes índices não especificam a etiologia da anemia, mas são muito úteis para

determinar o mecanismo fisiopatológico, o que auxilia na seleção do protocolo de tratamento (MEYER et al., 1995).

O HCM é calculado a partir da concentração de hemoglobina e da contagem de hemácias (THRALL et al., 2004). Por variar com o tamanho das hemácias e com a espécie, não é frequentemente utilizado em medicina veterinária (JAIN, 1993).

O VCM é obtido por simples relação matemática entre o hematócrito e a contagem global das hemácias (DUNCAN et al., 1994; KERR, 2003). Este índice permite a classificação das anemias em macrocíticas, quando o VCM estiver acima do valor máximo para a espécie; normocítica, quando estiver dentro do intervalo de normalidade; e microcítica, quando estiver abaixo do valor mínimo considerado para a espécie (MEYER et al., 1995). Os valores do VCM variam bastante entre as espécies e são independentes do tamanho do animal. Animais jovens tendem a ter hemácias maiores em relação aos animais adultos (JAIN, 1993; FELDMAN et al., 2000; KERR, 2003).

O CHCM é definido como o grau de saturação de hemoglobina em 100 mL de sangue e é obtido por simples relação matemática entre hemoglobina e hematócrito (DUNCAN et al., 1994; KERR, 2003). Este índice permite a classificação das anemias em normocrômicas, quando o valor do CHCM estiver dentro do intervalo de referência; e hipocrômicas, quando estiver abaixo do valor mínimo de referência. O valor normal para mamíferos independe da espécie, bem como do tamanho das hemácias (KERR, 2003).

2.1.1.3 Reticulócitos

Os reticulócitos são células vermelhas imaturas, com citoplasma repleto de organelas, como mitocôndrias, ribossomos e complexo de golgi, o que lhes confere coloração azulada por ação de corantes supravitais, rotineiramente utilizados. Os reticulócitos são chamados policromatófilos e, quando presentes, caracterizam a condição de policromasia ou policromatofilia. Para a contagem dos reticulócitos são necessários os referidos corantes supravitais, tais como o azul

de metileno ou o azul brilhante de cresil, que se precipitam nas organelas, conferindo à célula a imagem de uma rede de cordões ou pontos basofílicos (FELDMAN et al., 2000; FIGHERA, 2001).

Os reticulócitos são liberados da medula óssea, sob ação da eritropoetina, em resposta à hipóxia tecidual e, durante eritropoese intensa, são prematuramente lançados na circulação. Reticulocitemia e policromasia são indicadores de eritropoese intensa e sua presença ou ausência permite a classificação das anemias em regenerativas ou arregenerativas, respectivamente (FELDMAN et al., 2000).

2.1.2 Leucograma

O leucograma é a parte do hemograma que reflete as alterações quantitativas e qualitativas da série leucocitária e compreende as contagens global e diferencial dos leucócitos (REBAR et al., 2003) e é normalmente realizado para detectar e monitorar processos inflamatórios (MEYER et al., 1995).

2.1.2.1 Contagens Global e Diferencial dos Leucócitos

O termo leucócito inclui todas as células brancas do sangue e seus precursores medulares. Estas células são transportadas pela corrente sanguínea a partir da medula óssea até os tecidos, seu destino final. A quantidade de leucócitos circulantes, portanto, reflete o equilíbrio entre produção e perda. A contagem global de leucócitos engloba todas as variedades leucocitárias, que podem ser agrupadas em granulócitos, que incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e agranulócitos, que incluem linfócitos e monócitos (KERR, 2003). De outra parte, a contagem diferencial dos leucócitos diz respeito à enumeração de cada variedade leucocitária, a partir do exame de um esfregaço sanguíneo devidamente corado por uma mistura de anilinas ácidas e básicas tipo Romanowsky. De posse das contagens global e diferencial dos leucócitos (fórmula leucocitária relativa), torna-se possível a determinação da fórmula leucocitária absoluta, por uma regra de três direta, (JAIN, 1993).

Do ponto de vista funcional, os leucócitos circulantes pertencem a dois sistemas de defesa, a saber o fagocítico e imunocítico. O sistema fagocítico é constituído por granulócitos e monócitos/macrófagos e o sistema imunocítico engloba linfócitos T e B circulantes. Os fagócitos são a primeira linha de defesa contra o processo infeccioso ou tóxico-infeccioso. Essas células fagocitam e destroem as bactérias ou outros agentes invasores. O sistema imunocítico é o sistema imune específico e suas células efetoras são responsáveis pela consecução da imunidade humoral, na forma de anticorpos produzidos contra agentes específicos, e imunidade mediada por células, por meio da produção de citocinas específicas (REBAR, 1998).

2.1.2.2 Aspectos Morfofuncionais e Bioquímicos dos Leucócitos

2.1.2.2.1 Granulócitos

Os basófilos são células pouco estudadas, pois são raras na medula óssea e no sangue circulante (JAIN, 1993). As referidas células compartilham a mesma célula progenitora dos mastócitos tissulares. Ambas as células desempenham funções similares e possuem histamina (que desempenha papel fundamental nas reações de hipersensibilidade imediata), heparina (que contém efeito anticoagulante importante no processo inflamatório) e, em algumas espécies animais, serotonina em seus grânulos. Os basófilos são ainda capazes de sintetizar diversas citocinas que iniciam ou modulam uma resposta inflamatória (REBAR et al., 2003).

Os eosinófilos têm participações nas regulações das respostas alérgica e inflamatória, por meio da modulação da atividade dos mastócitos, das suas propriedades anti-histamínicas e antiinflamatórias e da ação das substâncias de seus grânulos, tais como a serotonina e a bradicinina, que inibem a indução de edema (JAIN, 1993). Além disso, tais células possuem as capacidades de fagocitose e de degranulação. Também atuam no controle de infecções parasitárias por meio de ação parasiticida intermediada pela interação com mastócitos e linfócitos (JAIN, 1993; REBAR, 1998).

Os neutrófilos são os granulócitos circulantes predominantes em cães, gatos, seres humanos, dentre outros, e, apesar de sua função primária ser a fagocitose de microorganismos, estas células também exercem função secretória, participando assim da resposta inflamatória sistêmica (REBAR, 1998; THRALL et al., 2004).

O aumento (neutrofilia) e a diminuição (neutropenia) no número de neutrófilos são clinicamente significantes, particularmente em doenças inflamatórias (REBAR, 1998). Em condições normais, os neutrófilos bastonetes, um estágio evolutivo que antecede o dos neutrófilos segmentados, são raramente observados. A liberação de neutrófilos imaturos para a circulação é clinicamente relevante e ocorre quando aumenta a demanda por neutrófilos para os tecidos ou em casos de leucemias mielógenas ou mielomonocíticas agudas ou crônicas (REBAR, 1998; THRALL et al., 2004). Em determinadas situações (intensa infecção local ou sistêmica, inflamação estéril ou toxicidade por substâncias), os neutrófilos adquirem aspecto tóxico, com basofilia citoplasmática, vacuolização, corpúsculos de Döhle e, raramente, granulação tóxica.

Outras alterações que os neutrófilos podem apresentar incluem assincronia da maturação nuclear e hipersegmentação (encontrados nos casos de neutrofilia ressurgente e significativa, na leucemia mielóide e na síndrome mielodisplásica). Portanto, a visualização dos neutrófilos por meio de microscopia óptica fornece importantes informações sobre a enfermidade do paciente (FELDMAN et al., 2000).

2.1.2.2 Agranulócitos

Os linfócitos do sangue periférico diferenciam-se tanto na medula óssea quanto do timo. Diferentemente dos granulócitos e monócitos, que se movem unidirecionalmente da medula óssea para o sangue e tecidos, alguns tipos de linfócitos recirculam. O padrão de tráfego dos linfócitos é do sangue para os linfonodos, linfa e novamente para o sangue (REBAR et al., 2003).

Desta forma, o aumento no número de linfócitos circulantes (linfocitose) pode ocorrer por estimulação antigênica no hipoadrenocorticismo, resposta à

excitação e conseqüente liberação de epinefrina, e também em linfossarcomas e leucemias linfocíticas, sendo, nesses dois últimos casos, eventos tardios. Por sua vez, a diminuição do número de linfócitos (linfopenia) ocorre quando há elevação da concentração de glicocorticóides na circulação, interrupção da circulação linfática, como ocorre em efusões quilosas, diminuição da linfopoese, em linfossarcomas como resultado da incapacidade dos linfócitos de emigrarem do tecido linfóide comprometido, em infecções bacterianas agudas (septicemia e endotoxemia) e na fase aguda de infecções virais (FELDMAN et al., 2000; REBAR et al., 2003, THRALL et al., 2004).

No caso dos monócitos, sua contínua maturação, até o estágio tecidual de macrófagos, representa a segunda maior linha de defesa do sistema de fagócitos. A função dessas células, além de fagocitose de microorganismos, é a regulação da resposta inflamatória por meio da liberação de mediadores inflamatórios, processamento de antígenos para apresentação aos linfócitos, produção de citocinas e fatores estimuladores de colônia requeridos na hematopoese, reparação tecidual e participação na regulação dos estoques de ferro no organismo (FELDMAN et al., 2000; REBAR et al., 2003). A elevação do número de monócitos no sangue ocorre nas anemias imunomediadas, inflamações (agudas ou crônicas), septicemias e neoplasias (FELDMAN et al., 2000).

2.1.3 Trombograma

As plaquetas são produzidas na medula óssea, por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos (JAIN, 1993; FELDMAN et al., 2000). A função primária destas células é a manutenção da hemostasia. As plaquetas são a primeira linha de defesa frente à perturbação da parede vascular e, atuando por intermédio de suas propriedades de aderência ao subendotélio, secreção e recrutamento de plaquetas adicionais para a área, agregação e aglutinação, facilitam a formação local de trombina e fibrina em um microambiente que assegura a rápida formação do trombo. Além disso, as plaquetas desempenham função importante na inflamação, em decorrência da liberação de mediadores

solúveis que modulam a atividade de células sanguíneas e do endotélio vascular (FELDMAN et al., 2000).

As desordens plaquetárias são classificadas em quantitativas ou qualitativas. Os transtornos quantitativos incluem a trombocitopenia ou diminuição do número de plaquetas, que é a anormalidade plaquetária mais comumente encontrada. A trombocitopenia é, provavelmente a causa mais comum de diátese hemorrágica em seres humanos e cães. Por outro lado, a trombocitose, que é o aumento do número de plaquetas, tem frequência baixa (JAIN, 1993).

A trombocitopenia pode ocorrer como resultado da diminuição da produção, encurtamento da vida média das plaquetas ou de ambas as causas, desencadeadas por ação de agentes infecciosos como a *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, drogas como citostáticos, antibióticos e antifúngicos, processos neoplásicos ou desordens imunomediadas; aumento do consumo de plaquetas, que está associado à coagulação intravascular disseminada (CID), hemangiossarcomas, vasculites e outras injúrias vasculares e aumento da destruição das plaquetas que é resultante do aumento da fagocitose de plaquetas pelo sistema monócito-macrofágico ou mecanismos imunomediados, tendo como consequência principal a trombocitopenia imunomediada (THRALL et al., 2004). Além da avaliação quantitativa das plaquetas presentes no sangue periférico, seu exame morfológico também contribui para o esclarecimento da situação do paciente, especialmente nos casos de neoplasias e leucemia felina (FELDMAN et al., 2000).

2.2 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas variáveis eritrocitárias

FURLANELLO et al. (2006) realizaram estocagem, por 48 horas, de sangue total, conservados em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), de cães hípidos, e observaram que as alterações no hematócrito, VCM e CHCM foram maiores nas amostras conservadas à temperatura ambiente do que à 4°C em todos os momentos analisados. A partir de 12 horas, ocorreu um aumento significativo do VCM, tanto em amostras estocadas a 4°C, quanto nas estocadas

à temperatura ambiente. O CHCM diminuiu significativamente entre 12 e 24 horas e continuou a diminuir até 48 horas, tanto à temperatura ambiente quanto a 4°C, contudo, a diminuição foi maior nas amostras à temperatura ambiente que nas amostras refrigeradas. Reportaram também um aumento pequeno dos valores de hemoglobina e aumento significativo do hematócrito, após 12 horas de estocagem à temperatura ambiente e a 4°C, e, ademais, observaram que os referidos parâmetros continuaram a aumentar ao longo das 36 horas que se seguiram.

PASTOR et al. (1997) avaliaram as alterações nos parâmetros do hemograma de 10 cães, após 72 horas de estocagem, à temperatura ambiente e a 4°C de amostras conservadas em EDTA, e observaram que a contagem global de hemácias e a taxa de hemoglobina se mantiveram estáveis. Os valores do hematócrito tenderam a aumentar com diferenças estatisticamente significativas observadas em amostras estocadas à temperatura ambiente por 24 horas.

Já MÉDAILLE et al. (2006) avaliaram amostras, de sangue total de cães, estocadas com EDTA por 48 horas, à temperatura ambiente, e relataram diminuição significativa da contagem global de hemácias após 24 e 48 horas de estocagem e, além disso, estabilidade da taxa de hemoglobina durante todo o estudo.

No estudo de COELHO (2006), realizado com amostras também estocadas em EDTA a 4°C, porém, observou-se redução do valor de CHCM, apenas após 36 horas. Observou também resultados semelhantes, com a contagem eritrocitária estável após 96 horas, e aumento no hematócrito após 36 horas.

Cabe ressaltar que em amostras de sangue estocadas por longos períodos, geralmente desenvolve-se o fenômeno hemolítico com conseqüente diminuição do hematócrito e da liberação de hemoglobina para o plasma, que é progressiva como relatado por BAILEY & BOVE (1975), FAGLILOLO et al. (1986) e ELLIOT et al. (2003).

2.3 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas variáveis leucocitárias

De acordo com COELHO (2006), que analisou o sangue de cães hígidos, não foram observadas diferenças significativas dos leucogramas, independentemente da temperatura de estocagem (ambiente ou 4°C), em qualquer um dos momentos do experimento (96 horas).

Segundo PASTOR et al. (1997), a contagem global de leucócitos aumentou significativamente, após 24 horas, nas amostras estocadas à temperatura ambiente e diminuiu significativamente a partir de 72 horas, nas amostras refrigeradas, porém as diferenças não foram clinicamente relevantes. Já de acordo com FURLANELLO et al. (2006), ocorreu diminuição significativa na contagem de leucócitos após 48 horas de estocagem nas amostras à temperatura ambiente.

Segundo MÉDAILLE et al. (2006), a média da contagem de leucócitos aumentou após 24 horas de estocagem, sem diferenças estatisticamente significativas.

GULATI et al. (2002) avaliaram as alterações nas contagens global e diferencial de leucócitos durante a estocagem de sangue humano em EDTA à temperatura ambiente, por sete dias, e observaram alterações na contagem diferencial de leucócitos nas primeiras 24 horas, incluindo aumento progressivo de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos e diminuição dos monócitos.

2.4 Influência do período de estocagem e da temperatura do sangue nas características plaquetárias

PASTOR et al. (1997) observaram que os valores das plaquetas diminuíram com o tempo, sendo que, nas amostras refrigeradas, as diferenças não foram significativas, contudo, foi observada uma diminuição progressiva na contagem de plaquetas estocadas sob refrigeração.

Segundo MÉDAILLE et al. (2006), ocorreu diminuição significativa na contagem de plaquetas após estocagem à temperatura ambiente decorridas 24 horas.

Já FURLANELLO et al. (2006) relataram que a contagem de plaquetas diminuiu significativamente após 36 horas de estocagem, à temperatura ambiente, e se manteve constante nas amostras refrigeradas.

2.5 Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela incapacidade dos rins em realizar as funções de excreção, controle e síntese, em razão da perda irreversível de néfrons ao longo de meses a anos. A falha da função excretora provoca a retenção de nitrogênio uréico, creatinina, fósforo, e outras substâncias excretadas por filtração glomerular (GRANT, 2006).

Uma insuficiência renal que progride rapidamente, ou seja, em menos de 3 meses, deve ser classificado como Insuficiência Renal Aguda, em contraste com a azotemia estável da insuficiência renal crônica, com taxa de filtração glomerular constante, sintomas urêmicos presentes por mais de um mês e poliúria (MADDOUGALL, 1988).

Algumas raças são predispostas em razão da doença renal crônica congênita ou familiar. No entanto, a maior parte dos cães e gatos com DRC possui idade avançada e doença adquirida, seja resultante de doenças infecciosas ou inflamatórias (Lesão glomerular imunomediada, secundária a esse quadro, normalmente evolui para DRC), amiloidose, substâncias nefrotóxicas e doença glomerular idiopática ou tubulointersticial. O comprometimento da capacidade dos rins em controlar o equilíbrio hidroeletrolítico e acidobásico ocasiona poliúria e polidipsia, hipocalemia, e acidose metabólica, bem como outras anormalidades. A incapacidade dos rins em sintetizar calcitriol causa hiperparatireoidismo renal secundário (GRANT, 2006).

2.6 Reflexos da Doença Renal Crônica no sangue

A anemia na doença renal Crônica é caracterizada por hemácias normocíticas e normocrômicas. A contagem de reticulócitos é baixa para o grau de anemia, e a medula óssea apresenta anemia hipoplástica eritróide, sem interferência na leucopoiese ou na megacariocitopoiese (REMUZZI et al, 2004).

Em pacientes com DRC, a anemia é multifatorial e pode ser exacerbada por doenças concomitantes. Entre os fatores resultantes da DRC estão, o tempo reduzido de vida das hemácias, anormalidades nutricionais (deficiência de ferro e a perda gastrointestinal crônica de sangue), plasma urêmico (que acaba inibindo a eritropoiese), perdas ocultas de sangue, mielofibrose e deficiência de eritropoetina, uma vez que os fibroblastos peritubulares do córtex renal são a maior fonte de sua síntese (POLZIN et al, 2005).

As hemácias de pacientes urêmicos são intrinsicamente normais, uma vez que estudos mostraram que hemácias de pessoas normais possuem um tempo de vida reduzido após transfusão a pacientes urêmicos, enquanto hemácias de pacientes urêmicos possuíram um tempo de vida normal em pacientes saudáveis. Em humanos, além de restaurar a eritropoiese, terapias com eritropoetina recombinante humana (rhEPO), trouxeram aos eritrócitos sua sobrevida e viabilidade normais. Outro fator importante na diminuição do tempo de vida das hemácias é a peroxidação lipídica da membrana da célula, cujo motivo pode ser a atividade antioxidante defeituosa durante a uremia (REMUZZI et al, 2004).

A quimiotaxia leucocitária se encontra prejudicada durante a uremia. Entretanto a atividade granulocitária se mostra normal (Abruptyn et al, 1977), e estudos mais recentes sugerem que a uremia está associada a um aumento na ativação de granulócitos (REMUZZI et al, 2004).

Dados clínicos e experimentais sugerem a possibilidade que a tendência hemorrágica da uremia está associada com o excesso de formação de óxido nítrico, uma molécula vasoativa potente. Pacientes com doença crônica renal possuem uma agregação plaquetária precária associada a essa síntese de óxido nítrico acima do normal (REMUZZI et al, 2004).

3. OBJETIVOS

Considerando o apelo cada vez mais presente da adoção de boas práticas de laboratório para o alcance de resultados clínico-patológicos que se afigurem como exatos e precisos, bem como considerando as dificuldades impostas por amostras biológicas não representativas, ao diagnóstico clínico-patológico seguro e confiável, concebeu-se este ensaio com o fito de avaliar a influência do tempo e da temperatura de estocagem nas características eritro, leuco e trombométricas (contagem global de hemácias, leucócitos, plaquetas e reticulócitos, bem como os valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média) de amostras do sangue de cães doentes renais crônicos, estocadas à temperatura ambiente (25°C) ou sob refrigeração (4°C), bem como em diferentes momentos do período de estocagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas amostras de sangue de cães atendidos pelo Serviço de Nefrologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal. Os cães passaram por exame clínico, quando então eram colhidas amostras de sangue para os exames hematológico e bioquímico, bem como urina para a urinálise.

O estadiamento da doença renal crônica dos animais foi realizado de acordo com os resultados da mensuração da pressão sanguínea e nível de creatinina no soro, de acordo com os parâmetros impostos pela International Renal Interest Society (IRIS) e mensurados pelo sistema de diagnóstico Labtest, por espectrofotômetro semi automático (Labquest):

Estágio 2 = 1,4 a 2,0 mg/dL;

Estágio 3 = 2,1 a 5,0 mg/dL;

Estágio 4 = Acima de 5,0 mg/dL.

O estágio 1 da doença renal crônica não foi utilizada, uma vez que os animais raramente apresentam sinais clínicos e, portanto, é identificável somente sob acompanhamento clínico intensivo do cão, com consecutivas análises bioquímicas e urinálises.

Animais que se encontravam hígidos eram separados para o grupo controle. Foram separados no total seis amostras para cada um dos estágios da DRC e seis amostras de cães hígidos para controle, fazendo um total de 24 amostras de sangue

4.2 Hemograma

Logo após a colheita, as amostras de sangue, conservadas em anticoagulante EDTA-K3, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do referido hospital veterinário, onde as características eritro, leuco e trombométricas foram obtidas com auxílio de um contador automático de células (ABC-VET), e o esfregaço sanguíneo confeccionado e corado com uma mistura de metanol, May-Grunwald

e Giemsa – MGG, para obtenção da fórmula leucocitária relativa. As amostras foram também coradas com Azul Brilhante de Cresil para contagem de reticulócitos no microscópio óptico.

As amostras, após a primeira análise, foram divididas em duas frações, que foram armazenadas sob temperatura ambiente (25°C) e temperatura de refrigeração (4°C), respectivamente. As características eritro, leuco e trombométricas das amostras em questão foram determinadas após quatro, oito, vinte e quatro, quarenta e oito e setenta e duas horas, do período de estocagem.

4.3 Grupos

Para facilitar a interpretação dos dados, ao se analisar os resultados, as amostras foram separadas nos seguintes grupos experimentais:

G1: cães hípidos, cujas amostras foram conservadas a 4 °C (n=6);

G2: cães hípidos, cujas amostras foram conservadas a 25 °C (n=6);

G3: cães no estágio 2, cujas amostras foram conservadas a 4 °C (n=6);

G4: cães no estágio 2, cujas amostras foram conservadas a 25 °C (n=6);

G5: cães no estágio 3, cujas amostras foram conservadas a 4 °C (n=6);

G6: cães no estágio 3, cujas amostras foram conservadas a 25 °C (n=6);

G7: cães no estágio 4, cujas amostras foram conservadas a 4 °C (n=6);

G8: cães no estágio 4, cujas amostras foram conservadas a 25 °C (n=6).

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos para cada parâmetro hematológico foram devidamente tabulados, ao longo dos diferentes momentos de avaliação, e submetidos a um delineamento inteiramente casualizado, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS), versão 9. A normalidade dos dados foi checada. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se a transformação $\log(\text{obs} + 1)$ (SNEDECOR & COCHRAN, 1987).

6. RESULTADOS

Como mostrado na tabela (Apêndice 1), segundo o estadiamento da DRC do animal, quase todas as variáveis foram significativas, excetuando pela variável Basófilos, que mostra uma enorme coeficiência de variação. Porém, a relevância dessa informação será melhor detalhada adiante.

De acordo com a temperatura, apenas as variáveis Leucócitos, Neutrófilos Segmentados e Linfócitos não demonstraram resultados significativos. Com o Tempo, os resultados foram parecidos, apenas não sendo significativos para Basófilos, Eosinófilos e Linfócitos.

Analisando a interação Estágio x Temperatura, entretanto, das quinze variáveis, apenas Reticulócitos, Volume Corpuscular Médio, Hemoglobina Corpuscular Média, Leucócitos, Neutrófilos segmentados e Plaquetas se mostraram significativas. Algo similar ocorre na interação Estágio x Tempo, onde apenas as variáveis Reticulócitos, Hemoglobina, Volume Corpuscular Médio, Basófilos, Eosinófilos e Neutrófilos Bastonetes se mostraram significativos.

A interação Temperatura x Tempo, como esperado, se mostrou significativo na maioria das variáveis, excetuando Hemoglobina, Basófilos, Eosinófilos, Neutrófilos Segmentados, Linfócitos e Plaquetas.

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Apesar de estatisticamente significativas, o estadiamento da doença renal crônica não deve ser levado em conta, a menos que relacionada com o tempo ou temperatura. Sua variação decorre da diferença do estado de saúde dos animais no momento em que o sangue foi coletado que, desde o início do experimento, já apresentavam anemia e valores maiores no leuco e trombograma, ainda que dentro da normalidade e portanto não caracterizando leucocitose e trombocitose.

Segundo a temperatura, apenas valores relativos ao leucograma não foram significativos. Enquanto as variáveis Neutrófilos segmentados e Linfócitos podem ser apenas um reflexo da variável Leucócitos. Esse dado discorda apenas dos achados de PASTOR et al. (1997), que relatou a diferença na alterações dos valores leucocitários a 25° e a 4°C.

Todas as variáveis foram significativas, dependendo de quantas horas após a coleta as amostras de sangue foram examinadas. As variáveis Basófilos e Eosinófilos não foram significativas, porém tendem a ser variáveis com um alto coeficiente de variação. A contagem de linfócitos, apesar de aumentar com o tempo, não foi significativa, portanto, corroborando apenas em parte com os achados de GULATI et al. (2002).

7.1 Hemácias

Na contagem global de hemácias, não houve diferença significativa nas interações Estágio x Tempo e Estágio x Temperatura (Apêndices 1 e 2). A tendência foi a mesma tanto para animais saudáveis quanto para doentes: estáveis a temperatura de resfriamento, mas com uma redução significativa à temperatura ambiente partir de 24 horas. Os dados sobre a contagem de hemácias corrobora com MÉDAILLE et al. (2006), porém, em parte discordam com PASTOR et al. (1997) e COELHO (2006), que relataram a estabilidade de hemácias tanto a 4°C quanto a 25°C.

7.2 Reticulócitos

Na contagem de reticulócitos, todas as interações foram significativas. A tendência na variação dos valores foi comparável a das hemácias: estabilidade a 4°C e redução dos valores com o tempo a 25°C. Porém, com o estadiamento avançado da doença renal crônica, os valores sofreram uma redução mais sutil a 25°C, onde passaram a não ser estatisticamente significativas (Apêndice 3).

Ocorre uma maturação *in vitro* dos reticulócitos durante a estocagem de sangue periférico (COWGILL et al., 2003). Segundo THRALL et al. (2004), a maturação dos reticulócitos envolve uma contínua e progressiva perda de organelas. À medida que os reticulócitos perdem suas organelas, a identificação dessas células é dificultada, uma vez que diminuem os pontos basofílicos formados no citoplasma através da precipitação das organelas após utilização de corantes supravitais, o que condiz com a diminuição das células.

Porém, é possível que a reduzida variação do valor de reticulócitos em um alto estadiamento da doença renal crônica seja decorrente do menor nível de maturação dos reticulócitos presentes no sangue. Essa teoria é suportada por BUTTHERP et al. (2000) que analisou reticulócitos na insuficiência renal crônica e encontrou também um aumento significativo na quantidade de organelas presentes nos reticulócitos desses pacientes.

7.3 Hemoglobina

Nos valores de hemoglobina, apenas a interação Estágio x Tempo foi significativa. Entretanto, na comparação das médias e desvios-padrão dos valores (Apêndice 4), não houve nenhuma alteração notável nos valores que explique essa significância.

A tendência dos valores é de um pequeno aumento decorrida as 72 horas, o que somente corrobora com os achados de FURLANELLO et al. (2006). Porém, analisando cada um dos grupos na comparação das médias, apenas 4 destes variaram significativamente (G1, G3, G7 e G8), portanto, a tendência ao valor de

hemoglobina se manter estável, citado por PASTOR et al. (1997), MÉDAILLE et al. (2006) e COELHO (2006) pode ser aplicado a este estudo.

7.4 Hematócrito

A variação do valor de hematócrito se mostrou significativa apenas na interação Temperatura x Tempo. Os valores começaram a apresentar aumento no valor após 48 horas, o que condiz com os achados de PASTOR et al. (1997) e COELHO (2006). Entretanto, contrariando os autores supracitados, observou-se uma maior alteração em amostras estocadas a 4°C do que nas amostras estocadas a 25°C (Apêndice 5).

7.5 Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM aumentou significativamente após 24 horas em amostras estocadas a 25°C. Nas amostras estocadas a 4°C, a elevação significativa ocorreu somente após 72h em todos os grupos experimentais. Esses achados corroboram em parte com os achados de PASTOR et al. (1997), FURLANELLO et al. (2006) e COELHO (2006) que relataram variações significativas a 4°C apenas 24, 12 e 36 horas após a coleta, respectivamente.

Todas as interações foram significativas para essa variável. Quanto ao estadiamento da doença renal crônica do animal, quanto mais avançado o estágio, observa-se valores iniciais e após as 72 horas mais baixos comparado ao grupo de animais hígidos (Apêndice 6). Apesar da anemia da doença crônica renal ser classificada como normocítica, é justo lembrar que as hemácias se encontram em uma situação precária de vida e viabilidade (REMUZZI et al, 2004).

A elevação do VCM durante a estocagem é causada pelo aumento do conteúdo de fluido no interior das hemácias, levando a redução do volume plasmático. O aumento do volume eritrocitário e diminuição do volume plasmático são possíveis causas do aumento do hematócrito (MÉDAILLE et al, 2006).

7.6 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Os valores de HCM se mantiveram estáveis a 4°C, e aumentaram significativamente a partir de 24 horas a 25°C. Esses dados discordam tanto de PASTOR et al. (1997), que relatou estabilidade em ambas as temperaturas por 72 horas, quanto de COELHO (2006), que relatou, nas amostras estocadas a 25°C, aumento após 12 horas, mas redução a partir de 48 horas.

Houveram variações significativas nas interações Estágio x Temperatura e Temperatura x Tempo. É possível observar que o maior estadiamento da doença crônica do animal resulta em uma variação maior após 72 horas da coleta em amostras a 25°C (Apêndice 7).

7.7 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Nos valores de CHCM, houve apenas uma variação significativa dentro da interação Temperatura x Tempo. Na comparação de médias (Apêndice 8), apenas os valores provenientes de amostras de cães hípidos, tanto armazenados a 4°C e a 25°C, mostraram uma redução estatisticamente significativa, após 48 horas, enquanto as demais se mantiveram estáveis. Este achado corrobora parcialmente do que foi relatado por FURLANELLO et al. (2006), que relatou uma redução logo após 12 horas, e por COELHO (2006), que relatou redução após 24 horas nas amostras a 25°C e redução após 36 horas em um grupo de amostras estocadas a 4°C.

7.8 Leucócitos

A contagem global de leucócitos mostrou uma variação significativa com o tempo, e com as interações Estágio x Temperatura e Temperatura x Tempo. As amostras conservadas a 4°C apresentaram valores maiores com o tempo que as amostras conservadas à temperatura ambiente (Apêndice 9). Do mesmo modo, um maior estadiamento da doença renal crônica do animal resultou em uma

diferença menor nos resultados entre as amostras estocadas nas duas temperaturas.

Apesar de na comparação de médias o dado não ser estatisticamente significativo para seis dos oito grupos, com o tempo, a contagem mostrou uma elevação no número de leucócitos. Esse achado discorda de grande parte dos autores, como FURLANELLO et al. (2006), que relatou uma redução na contagem após 48 horas, e GULATI et al. (2002) e COELHO (2006), que relataram estabilidade na contagem por um período de até 96 horas. Apenas PASTOR et al. (1997) e GREEN et al. (1976) relataram aumento no número de leucócitos. Uma explicação para esse fator pode ser a possível perda de líquidos do plasma na amostra de sangue, seja para o ambiente, para a parede e tampa do tubo vacutainer durante a homogeneização ou para as hemácias (que apresentaram aumento no volume) resultando em uma maior concentração de leucócitos na amostra. GREEN et al. (1976) também teorizou que, possivelmente esse aumento pode ser devido à contaminação da amostra ou devido à degeneração leucocitária, onde o contador automático pode interpretar erroneamente fragmentos destes leucócitos.

Sendo esse aumento na contagem de leucócitos apenas um artefato do processamento da amostra, pode-se teorizar que, no estadiamento avançado da doença renal crônica, o aumento sutil do valor de leucócitos era na verdade reflexo de uma degeneração leucocitária mais rápida, comparado a contagem de leucócitos de cães hípidos.

7.9 Plaquetas

Na contagem de plaquetas, três grupos de amostras (G1, G3 e G7), todas armazenadas a 4°C, apresentaram redução estatisticamente significativas 4 horas após a coleta, que se estendeu até as 72 horas (Apêndice 10). Os outros grupos apresentaram redução não significativa dos valores. Esses dados corroboram em parte com os achados de MEDÁILLE et al. (2006) e COELHO (2006), que relatam redução na contagem 24 horas após a coleta; e FURLANELLO et al. (2006), que

encontraram redução na contagem de plaquetas após 36 horas de armazenamento.

PASTOR et al. (1997) afirma que a diminuição na contagem de plaquetas ocorre devido a agregação plaquetária. OLSEN et al. (2001) relata que, em humanos, a formação destes agregados ocorre com menos frequência, nas amostras estocadas à temperatura ambiente que nas amostras refrigeradas, isto pois, têm sido proposto que as plaquetas são ativadas quando entram em contato com o EDTA em baixas temperaturas. Essa informação corrobora com os resultados do presente trabalho. As amostras foram examinadas dez minutos após retornarem a temperatura ambiente, tempo diferente utilizado por PASTOR et al (1997), que as mantinha cinco minutos em temperatura ambiente, e FURLANELLO et al. (2006), que processava as amostras após deixá-las trinta minutos em temperatura ambiente.

8. CONCLUSÕES

Com o referido estudo, podemos chegar às seguintes conclusões:

- 1- Deve-se processar a amostra de sangue para hemograma:
 - Dentro de no máximo 8 horas em temperatura ambiente.
 - Dentro do prazo de até 48 horas em temperatura de refrigeração, a 4 °C.
- 2- Amostras de sangue refrigeradas devem permanecer mais de dez minutos em temperatura ambiente antes da análise, para evitar contagens subestimadas do número de plaquetas.
- 3- O estadiamento da doença renal crônica não mostrou grande influência nos parâmetros eritrocitários, quando comparado às amostras de animais sadios. Os reticulócitos mostraram uma pequena alteração significativa, que pode ser resultado da maturação tardia causada pela DRC.
- 4- Não se pode tirar conclusões definitivas sobre a influência da DRC no leucograma. A princípio, nenhuma alteração significativa foi observada entre animais sadios e doentes renais crônicos.
- 5- Não houve alteração significativa na contagem de plaquetas nos diferentes estágios da doença renal crônica.

9. REFERÊNCIAS

ABRUPTYN, E., SOLOMONS N.W., CLAIR L.S.T., et al; Granulocyte function in patients with chronic renal failure: surface adherence, phagocytosis and bactericidal activity in vitro. **J Infect Dis** 135: 1-8, 1977

BAILEY, D.N.; BOVE, J. R. Chemical and hematological changes in stored CPD blood. **Transfusion**, Philadelphia, 15(3), 244-249, 1975

BUTTHERP, P.; JINDADAMRONGWECH, S.; KAEWKETHONG, P.; PANYAYUTHO, B.; WISEDPANICHKIJ, R.; BUNYARATVEJ, A. Reticulocyte analysis in systemic lupus erythematosus and chronic renal failure using flow cytometry. **Asian Pac J Allergy Immunol**. 2000 Mar;18(1):23-7.

COELHO, P. S. **Influência do tempo, temperatura e recipiente de estocagem nas características do hemograma de cães adultos** / Patrícia Sampaio Coelho. Jaboticabal: [s.n.], 2006 xxi, 59 f. : il. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

COWGILL, E.S.; NEEL, J.A.; GRINDEM, C.B. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. **Veterinary Clinical of Small Animals**, 33, 1223-1244, 2003.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. MAHAFFEY, E. **Veterinary laboratory medicine**. 3^a ed. Iowa:Ames, 1994. 300p.

ELLIOT, K. et al. Visualizing the hemolytic transfusion reaction. **Transfusion**, 43, 297, 2003.

FAGLILOLO, E.; MORES, N.; PELLICCETTI, A. Biochemical parameters to assess viability of blood stored for transfusion use. **Folia Haematol.**, Leipzig, 113, 783-789, 1986.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, C. N. **Schalm's veterinary hematology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott William e Wilkins, 2000. 1344p.

FIGHERA, R. A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria, 2001. 214p.

FURLANELLO, T; TASCA, S.; CALDIN, M.; PATRON, C.; TRANQUILLO, M.; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Artifactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. **Veterinary Clinical Pathology**, 35(1), 42-46, 2006.

GRANT, D.; FORRESTER S.D. in BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos animais**. Capítulo 77, pg 888-889. 3^oEd Elsevier Inc., New York, New York, USA, 2006 .

GREEN, H.H.; ATKINSON, S.M.; CARLOS, B.; SOBOL, B. Investigational studies of selected hematological parameters in fresh and mailed blood of six species of domestic animals. **Canadian Veterinary Journal**, 17 (8), 213-215,1976.

GULATI, G. L.; HYLAN, L. J.; KOCHER, W.; SCHWARTING, R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 126, 336-342, 2002.

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

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária – bioquímica, clínica e hematologia**. 2^a ed. Roca: São Paulo, 2003. 436p.

MACDOUGALL, D.F. in MICHELL, A.R. **Renal Disease in Dogs and Cats**, Cap. 3, pg 75-94. Blackwell Scientific Publications, 1988.

MÉDAILLE, C.; BRIEND-MARCHAL, A.; BRAUN, J. P. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. **Veterinary Clinical Pathology**, 35(1), 18-23, 2006.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária**. 1ª ed. Roca: São Paulo, 1995. 270p.

PASTOR, J.; CUENCA, R.; VELARDE, R.; VIÑAS, L.; LAVIN, S. Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. **Veterinary Clinical Pathology**, 26(3), 138-147, 1997.

POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; JACOB, F.; ROSS, S. in ETTINGER, S. J.; FELDMAN E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Capítulo 169, pg 1721-1749. 6ª Ed. Elsevier Saunders: St. Louis, 2005.

REBAR, A. H. **Hemogram interpretation for dogs and cats**. Checkboard Square: Ralston Purina Company, 1998. 89p.

REBAR, A. H.; MACWILLIAMS, P. S.; FELDMAN, B. F.; METZGER, F. L.; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. 1ª ed. Roca: São Paulo, 2003. 291p.

REMUZZI, G.; SCHIEPPATI, A.; LUIGI, M. in BRENNER, B.M; **The Kidney**, 7ªEd. Cp 46, pg 2165-2188 The Curtis Center, Independence Square West, Philadelphia, Pennsylvania, 2004.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. 6ed. Ames: Iowa State University Press, 1987. 593p.

SAS INSTITUTE, SAS user's guide: statistics. Cary, 1985, 956p.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Willian e Wilkins, 2004. 518p.

Apêndice 1 - Valores mínimos significativos (valor de p^{α}) do teste F da ANOVA (Delineamento inteiramente casualizado) para as variáveis Hemácias, Reticulócitos, Hemoglobina, Hematócrito, Volume corpuscular médio, Hemoglobina corpuscular média, Concentração de hemoglobina corpuscular média, Leucócitos, Basófilos, Eosinófilos, Neutrófilos Bastonete, Neutrófilos Segmentados, Linfócitos, Monócitos e Plaquetas (Jaboticabal, 2011).

Variáveis	CV (%)	Estágio (DRC)	Temperatura	Tempo	Estágio x Temperatura	Estágio x Tempo	Temperatura x Tempo
Hemácias	1,3832	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,2466	0,0994	< 0,0001
Reticulócitos	9,1451	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0048	0,0190	0,0010
Hemoglobina	0,8484	< 0,0001	0,0059	< 0,0001	0,4051	0,0270	0,2045
Hematócrito	09516	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,5305	0,2049	< 0,0001
VCM	0,1601	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0164	< 0,0001	< 0,0001
HCM	0,8070	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0035	0,1291	< 0,0001
CHCM	1,5477	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,1601	0,1144	0,0160
Leucócitos	2,6132	< 0,0001	0,5799	0,0002	0,0147	0,2605	0,0445
Basófilos*	124,15	0,2105	0,0240	0,6127	0,5183	0,0398	0,2802
Eosinófilos*	2,4118	< 0,0001	0,0099	0,1012	0,6015	0,0053	0,1748
Neutrófilos Bastonetes*	3,8145	< 0,0001	0,0091	0,0108	0,5356	0,0179	0,0362
Neutrófilos segmentados	3,0654	< 0,0001	0,9563	0,0001	0,0285	0,3296	0,5460
Linfócitos	8,9915	< 0,0001	0,8879	0,0541	0,9104	0,3311	0,3284
Monócitos*	4,1480	0,0009	0,0042	0,0039	0,0845	0,7312	0,0070
Plaquetas	4,2812	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0415	0,7369	0,1340

$^{\alpha}$ $p < 0,05$ valor significativo a 5%, $p < 0,01$ valor significativo a 1%, $p > 0,05$ valor não significativo a 5%.

* Valores transformados em log (obs+1).

Apêndice 2 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem global de Hemácias (He 10³/mm³) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4 °C), G2 (Hígido, 25 °C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4 °C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25 °C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4 °C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4 °C) e G8 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)				
		4	8	24	48	72
G1	7030 ±358a	7223 ±323a	6920 ±339a	6951 ± 418a	6993 ±369a	7025 ±337a
G2	7030 ±358a	6961 ±381a	6885 ±459ab	6443 ±612bc	6258 ±407c	6295 ±364c
G3	6101 ±1281a	6191 ±1294a	6056 ±1222a	6130 ±1257a	6131 ±1230a	6135 ±1249a
G4	6101 ±1281a	6020 ±1212a	6016 ±1225a	5448 ±1104b	5461 ±1166b	5451 ±1101b
G5	4443 ±1285a	4455 ±1178a	4458 ±1210ab	4488 ±1178ab	4491 ±1274ab	4630 ±1223b
G6	4443 ±1285a	4328 ±1263ab	4218 ±1198abc	3986 ±1213c	4001 ±1184c	4066 ±1156bc
G7	4066 ±1744a	4033 ±1698a	4000 ±1673a	4016 ±1702a	4040 ±1678a	4085 ± 1655a
G8	4066 ± 1744a	3873 ±1711ab	3801 ±1649ab	3598 ±1447b	3621 ±1439b	3670 ±1542b

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 3 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem de Reticulócitos (Ret/mm³) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 de DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	19166 ±8588a	16666 ±6088a	20000 ±9316a	17833 ±8542a	15000 ±7563a	18166 ±7730a	
G2	19166 ±8588a	17666 ±10462a	17000 ±9165a	14333 ±11792ab	9500 ±5128b	9000 ±5932b	
G3	26166 ±21235a	27000 ±23332a	31666 ±24063a	29166 ±19589a	26833 ±19508a	21166 ±15715a	
G4	26166 ±21235a	24000 ±23134ab	21333 ±17862ab	21166 ±15144ab	16333 ±11465ab	11333 ±7607b	
G5	13833 ±18925a	12833 ±12906a	10500 ±8043a	10500 ±10134a	11500 ±12533a	11166 ±15664a	
G6	13833 ±18925a	10000 ±9143a	8333 ±7788a	8166 ±10609a	9000 ±11384a	5500 ±6503a	
G7	15333 ±15552a	13833 ±9988a	13500 ±10616a	16500 ±14237a	14166 ±10666a	14333 ±15819a	
G8	15333 ±15552a	15333 ±15933a	11666 ±10856a	10500 ±7007a	11333 ±12011a	9666 ±9330a	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 4 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Hemoglobina (Hb g %) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 de DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Momentos (horas)					
	Após a coleta	4	8	24	48	72
G1	15,56 ±1,04ab	16,28 ±0,90a	15,36 ±1,12b	15,80 ±1,28ab	15,78 ±1,11ab	15,80 ±1,22ab
G2	15,56 ±1,04a	15,83 ±0,93a	15,41 ±1,08a	15,61 ±1,31a	15,25 ±1,18a	15,86 ±1,11a
G3	12,61 ±2,65a	12,85 ±2,73ab	12,70 ±2,73a	12,90 ±2,66ab	12,93 ±2,87ab	13,10 ±2,80b
G4	12,61 ±2,65a	12,83 ±2,67a	12,71 ±2,77a	12,61 ±2,58a	12,80 ±2,79a	13,05 ±2,78a
G5	9,96 ±2,91a	10,06 ±2,91a	9,98 ±2,78a	10,18 ±2,88a	10,30 ±2,88a	10,36 ±2,92a
G6	9,96 ±2,91a	10,06 ±2,93a	9,90 ±2,81a	10,00 ±2,82a	10,16 ±2,93a	10,26 ±2,84a
G7	9,03 ±3,05a	9,08 ±3,00a	9,11 ±3,08ab	9,20 ±3,06ab	9,35 ±3,18b	9,36 ±3,14b
G8	9,03 ±3,05ab	9,21 ±3,19abc	9,00 ±3,13a	9,05 ±3,07abc	9,30 ±3,36bc	9,33 ±3,18c

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 5 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Hematócrito (Ht %) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4 °C), G2 (Hígido, 25 °C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4 °C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25 °C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4 °C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4 °C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25 °C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)				
		4	8	24	48	72
G1	49,00 ±3,25a	50,50 ±2,31a	48,26 ±3,08a	49,00 ±3,65a	49,80 ±3,50a	50,50 ±3,32a
G2	49,00 ±3,25ab	48,83 ±3,26ab	48,35 ±3,70ab	46,80 ±4,69b	48,08 ±3,85ab	50,85 ±3,16a
G3	40,43 ±8,81ab	41,03 ±8,94ac	40,03 ±8,38b	41,10 ±8,85ac	41,65 ±8,88cd	42,16 ±8,96d
G4	40,43 ±8,81ab	40,13 ±8,46ab	40,25 ±8,57ab	37,90 ±7,81b	40,10 ±8,69ab	41,80 ±8,73a
G5	31,06 ±9,09a	31,18 ±8,43a	31,20 ±8,61a	31,70 ±8,72a	32,11 ±9,44ab	33,33 ±9,09b
G6	31,06 ±9,09ab	30,45 ±9,15ab	29,85 ±8,69b	29,06 ±9,16b	30,80 ±9,72ab	32,46 ±9,57a
G7	27,83 ±10,40ab	27,66 ±10,21b	27,45 ±10,02b	27,73 ±10,35b	28,26 ±10,49ab	28,95 ±10,44a
G8	27,83 ±10,40ab	26,78 ±10,44ab	26,40 ±10,04b	25,78 ±9,17b	27,18 ±9,93ab	28,70 ±11,00a

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 6 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Volume Corpuscular médio (fm³) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	69,66 ±2,06a	69,83 ±1,94a	69,50 ±2,34ab	70,50 ±2,34bc	71,16 ±2,48c	72,00 ±2,28d	
G2	69,66 ±2,06a	70,16 ±1,94a	70,16 ±1,94a	73,00 ±2,28b	76,83 ±2,56c	79,66 ±2,33d	
G3	66,00 ±3,22a	66,16 ±3,31a	66,00 ±3,22a	67,00 ±3,52ab	67,83 ±4,16bc	68,66 ±4,13c	
G4	66,00 ±3,22a	66,66 ±3,38a	67,00 ±3,22a	69,50 ±3,72 b	73,50 ±4,32c	76,66 ±4,36d	
G5	70,16 ±4,40a	70,00 ±4,24a	70,00 ±4,14a	70,50 ±4,67a	70,83 ±4,62a	72,00 ±4,81b	
G6	70,16 ±4,40a	70,16 ±4,57a	70,66 ±4,54a	72,50 ±4,23b	76,33 ±4,32c	79,66 ±3,88d	
G7	69,50 ±3,39a	69,66 ±3,38a	69,66 ±3,50a	70,00 ±3,09ab	70,50 ±3,27b	71,50 ±3,27c	
G8	69,50 ±3,39a	69,83 ±3,54a	70,33 ±3,61a	72,50 ±3,78b	75,66 ±2,87c	78,83 ±3,54d	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 7 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para Hemoglobina Corpuscular Média (pg) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 de DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	22,13 ±0,73a	22,56 ±1,02a	22,20 ±1,06a	22,68 ±1,16a	22,53 ±0,84a	22,46 ±0,91a	
G2	22,13 ±0,73a	22,71 ±0,99a	22,41 ±0,85a	24,30 ±1,45b	24,33 ±1,20b	24,93 ±1,98b	
G3	20,65 ±1,01a	20,78 ±0,86a	20,91 ±1,05a	21,03 ±0,94a	21,00 ±0,95a	21,30 ±1,41a	
G4	20,65 ±1,01a	21,28 ±0,89a	21,08 ±0,94a	23,15 ±1,86b	23,43 ±1,95b	23,90 ±1,53b	
G5	22,38 ±1,49a	22,46 ±1,93a	22,40 ±2,09a	22,51 ±1,96a	22,91 ±1,75a	22,30 ±2,54a	
G6	22,38 ±1,49a	23,26 ±2,25a	23,41 ±2,47a	25,23 ±1,44b	25,41 ±0,82b	25,31 ±1,56b	
G7	22,80 ±1,72a	23,06 ±1,86a	23,33 ±1,99a	23,50 ±2,09a	23,56 ±1,66a	23,38 ±1,47a	
G8	22,80 ±1,72a	24,38 ±2,69ab	24,35 ±2,66ab	25,60 ±1,67b	25,90 ±1,00b	26,05 ±1,86b	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 8 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para os valores de Concentração de Hemoglobina Corpúscular média (g/dl) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4°C), G2 (Hígido, 25°C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4°C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25°C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4°C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25°C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4°C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25°C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	31,75 ±0,32ab	32,25 ±0,88a	31,81 ±0,68ab	32,21 ±0,89a	31,70 ±0,67ab	31,26 ±0,43b	
G2	31,75 ±0,32ab	32,41 ±0,91ab	31,91 ±0,51ab	33,43 ±1,26a	31,68 ±1,36ab	31,23 ±1,85b	
G3	31,30 ±0,81a	31,41 ±0,57a	31,70 ±0,44a	31,43 ±0,73a	31,45 ±0,50a	31,00 ±0,35a	
G4	31,30 ±0,81a	32,00 ±1,28a	31,56 ±1,17a	33,33 ±1,78a	31,85 ±0,93a	31,18 ±1,21a	
G5	32,06 ±0,81a	32,13 ±1,23a	32,01 ±1,45a	31,95 ±1,19a	32,23 ±1,02a	30,95 ±1,48a	
G6	32,06 ±0,81a	33,16 ±2,31ab	33,20 ±2,68ab	34,81 ±1,72b	33,28 ±1,53ab	31,75 ±0,77a	
G7	32,81 ±1,58a	33,15 ±1,39a	33,48 ±1,90a	33,55 ±2,08a	33,28 ±1,52a	32,65 ±1,04a	
G8	32,81 ±1,58a	34,70 ±3,20a	34,51 ±2,83a	35,30 ±1,19a	34,28 ±1,20a	33,00 ±1,80a	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 9 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem global de Leucócitos (Le/mm³) dos cães dos grupos G1 (Hígido, 4 °C), G2 (Hígido, 25 °C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4 °C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25 °C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4 °C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4 °C) e G8 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	7100 ±1559a	7150 ±1521a	7166 ±1706a	7583 ±1698a	7783 ±2127a	8683 ±2371b	
G2	7100 ±1559a	7383 ±1514a	7316 ±1330a	7766 ±1342a	7700 ±1795a	7666 ±1416a	
G3	10050 ±3854a	10350 ±3994ab	10250 ±3840ab	10783 ±4006abc	11216 ±4353bc	11633 ±3985c	
G4	10050 ±3954a	10316 ±4046a	10816 ±4468a	10766 ±4414a	10766 ±4540a	10733 ±4485a	
G5	11250 ±5261a	11100 ±5020a	11250 ±5094a	11050 ±5073a	11016 ±5221a	11083 ±5149a	
G6	11250 ±5261a	11250 ±5007a	11516 ±5264a	12033 ±5341a	11583 ±5341a	11533 ±5300a	
G7	8100 ±2725a	8150 ±3115a	8150 ±2893a	8383 ±3301a	8716 ±2976a	8950 ±2985a	
G8	8100 ±2725a	8350 ±3083a	8200 ±2830a	8300 ±2989a	8283 ±3156a	8200 ±2924a	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Apêndice 10 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagem de Plaquetas (PI/ mm³) dos cães dos grupos dos grupos G1 (Hígido, 4 °C), G2 (Hígido, 25 °C), G3 (Estágio 2 de Doença Crônica Renal[DRC], 4 °C), G4 (Estágio 2 de DRC, 25 °C), G5 (Estágio 3 de DRC, 4 °C), G6 (Estágio 4 de DRC, 25 °C), G7 (Estágio 4 de DRC, 4 °C) e G8 (Estágio 4 da DRC, 25 °C), nos diferentes momentos (horas) de conservação das amostras de sangue (Jaboticabal, 2011).

Grupos	Após a coleta	Momentos (horas)					
		4	8	24	48	72	
G1	288333 ±63006a	243666 ±55823b	230833 ±49961b	225666 ±54580b	224000 ±43418b	199833 ±37306b	
G2	288333 ±63006a	269166 ±60396a	266166 ±55718a	252333 ±36658a	262333 ±77531a	277500 ±61937a	
G3	366000 ±249745a	330166 ±239120ab	337833 ±232200ab	325333 ±241866ab	300500 ±219408b	297000 ±210193b	
G4	366000 ±249745a	349500 ±245351a	357166 ±231867a	336833 ±195036a	319333 ±183281a	328000 ±178368a	
G5	375666 ±109095a	357500 ±82495a	335500 ±65540a	334166 ±56414a	340833 ±78667a	347833 ±86921a	
G6	375666 ±109095a	375166 ±112059a	361333 ±94001a	356166 ±89091a	333500 ±75418a	330333 ±75380a	
G7	350833 ±195363a	339500 ±173330ab	317166 ±152773ab	310333 ±146894ab	265500 ±130403b	265166 ±131384b	
G8	350833 ±195363a	354666 ±179294a	352500 ±159948a	349500 ±174872a	332333 ±171609a	336666 ±168634a	

Médias seguidas por mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)