

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PESQUISA DO ANTÍGENO ERITROCITÁRIO CANINO 1.1 EM
PLAQUETAS DE CÃO

CYNTHIA DE ASSUMPÇÃO LUCIDI

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira

BOTUCATU – SP
2007

Aos meus pais, Tânia e Eduardo, e minha
irmã, Samantha, pelo amor incondicional
e por estarem ao meu lado,
sempre.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, e ao College of Veterinary Medicine da MSU, por tornarem possível a realização do curso e do projeto de mestrado.

À Regina, muito mais do que minha orientadora, minha amiga, por tudo o que certamente é impossível listar aqui, mas que eu posso tentar. Pelos ensinamentos de amor ao próximo, crescimento espiritual, dedicação, otimismo, dignidade e caráter. Pela confiança no meu trabalho e na minha capacidade. Pelo exemplo de amor à profissão e competência, o que só confirmou minha paixão pela docência e pelo aprendizado constante. Por me ensinar que a corrida é muito mais do que um esporte. Por todas as conversas, pizzas, cinemas, pipocas, caronas, estudos, viagens, palestras, idas ao médico, conselhos e, sempre e principalmente, pelo amor gratuito. Amo você Rê.

Aos meus pais, pessoas que mais amo no mundo, meu porto seguro, pelo esforço em entender minha ausência durante todo o tempo em que passei longe deles, plantando um sonho. Pela compreensão e afeto nas muitas horas em frente ao computador. Por serem pra mim o melhor exemplo e os melhores professores de amor incondicional, caráter e dignidade. Amo vocês meus pais.

À minha irmã, Samantha, pela amizade, sempre ao meu lado, de “mãos” dadas, onde quer que eu esteja. Como crescemos juntas nestes últimos anos. Se eu confiasse em mim mesma metade do que ela confia em mim, teria o maior ego do mundo! Obrigada pelo apoio e incentivo. Te amo irmã.

Ao meu avô e Tia Célia, por todo o carinho. Tanto temos a aprender com os mais velhos, por quem minha admiração só aumenta com o passar dos anos. Os maiores professores, de vida. E que apesar de saberem mais do que qualquer um, têm a humildade de achar que ainda não sabem tudo. Amo vocês pelo exemplo de sabedoria e otimismo. Pra frente e pro alto, sempre!

Ao meu querido, Rodrigo, que me fez enxergar um lado novo do nosso papel no mundo, me dando coragem para desafiar novas possibilidades em busca do amor.

Ao Mike Scott, que no início era um ídolo, autor do meu livro preferido de patologia clínica veterinária, se transformou no meu co-orientador com minha ida para Michigan para fazer meu experimento, virou pai postiço quando passamos a morar juntos e hoje em dia é um grande amigo, no outro hemisfério, que guardo no peito com muito amor e saudades.

À família Scott, que me abrigou e me adotou durante minha estadia em Michigan. Foi uma experiência única aprender tanto sobre a cultura americana.

Aos meus amores de Botucatu, minha Happy Family querida, os residentes do Laboratório Clínico Veterinário: Gracy, Sandra, Dani, Cirrose. Meus lindos, aonde quer que eu vá, sempre vou guardar no meu coração lembranças de como é divertido quando estamos juntos e quanto amor existe entre nós. Que a gente nunca se esqueça de lutar pelos nossos sonhos, de exercitar a “Teoria Bambi”, de saber rir, sorrir e gargalhar, de desculpar e pedir desculpas, de crescer de mãos dadas. A família é a melhor escola de vida, e agradeço a Deus por ter ganho a segunda estando em Botucatu. Amo vocês minha eterna Happy Family!

À Carminha, Jorge, Zé e Carol, meus colegas, que viraram amigos e hoje em dia são meus pais e irmãos. Obrigada por me adotarem no lar e no coração de vocês, e por me lembrarem mais uma vez da beleza da instituição familiar. Vocês são o maior exemplo de uma família reunida pelo amor que eu quero pra mim.

Às amigas de residência, Renata e Pepéia, que apesar de longe atualmente, foram parte fundamental no meu crescimento profissional e pessoal ao longo destes anos longe de casa. Saudades!

Aos amigos de Botucatu, Tenesmo, Mirela, Hugo, Karina, Veri, Lu, Cris Moraes, Cássia, Tucano, Thiago e todos os outros que fizeram parte do meu caminho. Cada um de vocês teve sua importância na minha caminhada, e serei eternamente grata e feliz por ter tido vocês ao meu lado.

À equipe do Laboratório Clínico Veterinário de Botucatu, Sueli, Matiazzi e Ilson, pela ajuda e boa convivência em um dos melhores ambientes profissionais que já conheci.

Ao Professor Raimundo, pela presença reconfortante e o tom de voz sempre macio, pelo apoio e incentivo constantes.

À Anne Hale e MABS (Midwest Animal Blood Services), pelo suporte na disponibilização de cães e reagentes para o experimento.

À equipe de pesquisa da MSU (College of Medicine, Michigan State University): Susan Forney, Dr. John Gerlach, Jon Davis, Dr. Ken Schwartz e Dr. Louis King, pela grande contribuição científica em todas as etapas do projeto, pelas discussões enriquecedoras e principalmente pela hospitalidade e alegria em uma terra tão fria.

À Alice Parr e Rose Wahl (Blood Bank of the College of Veterinary Medicine - MSU), Dr. Ari Jutkowitz, Dr. Matthew Beal e Dra. Valerie Chadwick (Veterinary Teaching Hospital - MSU), e à equipe do Veterinary Clinical Pathology Lab (MSU), pela amizade e apoio técnico-científico constantes, e pela recepção calorosa e amorosa.

Aos amigos que conquistei em Michigan, principalmente Tenesmo, Kaz, Tommomi e Camilo, por me fazer sentir em casa, pela convivência culturalmente enriquecedora e por terem feito parte de uma das melhores experiências da minha vida.

Aos meus queridos amigos do RJ, por me mostrarem que realmente o tempo e a distância nada são frente a uma amizade verdadeira, e por permanecerem ao meu lado sempre, mesmo de longe, muito longe.

À equipe do Hemocentro da Faculdade de Medicina – Unesp – Botucatu, Léia, Marjorie e Prof. Paulo, pelo treinamento na citometria de fluxo, e à Profa. Elenice Deffune, pela valiosa contribuição científica.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Fluminense, responsável pelos meus primeiros passos nesta área tão interessante e a apaixonante da Medicina Veterinária.

Aos cães que tornaram possível este experimento, principalmente Shmaggi e Tess, sempre com olhar amoroso e dispostos a ajudar, pelo simples fato de serem os melhores amigos do homem.

À minha vó Cida, pelo amor e cuidado sempre presentes.

Quanto aprendi neste mestrado! Mais do que técnicas, didática, patologia clínica, ou qualquer coisa ligada à minha profissão, aprendi muito sobre amor, amizade, crescimento. Aprendi que ninguém cresce sozinho. Aprendi que a família é nosso porto seguro, incondicionalmente. Aprendi que saudades... Nossa, tanto aprendi sobre saudades que é até difícil escrever num papel. Saudades sempre vão existir. A cada dia que se passava, em cada lugar que eu estivesse (no Rio de Janeiro, em Botucatu – SP, em Maringá – PR em pleno dia das mães ou em Michigan – EUA), as saudades estavam sempre lá. Cada amigo que eu fiz, cada pessoa que aprendi a amar em cada lugar que passei, me faz falta. Deixou um pedaço comigo e levou um pedaço de mim. A convivência com diferentes pessoas nos transforma dia a dia, e nos faz transformar pessoas. O quanto aprendemos ouvindo e nos doando ao outro e o quanto aprendemos com nossos próprios passos, é insubstituível, e nos deve fazer crescer. A nossa vida é somente nossa, e devemos plantar nela as melhores sementes que conseguirmos, para um dia poder olhar para trás e ver um belo jardim! O amor e a paz são indispensáveis e insubstituíveis.

“Um sorriso enriquece os recebedores sem empobrecer os doadores.”

(Mário Quintana)

“Quem muito pensa no futuro perde o presente.”

(Mário da Silva Brito)

“Os professores abrem a porta,
mas você precisa entrar sozinho”

(Provérbio chinês)

Quanto mais eu estudo, mais acho que tenho que estudar!

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	13
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 – O sistema DEA.....	14
2.1.1 – Tipos sanguíneos em cães.....	14
2.1.2 – Aloanticorpos relacionados aos antígenos eritrocitários caninos.....	16
2.1.3 – Ocorrência de anticorpos naturais e antigenicidade dos diferentes tipos sanguíneos caninos.....	17
2.2 – Transfusão de plaquetas em cães.....	21
2.2.1 – Subprodutos do sangue ricos em plaquetas.....	21
2.2.2 – Indicações para a transfusão de plaquetas.....	22
2.2.3 – Reações transfusionais causadas por plaquetas.....	24
2.3 – Antígenos expressos em plaquetas.....	26
2.3.1 – Plaquetas humanas expressam os antígenos ABO.....	27
2.3.2 – Plaquetas caninas expressam os antígenos DEA?.....	29
2.4 – Detecção de antígenos em ensaios imunológicos.....	29
2.4.1 – Citometria de fluxo.....	29
2.4.2 – Detecção de antígenos em hemácias de cães.....	30
2.4.3 – Detecção de antígenos em plaquetas de cães.....	31
3 – OBJETIVOS.....	32
3.1 – Objetivos gerais.....	32
3.2 – Objetivos específicos.....	32
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 – Animais.....	33
4.2 – Colheita de material.....	33
4.3 – Acondicionamento das amostras.....	34
4.4 – Reagentes utilizados na primeira incubação.....	34
4.4.1 – Soro anti-DEA 1.1.....	34
4.4.2 – Pool de plasmas de cães saudáveis não reagente.....	35
4.4.3 – Preparo dos reagentes para a	

incubação com plaquetas.....	35
4.5 – Citometria de fluxo.....	36
4.5.1 – Anticorpos secundários.....	36
4.5.2 – Fase analítica.....	36
4.6 – Exames laboratoriais.....	37
4.6.1 – Hematócrito.....	37
4.6.2 – Contagem de plaquetas.....	37
4.7 – Pesquisa do antígeno eritrocitário canino 1.1 por citometria de fluxo.....	38
4.7.1 – Hemácias.....	38
Preparo da solução de hemácias.....	38
Primeira incubação.....	38
Segunda incubação.....	38
Citometria de fluxo.....	39
Controles.....	39
4.7.2 – Plaquetas.....	39
Preparo da solução de plaquetas.....	39
Primeira incubação.....	40
Segunda incubação.....	40
Citometria de fluxo.....	40
Controles.....	41
4.8 – Tipagem sanguínea para o DEA 1.1 pelo método da aglutinação em tubo.....	41
4.8.1 – Preparo da solução de hemácias.....	42
4.8.2 – Ensaio para tipagem sanguínea para o DEA 1.1 pelo método de aglutinação em tubo.....	42
4.8.3 – Análise dos resultados.....	43
4.9 – Análise estatística.....	44
4.9.1 – Hemácias.....	44
4.9.2 – Plaquetas.....	44
5 – RESULTADOS.....	46
5.1 – Hematócrito e número de plaquetas.....	46
5.2 – Detecção do antígeno DEA 1.1 em hemácias de cães.....	46
5.2.1 – Método de citometria de fluxo.....	46

5.2.2 – Método de aglutinação em tubo.....	48
5.2.3 – Prevalência do DEA 1.1.....	57
5.3 – Detecção do antígeno DEA 1.1 em plaquetas de cães por citometria de fluxo.....	58
6 – DISCUSSÃO.....	68
6.1 – Metodologia.....	68
6.2 – Detecção do DEA 1.1 em hemácias de cão.....	74
6.3 – Detecção do DEA 1.1 em plaquetas de cão.....	77
7 – CONCLUSÕES.....	80
8 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
9 – BIBLIOGRAFIA.....	82
10 – APÊNDICE.....	91

LUCIDI, C.A. Pesquisa do antígeno eritrocitário canino 1.1 em plaquetas de cão. Botucatu, 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. 2007. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A expressão de antígenos eritrocitários do sistema ABO em plaquetas humanas pode causar baixo incremento plaquetário pós-transfusional e refratariedade no receptor. Na Medicina Veterinária, o antígeno eritrocitário canino (DEA) 1.1 causa as reações transfusionais hemolíticas mais importantes clinicamente, e se presente nas plaquetas caninas pode estar envolvido em reações imunológicas levando à baixa sobrevivência das plaquetas transfundidas ou aloimunização do paciente receptor. O objetivo deste estudo foi investigar a presença do DEA 1.1 em plaquetas de cão. Para tanto, plaquetas de 110 cães DEA 1.1 positivos e 62 cães DEA 1.1 negativos foram incubadas com soro policlonal anti-DEA 1.1, e então com o anticorpo policlonal anti-IgG canina marcado com FITC, e posteriormente avaliadas pelo método de citometria de fluxo. As hemácias de todos os cães foram testadas da mesma forma, a fim de demonstrar a eficácia da técnica de citometria de fluxo para detecção deste antígeno. Além disso, todas as amostras foram tipadas para o DEA 1.1 pelo teste convencional da aglutinação em tubo, para confirmação dos resultados obtidos pela citometria de fluxo em hemácias. Os resultados demonstraram que o DEA 1.1 não está presente nas plaquetas caninas e que parece não haver a necessidade de transfusão de plaquetas compatíveis para este tipo sanguíneo em cães. Foi observado ainda, que a citometria de fluxo é um teste mais sensível e acurado para a tipagem sanguínea do DEA 1.1 do que o teste de aglutinação em tubo.

LUCIDI, C.A. Detection of dog erythrocyte antigen 1.1 in canine platelets. Botucatu, 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. 2007. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The expression of erythrocyte antigens, from the ABO system, by human platelets can cause post-transfusional low platelet increment and refractoriness on the receptor. In Veterinary Medicine, the dog erythrocyte antigen (DEA) 1.1 causes the most clinically important hemolytic transfusion reactions, and if present on canine platelets may be the cause of immunologic platelet transfusion reactions, leading to short survival of the transfused platelets or alloimmunization of the recipient. The purpose of this study was to investigate the presence of the DEA 1.1 antigen in canine platelets. For that, platelets from 110 DEA 1.1 positive dogs and 62 DEA 1.1 negative dogs were incubated with anti-DEA 1.1 polyclonal sera, and then with anti-canine IgG FITC-labeled polyclonal antibody, to be evaluated by flow cytometry. All canine erythrocytes were tested the same way, to demonstrate the efficacy of the flow cytometric technique to detect this antigen. Moreover, all samples were typed for DEA 1.1 by the gold-standard tube typing test, to confirm the results obtained to the red cells by flow cytometry. The results showed that the DEA 1.1 antigen is not present on canine platelets, and that it seems to not be necessary the transfusion of DEA 1.1 compatible platelets in dogs. Further observation also showed that the flow cytometric test is more sensitive and accurate than the tube typing test for the detection of DEA 1.1 antigen.

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de plaquetas é recomendada para conter ou prevenir hemorragias em populações de risco, geralmente cães com produção plaquetária comprometida por acometimento da medula óssea (ABRAMS-OGG, 2003). Os componentes do sangue ricos em plaquetas caninas já se encontram disponíveis comercialmente, no Brasil e no Exterior, e seu uso tende a se tornar cada vez mais comum na Medicina Veterinária.

Na Medicina Humana, sabe-se que as plaquetas podem expressar antígenos eritrocitários do sistema ABO. A transfusão de plaquetas ABO-incompatíveis pode levar à baixa eficácia terapêutica, sendo recomendada a transfusão de plaquetas ABO-compatíveis sempre que possível (BENSON, 1999). Não se sabe se as plaquetas caninas expressam antígenos eritrocitários (Dog Erythrocyte Antigen – Antígeno Eritrocitário Canino), nem qual seria a relevância clínica deste fato. Se as plaquetas caninas expressarem o DEA, transfusões de plaquetas DEA-incompatíveis podem apresentar baixo incremento, levar à refratariedade, ou causar aloimunização do receptor. Esta hipótese se torna mais relevante em relação ao tipo sanguíneo DEA 1.1, por sua alta prevalência na população canina e potencial antigenicidade (HALE, 1995).

Este estudo teve como principal objetivo determinar a presença do DEA 1.1 em plaquetas de cães, por meio da técnica de citometria de fluxo, que já foi empregada da mesma forma para demonstrar a presença dos antígenos A e B em hemácias e plaquetas humanas (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000; COOLING et al., 2005). A presença do DEA 1.1 em plaquetas pode indicar a necessidade de transfusão de plaquetas DEA-compatíveis, a fim de aumentar a eficácia das transfusões de plaquetas em cães e evitar a aloimunização dos animais receptores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O SISTEMA DEA

2.1.1 – Tipos sanguíneos em cães

O estudo dos tipos sanguíneos caninos e sua importância na medicina transfusional veterinária se iniciou no século 17, pelo médico Richard Lower, que realizou a primeira transfusão sanguínea entre dois cães (HALE, 1995). Em 1910, Von Dungern e Hirszfeld documentaram a presença de quatro hemolisinas e aglutininas geradas pela aloimunização canina, e no fim da década de 50, foram descritos pela primeira vez os tipos sanguíneos em cães (SWISHER & YOUNG, 1961; HALE, 1995).

Ao longo dos anos, a terapia transfusional tem se tornado uma prática cada vez mais comum na Medicina Veterinária. Seu sucesso depende do conhecimento de conceitos básicos como os grupos sanguíneos, a prevalência de anticorpos, as indicações para a transfusão, as formas de obtenção e armazenamento dos hemocomponentes, e os meios de minimizar as reações transfusionais (LANEVSKI & WARDROP, 2001).

Os antígenos eritrocitários caninos (dog erythrocyte antigens – DEA) são receptores formados por glicolipídeos e glicoproteínas presentes na superfície dos eritrócitos. Eles definem os grupos sanguíneos e são responsáveis por iniciar aproximadamente 70 a 80% das reações transfusionais hemolíticas imunomediadas em cães. Na saúde, estes receptores participam do reconhecimento celular, e na doença podem atuar como receptores para anticorpos ou marcadores celulares (HALE, 1995).

Apesar de alguns DEA serem conhecidos desde o início do século, há poucos estudos sobre a frequência dos tipos sanguíneos em cães, provavelmente devido à disponibilidade limitada dos reagentes usados para a tipagem (GIGER et al., 1995). O que se sabe sobre os antígenos eritrocitários caninos está relacionado a estudos realizados com soros anti-DEA, ricos em

anticorpos policlonais produzidos por aloimunização de cães (HALE, 1995) ou anticorpos monoclonais murinos (HARA et al., 1991; ANDREWS et al. 1992).

Os tipos sanguíneos em cães são determinados pelo sistema DEA, sendo sete grupos principais reconhecidos pelos padrões internacionais: 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (HARA et al., 1991; HALE, 1995; CORATO et al., 1997). Os grupos sanguíneos caninos são herdados independentemente, de acordo com a dominância determinada pelas leis de Mendel (HALE, 1995). Um animal pode apresentar hemácias positivas ou negativas para qualquer um dos grupos sanguíneos, salvo as particularidades relacionadas ao grupo 1 (GIGER et al. 1995; HALE, 1995). Os métodos de tipagem sanguínea disponíveis atualmente reconhecem sete antígenos eritrocitários caninos (DEAs) com possível importância clínica: 1.1, 1.2, 1.3, 3, 4, 5 e 7 (HALE, 1995).

Segundo Hale (1995), a importância dos grupos sanguíneos em cães se baseia em três fatores: a incidência do antígeno na população, a incidência de anticorpos naturais na população e o efeito da interação antígeno-anticorpo *in vivo*.

O grupo DEA 1 possui quatro alelos, incluindo os tipos 1.1, 1.2, 1.3 e um tipo nulo (1.X), sendo que um cão pode apresentar apenas um destes quatro fenótipos. A prevalência dos tipos 1.1 e 1.2 na população canina norte americana é de 42% e 20%, respectivamente (HALE, 1995). No Brasil, a prevalência do tipo 1.1 é semelhante, como demonstrado por Novais et al. (1999) e Souza (2005) (Tabela 1). São poucos os estudos de prevalência do tipo 1.3, por este tratar-se de um antígeno recentemente descoberto (HALE, 1995). O DEA 1.1 é considerado o tipo mais importante em termos de reações transfusionais, por sua alta prevalência e por ser o mais antigênico, causando reações hemolíticas imediatas (HALE, 1995; CORATO et al., 1997).

Os tipos sanguíneos 3, 4, 5 e 7 apresentam uma prevalência de 6%, 98%, 23% e 45%, respectivamente, na população canina dos Estados Unidos (HALE, 1995). Entretanto, um estudo de Hara et al. (1991) mostrou uma maior expressão do antígeno DEA 3 na população canina japonesa, sendo esta de aproximadamente 17%. Apesar de reconhecidos internacionalmente, pouco se sabe a respeito dos tipos sanguíneos 6 e 8 (HALE, 1995).

A Tabela 1 apresenta um resumo da prevalência dos tipos sanguíneos caninos obtidos em diferentes datas e locais.

TABELA 1. Prevalência dos tipos sanguíneos caninos em diferentes datas e locais. 1) SWISHER & YOUNG, 1961; 2) GIGER et al., 1995; 3) HALE, 1995; 4) NOVAIS et al., 1999; 5) SOUZA, 2005; NR – não realizado; NI – não informado.

Local e data	Tipo sanguíneo (DEA)					
	1.1	1.2	3	4	5	7
Nova York (EUA), 1961 ¹						
Nº de cães testados	332	332	867	947	764	NR
Porcentagem de positivos	45	19	6	98	22	
Pensilvânia (EUA), 1993 ²						
Nº de cães testados	224	224	NR	145	NR	145
Porcentagem de positivos	33	7		97		8
Michigan (EUA), 1995 ³						
Nº de cães testados	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Porcentagem de positivos	42	20	6	98	23	45
São Paulo (Brasil), 1999 ⁴						
Nº de cães testados	150	150	NR	NR	NR	NR
Porcentagem de positivos	51	40				
São Paulo (Brasil), 2005 ⁵						
Nº de cães testados	300	NR	NR	NR	NR	300
Porcentagem de positivos	53					39

2.1.2 – Aloanticorpos relacionados aos antígenos eritrocitários caninos

Aloanticorpos são definidos como anticorpos produzidos contra tecidos estranhos provenientes de um indivíduo da mesma espécie (CALLAN et al., 1995; GIGER et al., 1995). Pouco se sabe sobre as classes de imunoglobulinas envolvidas com os diferentes tipos sanguíneos caninos. Esta informação é de extrema importância para o estudo da antigenicidade de cada antígeno eritrocitário e melhor compreensão das reações transfusionais em cães (HALE, 1995). Além disso, estudos voltados para a classificação das imunoglobulinas relacionadas aos DEAs permitem o aperfeiçoamento e desenvolvimento de

novos métodos de tipagem sanguínea e anti-soros eficazes para a aplicação na rotina médica (SOUZA, 2005). Estes conhecimentos são importantes, particularmente, para o desenvolvimento da técnica de citometria de fluxo, que detecta estes aloanticorpos por meio de reação imunomediada.

Em humanos, sabe-se que os anticorpos anti-A e anti-B hemaglutinantes são predominantemente da classe IgM (ROBACK et al., 2003; STUSSI et al., 2005).

Em um cão DEA 1.1 negativo, que apresentou reação transfusional hemolítica após sensibilização com hemácias DEA 1.1 positivas, três métodos diferentes foram usados para determinar se os aloanticorpos anti-DEA 1.1 eram da classe IgG ou IgM. Após inativação das imunoglobulinas IgM por clivagem ou sua remoção por anti-IgM canina, a atividade aglutinante do soro não sofreu alterações. Por fim, a separação do soro em uma fração rica em IgG e outra pobre em IgG, mostrou que a primeira manteve a capacidade de aglutinar hemácias DEA 1.1 positivas, ao passo que a segunda fração não. Estes resultados mostram claramente que os aloanticorpos anti-DEA 1.1 pertencem à classe IgG (GIGER et al., 1995).

Hara et al. (1991) desenvolveram três diferentes anticorpos monoclonais em culturas de células murinas contra o DEA 3, e todos eles pertenciam à classe IgG de imunoglobulinas.

2.1.3 – Ocorrência de anticorpos naturais e antigenicidade dos diferentes tipos sanguíneos caninos

Reações hemolíticas à transfusão de hemácias podem ser agudas (“reação imediata”) ou crônicas (“reação tardia”), imunológicas ou não-imunológicas e intravasculares ou extravasculares (remoção da circulação pelo sistema monocítico-fagocitário) (HOHENHAUS, 1992; CALLAN et al., 1995).

Animais podem produzir anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos estranhos, mesmo que eles nunca tenham sido expostos a hemácias estranhas. Estes anticorpos naturais anti-eritrocitários não derivam de um contato anterior com hemácias estranhas, mas resultam de uma exposição a epítomos semelhantes ou idênticos, que geralmente ocorrem na natureza (TIZARD, 2002). É fundamental a compreensão das conseqüências

da ocorrência de anticorpos naturais em relação aos antígenos eritrocitários para se entender a importância da tipagem sanguínea e reações transfusionais em cães. Na presença de anticorpos naturais contra algum tipo sanguíneo, a reação hemolítica imunomediada pode ocorrer em uma primeira transfusão envolvendo o tipo sanguíneo em questão. Por outro lado, tipos sanguíneos que não possuem anticorpos naturais, não apresentam risco de reação hemolítica imunomediada em uma primeira transfusão. Porém nestes casos, pode ocorrer a imunização do receptor, com a produção de aloanticorpos, e possível ocorrência de reação hemolítica em uma segunda transfusão incompatível (CALLAN et al., 1995; GIGER et al., 1995; HALE, 1995).

Ao contrário dos felinos e humanos, os cães não apresentam anticorpos naturais clinicamente importantes contra antígenos eritrocitários (GIGER et al., 1995; HALE, 1995; CORATO et al., 1997), o que implica em duas conclusões importantes: dois cães que nunca receberam transfusão sanguínea devem ser compatíveis nas provas maior e menor de um teste de compatibilidade sanguínea, e, a primeira transfusão entre estes dois cães não deve resultar em reação transfusional hemolítica aguda (GIGER et al., 1995). Apesar disso, aproximadamente 20% dos cães positivos para os grupos DEA 3 e 5 podem apresentar anticorpos naturais, o que pode levar a reações hemolíticas extravasculares brandas (HALE, 1995). No caso de transfusões não isogrupo compatíveis, a produção de aloanticorpos por um receptor negativo pode ocorrer de quatro a 14 dias após contato com hemácias DEA positivas (GIGER et al., 1995).

Apesar da ausência de anticorpos naturais contra o DEA 1.1, e ausência de risco de reação transfusional em uma primeira transfusão entre animais incompatíveis, este é o tipo sanguíneo mais antigênico (GIGER et al., 1995; HALE, 1995). Um cão negativo para o DEA 1.1, quando exposto a hemácias DEA 1.1 positivas, pode desenvolver uma potente hemolisina, que pode levar a reações transfusionais hemolíticas imunomediadas agudas em uma segunda exposição a este antígeno (GIGER et al., 1995). As reações transfusionais hemolíticas imunomediadas envolvendo o tipo 1.1 são consideradas as de maior importância clínica. Nestes casos, a hemólise e remoção das hemácias incompatíveis transfundidas são imediatas e podem ocorrer em até 12 horas, levando frequentemente à hemoglobinúria e hiperbilirrubinemia (GIGER et al.,

1995). Outras possíveis complicações da hemólise intravascular aguda são vasoconstrição, isquemia renal e coagulação intravascular disseminada (CID), esta última podendo resultar ainda em isquemia de outros órgãos e choque. Alguns dos sinais clínicos que podem estar associados à crise hemolítica aguda são febre, taquicardia ou bradicardia, hipotensão, dispnéia, cianose, salivação excessiva, e êmese (LANEVSKI & WARDROP, 2001). Fêmeas DEA 1.1 negativas podem desenvolver anticorpos anti-DEA 1.1 durante a gestação de filhotes positivos para este tipo sanguíneo em até 25% dos casos (HALE, 1995; CORATO et al., 1997).

Em relação ao DEA 1.2, um animal negativo previamente sensibilizado pode desenvolver reação hemolítica imunomediada quando em um segundo contato com hemácias positivas, porém a reação leva um tempo maior para ocorrer, causando hemólise extravascular por remoção das células 1.2 positivas em 12 a 24 horas. Pouco se sabe sobre a antigenicidade do tipo 1.3 devido à recente disponibilidade do anti-soro para tipagem (GIGER et al., 1995; HALE, 1995; CORATO et al., 1997).

Devido à antigenicidade e gravidade da reação hemolítica desencadeada pelas hemácias positivas para o DEA 1.1, deve-se evitar a transfusão de sangue originado de cães positivos para este tipo sanguíneo. Sangue e concentrado de hemácias oriundos de animais DEA 1.1 positivos devem ser utilizados apenas em animais também conhecidamente positivos para este tipo sanguíneo (GIGER et al., 1995; HALE, 1995).

O tipo sanguíneo 7 é determinado por um antígeno solúvel que se adere à superfície do eritrócito (LANEVSKI & WARDROP, 2001), e é considerado o mais controverso de todos os DEA devido à possível ocorrência de anticorpos naturais (GIGER et al., 1995; HALE, 1995). Alguns autores apresentaram indícios de que cães negativos para este tipo sanguíneo expressariam anticorpos naturais anti-DEA 7 (YOUNG et al., 1952; SWISHER & YOUNG, 1961). Entretanto, esses seriam representados por “crioaglutininas” (“cold agglutinins”), que só reagem em baixas temperaturas, permanecendo questionável sua importância clínica *in vivo*. Giger et al. (1995) não encontraram anticorpos naturais anti-7 que reagissem na temperatura corpórea (“warm agglutinins”) em 23 cães DEA 7 negativos. Além disso, o protocolo atual para a tipagem do DEA 7 envolve a incubação das hemácias testadas com o

anti-soro reagente e a leitura do resultado a 4°C, indicando a baixa temperatura ideal para a ocorrência da hemaglutinação quando se trata deste tipo sanguíneo (HALE, 2006). Cães negativos para o DEA 7, quando sensibilizados para este tipo sanguíneo, podem produzir aloanticorpos e apresentar reação transfusional tardia, na qual ocorre seqüestro das hemácias DEA 7 positivas pelo sistema monocítico fagocitário e hemólise extravascular em aproximadamente 72 horas (HALE, 1995).

Os tipos 3 e 5 são possuem menor significado clínico menor do que o DEA 1.1, devido à sua menor prevalência na população e por causarem reação transfusional imunomediada tardia, assim como no tipo 7, com hemólise extravascular por remoção das hemácias positivas em três a cinco dias após a transfusão não isogrupo compatível. Anticorpos naturais contra os tipos 3 e 5 são produzidos por aproximadamente 20% da população DEA 3 negativa e DEA 5 negativa, respectivamente (HALE, 1995).

Apesar do menor significado clínico dos DEA 3, 5 e 7, deve-se evitar o uso de animais positivos para estes tipos sanguíneos como doadores de sangue (HALE, 1995).

O tipo sanguíneo 4 apresenta a maior prevalência na população, e felizmente a menor antigenicidade. Cães DEA 4 negativos não produzem anticorpos naturais contra este tipo sanguíneo, e quando sensibilizados com hemácias positivas não apresentam hemólise nem remoção das hemácias transfundidas, pois o anticorpo produzido após a exposição é considerado benigno. Animais positivos apenas para o DEA 4 são considerados “doadores universais”, o que ocorre frequentemente entre os cães galgos (HALE, 1995; LANEVSCHI & WARDROP, 2001).

Além disso, há indícios da existência de outros antígenos eritrocitários comuns na população canina, que podem levar à formação de aloanticorpos e reações hemolíticas agudas, porém sua freqüência e estrutura ainda são desconhecidos, e mais estudos são necessários para avaliação de sua relevância clínica (CALLAN et al., 1995).

O objetivo da transfusão é prover hemácias viáveis, evitando-se as perdas por reações transfusionais hemolíticas. Apesar dos recentes avanços na medicina transfusional veterinária, no Brasil a grande maioria das transfusões sanguíneas é feita com sangue total, ao invés de componentes do

sangue, e sem o conhecimento dos tipos sanguíneos envolvidos, ou realização de testes de compatibilidade cruzada. Estas práticas não são mais consideradas aceitáveis em termos médicos e científicos, por sua falha em garantir uma terapia segura e eficaz ao receptor (NOVAIS et al., 1999). A sensibilização de animais negativos e nova exposição ao antígeno, em uma segunda transfusão, com exceção do DEA 4, podem causar destruição prematura das células transfundidas no receptor. É recomendada a realização de tipagem sanguínea e teste de compatibilidade cruzada em todos os animais envolvidos em transfusões sanguíneas, principalmente na segunda transfusão, a fim de minimizar a ocorrência de reações hemolíticas agudas e maximizar os benefícios da terapia transfusional (GIGER et al., 1995; HALE, 1995; NOVAIS et al., 1999). Todavia, animais aparentemente compatíveis (com teste de compatibilidade cruzada negativo) podem apresentar reação transfusional hemolítica tardia, devido ao baixo nível de anticorpos (insuficiente para revelar aglutinação positiva mas suficiente para causar a reação) ou à presença de IgA (anticorpo não-aglutinante).

2.2. TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS EM CÃES

2.2.1 – Componentes do sangue ricos em plaquetas

O reconhecimento do sangue como uma mistura complexa de componentes independentes e com diferentes funções vem incentivando o uso dos componentes do sangue ao invés do sangue total. A transfusão de plaquetas na Medicina Humana é uma prática relativamente recente, que tem evoluído muito nos últimos 35 anos. Atualmente nos Estados Unidos são consumidos mais componentes do sangue ricos em plaquetas do que concentrados de hemácias (FRIEDBERG & GAUPP, 1999).

É cada vez mais comum hemoterapia seletiva em cães, pois esta permite a reposição específica do componente do sangue necessário ao paciente, e assim um tratamento mais eficiente. Esta ainda minimiza a ocorrência de reações transfusionais, pois evita a exposição do paciente a

antígenos e componentes sanguíneos desnecessários (HARRELL & KRISTENSEN, 1995; KRISTENSEN & FELDMAN, 1995; LUCAS et al., 2004).

O desenvolvimento de técnicas para a obtenção de plaquetas e estudos envolvendo doses e indicações, vem popularizando a transfusão de plaquetas na Medicina Veterinária (ABRAMS-OGG, 2003; ULATA, 2005). Apesar de ainda pouco comum no Brasil, esta prática vem sendo estudada e estimulada ao longo dos últimos anos (PEREIRA & RAMALHO, 2001; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006).

Os componentes do sangue ricos em plaquetas de cães são o plasma rico em plaquetas (PRP) e o concentrado de plaquetas (CP). O primeiro é obtido por centrifugação lenta do sangue total fresco, enquanto que o segundo apresenta uma concentração maior de plaquetas e é obtido por centrifugação rápida do PRP ou aférese, técnica comumente usada na Medicina Humana, e que já vem sendo desenvolvida na Medicina Veterinária (*Midwest Animal Blood Services*, Stockbridge, MI, EUA) (KRISTENSEN & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003). Ambos os componentes devem ser conservados em temperaturas entre 20 a 24°C e mantidos em movimentação constante, por no máximo três a cinco dias (SCHNEIDER, 1995; ALLYSON et al., 1997). A eficácia da transfusão é maior, quanto mais frescas forem as plaquetas transfundidas (ENRIGHT et al., 2003).

O incremento esperado com a transfusão de uma UI (unidade internacional) de plasma rico em plaquetas ou concentrado de plaquetas a cada 10 Kg de peso do receptor é de 5.000 a 40.000 plaquetas/ μ L. Em contrapartida, se espera um aumento máximo de 10.000 plaquetas/ μ L a cada 10 mL/Kg de sangue total fresco transfundido, reiterando a maior eficácia dos hemocomponentes quando comparados ao sangue total (KRISTENSEN & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003).

2.2.2 – Indicações para a transfusão de plaquetas

Na Medicina Humana, a terapia transfusional de plaquetas é fundamental para o suporte profilático ou terapêutico de distúrbios hemorrágicos associados a condições como leucemia aguda, anemia aplástica,

alguns tipos de linfomas e tumores sólidos, a fim de reduzir o sangramento e a mortalidade dos pacientes (HEAL et al., 1987; FRIEDBERG & GAUPP, 1999).

Da mesma forma, na Medicina Veterinária, esta terapia pode ser terapêutica ou profilática, sendo a primeira a mais comum (ABBRAMS-OGG, 2003). A transfusão terapêutica de plaquetas é indicada para interromper hemorragias intensas ou de alto risco ao paciente, como epistaxe, hemoptise, hematêmese, melena, hematúria, hifema, ou quando há sinais de hemorragia no sistema nervoso central, e é contra-indicada para prevenir ou tratar sangramentos discretos como petéquias e equimoses (de GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003). Já a transfusão profilática é indicada nos casos de intensas trombocitopenias acompanhadas de alto risco hemorrágico. Devido à ausência de estudos específicos em animais, têm-se usado os parâmetros aplicados a humanos para as transfusões de plaquetas em cães. As principais recomendações para a terapia com plaquetas em cães envolvem acometimento da medula óssea e diminuição na produção plaquetária, que pode ser observada em casos de leucemia aguda, trombocitopenia induzida por quimioterápico, anemia aplástica ou hipoplasia de medula óssea por outras causas variadas (de GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003). Nestes casos, a transfusão é indicada para animais com contagem de plaquetas abaixo de 10.000/ μ L. A transfusão profilática para prevenir hemorragias espontâneas também é indicada antes ou durante a cirurgia de cães trombocitopênicos. Para a realização de procedimentos cirúrgicos são recomendadas contagens maiores do que 50.000/ μ L (ABRAMS-OGG, 2003).

Cães submetidos ao transplante de medula óssea apresentam intensa trombocitopenia, secundária à mielossupressão causada pela radiação mieloablativa. Geralmente estes animais levam em torno de oito semanas para alcançar uma contagem maior do que 20.000 plaquetas/ μ L, sendo por isso recomendada a transfusão de plaquetas, profilática ou terapêutica, durante este período inicial. Foi demonstrado que a administração de concentrados de plaquetas reduziu a ocorrência de hemorragias nestes pacientes (ABRAMS-OGG et al., 1993).

A maior parte das trombocitopatias, ou distúrbios de função plaquetária, pode ser tratada com a administração de plaquetas. Destacam-se, entre as

disfunções adquiridas, as induzidas por drogas (p.ex. aspirina ou heparina), nefropatia, hepatopatia ou agentes infecciosos (p.ex. *Ehrlichia canis*). Todavia, a transfusão de plaquetas é recomendada após a eliminação da droga ou minimização da uremia, representando a eliminação do agente causador da trombocitopatia. Entre as trombocitopatias congênitas, destacam-se as doenças de estoque, a Trombastenia Trombastênica e a Trombastenia de Glanzmann. É importante ressaltar que a terapia com plaquetas é indicada somente em casos de hemorragia ativa, condições de risco hemorrágico ou previamente a procedimentos cirúrgicos (de GOPEGUI & FELDMAN, 1998).

A transfusão de plaquetas é contra-indicada em casos de consumo plaquetário, como observado na CID ou nas vasculites, pois as plaquetas são rapidamente destruídas ou consumidas após a transfusão (ABRAMS-OGG, 2003). Nos casos de seqüestro de plaquetas, como observado nas esplenomegalias, esta terapia também é contra-indicada, visto que a massa de plaquetas total do animal encontra-se normal (de GOPEGUI & FELDMAN, 1995).

A trombocitopenia imunomediada é a causa mais comum de trombocitopenia em cães, e nela é contra-indicada a transfusão de plaquetas, pois as plaquetas transfundidas são rapidamente destruídas. Nestes casos, é preferível o tratamento com drogas imunossupressivas. A transfusão de plaquetas só deve ser realizada em cães com trombocitopenia imunomediada que precisem ser submetidos a algum procedimento cirúrgico, imediatamente antes ou durante a cirurgia (de GOPEGUI & FELDMAN, 1995; ABRAMS-OGG, 2003).

As plaquetas transfundidas apresentam curta vida média, sendo esperado um decréscimo de aproximadamente 33% a cada 24 horas. Desta forma, recomenda-se nova transfusão a cada 24 a 48 horas (ABRAMS-OGG, 2003).

2.2.3 – Reações transfusionais causadas por plaquetas

Embora transfusões sanguíneas apropriadas possam salvar vidas, quando inapropriadamente ou mal concebidas podem representar risco de morte para o paciente. Apesar de geralmente consideradas de baixa frequência

na população canina, reações transfusionais podem ocorrer e resultar em complicações graves ou até fatais (BROOKS, 2006). Estudos sobre incidência, causa e significado clínico das reações transfusionais em cães apesar de ainda limitados, têm recebido cada vez mais atenção da comunidade científica veterinária (GIGER et al., 1995; HARRELL & KRISTENSEN, 1995; BROOKS, 2006; GONÇALVES, 2006).

As reações transfusionais podem ser desencadeadas por qualquer um dos componentes do sangue (hemácias, leucócitos, plaquetas ou plasma) e são classificadas de três formas: imunomediadas ou não-imunomediadas, imediatas ou tardias, e hemolíticas ou não-hemolíticas. Reações imunológicas são classificadas como hipersensibilidade do tipo II, e causadas pela interação de anticorpos circulantes do receptor com uma fração protéica ou celular específica do tecido do doador (HARRELL & KRISTENSEN, 1995; BROOKS, 2006). Já as reações não-imunológicas resultam de contaminação, manuseio inadequado ou ativação de citocinas no produto sanguíneo. Reações transfusionais imunomediadas agudas não-hemolíticas, também chamadas reações transfusionais febris não hemolíticas, são as complicações mais comuns em humanos, e podem estar relacionadas à transfusão de leucócitos ou plaquetas (HOHENHAUS, 1992; HARRELL & KRISTENSEN, 1995). As reações agudas podem ocorrer durante, ou poucas horas após a transfusão, à medida que as reações tardias podem levar dias a meses para se desenvolver (BROOKS, 2006).

Reações febris agudas às transfusões de plaquetas são aparentemente causadas por anticorpos do receptor contra antígenos da superfície das plaquetas do doador, e se caracterizam por baixo incremento plaquetário. É comum se observar febre discreta e transitória que pode ocorrer nos primeiros 30 minutos de transfusão e durar por até oito a 12 horas. Geralmente, a interrupção da transfusão e o tratamento com antipiréticos são suficientes para a recuperação do paciente. A incidência deste tipo de reação transfusional não é documentada em cães (HOHENHAUS, 1992; HARRELL & KRISTENSEN, 1995).

As reações transfusionais imunomediadas tardias às transfusões de plaquetas em cães caracterizam-se pela púrpura trombocitopênica pós-transfusional. Nesta complicação, repetidas transfusões de plaquetas podem

levar à formação de anticorpos contra as plaquetas transfundidas. Estes anticorpos anti-plaquetários podem fazer reação cruzada com as plaquetas do próprio animal, levando a um estado de trombocitopenia grave e crônica, que se instala em torno de 10 dias após a transfusão e pode persistir por até dois meses. Podem ser observados sinais como petéquias, hifema e hematúria. Esta é uma doença geralmente auto-limitante que deve ser tratada como trombocitopenia imunomediada (HARRELL & KRISTENSEN, 1995). Embora a incidência de púrpura trombocitopênica pós-transfusional em cães seja desconhecida, a mesma já foi relatada em um cão que apresentou trombocitopenia na semana seguinte à transfusão, com remissão espontânea (WARDROP et al., 1997).

Estudos de Slichter e colaboradores (1986) demonstraram que terapias a longo prazo com plaquetas em cães podem levar ao desenvolvimento de aloanticorpos plaquetários, reduzindo a sobrevivência das plaquetas transfundidas e induzindo à refratariedade. Não foi esclarecido qual seria o antígeno da superfície plaquetária envolvido neste evento.

No caso de transfusões de hemácias, as reações imunomediadas agudas ou tardias ocorrem pela interação de anticorpos do receptor com antígenos DEA das hemácias do doador, levando à redução da sobrevivência das hemácias transfundidas (HARRELL & KRISTENSEN, 1995). A incidência de reações associadas a aloanticorpos plaquetários é desconhecida em cães (HOHENHAUS, 1992), entretanto, sabe-se que aproximadamente 70% a 80% das reações transfusionais imunomediadas após transfusão de sangue total em cães são causadas pelos antígenos eritrocitários caninos (DEAs) (HALE, 1995).

2.3. ANTÍGENOS EXPRESSOS EM PLAQUETAS

As plaquetas humanas expressam três grupos de antígenos com relevância clínica: antígenos eritrocitários (pertencentes ao sistema ABO), antígenos HLA (Antígenos Leucocitários Humanos ou "Human Leukocyte

Antigens”) e antígenos específicos de plaquetas HPA (Antígenos Plaquetários Humanos ou “Human Platelet Antigens”). Todos podem estar associados a reações imunológicas e queda na eficácia da terapia transfusional plaquetária (LEE & SCHIFFER, 1989; OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000; PEREIRA, 2001).

2.3.1 – Plaquetas humanas expressam os antígenos ABO

A presença de antígenos eritrocitários do sistema ABO em plaquetas humanas vem sendo estudada desde a década de 50 (GUREVITCH & NELKEN, 1954), porém foi somente em 1965, que Aster demonstrou claramente sua importância clínica. Dunstan et al. (1985) demonstraram que as plaquetas possuem na sua superfície os antígenos A e B, correspondentes ao grupo sanguíneo do sistema ABO do indivíduo, sendo 55% intrínsecos (expressos pelas plaquetas), e 45% adsorvidos do plasma.

A transfusão de plaquetas ABO-incompatíveis pode ser ineficaz quando acompanhada de reações imunológicas, nas quais se observa baixo incremento plaquetário, desenvolvimento de refratariedade, ou aloimunização do receptor (LEE & SCHIFFER, 1989; HEAL et al., 1993; OGASAWARA et al., 1993; BENSON, 1999; CURTIS et al., 2000; COOLING et al., 2005).

O incremento plaquetário corresponde ao aumento no número de plaquetas observado após a transfusão (FRIEDBERG & GAUPP, 1999). O baixo incremento plaquetário decorrente da transfusão de plaquetas incompatíveis para o sistema ABO, foi primeiramente demonstrado por Aster (1965). Ele concluiu que plaquetas de doadores do grupo A transfundidas para receptores do tipo O apresentaram um percentual de recuperação de 19% enquanto que transfusões com plaquetas ABO-compatíveis apresentaram percentual de recuperação de 63%. A magnitude da redução no incremento plaquetário pode variar entre diversos estudos, porém, todos concordam que a transfusão de plaquetas incompatíveis para o sistema ABO pode comprometer a eficácia desta terapia (LEE & SCHIFFER, 1989; HEAL et al., 1993; BENSON, 1999).

A baixa sobrevida das plaquetas transfundidas é definida como refratariedade, e também pode ser induzida, entre outros fatores, por

transfusões repetidas de plaquetas ABO-incompatíveis (CARR et al., 1990; HEAL et al., 1993; BENSON, 1999). Nestes casos, os receptores apresentam elevados títulos de anticorpos anti-A ou anti-B (LEE & SCHIFFER, 1989), ou imunocomplexos compostos de antígenos ABO e seus respectivos anticorpos, que podem se adsorver às plaquetas e causar baixo incremento (HEAL et al., 1993). Carr e colaboradores (1990) sugeriram o uso de plaquetas ABO-compatíveis para pacientes que necessitam de repetidas transfusões para reduzir o risco de aloimunização e desenvolvimento da refratariedade. Um estudo recente afirma que a transfusão de plaquetas ABO-compatíveis melhorou o incremento plaquetário, porém não se observou vantagens na sobrevida das plaquetas (SLICHTER et al., 2005).

A aloimunização do receptor foi demonstrada em um estudo de Lee e Schiffer (1989), no qual três de 40 pacientes com leucemia aguda, apresentaram aumento considerável nos níveis de aglutininas anti-A ou anti-B, além de redução do incremento plaquetário, após a transfusão de plaquetas ABO-incompatíveis. Além de reduzir o incremento de plaquetas, a aloimunização pode representar um risco em futuras transfusões de hemácias.

Geralmente as plaquetas expressam baixos níveis de antígenos A ou B em sua superfície, porém uma pequena parte de população apresenta alta expressão destes antígenos. Um estudo de Ogasawara e colegas (1993) demonstrou que 7% dos japoneses estudados apresentavam alta expressão dos antígenos A ou B pelas plaquetas. Outro estudo, com caucasianos, revelou que os antígenos eritrocitários humanos A e B são altamente expressos em plaquetas de 7% e 4% da população, respectivamente (CURTIS et al., 2000). A relação entre a quantidade de expressão destes antígenos e a eficácia da transfusão de plaquetas incompatíveis ainda é discutida entre os autores (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000).

Desta forma, a Associação Americana de Bancos de Sangue recomenda a transfusão de plaquetas ABO-compatíveis, sempre que possível (BENSON, 1999; COOLING et al., 2005).

2.3.2 – Plaquetas caninas expressam os antígenos DEA?

Não se sabe se as plaquetas caninas expressam antígenos eritrocitários, e nem quais seriam as implicações clínicas deste fato. Todavia, com base nos estudos relacionados a plaquetas de humanos e nos conhecimentos dos antígenos plaquetários de cães (SCOTT, 2000), existem as hipóteses de que transfusões de plaquetas DEA-incompatíveis possam: 1) reduzir o incremento plaquetário esperado; 2) induzir a refratariedade; 3) induzir à formação de aloanticorpos anti-DEA no receptor.

Neste trabalho supõe-se que, dentre todos os antígenos eritrocitários caninos, o DEA 1.1 apresente maior relevância clínica se presente nas plaquetas de cães, devido à sua alta prevalência na população canina e maior potencial antigênico.

Há décadas, Slichter e colaboradores vêm estudando a aloimunização plaquetária, tendo o cão como modelo experimental. Em 1986 eles relataram a existência de um antígeno plaquetário canino, que não o DLA (Antígeno Leucocitário Canino ou “Dog Leukocyte Antigens” – análogo ao HLA humano), capaz de causar aloimunização e refratariedade (SLICHTER et al., 1986). Todavia, a origem do antígeno em questão permaneceu a ser esclarecida.

2.4. DETECÇÃO DE ANTÍGENOS EM ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

2.4.1 – Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo vem sendo desenvolvida e utilizada na Medicina Humana para diversos fins, sendo a imunohematologia uma de suas aplicações mais importantes, para a avaliação do tipo e quantidade de antígenos e anticorpos presentes na superfície de eritrócitos e plaquetas (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000; ROBACK et al., 2003; COOLING et al., 2005; STUSSI et al., 2005).

Em Medicina Veterinária, no Brasil e no Exterior, esta técnica tem sido cada vez mais estudada e difundida (NAKAGE et al., 2005; TARRANT, 2005;

NETA et al., 2006; TERRAZZANO et al., 2006), inclusive na imunohematologia, para a detecção de antígenos e/ou anticorpos eritrocitários (WILKERSON et al., 2000; QUIGLEY et al. 2001; KUCINSKIENE et al., 2005; PEREIRA et al., 2005) e plaquetários (WILKERSON et al., 2001; McGURRIN et al., 2004; SEGURA et al., 2006). A maior limitação técnica deste método na Medicina Veterinária é a baixa disponibilidade de anticorpos secundários específicos contra antígenos animais. Contudo, este problema vem sendo contornado com o desenvolvimento de novos anticorpos secundários, com a incubação primária com soros/plasmas reagentes, ou com o uso de anticorpos anti-receptores humanos que fazem reação cruzada com receptores de animais.

2.4.2 – Detecção de antígenos em hemácias de cães

O teste de compatibilidade cruzada detecta incompatibilidade imunológica entre o receptor e o doador, porém, não identifica os antígenos eritrocitários, nem, consequentemente, o tipo sanguíneo do paciente. Por outro lado, os testes de tipagem convencionais se baseiam em reações de aglutinação ou hemólise, nas quais um reagente ou anticorpo reage com as hemácias do cão testado, detectando os antígenos eritrocitários presentes, e permitindo a identificação do tipo sanguíneo específico do paciente (LANEVSKI & WARDROP, 2001; GIGER et al., 2005).

Atualmente a tipagem sanguínea de cães pode ser realizada por meio do uso de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-DEA, que são oferecidos por laboratórios particulares ou centros universitários (HARA et al., 1991; HALE, 1995). O teste de aglutinação em tubo da *Michigan State University* é o único teste que utiliza anticorpos policlonais¹ produzidos em cães para detecção dos DEA 1.1, 1.2, 1.3, 3, 4, 5 e 7 (GIGER et al., 2005; HALE, 2006). O teste em gel² foi adaptado da Medicina Humana e se baseia na aglutinação de hemácias em micro-colunas de gel, que contém anticorpo monoclonal reagente anti-DEA 1.1 (GIGER et al., 2005). Cartões para tipagem³ do DEA 1.1 se tornaram disponíveis comercialmente a partir da década de 90, e se

¹ Midwest Animal Blood Services, Michigan, EUA

² ID-Card DEA 1.1, DiaMed AG, Cressier sur Morat, Suíça

³ Rapid Vet-H canine blood typing, DMS Laboratories, Flemington, Nova Jersey, EUA

baseiam na reação de uma gota de hemácias do animal testado com uma gota do anticorpo monoclonal reagente anti-DEA 1.1¹, para visualização ou não de aglutinação (LANEVSKI & WARDROP, 2001; GIGER et al., 2005). Alguns outros métodos de tipagem encontram-se disponíveis ou em desenvolvimento, porém são menos comuns nos Estados Unidos, e obedecem uma classificação para tipagem desenvolvida no Japão, diferente do sistema DEA (GIGER et al., 2005).

Embora o teste de aglutinação no tubo ainda seja considerado o teste padrão-ouro (“gold-standard”) para tipagem sanguínea, esta é uma técnica trabalhosa, não-automatizada, e que pode apresentar variações nos resultados dependendo do técnico que a realiza e da quantidade de antígenos DEA presentes na superfície das hemácias. A tipagem sanguínea por citometria de fluxo é uma alternativa que já vem sendo estudada na Medicina Humana, e representa uma técnica acurada, sensível, rápida e financeiramente viável (ROBACK et al., 2003; STUSSI et al., 2005).

2.4.3 – Detecção de antígenos em plaquetas de cães

Diversos tipos de ensaios, diretos ou indiretos, têm sido empregados para a detecção de antígenos e anticorpos na superfície de plaquetas de cães, como imunofluorescência (LEWIS & MEYERS, 1996a), ELISA (LEWIS & MEYERS, 1996b) e ensaios imunoradiométricos (SCOTT et al., 2002). Entretanto, cada vez mais estudos têm mostrado que a citometria de fluxo é um ensaio prático, simples, reprodutível e sensível, que pode ser utilizado no estudo de plaquetas de cães (LEWIS et al., 1995; WILKERSON & SHUMAN, 2001; WILKERSON et al., 2001).

A citometria de fluxo já vem sendo empregada para a detecção de antígenos eritrocitários em plaquetas humanas (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000; COOLING et al., 2005) e acredita-se que esta técnica possa ser utilizada para o mesmo fim em plaquetas caninas.

¹ Anticorpo anti-DEA 1.1 monoclonal murino, desenvolvido pela Kansas State University

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Detectar a presença do DEA 1.1 em plaquetas de cães, por meio da técnica de citometria de fluxo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Desenvolver e padronizar a técnica de detecção do antígeno DEA 1.1 em hemácias de cães, pelo método de citometria de fluxo.

2) Validar a técnica de tipagem sanguínea para o tipo sanguíneo DEA 1.1 por citometria de fluxo, comparando-a com o teste padrão de aglutinação em tubo.

3) Avaliar a frequência do tipo sanguíneo DEA 1.1 em cães.

4) Desenvolver e padronizar a técnica de citometria de fluxo para avaliação de plaquetas de cães, e investigar a presença do antígeno DEA 1.1 nas mesmas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 172 cães adultos, de raças variadas, fêmeas e machos, clinicamente saudáveis. Estes animais eram provenientes de programas de doação de sangue dos bancos de sangue *Midwest Animal Blood Services* – Stockbridge – Michigan – EUA e *Michigan State University Veterinary Blood Bank* – East Lansing – Michigan – EUA.

Dos 172 animais, 54 apresentavam tipagem sanguínea para o tipo DEA 1.1 conhecida, enquanto 118 cães apresentavam tipo sanguíneo desconhecido. Desta forma, o presente estudo foi realizado parcialmente às cegas em relação à positividade dos cães para o tipo sanguíneo DEA 1.1.

4.2. COLHEITA DE MATERIAL

As amostras dos 172 cães foram colhidas e processadas em 14 dias diferentes, ao longo de 46 dias, sendo distribuídas em grupos: G1 (27 cães), G2 (11 cães), G3 (sete cães), G4 (nove cães), G5 (13 cães), G6 (sete cães), G7 (17 cães), G8 (nove cães), G9 (11 cães), G10 (13 cães), G11 (10 cães), G12 (seis cães), G13 (17 cães), G14 (15 cães).

Seis mililitros de sangue total foram obtidos em um único momento, por meio de punção jugular e sistema de coleta a vácuo, usando-se agulhas hipodérmicas (20G x 1,5)¹ e tubos plásticos estéreis contendo K₃EDTA (sal tripotássico do ácido etilenodiaminotetracético)¹, evitando-se garroteamento prolongado e múltiplas punções. Os animais foram mantidos em jejum de oito a

¹ BD – Becton Dickinson, Califórnia, EUA

doze horas antes da coleta de material, uma vez que a lipemia plasmática pós-prandial poderia alterar os resultados obtidos na citometria de fluxo.

4.3. ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Depois de colhidas, as amostras foram imediatamente acondicionadas em banho-maria a 37°C e processadas em até trinta minutos para realização de hematócrito, confecção de esfregaço sanguíneo para contagem de plaquetas, e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) para pesquisa do DEA 1.1 em plaquetas por citometria de fluxo. A mesma amostra foi utilizada para a realização de todos os testes.

Após remoção do PRP, as amostras foram novamente centrifugadas para extração do plasma restante e da camada leucocitária, e obtenção do concentrado de hemácias. Este foi acondicionado em Solução de Alsever¹ na proporção 1:1 (1mL de concentrado de hemácias / 1mL de Solução de Alsever) e estocado em refrigeração (4°C) por dois a sete dias, para pesquisa do DEA 1.1 em hemácias por citometria de fluxo e tipagem sanguínea para o DEA 1.1 pelo método de aglutinação em tubo.

4.4. REAGENTES UTILIZADOS NA PRIMEIRA INCUBAÇÃO

4.4.1 – Soro anti-DEA 1.1

O soro anti-DEA 1.1 utilizado no experimento foi obtido em alíquotas de 1mL do banco de sangue *Midwest Animal Blood Services* – Stockbridge – Michigan – EUA.

¹ Sigma-Aldrich, Missouri, EUA

O soro utilizado nos testes com hemácias e plaquetas foi mantido congelado a -8°C e -20°C , respectivamente, e descongelado previamente ao processamento das amostras. O mesmo lote de soro anti-DEA 1.1 foi utilizado durante todo o experimento.

4.4.2 – Pool de plasmas de cães saudáveis não reagente

Um pool de plasmas de cães saudáveis não reagente com nenhum tipo sanguíneo, por não apresentar anticorpos naturais ou aloanticorpos, foi obtido do banco de sangue *Midwest Animal Blood Services* – Stockbridge – Michigan – EUA e separado em alíquotas de 1 mL.

As alíquotas utilizadas nos testes com hemácias e plaquetas foram mantidas congeladas a -8°C e -20°C , respectivamente, e descongeladas previamente ao processamento das amostras. O mesmo lote de pool de plasmas de cães saudáveis não reagente com nenhum tipo sanguíneo foi utilizado durante todo o experimento.

4.4.3 – Preparo dos reagentes para a incubação com plaquetas

Foi realizada a precipitação de imunocomplexos de IgG e inativação do complemento pelo calor, através da incubação do soro anti-DEA 1.1 ou o pool de plasmas de cães saudáveis a 56°C por 10 minutos e posterior centrifugação a $8000\times g$. Para a imunoabsorção e remoção de imunoglobulinas inespecíficas, o sobrenadante foi removido e incubado com plaquetas de um cão saudável a 37°C , por 45 minutos, e posteriormente centrifugado a $1300\times g$ por dois minutos. Este procedimento de incubação com plaquetas e centrifugação foi repetido, e os sobrenadantes do soro anti-DEA 1.1 ou do pool de plasmas de cães saudáveis foram removidos, separados em alíquotas de $50\mu\text{L}$, e congelados a -20°C . O volume de soro ou plasma necessários para a realização de todo o experimento foram submetidos ao processamento descrito no mesmo momento, e o mesmo lote foi utilizado durante todo o estudo.

4.5. CITOMETRIA DE FLUXO

4.5.1 – Anticorpos secundários

O reagente escolhido para a detecção da imunoglobulina IgG canina foi o anticorpo policlonal ovino anti-IgG canina (cadeias leve e pesada) marcado com FITC (FITC labeled sheep anti-dog IgG-h&l polyclonal antibody), número de catálogo: A40-105F, Bethyl Laboratories, Texas, EUA.

Além disso, diversos anticorpos foram utilizados durante o estudo piloto, sendo estes:

- anticorpo monoclonal murino anti-CD61 marcado com PE (PE labeled mouse anti-human CD61 monoclonal antibody, clone VI-PL2), número de catálogo: 555754, Becton Dickinson, California, EUA;

- anticorpo policlonal caprino anti-IgM canina marcado com FITC (FITC labeled goat anti-dog IgM polyclonal antibody), número de catálogo: A40-116F, Bethyl Laboratories, Texas, EUA;

- anticorpo policlonal caprino anti-IgA canina marcado com FITC (FITC labeled goat anti-dog IgA polyclonal antibody), número de catálogo: A40-104F, Bethyl Laboratories, Texas, EUA.

Os reagentes citados acima foram mantidos sob refrigeração (4°C) e ao abrigo da luz (cobertos com papel alumínio), durante todo o experimento.

4.5.2 – Fase analítica

As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo FACScalibur¹, computador Power Macintosh e programa Cell Quest¹. O aparelho foi calibrado² antes de cada bateria de exames, e sua programação ajustada para a escala log, com a configuração para o detector de FSC (“forward scatter”) sendo de voltagem = E00 e AmpGain = 2,25; SSC (“side scatter”) sendo de voltagem = 304 e AmpGain = 1.32; FL1 (detector de fluorescência verde – FITC) sendo de voltagem = 703; FL2 (detector de fluorescência vermelha – PE) sendo de voltagem = 417; e FSC threshold = 100.

¹ BD – Becton Dickinson, Califórnia, EUA

² CaliBRITE 3 Beads – BD – Becton Dickinson, Califórnia, EUA

4.6. EXAMES LABORATORIAIS

4.6.1 – Hematócrito

O hematócrito foi determinado até trinta minutos após a colheita pelo método do microhematócrito¹, usando-se sangue total. Foram descartados do estudo cães com resultados diferentes aos valores de referência para a espécie (37 – 55%)².

4.6.2 – Contagem de plaquetas

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados a partir do sangue total, até 30 minutos após a colheita, secos ao ar e corados com Wright. O número de plaquetas foi estimado calculando-se a média do número de plaquetas obtida em cinco campos de imersão (1000x)³ e multiplicando-se pelo fator 15.000, conforme metodologia adotada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do *College of Veterinary Medicine – Michigan State University – East Lansing – MI – EUA* e no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual Paulista – Botucatu – SP. Entraram no experimento somente cães com número de plaquetas dentro dos valores de referência para a espécie (150.000 – 500.000 plaquetas/ μ L)².

¹ Microcentrífuga Haematocrit 4203, ALC, Itália

² Valores adotados pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do College of Veterinary Medicine – Michigan State University – East Lansing – MI – EUA

³ Microscópio BX51, Olympus, EUA

4.7. PESQUISA DO ANTÍGENO ERITROCITÁRIO CANINO 1.1 POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.7.1 – Hemácias

Preparo da solução de hemácias

As amostras de sangue total foram centrifugadas a $3500 \times g$ ¹ por dois minutos para extração do plasma e da camada leucocitária. O concentrado de hemácias foi acondicionado em Solução de Alsever² na proporção 1:1 e estocado em refrigeração (4°C). A pesquisa do DEA 1.1 em hemácias de cães por citometria de fluxo foi realizada de dois a sete dias após a colheita do material. Para isso, 100µL de concentrado de hemácias foram lavados três vezes em 1mL de solução tampão PBS-BSA-EDTA e ressuspensos em 1mL da mesma solução tampão.

Primeira incubação

Para cada cão testado, dois tubos foram identificados como “controle negativo” e “teste”. No tubo “controle negativo”, foram misturados 50µL da solução de hemácias com 50µL de um pool de plasmas de cães saudáveis não reagente com nenhum tipo sanguíneo (diluído 1:2, ou seja, uma parte de plasma para uma parte de solução tampão). No tubo “teste” foram misturados 50µL da solução de hemácias com 50µL de soro anti-DEA 1.1 (diluído 1:2, ou seja, uma parte de soro para uma parte de solução tampão). Ambos os tubos foram incubados³ a 37°C por 30 minutos.

Segunda incubação

Após a primeira incubação, as hemácias foram lavadas duas vezes com PBS-BSA-EDTA e o “pellet” de células foi ressuspensão em 500µL da mesma

¹ HN-SII Centrifuge, International Equipment Company, Massachusetts, EUA

² Sigma-Aldrich, Missouri, EUA

³ Imperial III Incubator, Lab-Line, Barnstead International, Iowa, EUA

solução tampão, de forma a se atingir uma solução de aproximadamente 50.000 células/ μL . Em seguida, 100 μL da solução de hemácias foram incubados, à temperatura ambiente (23 °C), com 3 μL do anticorpo policlonal ovino anti-IgG canina marcado com FITC, no escuro, por 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado nos tubos controle negativo e teste.

Citometria de fluxo

Após a incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS-BSA-EDTA e ressuspensas em 500 μL de PBS-FCS, resultando em uma solução de aproximadamente 5×10^6 células. A população de hemácias foi selecionada por “gate”, usando-se os parâmetros de tamanho (FSC = “Forward scatter”) e granulosidade (SSC = “Side scatter”) e 10.000 eventos foram contados.

Controles

A cada bateria de exames (uma bateria por grupo), hemácias conhecidamente positivas e negativas para o DEA 1.1 foram processadas e incubadas da mesma forma descrita acima, com o soro anti-DEA 1.1, para controle positivo e negativo da reação, respectivamente.

4.7.2 – Plaquetas

Preparo da solução de plaquetas

Plasma rico em plaquetas (PRP) foi separado do sangue total por centrifugação a 1300 $\times g$ ¹ por dois a quatro minutos, até trinta minutos após a colheita do material. As amostras de PRP foram tratadas com Prostaglandina E1 (PgE1)², na proporção de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, e centrifugadas a 1300 $\times g$ ³ por dois minutos. Após remoção do plasma, as plaquetas foram lavadas três vezes com

¹ HN-SII Centrifuge, International Equipment Company, Massachusetts, EUA

² Prostaglandin E1, # P5515, Sigma-Aldrich, EUA

³ Marathon MicroM Centrifuge, Fischer Scientific, EUA

solução tampão PBS-BSA-EDTA a 37°C, e ressuspensas em 1mL da mesma solução. As plaquetas foram contadas pelo método do hemocítômetro e a solução foi ajustada para uma concentração de 100.000 plaquetas/ μ L.

Primeira incubação

Para cada cão testado, dois tubos foram identificados como “controle negativo” e “teste”. No tubo “controle negativo” foram misturados 50 μ L da solução de plaquetas com 50 μ L de um pool de plasmas de cães saudáveis não reagente com nenhum tipo sanguíneo (diluído 1:3, ou seja, uma parte de plasma para duas partes de solução tampão). No tubo “teste” foram misturados 50 μ L da solução de plaquetas com 50 μ L de soro anti-DEA 1.1 (diluído 1:3, ou seja, uma parte de soro para duas partes de solução tampão). Ambos os tubos foram incubados¹ a 37°C por 30 minutos.

Segunda incubação

Após a primeira incubação, as plaquetas foram lavadas três vezes com PBS-BSA-EDTA a 37°C, ressuspensas em 100 μ L da mesma solução tampão e incubadas à temperatura ambiente (23 °C), com 3 μ L do anticorpo policlonal ovino anti-IgG canina marcado com FITC, no escuro, por 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado nos tubos controle negativo e teste.

Citometria de fluxo

Após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas três vezes com PBS-BSA-EDTA e ressuspensas em 500 μ L de PBS-FCS, resultando em uma solução de aproximadamente 5×10^6 células. A população de plaquetas foi selecionada a partir de sua marcação com o anticorpo monoclonal murino anti-CD61 marcado com PE e com base nos parâmetros FSC e SSC. Foram adquiridos 10.000 eventos.

¹ Imperial III Incubator, Lab-Line Instruments Inc, Barnstead International, Iowa, EUA

Controles

A cada bateria de exames, hemácias conhecidamente positivas e negativas para o DEA 1.1 foram processadas e incubadas com o soro anti-DEA 1.1 da mesma forma descrita acima, para controle positivo e negativo da reação, respectivamente.

Além disso, foram realizados controles com plaquetas, também a cada bateria de exames, sempre com o primeiro animal de cada grupo. Os controles realizados foram:

1) controle para auto-fluorescência das plaquetas: plaquetas foram incubadas com a solução tampão PBS-BSA-EDTA na primeira e segunda incubações;

2) controle para a ligação inespecífica do anticorpo anti-IgG canina às plaquetas: plaquetas foram incubadas com a solução tampão PBS-BSA-EDTA na primeira incubação, e com o anticorpo policlonal ovino anti-IgG canina na segunda incubação;

3) controle positivo da ligação do anticorpo secundário anti-IgG canina à IgG canina: plaquetas foram incubadas com o plasma proveniente de um animal com trombocitopenia imunomediada (rico em IgG anti-GPIbIX canina) na primeira incubação, e com o anticorpo policlonal ovino anti-IgG canina na segunda incubação.

4.8. TIPAGEM SANGUÍNEA PARA O DEA 1.1 PELO MÉTODO DA AGLUTINAÇÃO EM TUBO

A tipagem sanguínea pela aglutinação em tubo consiste no teste padrão (“gold-standard”) para tipagem sanguínea em cães, e se baseia na hemaglutinação para detecção de antígenos específicos na superfície de hemácias.

Este teste foi utilizado primeiramente para confirmar os resultados obtidos para tipagem sanguínea pelo método de citometria de fluxo. Além

disso, a comparação entre os resultados de ambos os testes permitiu determinar a acurácia diagnóstica da tipagem sanguínea pelo método de citometria de fluxo, avaliando sua possível utilização como um ensaio clínico.

Os testes que apresentaram resultados discrepantes para a presença do DEA 1.1 em hemácias de cães, entre os dois ensaios, foram repetidos, utilizando-se ambas as técnicas.

4.8.1 – Preparo da solução de hemácias

Para a tipagem sanguínea para o DEA 1.1, 1mL de concentrado de hemácias foi colocado em um tubo de ensaio com aproximadamente 4mL de solução tampão PBS, homogeneizado e centrifugado¹ na velocidade de 1000xg por um minuto, desprezando-se o sobrenadante. Este processo de lavagem de células foi repetido por três vezes, para remoção das proteínas do plasma ligadas às hemácias, e 100µL de hemácias lavadas foram ressuspensas com 2,5mL de PBS, para a obtenção de uma solução de hemácias a 4%.

4.8.2 – Ensaio para tipagem sanguínea para o DEA 1.1 pelo método de aglutinação em tubo

Para cada cão testado, dois tubos foram identificados como “controle negativo” e “teste”. Foram colocados 50µL de PBS no tubo “controle negativo” e 50µL de soro anti-DEA 1.1 no tubo “teste”. Em ambos os tubos foram adicionados 50µL de solução de hemácias a 4%. Os tubos foram agitados cuidadosamente para homogeneização dos reagentes e incubados² por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados³ a 1000xg por 15 segundos e lidos para aglutinação ou hemólise⁴.

As células de todos os tubos foram lavadas (conforme anteriormente descrito) três vezes com 1mL de PBS, e após descarte do sobrenadante, foram adicionados 50µL de Reagente de Coombs⁴ (diluído 1:10) a cada tubo, a fim de

¹ Sero-Fuge Centrifuge, Clay Adams Brand, BD, Califórnia, EUA

² Mult-Blok Module Heater, Lab-Line, Barnstead International, Iowa, EUA

³ Sero-Fuge Centrifuge, Clay Adams Brand, BD, Califórnia, EUA

⁴ Agglutination Viewer, Clay Adams Brand, BD, Califórnia, EUA

aumentar a sensibilidade da reação. Os tubos foram agitados cuidadosamente para homogeneização dos reagentes e incubados¹ por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados² a 1000xg por 15 segundos e lidos para aglutinação ou hemólise³. A cada bateria de exames foram testadas amostras de sangue conhecidamente positivas e negativas para o DEA 1.1, como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.8.3 – Análise dos resultados

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram aglutinação (de uma a quatro +) ou hemólise nos tubos, conforme escala de positividade utilizada pelo Laboratório de Imunohematologia e Sorologia (*Immunohematology and Serology Laboratory*) da *Michigan State University* (Figura 1).

Com base nos parâmetros determinados para positividade, foram calculadas e comparadas a acurácia do teste de tipagem sanguínea de hemácias por aglutinação em tubo e por citometria de fluxo.

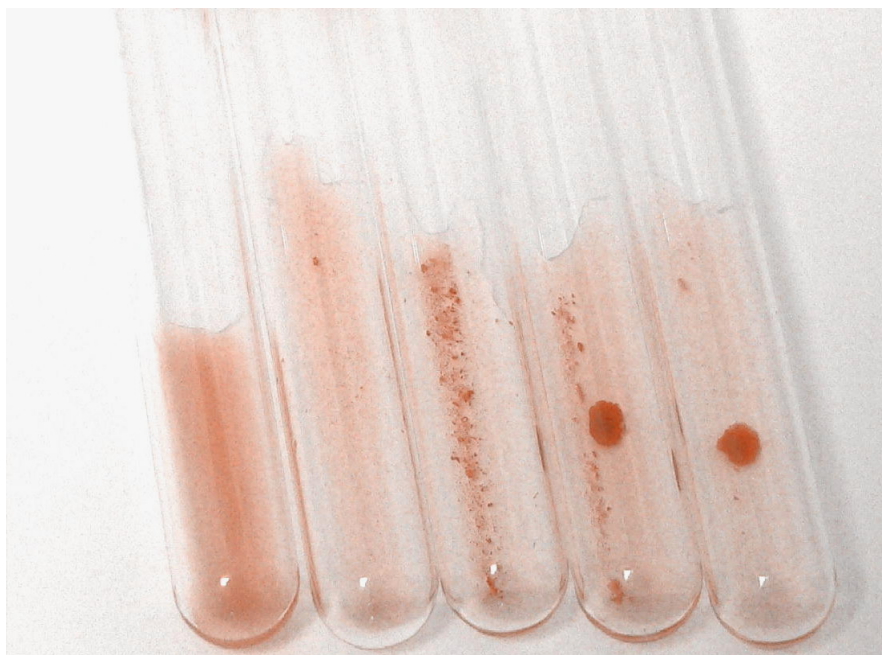


FIGURA 1: Escala de hemaglutinação para positividade para o DEA 1.1. Da esquerda para a direita: negativo, positivo +, ++, +++ e ++++.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos resultados obtidos pela citometria de fluxo foi realizada considerando-se os valores de intensidade de fluorescência mediana (MdFI), devido à distribuição não normal da população de células nos histogramas avaliados.

4.9.1 – Hemácias

Foram consideradas negativas para o DEA 1.1 hemácias com MdFI entre 8,58 e 24,58; e positivas hemácias com MdFI entre 73,65 e 749,89; com base nos resultados obtidos na tipagem sanguínea pelo método de aglutinação em tubo.

Para a comparação dos dois grupos (hemácias positivas e negativas para o DEA 1.1 pela citometria de fluxo), utilizou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância foi de 1%.

4.9.2 – Plaquetas

Foram comparados os valores de MdFI obtidos para as plaquetas do grupo de animais com tipo sanguíneo DEA 1.1 negativo e DEA 1.1 positivo, usando-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Para detecção de indivíduos possivelmente positivos para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas, foram selecionados do grupo de animais com tipo sanguíneo DEA 1.1 positivo, os animais com valores de MdFI em plaquetas maiores do que o maior valor de MdFI em plaquetas obtido no grupo dos animais com tipo sanguíneo DEA 1.1 negativo. Em seguida, foram obtidas as razões entre a MdFI de plaquetas incubadas com o soro anti-DEA 1.1 (teste) e a MdFI de plaquetas incubadas com o pool de plasmas de cães não reagentes, para todos os animais, a fim de neutralizar sinais de fluorescência provenientes de ligações inespecíficas de imunoglobulinas do soro com as plaquetas testadas. Os testes de Mann-Whitney e t de Student foram empregados para a comparação das razões entre o grupo de animais positivos

e negativos para o tipo sanguíneo DEA 1.1, e para a comparação das razões entre os animais possivelmente positivos e negativos para o DEA 1.1, respectivamente. O nível de significância foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. HEMATÓCRITO E NÚMERO DE PLAQUETAS

Os 172 cães estudados apresentaram hematócrito (Ht) entre 37 e 55%, com média de 47,5%, e número de plaquetas entre 159.000 e 465.000/ μ L, com média de 242.145 plaquetas/ μ L. Os valores de hematócrito e número de plaquetas de todos os animais encontram-se na Tabela 2.

5.2. DETECÇÃO DO ANTÍGENO DEA 1.1 EM HEMÁCIAS DE CÃES

5.2.1 – Método de citometria de fluxo

A população de hemácias foi selecionada por “gate”, a partir dos parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade), em estudos piloto com hemácias não coradas, provenientes de concentrado de hemácias (Figura 2).

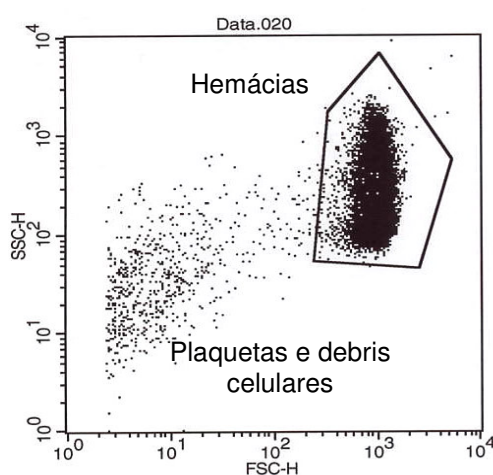


FIGURA 2: “Gating” da população de hemácias, em gráfico de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), obtido a partir de concentrado de hemácias.

Foram obtidos resultados entre 8,58 e 749,89 de MdFI nas hemácias testadas para a detecção do antígeno DEA 1.1. Com base nos resultados obtidos na tipagem sanguínea pela aglutinação em tubo, foram consideradas negativas para o DEA 1.1 hemácias com MdFI entre 8,58 e 24,58; e positivas hemácias com MdFI entre 73,65 e 749,89.

A Tabela 2 mostra os valores de MdFI para detecção do antígeno DEA 1.1 em hemácias dos 172 cães estudados, e sua interpretação para este tipo sanguíneo, sendo considerados 62 animais negativos e 110 positivos. A média da MdFI das hemácias positivas (407,44) foi 25,85 vezes maior do que a média da MdFI das hemácias negativas (15,76). O menor valor obtido para as hemácias positivas (73,65) foi pelo menos três vezes maior do que o maior valor obtido para as hemácias negativas (24,58). O maior valor obtido para as hemácias positivas (749,89) foi até 30 vezes maior do que o maior valor obtido para animais negativos (24,58). A Figura 3 ilustra o histograma obtido na detecção do antígeno DEA 1.1 em hemácias de um cão negativo e um positivo para este tipo sanguíneo.

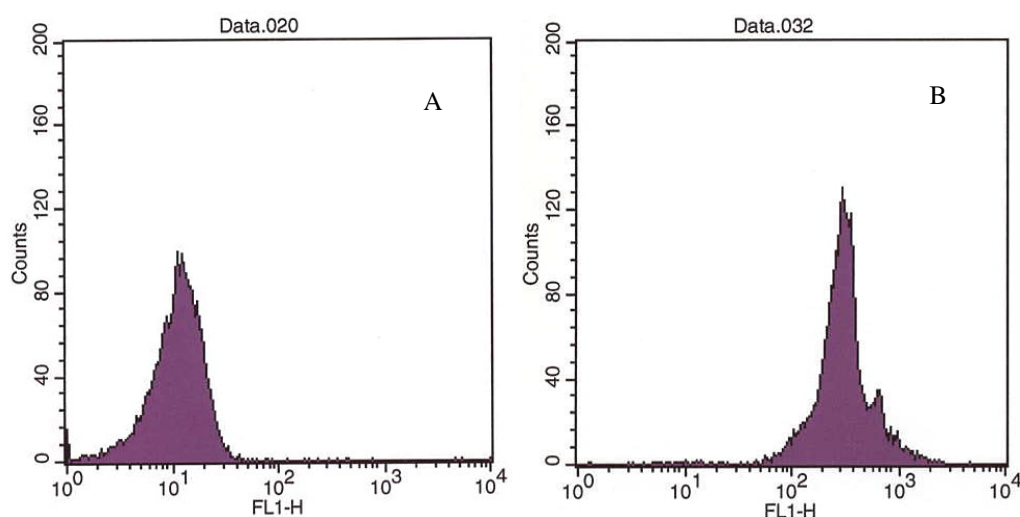


FIGURA 3: A) Histograma de hemácias de um cão negativo para o tipo sanguíneo DEA 1.1 (MdFI = 12,08); B) Histograma de um cão positivo para este mesmo tipo sanguíneo (MdFI = 330,77).

A avaliação estatística revelou diferença significativa ($P \leq 0,001$) entre o grupo de animais negativos ($n = 62$) e positivos ($n = 110$) para o tipo sanguíneo DEA 1.1; com valores de mediana de 15,06 e 390,69; respectivamente.

5.2.2 – Método de aglutinação em tubo

A tipagem sanguínea dos 172 cães pela aglutinação em tubo revelou, inicialmente, 102 animais positivos e 70 negativos para o DEA 1.1. Dez animais apresentaram resultado negativo na aglutinação em tubo, porém altos valores de MdFI na citometria de fluxo, ao passo que dois animais apresentaram resultado positivo na aglutinação em tubo e baixa fluorescência nas hemácias. Desta forma, 12 animais apresentaram resultados discrepantes, e a tipagem sanguínea para o DEA 1.1 foi repetida usando-se ambos os métodos. A Tabela 2 mostra os resultados para tipagem sanguínea obtidos para os 172 cães avaliados por ambos os testes no primeiro momento, e os resultados discrepantes encontram-se destacados em negrito.

Após a repetição dos ensaios, todos os resultados discrepantes concordaram com os resultados obtidos a princípio pela citometria de fluxo, conforme mostra a Tabela 3.

TABELA 2a: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
Grupo 1 – 27 cães							
1	Boodie Ray*	48	264.000	14,72	-	-	53,28
2	Quiney Ray*	48	171.000	209,08	+	+	46,56
3	Grace Ray*	49	207.000	291,64	+	+	28,39
4	Cleveland Ray*	48	261.000	73,65	+	+	44,51

TABELA 2b: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
5	Chana Naegle*	52	228.000	15,12	-	-	36,85
6	Brutus England*	54	201.000	15,26	-	-	43,32
7	Luke Cote*	55	213.000	14,72	-	-	44,11
8	Maddie Otto*	50	207.000	13,7	-	-	55,23
9	Kiff Watson*	55	234.000	281,33	+	+	32,2
10	Lars Williams*	55	177.000	12,52	-	-	31,62
11	Jammer Williams*	49	234.000	12,08	-	-	25,71
12	Mc Keaq Gorman*	42	279.000	239,28	+	-	34,91
13	Cujo Gorman*	50	219.000	410,47	+	+	25,03
14	Grady Tobin*	45	228.000	241,44	+	+	36,85
15	Time Tobin*	46	216.000	14,99	-	-	54,74
16	Meg Greenleaf*	54	291.000	299,61	+	+	31,06
17	Cric lab Plummer*	55	174.000	98,22	+	+	43,32
18	Harley Plummer*	51	252.000	14,99	-	-	50,03
19	Hershey Dalton*	52	246.000	321,97	+	+	33,38
20	Norman Marcoux*	49	243.000	316,23	+	+	33,98
21	Trinia Eales*	55	228.000	13,95	-	-	37,86
22	Grace Adams*	52	264.000	13,7	-	-	29,43
23	Tuscan Marcoux*	53	207.000	230,82	+	+	31,34
24	Sherman Marcoux*	54	225.000	96,47	+	+	26,18
25	Bert Marcoux*	50	285.000	15,4	-	-	33,38
26	Jenna Marcoux*	47	321.000	336,78	+	+	24,14
27	Baily Marcoux*	52	234.000	283,87	+	+	29,16

TABELA 2c: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
Grupo 2 – 11 cães							
28	Louie Schupska*	45	216.000	9,65	-	-	45,73
29	Dylan Schupska	42	240.000	254,83	+	+	52,33
30	Bunnie Parr	42	357.000	305,05	+	+	51,4
31	Sabrina Clark	45	270.000	250,29	+	+	85,05
32	Brody Beam	44	222.000	235,01	+	+	29,69
33	Maia Beam*	49	234.000	182,69	+	+	47,4
34	Howdy Wellce	44	306.000	216,74	+	+	31,91
35	Dulce Chadwick	48	261.000	83,54	+	+	122,98
36	Zachariah Chadwick	39	213.000	286,44	+	+	58,82
37	Beau	49	285.000	214,8	+	+	46,98
38	Guinness	44	213.000	8,58	-	-	32,78
Grupo 3 – 7 cães							
39	Willow Chidester	39	354.000	8,9	-	-	33,38
40	Handsome Baker	44	198.000	316,23	+	+	56,23
41	Tabor Johnson	38	213.000	209,08	+	+	74,32
42	Cedar Begin	44	273.000	218,7	+	+	40,32
43	Jake Conley	39	213.000	8,66	-	-	63,78
44	Atlas G	43	249.000	218,7	+	+	46,56
45	Sage Grillo	47	201.000	330,77	+	+	37,86
Grupo 4 – 9 cães							
46	Grace Le Blanc	46	252.000	449,1	+	+	56,74
47	Dudley Johnson	44	234.000	704,14	+	+	51,86

TABELA 2d: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
48	Maddie Mauro	43	279.000	417,92	+	+	31,91
49	Faygo Bunce	42	264.000	523,3	+	+	39,6
50	Zipper Striler	41	201.000	465,55	+	+	60,43
51	Dusty Striler	38	402.000	542,47	+	+	22,27
52	Soda Bunce	37	300.000	18,43	-	-	33,38
53	Mason Hulder	50	216.000	17,47	-	-	37,86
54	Valentine Chedwick	49	219.000	716,92	+	+	94,75
Grupo 5 – 13 cães							
55	Hugs Ridler	47	216.000	593,52	+	+	79,86
56	Kisses Ridler	45	228.000	562,34	+	+	46,98
57	Duke Carey	53	264.000	697,83	+	+	61,53
58	George Limone	47	267.000	673,17	+	+	66,71
59	Vader Sanchez*	55	294.000	620,82	+	+	55,73
60	Hamm Lane	55	282.000	18,43	-	-	71,69
61	Stipe Noah	53	222.000	486,97	+	+	44,51
62	Tupelo Smith	45	267.000	23,08	-	-	66,12
63	Harley Sparks*	46	198.000	486,97	+	+	50,03
64	Sheba Lynn*	49	252.000	20,91	-	-	36,19
65	Angélica Simon*	48	450.000	18,11	-	-	40,32
66	Donna Simon*	46	255.000	223,67	+	+	45,32
67	Rajah Zoote	40	186.000	395,96	+	+	48,7
Grupo 6 – 7 cães							
68	Zeke Lugten	50	255.000	245,82	+	+	42,94

TABELA 2e: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
69	Caimen Lugten	41	183.000	704,14	+	+	35,23
70	Robie Merkel	46	237.000	528,03	+	+	32,49
71	Demi Wahl*	54	198.000	743,18	+	-	29,43
72	Stella Noves*	42	258.000	17,31	-	-	34,91
73	Lilly Vonhusson*	47	324.000	567,42	+	-	43,32
74	Maya Vorner*	44	207.000	403,15	+	-	56,49
Grupo 7 – 17 cães							
75	Cy Jones*	46	237.000	500,29	+	+	46,56
76	Annie Cate*	44	240.000	22,47	-	-	45,32
77	Kodiak Faney*	50	246.000	736,53	+	+	36,19
78	Keegan Fourier*	42	204.000	143,3	+	-	45,32
79	Melaine Israel*	52	186.000	410,47	+	+	46,56
80	Sprout Niksich*	49	258.000	16,85	-	-	29,16
81	Jackson Stamper*	44	252.000	23,08	-	-	41,42
82	Pico Turnbull*	46	237.000	24,58	-	-	45,73
83	Lakota Belanger*	49	177.000	21,1	-	-	46,14
84	Yasmeen Brantman*	49	219.000	24,14	-	-	44,11
85	Ethel Huck*	45	273.000	749,89	+	-	38,2
86	Arlo Baer*	40	300.000	15,68	-	-	28,9
87	Gidget Genda-Kolber*	52	273.000	509,37	+	+	36,52
88	Rusty Swayman*	45	315.000	437,14	+	+	42,55
89	Rosco Barlage*	47	216.000	414,18	+	+	41,42
90	Griff Withers*	44	204.000	523,3	+	+	59,89
91	Dawson Whitmer*	44	165.000	385,42	+	+	55,23

TABELA 2f: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
Grupo 8 – 9 cães							
92	Magoo Hardy*	44	165.000	156,79	+	+	53,76
93	Vegas Brooks	51	222.000	567,42	+	+	44,91
94	Coconut Denhouter*	51	231.000	153,99	+	-	35,23
95	Katy McNitt*	55	165.000	327,81	+	-	30,78
96	Jessie Mauro	45	234.000	371,8	+	+	51,4
97	Sadie Salmon*	51	234.000	18,11	-	-	53,76
98	Noah Loomans*	52	174.000	313,4	+	-	68,54
99	Callisto Pfent	55	204.000	14,2	-	-	43,71
100	Otter Swanson*	45	189.000	273,84	+	+	37,52
Grupo 9 – 11 cães							
101	Bailey Rosetto	51	243.000	378,55	+	-	37,52
102	Durga Schaible*	54	159.000	132,16	+	+	33,98
103	Harley Weber*	46	210.000	18,27	-	-	33,08
104	Sandy Weber*	53	204.000	21,48	-	-	34,29
105	Porter Prinz	47	231.000	352,27	+	+	41,42
106	Baxter DuPuis	49	201.000	296,93	+	+	51,86
107	Guinness Prinz	50	192.000	381,97	+	+	72,34
108	Jake DuPuis	50	180.000	504,81	+	+	56,23
109	Gunner Prinz	48	159.000	342,89	+	+	45,32
110	Jessie Heck*	49	231.000	457,25	+	+	42,17
111	Annabelle Heck*	54	198.000	552,32	+	+	39,6

TABELA 2g: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
Grupo 10 – 13 cães							
112	Lui Fitzpatrick*	48	288.000	410,47	+	+	30,51
113	Darci Fitzpatrick*	50	225.000	13,46	-	-	43,71
114	Clark Miller*	55	225.000	395,96	+	+	27,63
115	Blue Nowicki*	42	258.000	542,47	+	+	24,8
116	Hanah Smith*	50	198.000	11,86	-	-	28,9
117	Porkchop Moore*	46	255.000	266,55	+	+	24,36
118	Ebony Timmer*	51	234.000	278,81	+	+	58,29
119	Skylar Krentz*	47	267.000	14,99	-	-	19,81
120	Lily Fedore*	47	213.000	13,95	-	-	35,23
121	Buddy Beal*	53	207.000	13,7	-	-	28,13
122	Casper Gershenson*	52	231.000	12,86	-	-	15,12
123	T-Bone Vong*	48	177.000	12,86	-	-	23,93
124	Bear Verberkman	53	168.000	319,08	+	+	44,51
Grupo 11 – 10 cães							
125	Diva Ocello	49	186.000	224,68	+	+	41,05
126	Susie Nowicki*	55	315.000	13,7	-	-	38,89
127	Allie Gilbert*	53	204.000	12,08	-	-	20,72
128	Sampson Surbu*	52	183.000	16,4	-	-	34,6
129	ICAC 06-190*	45	264.000	15,4	-	-	40,68
130	ICAC 06-191*	45	294.000	13,7	-	-	42,94
131	ICAC 06-193*	40	306.000	365,17	+	+	34,29
132	ICAC 06-196*	38	204.000	495,81	+	+	33,98
133	ICAC 06-192*	40	252.000	342,89	+	+	29,16

TABELA 2h: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
134	ICAC 06-194*	38	207.000	577,72	+	+	86,6
Grupo 12 – 6 cães							
135	Freddie	46	189.000	342,89	+	+	30,23
136	Ellie Mac	43	204.000	441,09	+	+	32,49
137	Mark	53	207.000	19,81	-	+	37,52
138	Oscar	53	225.000	355,45	+	+	26,42
139	Patrick	43	171.000	120,79	+	+	51,86
140	Beaker	44	198.000	13,95	-	+	24,14
Grupo 13 – 17 cães							
141	Tinker Roach*	49	225.000	620,82	+	+	43,32
142	Muqsy Roach*	47	225.000	504,81	+	+	66,12
143	Briggs Roach*	55	219.000	15,82	-	-	55,23
144	Li Hechief*	55	273.000	17,47	-	-	38,2
145	Astrid Rodriguez*	47	234.000	15,4	-	-	33,98
146	Bengal Rodriguez*	48	216.000	437,14	+	+	35,23
147	Ty Lamar*	52	222.000	14,33	-	-	41,79
148	Frank Beal	43	246.000	567,42	+	+	34,29
149	Corki Lamar*	51	261.000	14,2	-	-	53,76
150	Josey Lamar*	50	291.000	226,71	+	+	37,52
151	CXPAWE*	45	228.000	20,91	-	-	41,05
152	CMXBAV*	45	249.000	16,4	-	-	52,33
153	CXMART*	39	240.000	15,96	-	-	66,71
154	CXPAFW*	38	216.000	14,86	-	-	43,32

TABELA 2i: Hematócrito (Ht), número de plaquetas (Plq), MdFI de hemácias para o DEA 1.1 (MdFI He), resultado da tipagem sanguínea de hemácias para o DEA 1.1 por citometria de fluxo (CF) e aglutinação em tubo (AT), e MdFI de plaquetas para o DEA 1.1 (MdFI Plq) dos 172 cães estudados. Estão destacados em negrito os resultados discrepantes entre os dois testes avaliados para tipagem sanguínea das hemácias de 12 cães.

Cão	Nome	Ht (%)	Plq (/µl)	MdFI He	CF	AT	MdFI Plq
155	CXMAXF*	38	243.000	16,25	-	-	63,78
156	CXPBAH*	38	243.000	283,87	+	+	33,68
157	CXMABZ*	39	216.000	17,94	-	-	52,8
Grupo 14 – 15 cães							
158	Aviendha Simon*	49	339.000	643,57	+	+	32,49
159	Snap Simon*	53	264.000	13,95	-	-	44,11
160	Odin Simon*	51	297.000	729,93	+	+	42,55
161	Jane Simon*	53	264.000	679,25	+	+	34,91
162	Galloway Simon*	51	402.000	723,39	+	+	30,78
163	Gidget Simon*	55	387.000	562,34	+	+	23,93
164	Buffy Simon*	55	306.000	667,14	+	+	36,85
165	Amaretto Simon*	50	345.000	12,63	-	-	33,08
166	Adam Simon*	43	258.000	11,44	-	-	27,63
167	Moses Simon*	41	465.000	469,76	+	+	29,43
168	Doris Simon*	47	261.000	637,8	+	+	36,19
169	Junior Simon*	49	384.000	567,42	+	+	42,94
170	Luke Simon*	50	333.000	704,14	+	+	41,42
171	ICAC Valerie*	39	237.000	495,81	+	+	46,56
172	ICAC Tia*	37	240.000	449,1	+	+	27,88

*: Animais com tipo sanguíneo inicialmente desconhecido.

TABELA 3: Resultados discrepantes para a detecção do antígeno DEA 1.1 em hemácias em 12 animais, para os quais CF 1 = primeira tipagem por citometria de fluxo, AT 1 = primeira tipagem por aglutinação em tubo, CF 2 = segunda tipagem por citometria de fluxo e AT 2 = segunda tipagem por aglutinação em tubo, MdFI = mediana da intensidade de fluorescência de hemácias para o DEA 1.1.

Cão	Nome	CF 1 / MdFI	AT 1	CF 2 / MdFI	AT 2	Conclusão
12	Mc Keaq Gorman	+ / 239,28	-	+ / 133,35	+	+
69	Demi Wahl	+ / 743,18	-	+ / 557,31	+	+
71	Lilly Vonhusson	+ / 567,42	-	+ / 557,31	+	+
72	Maya Vornier	+ / 403,15	-	+ / 271,39	+	+
76	Keegan Fourier	+ / 143,30	-	+ / 132,16	+	+
83	Ethel Huck	+ / 749,89	-	+ / 598,89	+	+
91	Coconut Denhouter	+ / 153,99	-	+ / 130,97	+	+
92	Katy McNitt	+ / 327,81	-	+ / 288,91	+	+
95	Noah Loomans	+ / 313,40	-	+ / 191,33	+	+
98	Bailey Rosetto	+ / 378,55	-	+ / 332,56	+	+
132	Mark	- / 19,81	+	- / 22,88	-	-
135	Beaker	- / 13,95	+	- / 12,86	-	-

5.2.3 – Prevalência do DEA 1.1

Dos 172 cães estudados, 118 apresentavam tipagem sanguínea desconhecida para o DEA 1.1. Destes 118 animais, 66 foram positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1, representando 55,9% da população. Os animais com tipo sanguíneo desconhecido estão sinalizados com “*” na Tabela 2.

5.3 – DETECÇÃO DO ANTÍGENO DEA 1.1 EM PLAQUETAS DE CÃES POR CITOMETRIA DE FLUXO

A população de plaquetas foi selecionada por “gate”, a partir de estudos piloto com o anticorpo monoclonal murino anti-CD61 marcado com PE e os parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade), em plaquetas provenientes de plasma rico em plaquetas, conforme demonstrado nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

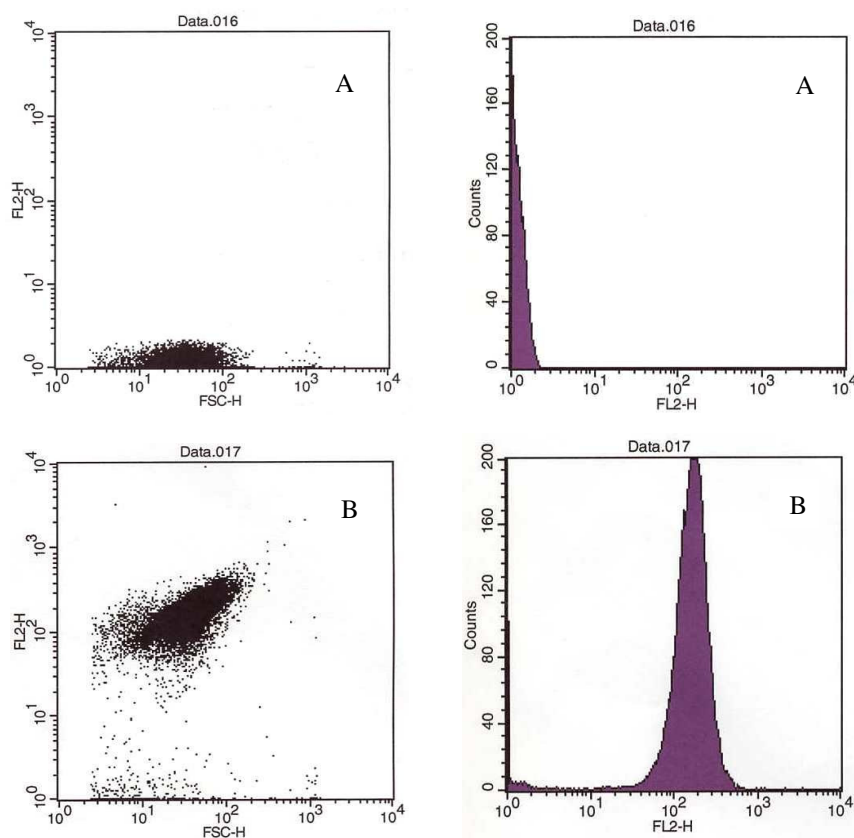


FIGURA 4: População de plaquetas, em gráficos de tamanho (FSC-H) x fluorescência (FL2-H) e fluorescência (FL2-H) x número de eventos (Counts), obtido a partir de plasma rico em plaquetas. A) Plaquetas não coradas com anticorpo monoclonal murino anti-CD61 marcado com PE (Intensidade de fluorescência média = 1,07); B) Plaquetas coradas com anticorpo monoclonal murino anti-CD61 marcado com PE (Intensidade de fluorescência média = 164,87).

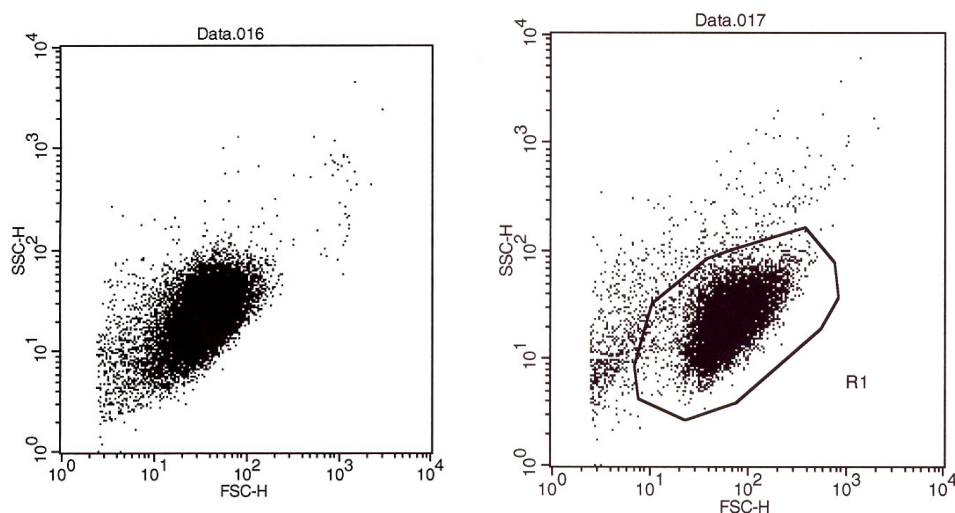


FIGURA 5: “Gating” da população de plaquetas (R1), em gráfico de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), obtido a partir de plasma rico em plaquetas.

Os controles negativos para autofluorescência das plaquetas, realizados a cada bateria de exames, apresentaram baixa reatividade, com média de MdFI de 2,5 e desvio padrão de 0,26. Os controles negativos para a ligação inespecífica do anticorpo anti-IgG canina às plaquetas apresentaram níveis um pouco mais elevados, com a média de MdFI de 18,51 e desvio padrão de 9,9. Os controles positivos para a ligação do anticorpo secundário anti-IgG canina à IgG canina em plaquetas apresentaram média de MdFI de 671,35 e desvio padrão de 179,31. Os valores de MdFI obtidos com os controles negativos e positivo apresentam-se na Tabela 4 e estão ilustrados na Figura 6.

A Tabela 2 mostra os valores de MdFI para pesquisa do antígeno DEA 1.1 em plaquetas dos 172 cães estudados. A Figura 7 ilustra o histograma obtido para a detecção do antígeno DEA 1.1 em plaquetas de um cão negativo e um positivo para este tipo sanguíneo.

TABELA 4: Valores de MdFI obtidos nos controles negativos para autofluorescência das plaquetas (Cont neg 1 - buffer), controles negativos para a ligação inespecífica do anticorpo anti-IgG canina às plaquetas de cães (Cont neg 2 – buffer + FITC) e controles positivos para a ligação do anticorpo secundário anti-IgG canina à IgG canina em plaquetas (Cont pos).

Grupo	Cont neg 1 – buffer	Cont neg 2 – buffer + FITC	Cont pos
1	3,13	17,15	523,30
2	2,62	15,26	637,80
3	2,79	12,86	889,65
4	2,27	44,91	355,45
5	2,34	35,87	784,39
6	2,33	18,94	685,39
7	2,86	18,43	873,79
8	2,39	19,99	770,40
9	2,25	14,59	582,94
10	2,44	11,44	399,54
11	2,39	15,61	736,53
12	2,31	11,76	661,17
13	2,57	11,62	956,02
14	2,29	10,65	542,47
Média	2,50	18,51	671,35
DP	0,26	9,90	179,31

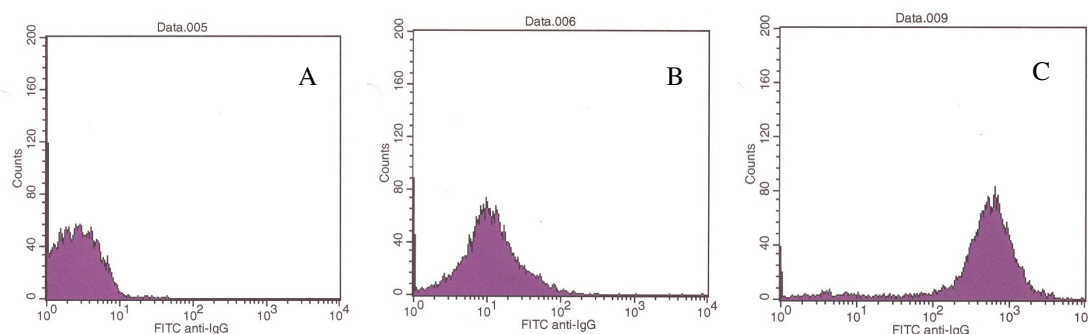


FIGURA 6: Histogramas ilustrando: A) controle negativo para autofluorescência das plaquetas (plaquetas incubadas com solução tampão – MdFI = 2,25); B) controle negativo para a ligação inespecífica do anticorpo anti-IgG canina às plaquetas de cães (plaquetas incubadas com solução tampão e anticorpo secundário anti-IgG canina FITC – MdFI = 14,59); e C) controle positivo para a ligação do anticorpo secundário anti-IgG canina à IgG canina em plaquetas (plaquetas incubadas com plasma de animal com trombocitopenia imunomediada e anticorpo secundário anti-IgG canina FITC – MdFI = 582,94).

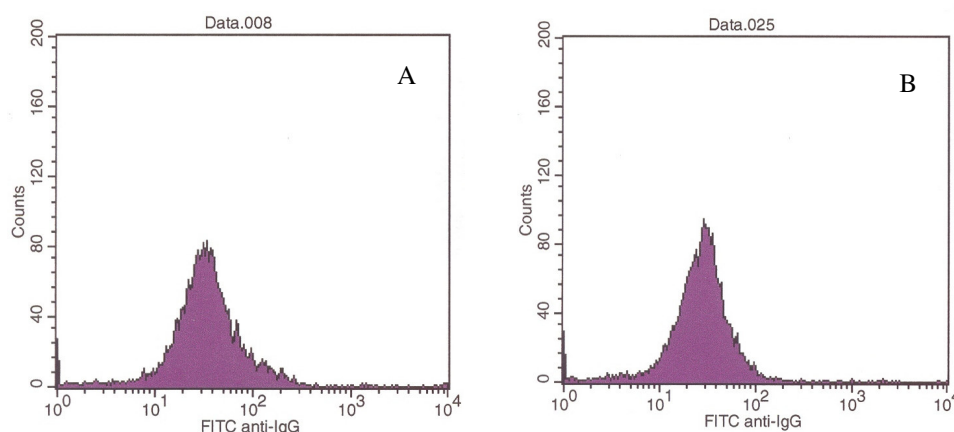


FIGURA 7: Histogramas obtidos na detecção do antígeno DEA 1.1 em plaquetas de: A) um cão negativo para o tipo sanguíneo DEA 1.1 (MdFI = 32,49) e B) um cão positivo para este mesmo tipo sanguíneo (MdFI = 27,63).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,385$) entre o grupo de animais negativos ($n = 62$) e positivos ($n = 110$) para o tipo sanguíneo DEA 1.1 para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas; com valores de mediana de 39,61 e 41,42; respectivamente.

No grupo dos animais negativos para o tipo sanguíneo DEA 1.1, o maior valor de MdFI obtido para plaquetas foi de 71,69. Sete animais com tipo sanguíneo DEA 1.1 positivo apresentaram MdFI nas plaquetas maiores do que este valor (71,69), representando animais possivelmente positivos para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas. Para avaliar se estes animais eram realmente positivos, as razões entre a MdFI obtida nas plaquetas incubadas com o soro anti-DEA 1.1 (teste) e a MdFI obtida nas plaquetas incubadas com o pool de plasmas de cães não reagentes (razão teste/pool) foram calculadas para todos os animais. A Tabela 5 mostra os valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1, destacados em negrito os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto (71,69) encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão.

A comparação dos resultados de razões teste/pool do grupo de 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1 foi realizada pelo Teste t de Student, devido à distribuição paramétrica das populações, e não revelou diferença significativa entre os dois grupos avaliados ($p = 0,966$). Além disso, foram comparadas as razões teste/pool dos sete animais possivelmente positivos para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas ($n = 7$; mediana = 1,01) com o grupo de animais negativos para este tipo sanguíneo ($n = 62$; mediana = 0,93), pelo teste de Mann-Whitney, e não se observou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,093$). Desta forma, estes animais não foram considerados positivos para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas.

TABELA 5a: Valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1. Os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão, encontram-se em negrito.

Razão teste/pool	
DEA 1.1 negativos (n = 62)	DEA 1.1 positivos (n = 110)
0,73	0,51
0,76	0,64
0,76	0,66
0,78	0,68
0,78	0,68
0,8	0,69
0,81	0,70
0,81	0,70
0,82	0,74
0,82	0,74
0,84	0,74
0,84	0,74
0,84	0,76
0,84	0,79
0,85	0,79
0,87	0,80
0,87	0,80
0,87	0,80
0,88	0,81
0,88	0,85
0,89	0,85
0,9	0,85
0,9	0,87
0,9	0,87
0,91	0,87

TABELA 5b: Valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1. Os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão, encontram-se em negrito.

Razão teste/pool	
DEA 1.1 negativos (n = 62)	DEA 1.1 positivos (n = 110)
0,91	0,87
0,91	0,87
0,91	0,87
0,92	0,88
0,92	0,88
0,92	0,88
0,93	0,88
0,93	0,88
0,94	0,89
0,95	0,90
0,95	0,91
0,95	0,91
0,96	0,91
0,96	0,91
0,96	0,92
0,97	0,92
0,97	0,92
0,99	0,92
1,00	0,93
1,00	0,93
1,01	0,94
1,01	0,94
1,01	0,94
1,02	0,94
1,06	0,94

TABELA 5c: Valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1. Os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão, encontram-se em negrito.

Razão teste/pool	
DEA 1.1 negativos (n = 62)	DEA 1.1 positivos (n = 110)
1,06	0,95
1,07	0,95
1,08	0,95
1,11	0,95
1,12	0,96
1,12	0,96
1,12	0,96
1,15	0,97
1,15	0,97
1,15	0,97
1,19	0,97
1,3	0,97
-	0,97
-	0,97
-	0,98
-	0,99
-	0,99
-	0,99
-	1,00
-	1,00
-	1,00
-	1,00
-	1,01
-	1,01
-	1,01

TABELA 5d: Valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1. Os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão, encontram-se em negrito.

Razão teste/pool	
DEA 1.1 negativos (n = 62)	DEA 1.1 positivos (n = 110)
-	1,02
-	1,03
-	1,03
-	1,03
-	1,04
-	1,04
-	1,04
-	1,04
-	1,04
-	1,04
-	1,06
-	1,06
-	1,07
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,08
-	1,09
-	1,10
-	1,10
-	1,11

TABELA 5e: Valores das razões teste/pool de plaquetas dos 62 animais negativos e dos 110 animais positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1. Os resultados dos sete animais que apresentaram MdFI nas plaquetas maior do que o valor mais alto encontrado nas plaquetas dos animais negativos para o tipo sanguíneo em questão, encontram-se em negrito.

Razão teste/pool	
DEA 1.1 negativos (n = 62)	DEA 1.1 positivos (n = 110)
-	1,11
-	1,12
-	1,12
-	1,13
-	1,13
-	1,18
-	1,18
-	1,18
-	1,19
-	1,20

6. DISCUSSÃO

6.1. METODOLOGIA

A partir da avaliação do hematócrito e número de plaquetas, somente foram incluídos no projeto cães com valores normais para a espécie, a fim de excluir possíveis casos de anemia hemolítica ou trombocitopenia imunomediadas. O anticorpo secundário utilizado na segunda incubação poderia se ligar à IgG canina presente em hemácias e plaquetas nestas condições, causando resultados falsamente aumentados para a presença de DEA 1.1, nos ensaios de citometria de fluxo.

No presente trabalho, a técnica de detecção de antígenos em hemácias por citometria de fluxo foi desenvolvida com base em estudos prévios de Wilkerson et al. (2000), Kucinskiene et al. (2005) e do protocolo utilizado no Laboratório de Imunohematologia e Sorologia (*Immunohematology and Serology Laboratory*) da *Michigan State University*. Da mesma maneira, a metodologia para detecção de antígenos na superfície de plaquetas de cão foi desenvolvida com base em estudos anteriores (KRISTENSEN et al., 1994; LEWIS et al., 1995; WILKERSON et al., 2001; WILKERSON & SHUMAN, 2001; SCOTT et al., 2002; MORITZ et al., 2003; SEGURA et al., 2006; TERRAZZANO et al., 2006; WILLS et al., 2006). Várias diluições da solução de hemácias, solução de plaquetas, anticorpos primários (utilizados na primeira incubação) e secundários (utilizados na segunda incubação), foram testadas em estudos piloto, bem como diferentes tempos e temperaturas para as reações. O protocolo escolhido foi o que apresentou melhores resultados em relação ao tempo de processamento, material utilizado e minimização de sinais interferentes na técnica, como aglutinação e agregação celulares.

Estudos preliminares foram realizados também com anticorpos secundários policlonais caprinos anti-IgM canina e anti-IgA canina, para detecção dos anticorpos anti-DEA 1.1, porém os melhores resultados foram obtidos com o anticorpo secundário policlonal ovino anti-IgG canina, e este foi o

escolhido para a realização do experimento. Este achado concorda com Giger et al. (1995), que demonstraram que os aloanticorpos anti-DEA 1.1 pertencem à classe IgG de imunoglobulinas.

Como a técnica de citometria de fluxo requer amostras com células isoladas em suspensão para passagem de seu fluxo contínuo no aparelho, aglutinados de hemácias ou plaquetas, geralmente mediados por anticorpos, podem representar problemas, como o bloqueio do fluxo celular. A realização de ensaios preliminares para ajuste da melhor concentração dos reagentes e técnica utilizados foi fundamental para minimizar a aglutinação das partículas em suspensão, assim como realizado em outros estudos (WILKERSON et al., 2000; ROBACK et al., 2003).

A aglutinação ou agregação plaquetária também podem interferir na leitura das amostras nos ensaios de citometria de fluxo, resultando em leituras não acuradas e geralmente falsamente aumentadas (WILKERSON et al., 2001; SCOTT et al., 2002), assim como foi observado no delineamento deste projeto. A agregação plaquetária foi inibida a partir das boas práticas de coleta e imediato processamento da amostra, além da utilização de PgE₁ (Figura 8) e do emprego da temperatura de 37°C para processamento das plaquetas nas etapas iniciais, como descrito na literatura (SCOTT et al., 2002) e comprovado nos estudos piloto. Conforme citado por outros autores, observou-se que o processamento imediato das amostras é importante para evitar resultados falsamente elevados, pois com o tempo há um aumento nos níveis de imunoglobulinas ligados à superfície das plaquetas. Além disso, o processamento rápido aumenta o rendimento de plaquetas obtidas no plasma rico em plaquetas após a centrifugação (LEWIS et al., 1995; WILKERSON et al., 2001; WILKERSON & SCHUMAN, 2001; SCOTT et al., 2002). O tratamento inicial das plaquetas com a PgE₁ e seu processamento a 37°C, nas etapas iniciais de centrifugação e incubação, são fundamentais para impedir a ativação e agregação plaquetárias, e foram realizadas neste trabalho assim como sugerido por Schwartz (1988) e Scott et al. (2002).

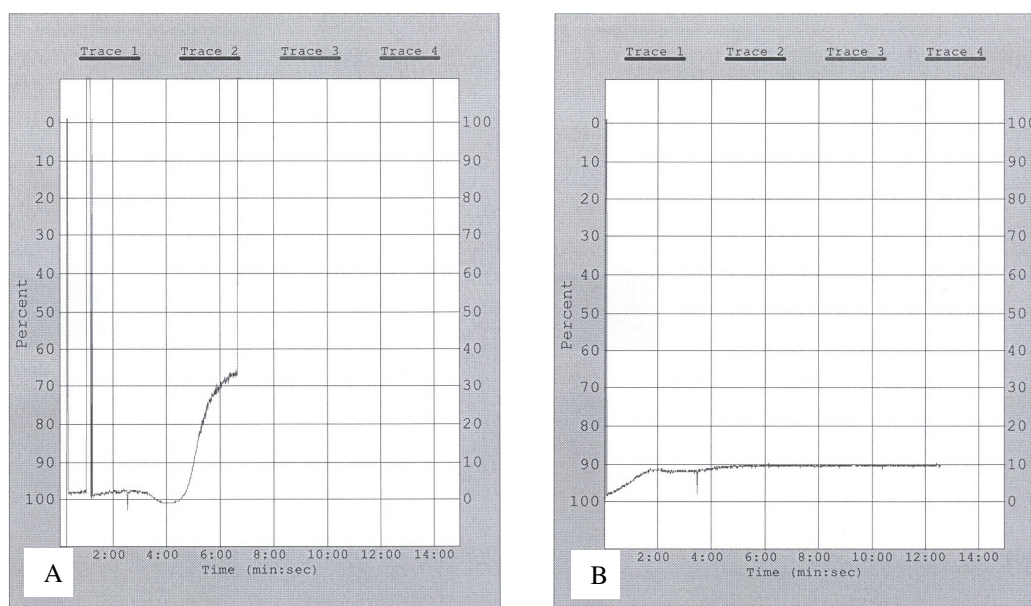


FIGURA 8: Teste de agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) (400 μ L de PRP + 5 μ L de colágeno) não tratado (A) e previamente tratado com PgE1 (B).

Durante o delineamento do protocolo, apesar das práticas citadas anteriormente, continuou-se observando um padrão sugestivo de agregação ou aglutinação plaquetárias (“cometa”) nos resultados obtidos com a incubação de plaquetas com soro ou plasma caninos (Figura 9). Este padrão, além de impedir a correta separação (“gating”) das plaquetas estudadas, ainda causou um falso aumento na fluorescência da amostra (Figura 10). Como os testes com PgE1 confirmaram a inibição da agregação plaquetária, suspeitou-se de aglutinação das plaquetas mediada por imunocomplexos de IgG ou por elementos do sistema complemento, com base em estudos prévios realizados por Scott (1995). Estes estudos mostram que imunocomplexos de IgG podem ser formados no congelamento do soro ou plasma, e sugerem ainda a possível presença de fatores do sistema complemento no sangue canino, capazes de causar aglutinação plaquetária. Outros autores realizaram a inativação do complemento em soro canino por meio de seu aquecimento a 56°C por 30 minutos (CALLAN et al., 1995; GIGER et al., 1995), porém a técnica que foi utilizada, conforme sugerido por Scott (1995), apresentou resultados satisfatórios. No presente trabalho, o soro policlonal anti-DEA 1.1 e o pool de

plasmas de cães saudáveis utilizados nos testes com plaquetas, foram submetidos a um tratamento pelo calor para a remoção dos possíveis imunocomplexos de IgG e inativação do complemento.

Na Medicina Humana, já existem anticorpos monoclonais murinos anti-A e anti-B, para a detecção dos antígenos eritrocitários A e B, aumentando a padronização e reprodutibilidade dos ensaios (ROBACK et al., 2003). Devido à restrita disponibilidade de anticorpos monoclonais contra os antígenos eritrocitários caninos, no presente trabalho, foi empregado o anticorpo policlonal canino anti-DEA 1.1 para a detecção deste antígeno na superfície de hemácias e plaquetas de cães. O uso de anticorpos policlonais pode apresentar desvantagens como a ocorrência de ligações inespecíficas de imunoglobulinas presentes no soro com receptores presentes nas células estudadas. No caso das hemácias não foi observado sinal de fluorescência representativo para positividade. Porém, no caso das plaquetas, o soro rico em anticorpos policlonais produziu alto sinal de fluorescência (MdFI) em algumas amostras do estudo piloto, alterando a interpretação dos resultados. Para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas e resultados falsamente aumentados, foi realizada a imunoadsorção de imunoglobulinas inespecíficas presentes no soro anti-DEA 1.1 e pool de plasmas de cães saudáveis, a partir da incubação com plaquetas de um cão saudável, conforme realizado em outros estudos (GIGER et al., 1995; STUSSI et al., 2005).

Após a precipitação de imunocomplexos de IgG e inativação do complemento pelo calor, e a imunoadsorção para remoção de imunoglobulinas inespecíficas, não se observou mais o padrão de “cometa”, nem falsa elevação na MdFI nos ensaios com plaquetas (Figuras 9 e 10).

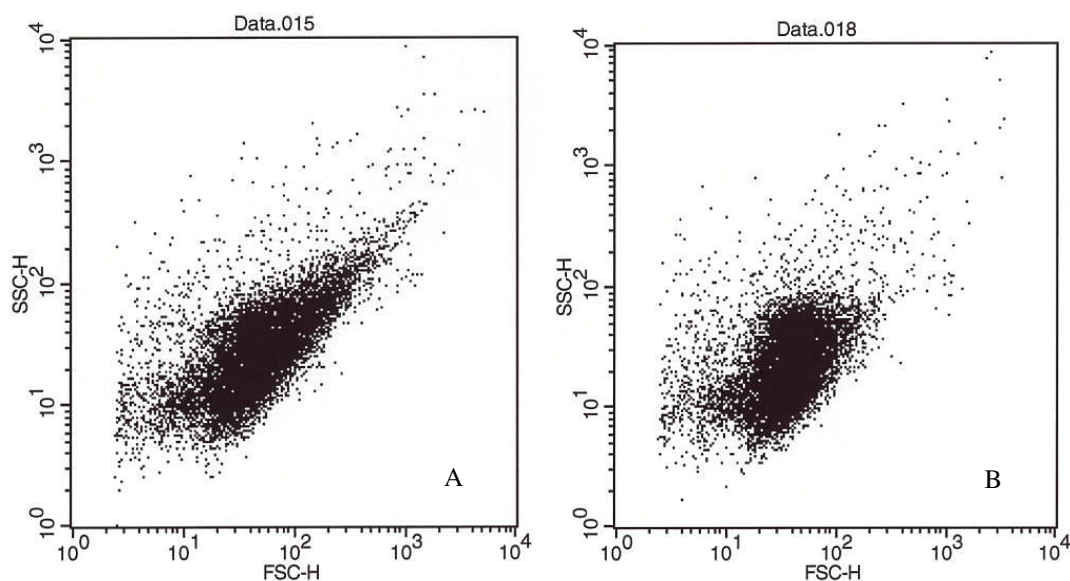


FIGURA 9: Tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H) de plaquetas incubadas com soro anti-DEA 1.1 antes e após seu tratamento com imunoabsorção e inativação pelo calor. A) Antes do tratamento do soro, observa-se um padrão sugestivo de aglutinação plaquetária (“cometa”); B) após o tratamento do soro, o padrão de “cometa” não é mais observado.

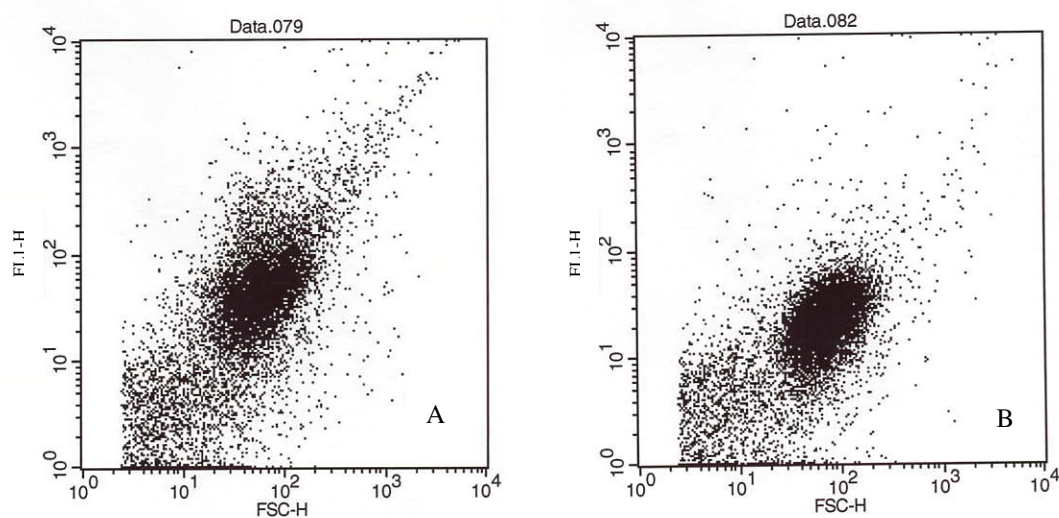


FIGURA 10: Tamanho (FSC-H) e fluorescência (FL1-H) de plaquetas incubadas com soro anti-DEA 1.1 antes e após seu tratamento com imunoabsorção e inativação pelo calor. A) Antes do tratamento do soro, observa-se um padrão sugestivo de aglutinação plaquetária (“cometa”) e maior fluorescência (MdFI = 103); B) após o tratamento do soro, o padrão de “cometa” não é mais observado e a fluorescência é menor (MdFI = 39).

O soro anti-DEA 1.1 antes e depois do tratamento pelo calor e imunoabsorção foi testado para tipagem sanguínea por citometria de fluxo de hemácias DEA 1.1 negativas e positivas, com a finalidade de verificar a viabilidade do anticorpo anti-DEA 1.1. Não foi observada diferença significativa entre a fluorescência obtida com as hemácias positivas e negativas reagidas com o soro anti-DEA 1.1 antes ou após o tratamento do soro reagente, mostrando que o soro anti-DEA 1.1 manteve seus níveis de anticorpos anti-DEA 1.1 viáveis e sua capacidade de se ligar aos antígenos eritrocitários correspondentes.

A albumina de soro bovino (BSA) e o EDTA foram utilizados na solução tampão (PBS-BSA-EDTA) para reduzir a ligação inespecífica de proteínas do plasma às células estudadas e reduzir a agregação plaquetária, respectivamente.

Estudos preliminares determinaram melhores resultados após diluição do soro anti-DEA 1.1 e o plasma de cães saudáveis não reagente com a solução tampão na proporção 1:2, para o ensaio com hemácias, e na proporção 1:3, para o ensaio com plaquetas, para reduzir a formação de ligações inespecíficas de proteínas às células estudadas. A diluição dos reagentes foi anteriormente realizada por outros autores com o mesmo fim (HEAL et al., 1987).

Nos primeiros ensaios, foram processados tubos para controle negativo da reação de hemácias, assim como para plaquetas, nos quais as células eram incubadas somente com solução tampão nas duas incubações, e com solução tampão na primeira incubação e anticorpo secundário na segunda incubação. Porém esta se mostrou uma prática desnecessária, devido à mínima autofluorescência e ligação inespecífica de anticorpos às células estudadas, e sua pequena interferência nos resultados, sendo abolida dos ensaios com hemácias. Já nos ensaios com plaquetas, esta prática foi considerada importante, pois a fluorescência obtida nos controles foi representativa e poderia influenciar nos resultados de fluorescência dos testes. Esta foi uma importante ferramenta para monitoramento da estabilidade dos reagentes e das reações com plaquetas.

As populações de hemácias e plaquetas foram selecionadas por meio de “gate”, conforme sugerido na literatura (WILKERSON & SCHUMAN, 2001;

McGURRIN et al., 2004). A utilização de “gate” é importante para excluir qualquer sinal oriundo de debris celulares, contaminação por hemácias nos estudos de plaquetas, ou contaminação por plaquetas nos estudos de hemácias (WILKERSON et al., 2001).

A presença do antígeno DEA 1.1 na superfície de hemácias e plaquetas foi avaliada com base na intensidade de fluorescência mediana (MdFI) da população de células. A mediana representa o ponto que divide o histograma em duas partes contendo o mesmo número de eventos, e foi escolhida, pois é um bom indicador da tendência central de uma população, ao passo que os valores de média são facilmente desviados por pequenos números de eventos que representam valores extremos em uma população (LEWIS et al., 1995; OSBORNE, 2000). Outros autores, também preferiram a mediana para avaliação da fluorescência em estudos com plaquetas, nos quais a distribuição das células nos histogramas não era normal (LEWIS et al., 1995; MORITZ et al. 2003).

6.2. DETECÇÃO DO DEA 1.1 EM HEMÁCIAS DE CÃO

As hemácias de todas as amostras foram testadas para o antígeno DEA 1.1 por citometria de fluxo para demonstrar que este antígeno pode ser confiavelmente detectado com os reagentes e protocolos utilizados, podendo ser também aplicados para a detecção deste mesmo antígeno na superfície de plaquetas.

A tipagem por aglutinação em tubo foi realizada como teste padrão, como forma de garantir que a citometria de fluxo é capaz de detectar o antígeno DEA 1.1, através da comparação dos resultados de ambos os métodos. Entretanto, 12 animais apresentaram discrepância entre os resultados obtidos para a tipagem sanguínea pelos dois métodos adotados, concluindo-se após a repetição dos ensaios que os resultados obtidos inicialmente pela citometria de fluxo estavam corretos. Desta forma, a citometria de fluxo apresentou acurácia de 100% (172 acertos/172 testes), ao passo que a tipagem por aglutinação em tubo realizada na primeira vez, a

acurácia foi de 93% (160 acertos/172 testes). Estes resultados concordam com a literatura, na qual a citometria de fluxo para tipagem sanguínea de hemácias humanas apresentou uma acurácia de 99,1%, em constraste a 95% apresentado pelo teste de aglutinação em tubo (ROBACK et al., 2003).

Além de mais acurado, a citometria de fluxo demonstrou ser um teste mais sensível, pois foi capaz de detectar baixos níveis de antígenos na superfície das hemácias, insuficientes para revelar a aglutinação positiva evidente na tipagem pelo tubo. Os 10 resultados falsos negativos obtidos pelo método de aglutinação em tubo, provavelmente apresentaram aglutinação macroscópica de hemácias ausente ou fraca, sendo lidos como resultados negativos. Uma sugestão para se aumentar a sensibilidade do método de aglutinação em tubo seria a realização da pesquisa também de aglutinação microscópica. Outro fator que pode contribuir para a menor acurácia do teste de aglutinação em tubo é a subjetividade da interpretação de seus resultados, já esta depende da observação de aglutinação por um técnico (ROBACK et al., 2003). Por outro lado, os resultados da citometria de fluxo são apresentados em números (intensidade de fluorescência), sendo mais fácil e exata a quantificação de positividade.

Os dois resultados falsos positivos obtidos pela aglutinação em tubo podem ter sido provenientes de erros analíticos no processamento das amostras.

O tipo sanguíneo DEA 1.1 é o que apresenta maior importância clínica, por sua alta antigenicidade (HALE, 1995). A frequência do DEA 1.1 na população canina é alta no Exterior e no Brasil, reforçando sua importância na ocorrência de reações aloimunes. Segundo Novais et al. (1999), a prevalência do DEA 1.1 em cães no Brasil (Jaboticabal – SP) é de 51%. Através de um estudo estatístico; a probabilidade de um cão DEA 1 negativo receber sangue DEA 1.1 positivo em uma primeira transfusão é de 4,5%; representando o risco potencial de sensibilização. As chances de um cão DEA 1 negativo receber sangue DEA 1.1 positivo na primeira e segunda transfusão, apresentando risco de reação transfusional é de 2,2%. Embora os autores considerem este um risco mínimo de ocorrer reação transfusional, deve-se considerar sua importância clínica e fazer com que este risco seja evitado.

No presente estudo, dos 118 cães com o tipo sanguíneo desconhecido, 55,9% foram positivos para o DEA 1.1, em comparação com outros estudos norte-americanos, que relataram freqüência de 45% (SWISHER & YOUNG, 1961) e 42% (HALE, 1995). Contudo, Hale (2006) sugere que a prevalência deste antígeno na população canina nos Estados Unidos seja ainda maior, chegando a aproximadamente 60%.

Apesar de acurado e sensível, o teste de tipagem de hemácias por citometria de fluxo desenvolvido no presente estudo não ofereceu vantagens em relação ao tempo necessário para sua realização, já que levou trinta minutos em cada uma das duas incubações, além do tempo requerido para a lavagem e processamento das células no citômetro de fluxo. Estudos futuros podem ser conduzidos para reduzir os tempos de incubação. Além disso, o desenvolvimento de anticorpos marcados com FITC direcionados diretamente contra o DEA 1.1, assim como os anticorpos monoclonais murinos anti-A ou anti-B, utilizados na Medicina Humana, devem otimizar o tempo de realização do teste e aumentar sua reprodutibilidade, no futuro.

Outra desvantagem deste teste é o elevado custo dos reagentes e do aparelho de citometria de fluxo, em contraste com o teste de aglutinação em tubo, que requer a utilização de equipamentos e reagentes de baixo custo (ROBACK et al., 2003). Por outro lado, o teste convencional de tipagem por aglutinação em tubo, apesar de mais barato, apresenta menor sensibilidade e requer pessoal treinado para a leitura dos resultados, podendo resultar em resultados falsos e menor acurácia. Apesar de apresentar algumas desvantagens para uso clínico, deve-se considerar o método de citometria de fluxo como uma importante ferramenta de pesquisa na Medicina Veterinária.

Existem poucos estudos no Brasil sobre terapia transfusional em cães, envolvendo revisões de literatura (Babo, 1998; Pereira e Ramalho, 2001) ou estudos de prevalência de tipos sanguíneos e reações transfusionais (NOVAIS et al., 1999; SOUZA, 2005; ULATA, 2005; GONÇALVES, 2006). A tipagem sanguínea de hemácias caninas tem sido realizada por meio do uso de anti-soros ricos em anticorpos policlonais (HALE, 1995) ou anticorpos monoclonais murinos (HARA et al., 1991). No Brasil, até hoje não há um centro de pesquisa que produza estes anticorpos para uso clínico, inviabilizando a tipagem sanguínea em cães. Os poucos estudos nacionais nesta área envolvem a

tipagem sanguínea de cães por meio de kits ou anticorpos importados dos Estados Unidos (NOVAIS et al., 1999; SOUZA, 2005).

O método disponível em âmbito nacional para se evitar reações hemolíticas imunomediadas em cães é a prova de compatibilidade cruzada, que identifica a presença de aloanticorpos no plasma do receptor contra as hemácias do doador (prova maior), e de aloanticorpos no plasma do doador contra as hemácias do receptor (prova menor), porém este teste apresenta limitações, e reações transfusionais podem ocorrer mesmo com um resultado negativo (GIGER et al., 1995). Desta forma, sugerem-se com este trabalho estudos futuros para o desenvolvimento de anticorpos que possam ser utilizados para tipagem sanguínea em cães no Brasil, visando o estudo e a redução da ocorrência de reações transfusionais imunomediadas nestes animais.

6.3. DETECÇÃO DO DEA 1.1 EM PLAQUETAS DE CÃO

Apesar de amplamente estudada na Medicina Humana, pouco se sabe sobre a expressão de antígenos eritrocitários em plaquetas de cães.

No presente trabalho a determinação dos antígenos plaquetários foi realizada uma única vez, ao passo que outros autores (CURTIS et al., 2000) realizaram as determinações em duplicata nos pacientes potencialmente positivos para a presença de antígenos eritrocitários em plaquetas, para garantir a acuidade dos resultados, descartando a ocorrência de fatores interferentes nos ensaios.

A ausência de diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais negativos ($n = 62$) e positivos ($n = 110$) para o tipo sanguíneo DEA 1.1 para a presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas não foi considerada suficiente para afirmarmos que este antígeno não está presente nas plaquetas caninas, pois os resultados de poucos indivíduos considerados positivos poderiam estar sendo mascarados pela análise do grupo como um todo. Por

isso, os resultados com plaquetas foram analisados também pelo uso da razão teste/pool.

Ao contrário de alguns autores (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000) que determinaram a presença de antígenos eritrocitários em plaquetas humanas por meio da determinação de um valor de corte para positividade utilizando-se média + 2 DP (desvio padrão), neste trabalho foram considerados possivelmente positivos os animais com tipo sanguíneo DEA 1.1 positivos, com MdFI para plaquetas acima do valor mais alto encontrado em animais negativos para este tipo sanguíneo. Se o critério de média mais 2 DP fosse empregado, animais negativos para o tipo sanguíneo estudado apresentariam para as plaquetas valores de fluorescência acima do valor de corte, representando falsos positivos para a presença do antígeno DEA 1.1. O método escolhido levou em conta a ocorrência de reações inespecíficas das plaquetas testadas com imunoglobulinas do plasma que poderiam causar o falso aumento da MdFI, por meio do cálculo da razão teste/pool, demonstrando que o antígeno eritrocitário DEA 1.1 não está presente em plaquetas caninas. Outros autores utilizaram a mesma análise da razão teste/controle negativo em um estudo com hemácias humanas (STUSSI et al., 2005).

A aplicação dos resultados obtidos a partir da reação das plaquetas com um pool de plasmas não reagente foi fundamental neste trabalho, devido à alta reação inespecífica das proteínas do plasma com as plaquetas caninas. A média da MdFI obtida na reação de hemácias com o pool de plasmas de cães saudáveis não reagente foi de 14,69; 3,1 vezes menor do que esta média obtida nas reações com plaquetas (45,53).

Estudos em humanos mostram a expressão de até 24 vezes mais antígenos A ou B nas plaquetas dos indivíduos com alta expressão (OGASAWARA et al., 1993), e a relação da quantidade destes antígenos com suas implicações clínicas é discutida. Dunstan e colaboradores (1985) sugeriram que a variação da resposta à transfusão de plaquetas ABO-incompatíveis pode ocorrer devido a diferenças no título de anticorpos anti-A ou anti-B do receptor, ou à quantidade de antígenos A ou B nas plaquetas do doador, sendo a expressão do antígeno diretamente proporcional à ocorrência de complicações clínicas. Porém outros autores (OGASAWARA et al., 1993; CURTIS et al., 2000) sugerem que a ocorrência de reações como baixo

incremento, refratariedade e aloimunização independem da quantidade de antígenos eritrocitários ABO que as plaquetas expressam.

Apesar de plaquetas humanas apresentarem níveis clinicamente importantes de antígenos eritrocitários do sistema ABO, o mesmo parece não ocorrer em cães. Portanto, a ocorrência de reações transfusionais imunológicas decorrentes da transfusão de plaquetas em cães parece não estar relacionada à presença do antígeno DEA 1.1 em plaquetas caninas. Desta forma, a transfusão de plaquetas de um cão DEA 1.1 positivo parece não ter potencial para a sensibilização de um cão receptor DEA 1.1 negativo, não havendo a necessidade de transfusão de plaquetas compatíveis para este tipo sanguíneo em cães.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que:

- A citometria de fluxo demonstrou ser um teste sensível e mais acurado (100% de acurácia) do que o teste padrão de aglutinação em tubo (93% de acurácia), para a detecção do DEA 1.1 em hemácias de cão e tipagem para este tipo sanguíneo.

- A frequência do tipo sanguíneo DEA 1.1 (55,9%) em cães do Estado de Michigan é semelhante ao relatado na literatura.

- Não foram observadas evidências estatisticamente significativas para a presença do antígeno eritrocitário canino 1.1 em plaquetas de cães positivos para o tipo sanguíneo DEA 1.1.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Incentivar a produção de reagentes para tipagem sanguínea de cães no Brasil, a fim de se evitar a ocorrência de reações transfusionais imunológicas nestes animais.

Estimular o uso de componentes do sangue, como os produtos ricos em plaquetas, na Medicina Veterinária, para uma terapia mais eficiente e que ofereça menos riscos ao paciente.

Investigar outros possíveis antígenos presentes em plaquetas caninas que possam estar envolvidos em reações transfusionais imunomediadas e aloimunização dos receptores.

9. BIBLIOGRAFIA

ABRAMS-OGG, A.C.G.; KRUTH, S.A.; CARTER, R.F.; VALLI, V.E.; KAMEL-REID, S.; DUBE, I.D. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.635-642, 1993.

ABRAMS-OGG, A.C.G. Triggers for prophylactic use of platelet transfusions and optimal platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.33, p.1401-1418, 2003.

ALLYSON, K.; ABRAMS-OGG, A.C.; JOHNSTONE, I.B. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. **Am. J. Vet. Res.**, v.58, p.1338-1347, 1997.

ANDREWS, G.A.; CHAVEY, P.S.; SMITH, J.S. Production, characterization and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.201, 1549-1552, 1992.

ASTER, R.H. Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelets. **Blood**, v.26, p.732-743, 1965.

BABO, V.J. Transfusão sanguínea em cães e gatos. **Clín. Vet.**, n.14, p.28-32, 1998.

BENSON, K. Criteria for diagnosing refractoriness to platelet transfusions. In: KICKLER, T.S.; HERMAN, J.H. **Current issues in platelet transfusion therapy and platelet alloimmunity**. Bethesda: AABB Press, 1999. cap.2, p.33-61.

BROOKS, M. Complications: transfusion reactions. In: NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 20, 2006, Orlando. **Proceedings of the North American Veterinary Conference**. Florida: USA, 2006. p.481-484.

CALLAN, M.B.; JONES, L.T.; GIGER, U. Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a commom antigen. **J. Vet. Int. Med.**, v.9, p.277-279, 1995.

CARR, R.; HUTTON, J.L.; JENKINS, J.A.; LUCAS, G.F.; AMPHLETT, N.W. Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. **Br. J. Haematol.**, v.75, p.408-413, 1990.

COOLING, L.L.W.; KELLY, K.; BARTON, J.; HWANG, D.; KOEMER, T.A.W.; OLSON, J. Determinants of ABH expression on human blood platelets. **Blood**, v.105, n.8, p.3356-3364, 2005.

CORATO, A.; MAZZA, G.; HALE, A.S.; BARKER, R.N.; DAY, M.J. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.59, 213-223, 1997.

CURTIS, B.R.; EDWARDS, J.T.; HESSNER, M.J.; KLEIN, J.P.; ASTER, R.H. Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals. **Blood**, v.96, n.4, p.1574-1581, 2000.

DE GOPEGUI, R.R.; FELDMAN, B.F. Use of blood and blood components in canine and feline patients with hemostatic disorders. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1387-1402, 1995.

DE GOPEGUI, R.R.; FELDMAN, B.F. Acquired and inherited platelet dysfunction in small animals. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.**, v.20, p.1039-1052, 1998.

DUNSTAN, R.A.; SIMPSON, M.B.; KNOWLES, R.W.; ROSSE, W.F. The origin of ABH antigens on human platelets. **Blood**, v.65, n.3, p.615-619, 1985.

ENRIGHT, H.; DAVIS, K.; GERNESHEIMER, T.; McCULLOUGH, J.; WOODSON, R.; SLICHTER, S.J. Factors influencing moderate to severe reactions to platelet transfusions: experience of the TRAP multicenter clinical trial. **Transfusion**, v.43, p.1545-1552, 2003.

FRIEDBERG, R.C.; GAUPP, B. Platelet transfusion: indications, considerations, and specific clinical settings. In: KICKLER, T.S.; HERMAN, J.H. **Current issues in platelet transfusion therapy and platelet alloimmunity**. Bethesda: AABB Press, 1999. cap.1, p.1-32.

GIGER, U.; GELENS, C.J.; CALLAN, M.B.; OAKLEY, D.A. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.206, p.1358-1362, 1995.

GIGER, U.; STIEGER, K.; PALOS, H. Comparison of various canine blood-typing methods. **Am. J. Vet. Res.**, v.66, p.1386-1392, 2005.

GONÇALVES, S. **Reações transfusionais após a administração de concentrados de plaquetas em cães**. 2006. 93p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

GUREVITCH, J.; NELKEN, D. ABO groups in blood platelets. **J. Lab. Clin. Med.**, v.44, p.562-570, 1954.

HALE, A.S. Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion medicine. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1323-1332, 1995.

HALE, A.S. Comunicação pessoal. EUA: Michigan State University, 2006.

HARA, Y.; EJIMA, H.; AOKI, S.; TAGAWA, M.; MOTOYOSHI, S.; SUGIYAMA, M.; IKEMOTO, S. Preparation of monoclonal antibodies against dog erythrocyte antigen D1 (DEA-3). **J. Vet. Med. Sci.**, v.53, 1105-1107, 1991.

HARRELL, K.A.; KRISTENSEN, A.T. Canine transfusion reactions and their management. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1333-1361, 1995.

HEAL, J.M.; BLUMBERG, N.; MASEL, D. An evaluation of crossmatching, HLA, and ABO matching for platelet transfusions to refractory patients. **Blood**, v.70, n.1, p.23-30, 1987.

HEAL, J.M.; ROWE, J.M.; McMIGAN, A.; MASEL, D.; FINKE, C.; BLUMBERG, N. The role of ABO matching in platelet transfusion. **Eur. J. Haematol.**, v.50, p.110-117, 1993.

HOHENHAUS, A.E. Canine blood transfusions. **Probl. Vet. Med.**, v.4, p.612-624, 1992.

KRISTENSEN, A.T.; WEISS, D.J.; KLAUSNER, J.S.; LABER, J.; CHRISTIE, D.J. Comparison of microscopic and flow cytometric detection of platelet antibody in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, n.8, p.1111-1114, 1994.

KRISTENSEN, A.T.; FELDMAN, B.F. General principles of small animal blood component administration. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1277-1291, 1995.

KUCINSKIENE, G.; SCHUBERTH, H.; LEIBOLD, W.; PIESKUS, J. Flow cytometric evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. **Vet. J.**, v.169, p.303-307, 2005.

LANEVSKI, A.; WARDROP, K.J. Principles of transfusion medicine in small animals. **Can. Vet. J.**, v.42, p.447-454, 2001.

LEE, E.J.; SCHIFFER, C.A. ABO compatibility can influence the results of platelet transfusion. **Transfusion**, v.29, p.384-389, 1989.

LEWIS, D.C.; MEYERS, K.M. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. **J. Vet. Intern. Med.**, v.10, n.4, p.207-218, 1996a.

LEWIS, D.C.; MEYERS, K.M. Studies of platelet-bound and serum platelet-bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura. **Exp. Hematol.**, v.24, p.696-701, 1996b.

LEWIS, D.C.; McVEY, D.S.; SHUMAN, W.S.; MULLER, W.B. Development and characterization of a flow cytometric assay for detection of platelet-bound immunoglobulin G in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.56, n.12, p.1555-1558, 1995.

McGURRIN, M.K.J.; ARROYO, L.G.; BIENZLE, D. Flow cytometric detection of platelet-bound antibody in three horses with immune-mediated thrombocytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.224, n.1, 83-87, 2004.

MORITZ, A.; WALCHECK, B.K.; WEISS, D.J. Flow cytometric detection of activated platelets in the dog. **Vet. Clin. Path.**, v.32, n.1, 6-12, 2003.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CÁPUA, M.L.B.; COELHO, P.S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na medicina veterinária. **Ciência Rural**, v.35, n.4, 966-973, 2005.

NETA, A.V.C.; ROCHA, R.D.R.; GONTIJO, C.M.F.; REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.4, 480-488, 2006.

NOVAIS, A.A.; SANTANA, A.E.; VICENTIN, L.A. Prevalence of DEA 1 canine blood group system in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) reared in Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, n.1, p.0-0, 1999.

OGASAWARA, K.; UEKI, J.; TANENAKA, M.; FURIHATA, K. Study on the expression of ABH antigens on platelets. **Blood**, v.82, n.3, p.993-999, 1993.

OSBORNE, G.W. Flow Cytometry Software Workshop: 2000; <http://jcsmr.anu.edu.au/facslab/analysis.html>, em 26/04/07.

PEREIRA, C.T. **O polimorfismo dos antígenos plaquetários**. 2001. 115p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.

PEREIRA, P.M., PASCON, J.P.E.; DeBRUM, A.M.; CHAMPION, T.; JOÃO, C.F.; SANTANA, A.E.; PALMA, P.V.B.; MORAIS, F.R.; TUNUCCI-COSTA, M. Application of a flow cytometric and direct antiglobulin test, pre and post treatment, in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. In: XXX WSAVA WORLD CONGRESS, 2005, México. **Pôster**. 2005.

PEREIRA, P.M.; RAMALHO, F.S. Transfusão sanguínea. **Clín. Vet.**, v.34, p.34-40, 2001.

QUIGLEY, K.A.; CHELACK, B.J.; HAINES, D.M.; JACKSON, M.L. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.13, p.297-300, 2001.

ROBACK, J.D.; BARCLAY, S.; HILLYER, D. An automatable format for accurate immunohematology testing by flow cytometry. **Transfusion**, v.43, p.918-927, 2003.

SCHNEIDER, A. Blood components. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.25, p.1245-1261, 1995.

SCHWARTZ, K.A. Platelet antibody: review of detection methods. **Am. J. Hematol.**, v.29, n.2, p.106-114, 1988.

SCOTT, M.A. **Canine immune-mediated thrombocytopenia: assay development, a role for complement, and assessment in a toxicologic**

study. 1995. 451p. Tese (Doutorado) – Michigan State University, East Lansing, MI, EUA.

SCOTT, M.A.; KAISER, L.; DAVIS, J.M.; SCHWARTZ, K.A. Development of a sensitive immunoradiometric assay for detection of platelet surface-associated immunoglobulins in thrombocytopenic dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, n.1, 124-136, 2002.

SCOTT, M.A. Granulocyte and platelet antigens. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.783-788.

SEGURA, D.; MONREAL, L.; PÉREZ-PUJOL, S.; PINO, M.; ORDINAS, A.; BRUGUÉS, R.; WHITE, J.G.; ESCOLAR, G. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. **J. Vet. Int. Med.**, v.20, p.581-588, 2006.

SLICHTER, S.J.; DAVIS, K.; ENRIGHT, H.; BRAINE, H.; GERNESHEIMER, T.; KAO, K.; KICKLER, T.; LEE, E.; McFARLAND, J.; MCCULLOUGH, J.; RODEY, G.; SCHIFFER, C.A.; WOODSON, R. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. **Blood**, v.105, p.4106-4114, 2005.

SLICHTER, S.J.; O'DONNELL, M.R.; WEIDEN, P.L.; STORB, R.; SCHROEDER, M. Canine platelet alloimmunization: the role of donor selection. **Br. J. Haematol.**, v.63, p.713-727, 1986.

SOUZA, S.L. **Estudo da frequência dos grupos sanguíneos DEA 1 e DEA 7 em cães de diferentes raças como subsídio à implantação de banco de sangue canino na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 2005. 56p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

STUSSI, G.; HUGGEL, K.; LUTZ, H.U.; SCHANZ, U.; RIEBEN, R.; SEEBACH, J.D. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. **Br. J. Haematol.**, v.130, 954-963, 2005.

SWISHER, S.N.; YOUNG, L.E. The blood group system of dogs. **Physiol. Rev.**, v.41, 495-520, 1961.

TARRANT, J.M. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **Vet. J.**, v.170, 278-288, 2005.

TERRAZZANO, G.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; ZAPPACOSTA, S.; DI LORIA, A.; SANTORO, D.; RUGGIERO, G.; CIARAMELLA, P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.110, 331-337, 2006.

TIZARD, I.R. Antígenos das hemácias e hipersensibilidade do tipo II. In: **Imunologia Veterinária – Uma introdução**. São Paulo: Roca, 2002. cap.27, p.363-372.

ULATA, S.K. **Determinação *in vitro* da atividade do fator de necrose tumoral (TNF) em concentrados de plaquetas de cães. Fracionamento do sangue total. Banco de sangue veterinário. HOVET – FMVZ – USP.** 2005. 113p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

WARDROP, K.J.; LEWIS, D.; MARKS, S.; BUSS, M. Posttransfusion purpura in a dog with hemophilia A. **J. Vet. Intern. Med.**, v.11, n.4, p.261-263, 1997.

WILKERSON, M.J.; DAVIS, E.; SHUMAN, W.; HARKIN, K.; COX, J.; RUSH, B. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **J. Vet. Int. Med.**, v.14, 190-196, 2000.

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W. Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. **Vet. Clin. Path.**, v.30, n.3, 107-113, 2001.

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W.; SWIST, S.; HARKIN, K.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A.A. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. **Vet. Clin. Path.**, v.30, n.3, 141-149, 2001.

WILLS, T.B.; WARDROP, K.J.; MEYERS, K.M. Detection of activated platelets in canine blood by use of flow cytometry. **Am. J. Vet. Res.**, v.67, n.1, 56-63, 2006.

YOUNG, L.E.; O'BRIEN, W.A.; SWISHER, S.N.; MILLER, G.; YUILE, C.L. Blood groups in dogs – their significance to the veterinarian. **Am. J. Vet. Res.**, v.13, 207-213, 1952.

10. APÊNDICE

Conversão de “xg” (RCF = força centrífuga relativa) para “RPM” (revoluções por minuto):

$$\text{xg (RCF)} = 0,0000118 \times \text{raio da centrífuga} \times (\text{RPM})^2$$