

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DAS COMPLICAÇÕES HEMATOLÓGICAS E
RENAIS E DO RISCO TROMBOEMBÓLICO DE CÃES COM AHIM**

LÍVIA FAGUNDES MORAES

**Botucatu – SP
Julho 2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DAS COMPLICAÇÕES HEMATOLÓGICAS E
RENAIS E DO RISCO TROMBOEMBÓLICO DE CÃES COM AHIM**

LÍVIA FAGUNDES MORAES

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

Orientadora: Prof^a Adj. Regina Kiomi Takahira

Nome do Autor: Livia Fagundes Moraes

**Título: AVALIAÇÃO DAS COMPLICAÇÕES HEMATOLÓGICAS E
RENAIS E DO RISCO TROMBOEMBÓLICO DE CÃES COM AHIM**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Adjunta Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu SP

Professor Adjunto Raimundo Souza Lopes
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu SP

Professor Titular Áureo Evangelista Santana
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
FCAV – UNESP – Jaboticabal SP

Data da defesa: 21 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe por sempre acreditar em mim, por me apoiar, por ser meu porto seguro, por tudo que sou.

Dedico à Frida, minha paixão, que por 12 anos foi minha companheira, que sempre demonstrou um amor incondicional, responsável por muitos momentos de felicidade, boas risadas e que fazia qualquer um se apaixonar por ela desde o primeiro momento. Você foi uma guerreira. Hoje você não está mais comigo, mas que sempre estará em meu coração.

Dedico também à Ishihiro, que apesar de não estar sempre comigo, nesses 14 anos você foi capaz de deixar meus dias sempre mais felizes toda vez que a reencontrava, me reconhecendo de longe, saudades...

Eu agradeço a todos os deuses por minha alma invencível.

Eu sou o senhor do meu destino e capitão da minha alma.

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar toda minha trajetória e minhas escolhas durante o período que permaneci em Botucatu;

À minha família a qual amo muito, principalmente à minha mãe Maria do Carmo (Carminha) pelo apoio, confiança e carinho;

Aos parentes que temos a chance de escolher, com quem criamos laços de amor. Rosania Salazar (Zaninha), Maria de Fátima, Jaifa Gabriela, Maria Tereza obrigada pelo carinho e atenção, amo vocês;

Aos meus queridos amigos que fizeram de Botucatu meu novo lar, minha família paulista querida: Marcela Marcondes (Ma querida), Taís Cremasco (Tatá), Ticiane Rocha (Tici), Erika Terra (Xô), Camila Thomazini (Bicolê), minha dupla Lia Rezende (Jajaziiinha), Eduardo Sotelo (Cirrose). Obrigada por me ouvirem, pelo carinho nas horas difíceis, por me acolherem, pelas risadas e baladinhas (as mais divertidas na casa da Marcela) e pela ajuda durante todo o projeto. Amo todos vocês, já estou com saudades;

Aos meus grandes amigos Yoly Gerpe, Maurício Dias e Paula Tussini por estarem comigo sempre, mesmo à distância;

As pós-graduandas Tatiana Barbosa, Carla Riani Costa, Selene Babboni, Márcia e aos residentes das Moléstias Infecciosas (MI) Jaqueline, Verônica, Ariani, Isabella, Ana Paula e aos residentes da Clínica de Pequenos Animais Josyanne, Felipe (KLB), Kelly, Paulo, Alan, Mariana, Matheus (Bago), Ana Rita, pelas dicas e ajuda na seleção dos animais. Sem vocês esse projeto não teria chegado ao fim. Josyanne, Felipe (KLB), Kelly obrigada pela dedicação à minha querida Frida, tenho certeza que fizemos o impossível. Frida (Fridoca, Ficuricu, Fifi, Firuketa, Fridinha) e Ishihiro saudades eternas, amo vocês;

Aos cães que também fazem parte da minha vida, Holly, Juju, Pequeno, Pequena e ao meu querido Chopp que agora junto da minha Fridoca tem o privilégio da companhia um do outro;

À minha orientadora Regina Kiomi Takahira pela dedicação, confiança, paciência e por me tornar uma pessoa mais segura, calma e confiante profissionalmente;

Aos professores do Laboratório Clínico Raimundo Souza Lopes e Elizabeth Schmidt pela ajuda, atenção e por sempre disponibilizar um tempinho para mim, muita obrigada;

Aos funcionários do laboratório Márcio, Luis Mattiazzi, Ilson e Solange, que deixam o ambiente de trabalho mais alegre. Obrigada pela ajuda, pelas boas risadas, almoços...;

À Marjorie Golim, Valéria Alves (Léia) e ao Serviço de Citometria de Fluxo do Setor de Hematologia da FM da Unesp pela realização das análises da citometria de fluxo e ajuda durante todo o projeto;

À Márcia Sueli Baggio e ao Setor de Hemostasia do HC de Ribeirão Preto SP pela realização das dosagens de antitrombina e ajuda durante todo o projeto, e

À FAPESP pela bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Porcentagens de positividade e negatividade nos testes de auto-aglutinação, Coomb's, citometria de fluxo e presença de esferócitos em relação à classificação da anemia nos 87 cães avaliados para AHIM.

Tabela 2. Comparação da sensibilidade e especificidade das técnicas de citometria de fluxo ao teste de Coomb's para o diagnóstico de AHIM em cães.

Tabela 3. Alterações clínico-laboratoriais de cães positivos e negativos para AHIM.

Tabela 4 Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n=61) e negativos (n=26) para AHIM em relação à hematimetria, contagem de reticulócitos e plaquetas.

Tabela 5 Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n=61) e negativos (n=26) para AHIM em relação à leucometria total e contagem diferencial de leucócitos (/microlitro).

Tabela 6 Grau de proteinúria dos cães com AHIM primária, secundária e cães negativos para AHIM

Tabela 7 Médias e desvios-padrão das variáveis utilizadas para avaliação da função renal de cães positivos (n=57) e negativos (n=15) para AHIM

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Médias, desvios- padrão e valor de p para TP, TTPA, TT, AT e contagem de plaquetas dos cães positivos para AHIM, negativos e cães saudáveis.

Tabela 2 Prolongamentos de TP, TTPA e TT e diminuição da atividade de AT em positivos e negativos para AHIM

Tabela 3 Concentrações de PDF ($\mu\text{g/mL}$) em cães positivos e negativos para AHIM

Tabela 4 Concentrações de Dímeros D ($\mu\text{g/mL}$) em cães positivos e negativos para AHIM

ANEXOS

Tabela 1 Percentual de células marcadas, intensidade média de fluorescência (IMF) de IgG e IgM na citometria de fluxo, médias e desvios padrão (DP) dos 19 cães controle.

LISTA DE FIGURAS

ANEXOS

Figura 1 Representação de um controle negativo (A) e um animal positivo (B) para AHIM pela técnica de citometria de fluxo

LISTA DE ABREVIACÕES

AHIM – Anemia hemolítica imuno-mediada
AT - Antitrombina
AAT – Atividade de antitrombina
C3 – Componente C3 do sistema complemento
CEEA – Câmara de ética para experimentação animal
CF – Citometria de fluxo
CID – Coagulação intravascular disseminada
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média
DP – Desvio padrão
FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”
FSC - Forward Scatter
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
Ig – Imunoglobulina
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
M – Média
NO – Óxido nítrico
PBS – Phosphate buffered saline - Tampão fosfato-salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDF – Produto da degradação da fibrina
PDW - Platelet distribution width
RDW - Red cell distribution width
SSC - Side Scatter
TAD – Teste de antiglobulina direta (Coomb’s)
TP – tempo de protrombina
TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada
TT – tempo de trombina
VCM – Volume corpuscular médio
VPM – Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

Página

RESUMOxii

ABSTRACTxiii

CAPÍTULO 11

 INTRODUÇÃO2

 REVISÃO DE LITERATURA4

 OBJETIVOS7

CAPÍTULO 2 – Trabalho científico: “Avaliação hematológica e da função renal de cães com AHIM”

 Resumo9

 Abstract10

 Introdução10

 Material e Métodos12

 Resultados e Discussão15

 Conclusões.....22

 Agradecimentos22

 Referências22

CAPÍTULO 3 – Trabalho científico: “Avaliação das alterações hemostáticas e do risco tromboembólico e, cães com AHIM”

 Resumo32

 Introdução35

 Material e Métodos37

 Resultados40

Discussão	43
Referências	47

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL	55
CONCLUSÕES GERAIS	59
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	67

MORAES, L.F. **Avaliação das complicações hematológicas e renais e do risco tromboembólico de cães com AHIM.** Botucatu, 2011. 82p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

RESUMO

A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais comum das anemias hemolíticas e tem sido associada a estados de hipercoagulabilidade. Neste trabalho objetivou-se: avaliar a ocorrência de alterações hematológicas, hemostáticas e renais e a prevalência das classes de imunoglobulinas (Ig) envolvidas nas AHIM. 87 cães anêmicos foram submetidos ao teste de Coomb's, citometria de fluxo (CF) e auto-aglutinação, além de hemograma e contagem de reticulócitos, perfil hemostático e renal, pesquisa de hematozoários e testados para *Ehrlichia* sp e leptospirose. Os resultados foram analisados pelo teste t, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. 61 cães (70,11%) foram positivos para AHIM na CF, 31 (35,63%) para o Coomb's e 24 (27,58%) para auto-aglutinação. Não houve predomínio de uma classe de Ig envolvida. As alterações clínico-laboratoriais para cães com AHIM incluíram anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica e reticulocitose, além de icterícia, febre, hiperglobulinemia e bilirrubinúria. 9,8% dos cães positivos apresentaram esferocitose, 29,5% leucocitose, 39,6% neutrofilia e 72,1% trombocitopenia. A proteinúria e o aumento na relação proteína: creatinina urinárias revelam indícios de lesão renal. Os cães anêmicos positivos e negativos para AHIM apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle para contagem de plaquetas, TP, TTPA, AT, PDF e Dímeros D. 25 cães positivos e sete cães negativos para AHIM apresentaram um estado tromboembólico. Estas alterações hemostáticas podem ser atribuídas à causa base predominante para a anemia em questão, uma vez que 74,6% dos casos de AHIM foram atribuídos às doenças infecciosas, a maioria associados à *Ehrlichia* sp.

Palavras-chave: Anemia hemolítica imuno-mediada, doença renal, *Ehrlichia* sp, hematologia, trombose, hemostasia, cães

MORAES, L.F. **Assessment of hematological and renal complications, and thromboembolic risk in dogs with IMHA** Botucatu, 2011. 82p. Master's Dissertation in Veterinary Medicine – School of Veterinary Medicine and Animal Science. São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT

Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most common cause of hemolytic anemia and has been associated with hypercoagulable states. The objectives of this study were: to evaluate the incidence of hemostatic, renal and hematological abnormalities, and the prevalence immunoglobulin's classes involved in IMHA. 87 anemic dogs were selected and submitted to Coomb's test, flow cytometry (FC) and auto-agglutination, along with CBC, reticulocyte count, hemostatic and renal profile, hemoparasite search in peripheral blood smears, and *Ehrlichia* sp and leptospirosis tests. The results were analyzed by t test, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis at 5% of significance. 61 dogs (70.11%) were positive to IMHA by CF, 31 (35.63%) by Coomb's test and 24 (27.58%) by auto-agglutination. There wasn't a predominance of IgG or IgM involvement. The hematological and clinical changes in dogs with IMHA included macrocytic, hypochromic regenerative anemia, and reticulocytosis, as well as icterus, fever, auto-agglutination, hyperglobulinemia and bilirubinuria. 9.8% of dogs with IMHA had spherocytosis, 29.5% leukocytosis, 39.6% neutrophilia and 72.1% thrombocytopenia. Proteinuria and the increase in urine protein creatinine ratio reveal evidences of renal injury. There were statistical differences between the control group and anemic dogs positive or negative for IHMA to the following tests: platelet count, PT, APTT, AT, FDP and D-dimer. 25 positive dogs and seven negative dogs for IMHA were in a thromboembolic state. These hemostatic changes observed in both groups of anemic dogs may be attributed to the predominant underlying cause of anemia, since 74.6% of IHMA cases were attributed to infectious diseases; mostly *Ehrlichia* sp related.

Key-words: Immune-mediated hemolytic anemia, renal disease, *Ehrlichia* sp., hematology, thrombosis, hemostasia, dogs

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais comum dentre as anemias hemolíticas e a doença imuno-mediada de maior prevalência em cães (MACKIN, 2000; QUIGLEY et al., 2001; MCCULLOUGH, 2003; GIGER, 2005).

A AHIM é caracterizada pela destruição direta ou fagocitose de hemácias opsonizadas por imunoglobulinas (Ig) como IgG ou IgM e/ou complemento. Os anticorpos podem ser direcionados às hemácias normais (AHIM primária ou idiopática) ou, ainda, às hemácias antigenicamente alteradas pela ação de medicamentos, neoplasias ou doenças infecciosas (leptospirose, babesiose, erliquiose canina), sendo esta última conhecida como AHIM secundária (HONECKMAN et al., 1996; MACKIN, 2000; MCCULLOUGH, 2003).

Há uma discordância em relação à prevalência das AHIM primárias e secundárias em cães. Tal discordância pode ser decorrente de uma maior prevalência real da AHIM secundária ou, então, da realização de uma investigação diagnóstica mais detalhada em busca da causa base para a anemia em questão, pois o diagnóstico de AHIM primária é feito por exclusão (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001; PEREIRA, 2006; BALCH e MACKIN, 2007b).

Duval e Giger (1996) sugerem uma associação entre a vacinação e o desenvolvimento da AHIM, pois cerca de um quarto dos animais (26%) com AHIM de causa desconhecida possuía um histórico de vacinação (vacina polivalente) de até quatro semanas antes do início dos sintomas.

Poucos relatos correlacionam a AHIM secundária com a picada de abelhas em cães (NOBLE e ARMSTRONG, 1999). As complicações clínicas resultantes das picadas de abelhas estão diretamente relacionadas ao número e local das picadas e fatores como idade, estado de saúde, hipersensibilidade e espécie envolvida (RODRIGUES-LAINZ et al., 1999). Os casos mais graves podem apresentar-se laboratorialmente compatíveis com AHIM, incluindo hemólise intravascular, esferocitose, anemia arregenerativa, icterícia, hemoglobinúria e hematúria (WYSOKE et al., 1990, NOBLE e ARMSTRONG, 1999).

A predisposição genética é evidente em alguns cães devido à grande incidência e a ocorrência familiar em algumas raças. O Cocker Spaniel representa cerca de um terço dos casos de AHIM idiopática, mas raças como o Old English Sheepdog, Doberman, Pinscher miniatura, Collie e Setter Irlandês apresentam uma elevada incidência da doença. Fêmeas inteiras adultas-jovens apresentam uma maior predisposição à doença (MCCULLOUGH, 2003; MILLER et al., 2004; TIZARD, 2004). Além dos fatores racial e sexual, o tipo sanguíneo também está associado ao desenvolvimento da AHIM, pois cães da raça Cocker Spaniel DEA 7 positivos têm um menor risco de desenvolvê-la (MILLER et al., 2004).

Aproximadamente 50% dos cães com AHIM apresentam estado de hipercoagulabilidade no momento do diagnóstico (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001). O tromboembolismo pulmonar tem sido atribuído como causa mais frequente de óbito em cães com AHIM, sendo encontrado em 80% dos casos em avaliação de necropsia (CARR et al., 2002). Um segundo estudo encontrou evidências de tromboembolismo em todas as necropsias realizadas (WEINKLE et al., 2005).

O diagnóstico das AHIM está fundamentado na identificação da destruição das hemácias na presença de anticorpos anti-hemácias, cuja situação depara-se com o encontro da presença de esferócitos, auto-aglutinação, teste de Coomb's ou citometria de fluxo positivos, além da anemia e sinais de hemólise (icterícia, hiperbilirrubinememia, bilirrubinúria, hemoglobinemia e/ou hemoglobinúria) (Carr et al., 2002).

REVISÃO DE LITERATURA

As AHIM podem ser classificadas em regenerativas ou arregenerativas e em intra ou extravasculares, de acordo com o tipo de resposta medular e destruição celular envolvidas, respectivamente (BALCH e MACKIN 2007a). A reação imune da AHIM é definida como hipersensibilidade do tipo II por ser mediada por complemento e anticorpos das classes IgG e IgM, sendo o envolvimento de IgG mais comum. A lise celular está relacionada com o tipo e quantidade de anticorpos ligados à membrana dos eritrócitos e o envolvimento ou não do complemento (STEWART e FELDMAN, 1993; MACKIN, 2000; WILKERSON et al.; 2000).

Geralmente, o processo de destruição celular é extravascular, dependente do reconhecimento da ligação das imunoglobulinas e/ou complemento na superfície dos eritrócitos pelos macrófagos, principalmente esplênicos e hepáticos (STEWART e FELDMAN, 1993; GIGER, 2005).

As técnicas preconizadas para o diagnóstico da AHIM incluem a avaliação de esfregaço de sangue periférico evidenciando a presença de esferócitos, teste de auto-aglutinação, detecção de anticorpos anti-eritrocitários por teste de antiglobulina direta (TAD) e citometria de fluxo (CF) (WILKERSON et al., 2000).

A auto-aglutinação em salina positiva é altamente sugestiva de AHIM além de evidenciar uma condição aguda e grave (STEWART e FELDMAN, 1993). Entretanto, uma aglutinação negativa somente é capaz de afirmar que o animal não possui anticorpos aglutinantes, não excluindo a suspeita de AHIM. Em grande parte dos casos, a auto-aglutinação está relacionada à presença de IgM ou grandes quantidades de IgG (KLAG et al., 1993; MACKIN, 2000).

O TAD, também conhecido como teste de Coombs, é frequentemente utilizado na medicina veterinária para detecção de anticorpos e/ou complemento ligados à superfície das hemácias no auxílio para o diagnóstico de AHIM (JONES et al., 1990; QUINGLEY et al., 2001; WARDROP, 2005; OVERMANN et al., 2007).

A sensibilidade do TAD é de aproximadamente 60% (OVERMANN, 2007). Outras técnicas mais sensíveis também são indicadas, como o teste direto de enzima ligada a antiglobulina (DELAT) e CF, pois há um menor risco de falsos negativos, principalmente nos casos em que há uma quantidade

insuficiente de anticorpos ou complemento ligados à superfície dos eritrócitos, que são incapazes de serem detectados pela técnica de TAD (JONES et al., 1990; 1992; WARDROP, 2005).

Resultados falsos negativos e falsos positivos no TAD têm sido atribuídos ao tratamento prévio com glicocorticóides e transfusões sanguíneas, respectivamente. Outras situações como relação antiglobulina-anticorpo e realização do teste em temperatura inadequada também podem acarretar em resultados falsos negativos (HONECKMAN et al., 1996).

A CF é uma técnica que permite classificar as células de acordo com seu tamanho, complexidade interna e intensidade de fluorescência. Imunoglobulinas ligadas à membrana das hemácias podem ser marcadas com um anti-soro conjugado à fluoresceína (QUIGLEY et al., 2001). Diversos trabalhos evidenciaram uma maior sensibilidade da CF para o diagnóstico da AHIM em relação ao TAD (WILKERSON et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; WEISS, 2002; KUCINSKIENE et al., 2005).

Os sinais clínicos mais comuns da AHIM estão associados à anemia, como fraqueza, letargia, intolerância ao exercício e palidez de mucosas. Os sinais podem ser agudos ou crônicos e incluem também anorexia, vômito, diarreia, pirexia, icterícia, desconforto abdominal, taquicardia, dispnéia, alteração na coloração da urina, esplenomegalia e menos comumente, hepato e linfadenomegalia (FELDMAN et al., 2000; MCCULLOUGH, 2003; NELSON e COUTO, 2009).

As alterações laboratoriais incluem intensa anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, presença de esferócitos e reticulocitose. Caso a doença apresente um curso agudo sem tempo suficiente para gerar uma resposta adequada, em um primeiro momento, a anemia será caracterizada como arregenerativa. No entanto, em cerca de um terço dos casos, os anticorpos podem ser direcionados contra precursores medulares eritróides ou a AHIM pode acarretar em alterações no microambiente medular e prejudicar a eritropoiese, levando a uma anemia arregenerativa de fato (KLAG et al., 1993; HONECKMAN et al., 1996; GIGER, 2005).

A leucocitose é caracterizada por uma neutrofilia discreta a intensa com alterações tóxicas e desvio à esquerda, sendo este degenerativo em alguns casos. (MCMANUS e CRAIG, 2001).

O perfil bioquímico pode revelar a gravidade da lesão tecidual causada pela hipóxia ou pela deposição de imuno-complexos (THRALL et al., 2004). A hipóxia e a nefrotoxicidade causadas pela hemoglobinemia refletem em aumento das enzimas hepáticas e azotemia, respectivamente (MCCULLOUGH, 2003).

Apesar da frequência com que ocorrem os distúrbios hemostáticos em cães com AHIM e do fato de os eventos tromboembólicos serem frequentes causas de letalidade, o mecanismo para esta condição é desconhecido. Algumas hipóteses são levantadas para este estado de hipercoagulabilidade como o aumento da concentração de fatores pró-coagulantes, a diminuição da concentração de fatores anticoagulantes e fibrinolíticos, a presença de coagulação intravascular disseminada (CID), aumento da atividade plaquetária e a presença de anticorpos anti-fosfolípidos (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001; WEINKLE et al., 2005; BALCH e MACKIN, 2007b).

A trombocitopenia é um achado laboratorial comum nas AHIM, e está associada ao aumento da mortalidade e risco de trombose (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001). Outras alterações hemostáticas associadas à AHIM incluem diminuição da concentração do fibrinogênio e antitrombina (AT), prolongamento do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de coagulação (TC) e tempo de trombina (TT) e aumento dos produtos da degradação da fibrina (PDF) e Dímeros-D (FELDMAN et al., 1999; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001).

A incidência de CID em pacientes com AHIM está entre 12% a 45% (KLAG et al., 1993; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2001; CARR et al., 2002; BALCH e MACKIN, 2007b). No entanto, o diagnóstico de CID pode não ser um fator de risco para trombose ou mortalidade em pacientes com AHIM (CARR et al., 2002).

OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Avaliar a ocorrência de alterações hematológicas, hemostáticas e complicações renais associadas à AHIM primária e secundária em cães.

2. Objetivos específicos

- a) Caracterização clínico-laboratorial e da possível etiologia das AHIM de acordo com a resposta à anemia;
- b) Avaliar a ocorrência de CID e outras alterações tromboembólicas associadas às AHIM primária e secundária;
- c) Avaliar a ocorrência de alterações renais decorrentes do quadro de hemólise e/ou CID associados a AHIM; e
- d) Estabelecer a prevalência das classes de imunoglobulinas (IgG ou IgM) envolvidas nas AHIM.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E DA FUNÇÃO RENAL DE CÃES COM AHIM

Lívia Fagundes Moraes*¹, Regina Kiomi Takahira², Marjorie de Assis Golim³

¹ Mestranda Laboratório Clínico Veterinário, Departamento de Clínica Veterinária FMVZ Unesp Botucatu; ² Prof^a Adj. Laboratório Clínico Veterinário, Departamento de Clínica Veterinária FMVZ Unesp Botucatu; ³ Hemocentro FM Unesp Botucatu

*Autor para correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n Depto de Clínica Veterinária, Laboratório Clínico Cep:18618-070 cx postal: 560 Botucatu SP. Tel 14-38116115 Fax: 14-38116067 e-mail: liviafm@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar a ocorrência de alterações hematológicas e renais e prevalência das classes de imunoglobulinas (Ig) envolvidas nas anemias hemolíticas imuno-mediadas (AHIM). 87 cães anêmicos foram submetidos ao teste de Coomb's, citometria de fluxo (CF) e auto-aglutinação, além de hemograma e contagem de reticulócitos, perfil renal, pesquisa de hematozoários e testados para *Ehrlichia* sp e leptospirose. Os resultados foram analisados pelo teste t ou Mann-Whitney ao nível de 5% de significância. 61 cães (70,11%) foram positivos para AHIM pela técnica de CF, 31 (35,63%) para o teste de Coomb's e 24 (27,58%) para auto-aglutinação. Não houve predomínio de uma classe de Ig envolvida nas AHIM, não privilegiando a escolha de IgM ou IgG para o diagnóstico pela técnica de CF. As alterações hematológicas e clínicas para cães com AHIM incluíram anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica e reticulocitose, além de icterícia, febre, auto-aglutinação, hiperglobulinemia e bilirrubinúria. 9,8% dos cães positivos apresentaram esferocitose, 29,5% leucocitose, 39,6% neutrofilia e 72,1% trombocitopenia. 74,6% dos casos de AHIM foram atribuídos às doenças infecciosas, a maioria associados à *Ehrlichia* sp (AHIM secundária). A proteinúria e o aumento na relação proteína: creatinina urinárias revelam indícios de lesão renal.

Palavras-chave: Anemia hemolítica imuno-mediada, doença renal, *Ehrlichia* sp, hematologia, cães

1 ABSTRACT

2 The objectives of this study were: to evaluate the incidence of hematological and renal
3 abnormalities, and the prevalence of immunoglobulin's classes involved in IMHA. 87
4 anemic dogs were selected and tested by Coomb's test, flow cytometric (FC) and auto-
5 agglutination, along with CBC, reticulocyte count, renal profile, hemoparasite search in
6 peripheral blood smears, and *Ehrlichia* sp and leptospirosis tests. The results were
7 analyzed by t test or Mann-Whitney with 5% of significance. 61 dogs (70.11%) were
8 positive for IMHA by CF, 31 (35.63%) by Coomb's test and 24 (27.58%) by auto-
9 agglutination. There wasn't a predominance of IgG or IgM involvement. The
10 hematological and clinical changes in dogs with IMHA included macrocytic,
11 hypochromic regenerative anemia, and reticulocytosis, as well as icterus, fever, auto-
12 agglutination, hyperglobulinemia and bilirubinuria. 9.8% of dogs with IMHA had
13 spherocytosis, 29.5% leukocytosis, 39.6% neutrophilia and 72.1% thrombocytopenia.
14 74.6% of cases of IHMA cases were attributed to infectious diseases; mostly associated
15 with *Ehrlichia* sp (secondary IMHA). Proteinuria and the increase in urine protein
16 creatinine ratio reveal evidences of renal injury.

17 **Key-words:** Immune-mediated hemolytic anemia, renal disease, *Ehrlichia* sp.,
18 hematology, dogs

19 20 INTRODUÇÃO

21 A anemia hemolítica imuno-mediada em cães é uma causa comum de anemia e
22 caracterizada pela destruição direta ou fagocitose das hemácias opsonizadas por IgG,
23 IgM e/ou complemento (Scott-Moncrieff et al., 2001 e Mccullough, 2003).

24 Os anticorpos podem ser direcionados às hemácias normais (AHIM primária ou
25 idiopática) ou, ainda, às hemácias antigenicamente alteradas pela ação de
26 medicamentos, neoplasias ou doenças infecciosas (leptospirose, babesiose, erliquiose
27 canina), sendo nestes casos conhecida como AHIM secundária (Honeckman et al. 1996;
28 Mackin 2000; Mccullough, 2003).

29 A AHIM é uma reação de hipersensibilidade tipo II na qual as hemácias são
30 destruídas devido a quebra da auto tolerância imune e a produção de anticorpos, da
31 classe IgG ou IgM. Estes anticorpos geralmente reconhecem as glicoproteínas de
32 membrana dos eritrócitos (Shaw e Harrell, 2008).

33 Os sinais clínicos incluem letargia, anorexia, vômito, diarreia, fraqueza,
34 taquicardia, dispnéia, palidez de mucosas, icterícia, desconforto abdominal, efeitos de

1 hipóxia em diversos órgãos como fígado, pulmões, coração, rins e intestinos,
2 pigmentúria, hepato e esplenomegalia e febre (Cotter, 1992; Mccullough, 2003; Nelson
3 e Couto, 2009). Geralmente as anemias são regenerativas, no entanto de 33 a 50% dos
4 casos as anemias são classificadas como arregenerativas (Shaw e Harrell, 2008). A
5 leucocitose é caracterizada por uma neutrofilia discreta a intensa com alterações tóxicas
6 e desvio à esquerda, sendo este degenerativo em alguns casos. (Mcmanus e Craig,
7 2001).

8 Algumas raças são predispostas à AHIM, dentre elas, o Cocker Spaniel, Setter
9 Irlandês, Old English Sheepdog, Doberman, Pinscher miniatura e Collie. Fêmeas
10 inteiras adultas-jovens apresentam uma maior predisposição à doença (Mccullough,
11 2003; Miller et al., 2004; Shaw e Harrell, 2008).

12 O diagnóstico das AHIM está fundamentado na identificação da destruição das
13 hemácias na presença de anticorpos anti-hemácias, cuja situação depara-se com o
14 encontro da presença de esferócitos, auto-aglutinação, teste de Coomb's ou citometria
15 de fluxo positivos, além da anemia e sinais de hemólise (icterícia, hiperbilirrubinemia,
16 bilirrubinúria, hemoglobinemia e/ou hemoglobinúria) (Carr et al., 2002).

17 O perfil bioquímico renal pode revelar alterações importantes face à gravidade
18 da lesão renal causada pela hipóxia ou por deposição de imuno-complexos (Thrall et al.,
19 2004). Isto ocorre porque a hipóxia tecidual aumenta o risco de lesão progressiva,
20 decorrente da queda aguda do hematócrito (abaixo de 22%), acarretando em necrose
21 tubular renal, ao passo que a deposição de imuno-complexos, principalmente no
22 parênquima renal, pode agravar a lesão renal, complicando ainda mais o quadro clínico
23 do animal. A lesão renal direta causada por cristalização de hemoglobina livre nos
24 túbulos renais pode resultar em azotemia renal (Stewart e Feldman, 1993). A hipóxia e a
25 nefrotoxicidade causadas pela hemoglobinemia reflete em aumento das enzimas
26 hepáticas e azotemia, respectivamente (Mccullough, 2003).

27 Neste trabalho objetivou-se caracterizar as alterações hematológicas e renais de
28 cães com AHIM, somados à avaliação clínico-laboratorial de acordo com a resposta à
29 anemia, e possível estabelecimento da etiologia. Objetivou-se também avaliar os
30 principais testes diagnósticos para AHIM e estabelecer a prevalência das classes de
31 imunoglobulinas (IgG ou IgM) envolvidas.

32

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 Foram selecionados 87 cães atendendo aos seguintes critérios: hematócrito
3 inferior a 20%, configurando um quadro de anemia tanto regenerativa quanto
4 arregenerativa, sem histórico prévio de tratamento com corticóides ou transfusão
5 sanguínea recente e apresentar ao menos um sinal clínico (hepato ou esplenomegalia,
6 icterícia, dispnéia, taquicardia, febre) ou laboratorial (esferócitos, auto-aglutinação,
7 hiperproteinemia, hiperglobulinemia, bilirrubinúria) comumente associado à AHIM ou
8 possuir pré-disposição racial (Cocker Spaniel, Old English Sheepdog, Doberman,
9 Pinscher miniatura, Collie e Setter Irlandês). Foram excluídos os animais com outras
10 causas conhecidas de anemia, tais como doença renal crônica, aplasia medular induzida
11 por drogas como estrógeno ou agentes quimioterápicos e casos de verminose.

12 Estes cães foram submetidos ao teste de Coomb's, citometria de fluxo (CF) e
13 auto-aglutinação para o diagnóstico de AHIM e também foram avaliados quanto ao
14 hemograma e contagem de reticulócitos, perfil renal, pesquisa de hematozoários em
15 sangue periférico, além do testes para *Ehrlichia* sp, pela técnica de PCR. A sorologia
16 para leptospirose foi realizada apenas para os cães positivos para AHIM.

17 Para a padronização da técnica de CF foi formado um grupo controle com 19
18 cães saudáveis selecionados com base nos exames físico e laboratoriais, provenientes do
19 canil do Hospital Veterinário da FMVZ UNESP- Botucatu. Todos os cães anêmicos
20 foram obtidos a partir da casuística do atendimento no Hospital Veterinário da FMVZ
21 Unesp Botucatu SP.

22 O teste de auto-aglutinação foi avaliado macro e microscopicamente em solução
23 salina na diluição 5:1 (Stockham e Scott, 2002).

24 O teste de Coomb's foi realizado a partir da utilização de antiglobulina
25 policlonal caprina (anti-IgG, IgM e C3), de acordo com as especificações do fabricante¹.

26 A CF foi realizada no equipamento FacScalibur (Becton Dickinson), utilizando-
27 se o software CELLQuest. 100µL do concentrado de hemácias foram diluídos em
28 4,9mL de solução PBS. Esta solução foi centrifugada, em seguida foi removido o
29 sobrenadante e acrescentou-se 4,9mL de solução PBS para uma nova lavagem e
30 subsequente centrifugação. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes,
31 obtendo uma solução de hemácias a 2%. Para utilização na técnica de CF, obteve-se
32 uma solução de hemácias a 1%. Foram utilizados anticorpos policlonais

¹ VRMD, Pullman, WA

1 monoespecíficos caprinos² anti-IgG (anti-IgG de cão marcado com fluoresceína –
2 FITC) e anti-IgM (anti-IgM de cão marcado com FITC). Foram utilizados três tubos,
3 sendo o primeiro tubo, um tubo controle contendo apenas 100µL da solução de
4 hemácias a 1%. Ao segundo e terceiro tubo foi adicionado 1µL (1mg/mL) de
5 antiglobulina policlonal caprina anti-IgG ou anti-IgM de cão, respectivamente. Os tubos
6 foram incubados por 20 minutos em ambiente escuro em temperatura ambiente. As
7 hemácias foram novamente lavadas com 1,0mL de PBS. A leitura foi realizada
8 imediatamente após a preparação da amostra.

9 A população de hemácias foi selecionada com base nos parâmetros FSC
10 (forward scatter – tamanho) e SSC (side scatter – granulosidade), e a presença de IgG e
11 IgM na superfície das células foi avaliada pela intensidade de fluorescência (FL1).
12 Foram adquiridos 20.000 eventos para confirmação do diagnóstico de AHIM e
13 classificação da classe de imunoglobulina (IgG ou IgM) envolvida.

14 A seleção da população de hemácias foi realizada por meio de “gate”, desenhado
15 com base nos parâmetros FSC e SSC, conforme recomendado na literatura (Wilkerson
16 et al., 2000; Quigley et al. 2001; Kucinskiene et al., 2005). A utilização de “gate” é
17 importante para excluir qualquer sinal oriundo de contaminação por plaquetas ou debris
18 celulares (Wilkerson et al., 2000). Adotou-se um valor de corte para positividade com
19 base na média das porcentagens de células marcadas dos cães controles + 2 DP (desvio
20 padrão), baseado em estudos anteriores (Wilkerson et al., 2000; Pereira, 2006); sendo
21 consideradas positivas para AHIM amostras com fluorescência para IgG maior que
22 16,72% e para IgM maior que 9,56%.

23 A CF foi escolhida como teste padrão-ouro, pois diversos trabalhos anteriores
24 evidenciaram sua maior sensibilidade e especificidade em relação aos testes de auto-
25 aglutinação e Coomb’s (Wilkerson et al., 2000; Quigley et al., 2001; Weiss, 2002;
26 Kucinskiene et al., 2005).

27 O hemograma foi realizado no contador automático de células HEMASCREEN
28 18 (Ebram) e incluiu os seguintes parâmetros: eritrograma (hematócrito, contagem de
29 hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM, RDW), leucograma (leucócitos totais, valores
30 relativos e absolutos), contagem de plaquetas, VPM e PDW. Para a determinação da
31 contagem de reticulócitos foi utilizada a técnica manual em esfregaços sanguíneos após
32 coloração com Novo Azul de Metileno e incubação em banho-maria a 37°C por 15
33 minutos.

² Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA

As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com panótico, por microscopia ótica em aumento de 100X em um total de 100 leucócitos observados na monocamada de hemácias (Hendrix, 2002).

Para avaliação da função renal foram realizadas as dosagens plasmáticas de uréia³ e creatinina⁴ pelo método enzimático colorimétrico e cinético, respectivamente; além do estabelecimento da relação proteína/creatinina urinárias e do exame de urina. A determinação da proteína urinária foi realizada por teste colorimétrico⁵ específico para baixas concentrações. A determinação da creatinina urinária foi realizada também pelo método cinético⁴. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado⁶.

O exame de urina consistiu em avaliação física, química e do sedimento. O exame químico foi realizado por meio de tiras reagentes⁷, a densidade urinária por refratometria e análise do sedimento urinário por avaliação microscópica do sedimento fresco em aumento de 40X (Hendrix, 2002). As amostras, em sua maioria, foram obtidas por cistocentese.

Os testes de PCR, sorologia e pesquisa de hematozoários foram utilizados para se estabelecer a classificação das AHIM em primárias ou secundárias. As AHIM primárias foram confirmadas nos casos negativos para estes testes e sem histórico de administração de medicamentos ou vacinas em um período de quatro semanas, neoplasia ou outras doenças infecciosas.

Este estudo foi aprovado pela câmara de ética em experimentação animal (CEPA) sob protocolo de número 165/2008.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para a avaliação da incidência das alterações hematológicas e renais, bem como da incidência da classe de imunoglobulina envolvida. Os resultados foram agrupados de acordo com a classificação da resposta à anemia (regenerativa ou arregenerativa) e quanto ao tipo de AHIM (primária ou secundária). As médias das variáveis obtidas para os referidos grupos (positivos ou negativos para AHIM) foram comparadas pelo teste t ou Mann-Whitney, de acordo com o tipo de distribuição da variável, ao nível de 5% de significância, no programa Sigmastat 3.1.

³ Katal, Biotecnológica Ind. Com. Ltda

⁴ Laborlab, produtos para laboratórios Ltda

⁵ Microprote, Doles reagentes e equipamentos para laboratório Ltda

⁶ COBAS Mira plus Roche®

⁷ Combur 10 Test – Roche

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 87 cães avaliados, 60 cães (68,96%) foram positivos para AHIM pela técnica de CF, ao passo que apenas 31 (35,63%) foram positivos no teste de Coomb's e 24 (27,58%) no teste de auto-aglutinação.

É importante ressaltar que dos 60 cães com diagnóstico de AHIM, seis cães foram positivos para o teste de auto-aglutinação e negativos para o teste de Coomb's e 13 foram negativos para o teste de auto-aglutinação e positivos para o teste de Coomb's. A Tab. 1 apresenta a relação entre os resultados dos testes utilizados para o diagnóstico de AHIM e a resposta à anemia.

Segundo estudos anteriores, a prevalência de auto-aglutinação nos casos de AHIM é de 40% a 87%; superior à prevalência deste estudo (27,58%) (Reimer et al., 1999; Scott-Moncrieff et al., 2001; Weinkle et al., 2005).

A auto-aglutinação em salina positiva é altamente sugestiva de AHIM, pois neste estudo todos os cães positivos para este teste também foram positivos na CF. Em grande parte dos casos, a auto-aglutinação está relacionada à presença de IgM ou grandes quantidades de IgG. Entretanto, uma aglutinação negativa somente é capaz de afirmar que o animal não possui anticorpos aglutinantes, não excluindo a suspeita de AHIM. (Klag et al., 1993; Mackin, 2000).

Quatro cães apresentaram resultados falsos positivos para o teste de Coomb's, pois estes foram negativos na CF. Portanto, a especificidade do teste de Coomb's foi menor do que 100%, discordando de trabalhos anteriores (Wilkerson et al., 2000; Quigley et al., 2001; Pereira, 2006). Para Morley et al., (2008) a CF é mais sensível do que o teste de Coomb's para a detecção de anticorpos anti-hemácias, no entanto com especificidade semelhante.

Um dos principais fatores relacionados a resultados falsos positivos para o teste de Coomb's é a presença de hipergamaglobulinemia, observada tanto em pacientes com gamopatia monoclonal quanto policlonal. Acredita-se que este resultado esteja relacionado à ligação não específica das imunoglobulinas devido à alta concentração plasmática (Wardrop, 2005). Nos quatro casos falsos positivos deste estudo, os cães apresentaram hiperglobulinemia, podendo assim justificar esse resultado.

O teste de Coomb's possui uma alta especificidade, porém uma menor sensibilidade, por volta de 60% dos casos (Scott-Moncrieff et al., 2001). Um teste negativo não exclui o diagnóstico de AHIM. Resultados falsos negativos estão relacionados a uma quantidade insuficiente de anticorpos detectáveis, mas suficiente

1 para remoção in vivo das hemácias e aparecimento de sinais clínicos, ou ainda, a uma
2 relação inapropriada entre quantidade de antiglobulina e anticorpo (efeito pró-zona)
3 (Honeckman et al., 1996; Wardrop, 2005). Estes dados confirmam a menor
4 porcentagem de positividade encontrada neste estudo quando comparada com a CF para
5 o diagnóstico de AHIM.

6 Em dois casos, o resultado negativo para a CF não foi compatível com a suspeita
7 clínica e outros achados laboratoriais; no entanto, para fins estatísticos e padronização
8 do diagnóstico, estes animais foram incluídos no grupo de cães negativos para AHIM.
9 Estes cães apresentaram resultados positivos nos testes de auto-aglutinação e Coomb's,
10 anemia regenerativa macrocítica hipocrômica com reticulocitose, icterícia, febre e PCR
11 positivo para *Ehrlichia* sp. Além disso, um dos casos também foi observado esferócitos
12 em esfregaço sanguíneo. A Tab. 2 resume a especificidade e sensibilidade dos
13 principais métodos diagnósticos para AHIM.

14 A CF é capaz de identificar anticorpos ligados a hemácias em 8% dos casos de
15 anemias não relacionadas à AHIM (falso positivo), enquanto no teste de Coomb's a
16 probabilidade de um resultado negativo em um paciente com AHIM é de 38%
17 (Wilkerson et al., 2000). No presente estudo os casos falsos negativo corresponderam a
18 7,4% (2/27). A CF é um método quantitativo rápido, altamente sensível para o
19 diagnóstico de AHIM quando comparada aos testes de auto-aglutinação e Coomb's,
20 além de requerer uma pequena quantidade de amostra para o teste (Quigley et al., 2001;
21 Morley et al., 2008).

22 Este estudo reafirma a maior sensibilidade da técnica de CF para o diagnóstico
23 de AHIM em relação aos testes de auto-aglutinação e de Coomb's, que apresentaram
24 uma sensibilidade ainda menor quando comparados com estudos anteriores (Reimer et
25 al., 1999; Scott-Moncrieff et al., 2001; Weinkle et al., 2005). Entretanto, quando
26 comparado com o estudo de Pereira (2006), as porcentagens de positividade nos
27 respectivos testes foram superiores.

28 A CF é facilmente aplicada na rotina clínica, tendo como fator limitante a
29 aquisição do equipamento específico para processamento das amostras. Casos suspeitos
30 de AHIM, mas negativos para os testes de auto-aglutinação e Coomb's não devem ser
31 descartados, pois a CF pode ser conclusiva nestas situações.

32 Não houve predomínio de uma classe de Ig envolvida nas AHIM, pois 58 cães
33 foram positivos tanto para IgG quanto para IgM. Apenas um cão foi positivo somente
34 para IgM (27,43% de hemácias fluorescentes) e um outro positivo somente para IgG

(34,63% de hemácias fluorescentes), sendo que nestes casos a AHIM foi detectada apenas pela técnica de CF. O predomínio dos casos de AHIM causados pela combinação de IgG e IgM reafirma os resultados encontrados em estudos anteriores (Quigley et al., 2001; Morley et al., 2008).

Cães anêmicos com AHIM apresentam maiores porcentagens de imunoglobulinas (Ig) ligadas a hemácias, principalmente de IgG, se comparados com outras doenças imuno-mediadas. A quantificação dos níveis destas Ig pode ser utilizada para monitoramento da eficácia da terapia imunossupressiva, principalmente em cães com AHIM, pois há um rápido decréscimo das porcentagens destas Ig após o início do tratamento, antes mesmo da constatação de mudanças no hematócrito ou presença de reticulocitose (Morley et al., 2008).

Baixas porcentagens de Ig ligadas a hemácias estão normalmente presentes em cães saudáveis e representam a detecção de hemácias senescentes a serem removidas da circulação pelo sistema monocítico fagocitário. Este antígeno provavelmente é uma proteína de membrana que é expressa ou exposta em hemácias mais velhas (Barker e Elson, 1995; Quigley et al., 2001; Pereira, 2006; Morley et al., 2008), justificando assim, a baixa marcação de IgG e IgM nos cães saudáveis utilizados como controle.

As alterações clínico-laboratoriais dos 87 cães estão resumidas na Tab. 3. A maioria dos cães positivos não possuía raça definida e, dentro das raças predispostas à AHIM, quatro eram Cocker Spaniel e um Collie, sendo três casos de AHIM primária em cães da raça Cocker Spaniel. Neste estudo não houve prevalência de sexo ou raça. Klag et al. (1993) também não encontraram relação entre AHIM e sexo.

A média de idade dos animais positivos é semelhante à relatada em trabalhos anteriores (Klag et al., 1993; Reimer et al., 1999; McCullough, 2003; Weinkle et al., 2005; Goggs et al., 2008). Em média, os cães positivos possuíam idade superior aos cães negativos, no entanto sem diferença estatística.

Neste estudo, as alterações clínico-laboratoriais mais comuns nos cães positivos incluíram esplenomegalia, icterícia, febre, auto-aglutinação, hiperglobulinemia e bilirrubinúria. Day (1996) relata que 35% dos cães com AHIM primária apresentavam febre. Os sinais clínicos são inespecíficos e estão associados à anemia, como fraqueza, letargia, intolerância ao exercício e palidez de mucosas. Os sinais podem ser agudos ou crônicos e incluem também anorexia, vômito, diarreia, febre, icterícia, desconforto abdominal, taquicardia, dispnéia, alteração na coloração da urina, esplenomegalia e

menos comumente, hepato e linfadenomegalia (Feldman et al., 2000; McCullough, 2003; Nelson e Couto, 2009).

Cães ictéricos apresentando auto-aglutinação são potencialmente candidatos ao desenvolvimento de tromboembolismo, principalmente pulmonar, com maiores chances de óbito se comparados com animais que não a manifesta (Klag et al., 1993; Johnson et al. 1999; Nelson e Couto, 2009).

Para as variáveis do hemograma, os cães com AHIM apresentaram valores de metarrubríctos e contagem de reticulócitos significativamente maiores ($p < 0,05$) que os animais anêmicos negativos para AHIM ($n=27$). 9,8% dos cães com AHIM apresentaram esferocitose. As AHIM se caracterizaram por uma anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, reticulocitose e com média de hematócrito semelhante ($15,44 \pm 3,91$) a estudos anteriores (Klag et al., 1993; Reimer et al., 1999; Carr, 2002; Goggs et al., 2008; Piek et al., 2008). Neste estudo, 58,3% (35/60) dos cães positivos apresentaram anemia regenerativa e o grau de regeneração foi mais intenso quando comparado com outras causas de anemias em cães, apesar da intensidade da anemia não apresentar diferença estatística (Tab. 4).

Evidências de anisocitose e aumento de RDW se relacionam a presença de hemácias grandes e pequenas na circulação, ou seja, presença de reticulócitos e esferócitos, respectivamente (Cotter, 1992). Caso a doença apresente um curso agudo sem tempo suficiente para se gerar uma resposta adequada, em um primeiro momento, a anemia é caracterizada como arregenerativa. No entanto, em cerca de um terço dos casos, os anticorpos podem ser direcionados contra precursores medulares eritróides ou a AHIM pode levar a alterações no microambiente medular e prejudicar a eritropoiese, levando a uma anemia arregenerativa de fato (Klag et al., 1993; Honeckman et al., 1996; Giger, 2005). Não foi possível a realização do mielograma dos animais que apresentaram uma anemia arregenerativa (25/60), portanto há apenas a suspeita de AHIM contra os precursores medulares.

Neste estudo 30% (18/60) dos cães positivos apresentaram leucocitose e 38,3% (23/60) neutrofilia. Os 18 cães com leucocitose também apresentaram sinais de hemólise como icterícia, bilirrubinúria e/ou auto-aglutinação das hemácias. A combinação de diversos mecanismos pode resultar em leucocitose nos casos de AHIM, como necrose tecidual, a presença de citocinas que estimulam uma hiperplasia mielóide, somadas a uma maior liberação medular, demarginação de neutrófilos e diminuição da migração destas células para tecidos com baixa perfusão e com lesões necróticas

(Mcmanus e Craig, 2001). Uma hemólise intravascular intensa pode acarretar em uma intensa leucocitose e uma resposta febril (Cotter, 1992). A Tab. 5 resume os resultados encontrados no leucograma dos animais anêmicos.

O prognóstico da AHIM é reservado na maioria dos casos. Alterações laboratoriais incluindo anemia com ausência de regeneração, leucocitose e trombocitopenia intensas, auto-aglutinação, icterícia, hiperbilirrubinemia, refletem em um prognóstico desfavorável (Klag et al., 1993; Carr et al., 2002; Weinkle et al., 2005).

Os valores médios obtidos para plaquetas mostraram-se inferiores àqueles descritos para as anemias decorrentes de outras etiologias, apesar da ausência de diferença estatística; e 72,1% dos cães apresentaram trombocitopenia, corroborando com estudos anteriores (Scott-Moncrieff et al., 2001; Carr et al., 2002; Goggs et al., 2008). Diversos autores relatam a trombocitopenia associada à AHIM (Reimer et al., 1999; Scott-Moncrieff, et al., 2001; Carr et al., 2002; Goggs et al., 2008). A trombocitopenia em cães com AHIM pode estar relacionada à concomitante destruição imuno-mediada das plaquetas, aumento do consumo devido à vasculite, processos inflamatórios generalizados, CID ou seqüestro (Scott-Moncrieff et al., 2001). Houve diferença estatística para VPM, com uma média maior para os cães negativos para AHIM ($13,78 \pm 2,94$; $p=0,012$). Os cães positivos não apresentaram diferença estatística quando comparados com os cães saudáveis ($média\ 11,89 \pm 2,94$).

Alguns autores relatam que cerca de 20% dos cães apresentam contagem de plaquetas inferior a $50.000/\mu L$, no entanto neste estudo foi observado um número muito maior de casos (54,2%), sendo esta associada ao aumento da mortalidade e risco de trombose (Scott-Moncrieff et al., 2001; Carr et al., 2002).

Todos os cães foram testados para *Ehrlichia* sp e a sorologia para leptospirose foi realizada apenas para os cães positivos para AHIM. 76,7% (46/60) dos casos de AHIM foram secundários a doenças infecciosas, em sua maioria associadas à *Ehrlichia* sp (89,1%).

Neste estudo a trombocitopenia observada provavelmente está relacionada à infecção por *Ehrlichia* sp, pois grande parte dos animais apresentaram PCR positivo, sendo esta diminuição relacionada ao consumo devido à vasculite ou destruição imuno-mediada observada nesta doença (Nelson e Couto, 2009).

Apenas cinco casos (8,3%) foram associados à leptospirose pelos sorovares *canicola*, *copenhageni*, *hardjo* e *grippotyphosa*. Dois cães com titulação positiva para leptospirose também foram positivos para *Ehrlichia* sp. Também foram diagnosticados

um caso de cinomose e um de babesiose a partir da observação das respectivas inclusões em esfregaço sanguíneo e um caso de neoplasia renal.

As AHIM primárias (14 cães – 23,3%, sendo sete fêmeas) foram confirmadas nos casos negativos para os testes de PCR e sorologia para leptospirose e sem histórico de administração de medicamentos ou vacinas em um período de quatro semanas, neoplasia ou outras doenças infecciosas. Dentre estas AHIM primárias 11 cães apresentaram anemia regenerativa e nove apresentaram teste de auto-aglutinação positivo.

Há uma discordância em relação à prevalência das AHIM primárias e secundárias em cães. Tal discordância pode ser decorrente de uma maior prevalência real da AHIM secundária ou, então, da realização de uma investigação diagnóstica mais detalhada em busca da causa base para a anemia em questão, pois o diagnóstico de AHIM primária é feito por exclusão (Scott-Moncrieff et al., 2001; Pereira, 2006; Balch e Mackin, 2007).

No Brasil, a presença de áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas pode contribuir para a maior prevalência de AHIM secundária. No município de Botucatu - SP foi relatada a ocorrência de 30,9% de cães positivos para *Ehrlichia canis* pela técnica de PCR e de 15,3% de cães positivos para 11 sorovares de *Leptospira sp.* pela técnica de soroaglutinação microscópica, no entanto estes casos não foram investigados quanto a possibilidade da associação com AHIM (Bulla et al., 2004; Modolo et al., 2006).

O exame de urina foi realizado em 56 dos 60 animais positivos, devido à impossibilidade de coleta em quatro casos (pouca urina na bexiga, incontinência urinária ou início de fluidoterapia antes da coleta). Não foram encontrados relatos anteriores sobre a avaliação renal de cães com AHIM.

Seis cães apresentaram isostenúria. A maioria dos cães apresentou proteinúria (n=42) (30 a 500 mg/dL), sendo esta mais significativa nos cães positivos e semelhante para as AHIM primárias e secundárias. Os dados referentes à avaliação da proteinúria estão descritos na Tab. 6. Houve diferença significativa para a relação proteína: creatinina urinárias ($p=0,043$). 21,4% dos cães positivos apresentaram azotemia e 51,8% aumento da relação proteína: creatinina urinária (Tab. 7).

A incapacidade de concentração urinária, assim como a proteinúria e cilindrúria são alguns dos marcadores de lesão renal (Nelson e Couto, 2009). Neste estudo, observou-se que os animais apresentaram sinais de lesão renal no momento do

1 diagnóstico, evidenciada por uma proteinúria significativa (75%). A proteinúria
2 persistente de origem renal indica a existência de uma doença renal crônica (Stockham e
3 Scott, 2002), no entanto como estes cães foram avaliados em um único momento, não
4 foi possível confirmar este quadro.

5 A proteinúria nos casos de AHIM secundária pode estar associada tanto a lesão
6 renal causada pela *Ehrlichia* sp quanto a própria doença imuno-mediada, já que houve
7 uma mesma proporção de casos de proteinúria nas AHIM primárias. Em estudos
8 experimentais citados por Neer e Harrus (2006) houve um pico de proteinúria em cães
9 com erliquiose, principalmente de albumina, entre 2,5 e 3,5 semanas após infecção.

10 25 cães apresentaram bilirrubinúria positiva ao teste com fita reagente, sendo
11 que 14 apresentaram cristais de bilirrubina à sedimentação, e dentre estes, nove
12 apresentaram impregnação por bilirrubina. A bilirrubinúria foi uma alteração
13 laboratorial importante observada em 44,6% dos casos, pois esta pigmentúria é um sinal
14 que precede a icterícia e hemoglobinemia nos casos de hemólise, já que os cães
15 possuem permeabilidade glomerular livre à bilirrubina conjugada (direta) (Stockham e
16 Scott, 2002).

17 39 animais apresentaram reação de sangue oculto positivo (de 1 a 4+), quatro
18 apresentaram reação traço e 13 animais apresentaram resultado negativo. Seis cães
19 apresentaram hematúria discreta a moderada (até 50 células/campo em aumento de
20 400X) e nove apresentaram leucocitúria discreta a moderada. Apenas dois cães
21 apresentaram bacterúria significativa.

22 Para as concentrações de uréia e creatinina plasmáticas não houve diferença
23 estatística ($p > 0,05$) entre os grupos dos cães positivos e negativos para AHIM, no
24 entanto, as médias dos animais positivos ($74,8 \pm 65,5 \text{ mg/dL}$ e $1,15 \pm 0,83 \text{ mg/dL}$,
25 respectivamente) foram maiores (Tab. 7). O aumento, em média, discreto nos valores de
26 uréia e creatinina não descarta a possibilidade de que cães com AHIM apresentem
27 insuficiência renal, já que foram excluídos os casos de anemia associados à evidência de
28 doença renal crônica prévia. O diagnóstico confirmatório de AHIM somente foi
29 realizado após a seleção dos cães atendendo aos critérios determinados, de modo que
30 alguns animais demonstraram uma discreta azotemia apenas após a avaliação
31 laboratorial completa. O perfil bioquímico pode ser importante para revelar a gravidade
32 da lesão tecidual causada pela hipóxia, pela deposição de imuno-complexos e pela
33 nefrotoxicidade causada pela hemoglobinemia (McCullough, 2003; Thrall et al., 2004).

Poucos cães apresentaram isostenúria, o primeiro sinal de perda da função renal (Stockham e Scott, 2002).

De acordo com a classificação IRIS, a doença renal crônica de cães e gatos é dividida, a partir dos valores de creatinina plasmática, em quatro estágios. Além disso, há uma segunda divisão, em sub-estágios, baseados na proteinúria e pressão sanguínea (Braun et al., 2008). Os cães deste estudo, em média, enquadram-se no estágio I da doença renal, pois nesta fase além do valor aumentado de creatinina em até 2,1mg/dL, há uma proteinúria de origem renal, além de outras alterações incluindo: inadequada capacidade de concentração urinária, sem relação com causas extra-renais, imagem ou palpação anormal dos rins e resultados alterados de biópsia renal.

CONCLUSÕES

A CF se confirmou como uma técnica mais sensível para o diagnóstico de AHIM quando comparada aos testes de auto-aglutinação e Coomb's. O teste de auto-aglutinação é mais específico que o teste de Coomb's, no entanto este último é mais sensível.

A prevalência semelhante de IgG e IgM nas AHIM não privilegia a escolha da classe de Ig envolvida para o diagnóstico pela técnica de CF.

Este estudo alerta para a alta prevalência de AHIM, em grande parte dos casos caracterizada por uma anemia regenerativa associada a uma intensa trombocitopenia.

A maioria dos casos de AHIM é secundária e relacionada à *Ehrlichia* sp em áreas endêmicas para esta doença infecciosa. Existem indícios de lesão renal associada à AHIM, pois os cães anêmicos apresentam proteinúria significativa e aumento na relação proteína: creatinina urinárias no momento do diagnóstico.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa nº 2008/10427-3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALCH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: treatment and prognosis. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian*. v.29, n.4, p.230-238, 2007.

- 1 2. BARKER, R.N.; ELSON, C.J. Red blood cell glycoproteins as B and T-cell
2 antigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Veterinary Immunology*
3 *and Immunopathology*. v.47, n.3- 4, p.225-238, 1995.
- 4 3. BRAUN, J-P.; LEFEBVRE, H.P. Kidney Function and Damage. In: KANEKO,
5 J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*.
6 6th ed. San Diego, California: Academic Press, , 2008.p. 485-528.
- 7 4. BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO, JR. J.P.; et al. The relationship
8 between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in
9 an endemic area. *Veterinary Research*. v.35, p.141-146, 2004.
- 10 5. CARR, A.P.; PANCIERA, D.L.; KIDD, L. Prognostic factors for mortality and
11 thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a
12 retrospective study of 72 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v 16,
13 n.5, p.504-509, 2002.
- 14 6. COTTER, S.M. Autoimmune hemolytic anemia in dogs. *The Compendium*
15 (*Small Animal*). v.14, n.1, p.53-59, 1992.
- 16 7. DAY, M.J. Serial monitoring of clinical, haematological and immunological
17 parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Journal of Small Animal*
18 *Practice*. v.37, p.523-534, 1996.
- 19 8. DUVAL, D.; GIGER, U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic
20 anemia in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.10, n.5, p.290-
21 295, 1996.
- 22 9. FELDMAN, B.F.; ZINKL J.G.; JAIN N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*.
23 5ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.
- 24 10. GIGER, U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In:
25 ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*.
26 6ed St. Louis Missouri: Elsevier Saunders, 2005. p. 1886-1907.
- 27 11. GOGGS, R.; BOAG, A.K.; CHAN, D.L. Concurrent immune-mediated
28 haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. *Veterinary*
29 *Records*. v.163, n.11, p.323-327, 2008.
- 30 12. HENDRIX, C.M. *Laboratory procedures for veterinary technicians*. 4ed St
31 Louis, Missouri: Mosby, 2002. 559p.
- 32 13. HONECKMAN, A.L.; KNAPP, D.W.; REAGAN, W.J. Diagnosis of canine
33 immune-mediated hematologic disease. *Compendium on Continuing of*
34 *Education for the Practicing Veterinarian*. v.18, n.2, p.113-124, 1996.

- 1 14. JOHNSON, L.R.; LAPPIN, M.R.; BAKER, D.C. Pulmonary thromboembolism
2 in 29 dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.13, n.4,
3 p.338-345, 1999.
- 4 15. KLAG, A.R.; GIGER, U.; SHOFER, F.S. Idiopathic immune-mediated
5 hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986- 1990). *Journal of the American*
6 *Veterinary Medical Association*. v.202, n.5, p.783-788, 1993.
- 7 16. KUCINSKIENE, G.; SCHUBERTH, H.; LEIBOLD, W.; et al. Flow cytometric
8 evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. *The Veterinary*
9 *Journal*. v.169, p.303-307, 2005.
- 10 17. MACKIN, A. Immune-mediated haemolytic anaemia. In: DAY, M.J.;
11 MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J.D. *Manual of Canine and Feline Haematology*
12 *and Transfusion Medicine*. 1ed. Gloucester: BSAVA, 2000. p. 67-77.
- 13 18. MCCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the
14 nemesis. *The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice*.
15 v.33, n.6, p.1295- 315, 2003.
- 16 19. MCMANUS, P.M.; CRAIG, L.E. Correlation between leucocytosis and
17 necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases
18 (1994- 1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.218,
19 n.8, p.1308-1313, 2001.
- 20 20. MILLER, S.A.; HOHENHAUS, A.E.; HALE, A.S. Case-control study of blood
21 type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic
22 anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.224, n.2,
23 p.232-235, 2004.
- 24 21. MODOLO, J.R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; et al. Investigação
25 soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de
26 Botucatu, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*
27 *Animal Science*. v.43, n.5, p.598-604, 2006.
- 28 22. MORLEY, P.; MATHES, M.; GUTH, A.; et al. Anti-Erythrocyte Antibodies
29 and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. *Journal of*
30 *Veterinary Internal Medicine*. v.22, p.886-892, 2008.
- 31 23. NOBLE, S.J.; ARMSTRONG, J. Bee sting envenomation resulting in secondary
32 immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. *Journal of the American*
33 *Veterinary Medical Association*. v.214, n.7, p.1026-1027, 1999.

- 1 24. NELSON, O.L. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic
2 disease in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v.41,
3 n.3, p.145-149, 2005.
- 4 25. NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Small Animal Internal Medicine*. 4thed. Mosby:
5 St. Louis Missouri, 2009. 1504 p.
- 6 26. NEER, T.M.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis
7 (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections
8 in: Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia infection. In:
9 GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3thed. Elsevier
10 Saunders: St. Louis Missouri, 2006. p.203-216.
- 11 27. PEREIRA, P.M. *Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste*
12 *da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esferócitos) e achados*
13 *clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em cães*. 2006. 92p.
14 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária
15 e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
16 Jaboticabal. 2006.
- 17 28. PIEK, C.J.; JUNIUS, G.; DEKKER, A.; et al. Idiopathic immune-mediated
18 hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs.
19 *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.22, p.366-373, 2008.
- 20 29. QUIGLEY, K.A.; CHELACK, B.J.; HAINES, D.M.; et al. Application of a
21 direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with
22 immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin
23 test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.13, n.4, p.297-300,
24 2001.
- 25 30. REIMER, M.E.; TROY, G.C.; WARNICK, L.D. Immune-mediated hemolytic
26 anemia: 70 cases (1988–1996). *Journal of the American Animal Hospital*
27 *Association*. v.35, p.384- 391, 1999.
- 28 31. RODRIGUES-LAINZ, A.; FRITZ, C.L.; MCKENNA, W.R. Animal and human
29 health risks associated with Africanized honeybees. *Journal of the American*
30 *Veterinary Medical Association*. v.215, n.12, p.1799-1804, 1999.
- 31 32. SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; TREADWELL, N.G.; MCCULLOUGH, S.M.; et
32 al. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic
33 anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v.37, n.3, p.220-
34 227, 2001.

- 1 33. SHAW, N.; HARRELL, K. IMHA: diagnosing and treating a complex disease.
2 *Veterinary Medicine*. Peer Reviewed, p.660-672, 2008.
- 3 34. STEWART, A.F.; FELDMAN, B.F. Immune-mediated hemolytic anemia. Part
4 I. An overview. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing*
5 *Veterinarian*. v.15, n.3, p.372-381, 1993.
- 6 35. STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Urinary system. In: STOCKHAM, S.L.;
7 SCOTT, M.A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 1thed.: Blackwell
8 Publishing Company: Iowa State Press, 2002. p.277-336.
- 9 36. THRALL, M A.; et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 1thed.
10 Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2004. 518 p.
- 11 37. WARDROP, K.J. The Coombs' test in veterinary medicine: past, present and
12 future. *Veterinary Clinical Pathology*. v.34, n.4, p.325-334, 2005.
- 13 38. WEINKLE, T.K.; CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F.; et al. Evaluation of
14 prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated
15 hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *Journal of the American*
16 *Veterinary Medical Association*. v.226, n.11, p.1869-1880, 2005.
- 17 39. WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical
18 hematology. *Veterinary Clinical Pathology*. v.31, n.2, p.72-82, 2002.
- 19 40. WILKERSON, M.J.; DAVIS, E.; SHUMAN, W.; et al. Isotype-specific
20 antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia.
21 *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.14, p.190-196, 2000.
- 22 41. WYSOKE, J.M.; BERG, P.B.V.; MARSHALL, C. Bee sting-induced
23 haemolysis, spherocytosis and neural dysfunction in three dogs. *Journal of the*
24 *South African Veterinary Association*. v.61, n.1, p.29-32, 1990.

25

- 1 Tabela 1. Porcentagens de positividade e negatividade nos testes de auto-aglutinação,
 2 Coomb's, citometria de fluxo e presença de esferócitos em relação à classificação da
 3 anemia nos 87 cães avaliados para AHIM. Botucatu, SP. 2011

	Classificação da Anemia	Resultados Positivos	Resultados Negativos
Auto- aglutinação	Regenerativa	17,2% (15/87)	32,2% (28/87)
	Arregenerativa	10,3% (09/87)	40,2% (35/87)
Teste de Coomb's	Regenerativa	20,7% (18/87)	29,9% (26/87)
	Arregenerativa	14,9% (13/87)	34,5% (30/87)
Citometria de Fluxo	Regenerativa	40,2% (35/87)	10,3% (09/87)
	Arregenerativa	28,7% (25/87)	20,7% (18/87)
Esferócitos	Regenerativa	6,9% (06/87)	43,7% (38/87)
	Arregenerativa	0	49,4% (43/87)

- 4
 5 Tabela 2. Comparação da sensibilidade e especificidade das técnicas de citometria de
 6 fluxo ao teste de Coomb's para o diagnóstico de AHIM em cães. Botucatu, SP. 2011

(%)	CF	Coomb's	Referência
Sensibilidade	100	58	Wilkerson et al. 2000
	92	53	Quigley et al. 2001
	84,6	68,4	Pereira 2006
	88	---	Morley et al 2008
Especificidade	87,5	100	Wilkerson et al. 2000
	100	100	Quigley et al. 2001
	65,5	100	Pereira 2006
	74,2	---	Morley et al. 2008

- 1 Tabela 3. Alterações clínico-laboratoriais de cães positivos e negativos para AHIM.
 2 Botucatu, SP. 2011

	Positivo para AHIM	Negativo para AHIM
Hepatomegalia	8,3% (05/60)	3,7% (01/27)
Esplenomegalia	20% (12/60)	22,2% (06/27)
Icterícia	28,3% (17/60)	33,3% (09/27)
Febre	28,3% (17/60)	48,1% (13/27)
Raça predisponente	8,3% (05/60)	11,1% (03/27)
Dispneia	6,7% (04/60)	3,7% (01/27)
Taquicardia	3,3% (02/60)	3,7% (01/27)
Esferócito	10% (06/60)	0
Auto-aglutinação		
Positiva	35% (21/60)	11,1% (03/27)
Hiperproteinemia	31,7% (19/60)	22,2% (06/27)
Hiperglobulinemia	66,7% (40/60)	70,4% (19/27)
Bilirrubinúria	44,6% (25/56)	50% (08/16)
Idade	Média 5,54 ±3,75 anos	Média 4,98± 4,37 anos
Sexo	Fêmea 30	Fêmea 12
	Macho 30	Macho 15

3

4

1 Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n=60) e negativos (n=27)
 2 para AHIM em relação à hematimetria, contagem de reticulócitos e plaquetas. Botucatu,
 3 SP. 2011

	Hemácias (/microlitro)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	RDW	Reticulócitos (/microlitro)	Plaquetas (/microlitro)
POS.	1,83 ±0,72	4,9 ±1,39	15,44 ±3,91	96,66 ±51,38	31,77 ±4,43	21,92 ±12,41	146.829 ±156.402	111.072 ±134.518
NEG.	2,09 ±0,82	4,99 ±1,73	15,89 ±5,08	79,69 ±14,39	31,33 ±3,53	19,52 ±10,80	66.511 ±111.016	138.994 ±150.018

4

5 Tabela 5. Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n=60) e negativos (n=27)
 6 para AHIM em relação à leucometria total e contagem diferencial de leucócitos
 7 (/microlitro). Botucatu, SP. 2011

	Leucócitos Totais (x10 ³)	Metamiel.	Bastão	Neutrófilo	Linfócito	Eosinófilo	Monócito	Metarrub.
POS.	14,49 ±12,27	33,1 ±105,1	223,9 ±435,1	12.424,9 ±10.231,1	1.219,3 ±1.282,3	157,4 ±270,7	1.108,2 ±1.530,9	11,9 ±22,3
NEG.	11,23 ±13,1	11,1 ±52,0	63,1 ±185,5	11.769,4 ±11.897,2	914,0 ±858,8	196,8 ±221,9	970,2 ±1.456,9	5,27 ±21,9

8 Metamiel.: metamielócito; Metarrub.: metarrubricito

9

1 Tabela 6. Grau de proteinúria dos cães com AHIM primária, secundária e cães
2 negativos para AHIM. Botucatu, SP. 2011

	Proteinúria Negativa	Proteinúria (< 30 mg/dL) Traços	Proteinúria (30 a 500 mg/dL) 1+ a 3+	Cilindrúria
				Hialino 1/13
AHIM 1 ^a	1/13 (7,7%)	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	Granuloso 2/13 (23,1%)
				Hialino 6/43
AHIM 2 ^a	0/43 (0%)	10/43 (23,2%)	32/43 (74,4%)	Granuloso 9/43 (34,9%)
				Hialino 3/16
NEG	0/16 (0%)	5/16 (31,2%)	11/16 (68,7%)	Granuloso 2/16 (31,2%)

3

4 Tabela 7. Médias e desvios-padrão das variáveis utilizadas para avaliação da função
5 renal de cães positivos (n=56) e negativos (n=16) para AHIM

	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Azotemia	Relação P: C Urínárias	Aumento Relação P: C	Densidade Urínária
POS.	74,8 ±65,5	1,15 ±0,83	21,4%	1,33 ±1,02	51,8%	1,028 ±0,015
NEG.	64,9 ±44,2	1,14 ±0,64	25,0%	0,75 ±0,42	18,7%	1,022 ±0,009
Valor de p	0,597	0,601	---	0,043	---	0,202

6 Relação P: C – Relação proteína: creatinina urinárias

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS E DO RISCO TROMBOEMBÓLICO EM CÃES COM AHIM

Lívia Fagundes Moraes¹, Regina Kiomi Takahira², Marjorie de Assis Golim³ e
Márcia Sueli Baggio⁴.

¹Mestranda e ²Profª Adj da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
(FMVZ) e ³Técnica do serviço de citometria de fluxo da Faculdade de Medicina
(FM), Universidade Estadual Paulista – Unesp Botucatu Brasil e ⁴Técnica do
setor de coagulação do Hospital das clínicas da Universidade de São Paulo -
USP Brasil

Autor para correspondência: Distrito de Rubião Jr s/n Botucatu SP Cep:18618-
970 caixa postal: 560. Depto de Clínica Veterinária – Laboratório Clínico e-mail:
liviafm@gmail.com

Resumo

Introdução: A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais
comum dentre as anemias hemolíticas e tem sido associada a estados de
hipercoagulabilidade. O tromboembolismo pulmonar tem sido atribuído como
causa mais freqüente de óbito nas AHIM.

Hipóteses: Cães com AHIM apresentam risco tromboembólico.

Objetivos: Correlacionar as possíveis alterações hemostáticas e o risco
tromboembólico nas AHIM e nas anemias por outras etiologias.

Animais e métodos: 76 cães anêmicos foram submetidos ao teste de
citometria de fluxo (CF) e avaliados quanto ao perfil hemostático (contagem de
plaquetas, TP, TTPA, TT, AT, PDF e Dímeros D).

Resultados: 59 cães foram positivos para AHIM. Não houve predomínio de
uma classe de Ig (IgG ou IgM) envolvida nas AHIM. 74,6% casos de AHIM

1 foram atribuídos às doenças infecciosas, sendo em sua maioria associados à
2 *Ehrlichia* sp. 72,1% apresentaram trombocitopenia. Houve diferença estatística
3 dos cães anêmicos positivos e negativos para AHIM para o grupo controle,
4 exceto para o TT. 25 cães positivos e sete negativos apresentaram estado
5 tromboembólico. A especificidade de PDF foi menor quando comparada com
6 estudos anteriores.

7 **Conclusões e importância clínica:** A escolha da classe de Ig não interfere no
8 diagnóstico de AHIM. A anemia está associada a alterações hemostáticas e ao
9 risco tromboembólico, no entanto a natureza imuno-mediada não é o fator
10 determinante para esta condição. Em parte, estas alterações podem ser
11 atribuídas ao quadro infeccioso observado em ambos os grupos (positivos e
12 negativos para AHIM).

13 **Palavras chave:** Anemia hemolítica imuno-mediada, trombose, hemostasia,
14 *Ehrlichia* sp., cães.

15

16 Lista de abreviações: AHIM – Anemia hemolítica imuno-mediada

17 AT - Antitrombina

18 AAT – Atividade de antitrombina

19 C3 – Componente C3 do sistema complemento

20 CEEA – Câmara de ética para experimentação animal

21 CF – Citometria de fluxo

22 CID – Coagulação intravascular disseminada

23 CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

24 DP – Desvio padrão

25 FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter

- 1 FSC - Forward Scatter
- 2 FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- 3 Ig – Imunoglobulina
- 4 IgG – Imunoglobulina G
- 5 IgM – Imunoglobulina M
- 6 M – Média
- 7 NO – Óxido nítrico
- 8 PBS – Phosphate buffered saline - Tampão fosfato-salino
- 9 PCR – Reação em cadeia da polimerase
- 10 PDF – Produto da degradação da fibrina
- 11 PDW - Platelet distribution width
- 12 RDW - Red cell distribution width
- 13 SSC - Side Scatter
- 14 TAD – Teste de antiglobulina direta (Coomb's)
- 15 TP – tempo de protrombina
- 16 TTPA – tempo de tromboplastina parcial ativada
- 17 TT – tempo de trombina
- 18 VCM – Volume corpuscular médio
- 19 VPM – Volume plaquetário médio
- 20 Local realização: FMVZ Unesp Botucatu Brasil
- 21 Câmara de ética: Protocolo CEEA 165/2008
- 22 Agradecimentos: FAPESP auxílio à pesquisa nº 2008/10427-3
- 23

1 **Introdução**

2 A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) é a causa mais comum
3 dentre as anemias hemolíticas e a doença imuno-mediada de maior
4 prevalência em cães ^{1,2,3,4}. A AHIM é caracterizada pela destruição direta ou
5 fagocitose de hemácias opsonizadas por imunoglobulinas como IgG ou IgM
6 e/ou complemento. Os anticorpos podem ser direcionados às hemácias
7 normais (AHIM primária ou idiopática) ou, ainda, às hemácias antigenicamente
8 alteradas pela ação de medicamentos, neoplasias ou doenças infecciosas
9 (leptospirose, babesiose, erliquiose canina), sendo esta última conhecida como
10 AHIM secundária ^{1,3,5}.

11 Há uma discordância em relação à prevalência das AHIM primárias e
12 secundárias em cães. Tal discordância pode ser decorrente de uma maior
13 prevalência real da AHIM secundária ou, então, da falta da realização de uma
14 investigação diagnóstica mais detalhada em busca da causa base para a
15 anemia em questão, pois o diagnóstico de AHIM primária é feito por exclusão
16 ^{6,7,8}. Um estudo realizado no interior de São Paulo evidenciou uma maior
17 prevalência de AHIM secundária, discordando de resultados internacionais
18 anteriores que afirmam a prevalência de AHIM primária ⁷.

19 O tromboembolismo é a complicação mais comum nas AHIM e
20 aproximadamente 50% dos cães apresentam estados de hipercoagulabilidade
21 no momento do diagnóstico ^{6,9,10,11}. O tromboembolismo pulmonar tem sido
22 atribuído como causa mais frequente de óbito em cães com AHIM, sendo
23 encontrado em 80% dos casos em avaliação de necropsia ¹¹. Um segundo
24 estudo encontrou evidências de tromboembolismo em todas as necropsias
25 realizadas em cães com AHIM ¹².

1 Apesar da freqüência com que ocorrem os distúrbios hemostáticos em
2 cães com AHIM e do fato de os eventos tromboembólicos serem frequentes
3 causas de letalidade, o mecanismo para esta condição é desconhecido.
4 Algumas hipóteses são levantadas para este estado de hipercoagulabilidade
5 como o aumento da concentração de fatores pró-coagulantes, a diminuição da
6 concentração de fatores anticoagulantes e fibrinolíticos, a presença de
7 coagulação intravascular disseminada (CID), aumento da atividade plaquetária
8 e a presença de anticorpos anti-fosfolipídeos ^{6,8,12}.

9 Os sinais clínicos capazes de evidenciar um estado trombótico, na
10 maioria das vezes, são inespecíficos ou ausentes. No entanto, a presença de
11 fatores de risco como perda de proteína por nefropatia ou doença
12 gastrointestinal, neoplasia, sepse, pancreatite, doenças imuno-mediadas ou
13 vasculares e aumento dos níveis de corticóides consolida a suspeita de um
14 possível estado trombótico, necessitando de uma investigação mais criteriosa
15 ¹³.

16 Diversos autores relatam a incidência de CID em pacientes com AHIM
17 entre 12% a 45% ^{6,8,9,11}. A trombocitopenia intensa está associada ao alto risco
18 de trombose em cães com AHIM, sendo que 90% apresentam suspeita de CID
19 ¹¹.

20 Nos estudos de Scott-Moncrieff et al. (2001) e Carr et al. (2002) a
21 coagulação intravascular disseminada (CID) foi diagnosticada em 45% e 32%
22 dos casos, respectivamente, após uma avaliação completa para hemostasia,
23 sendo que o primeiro estudo incluiu apenas os casos de AHIM primária. O
24 diagnóstico confirmatório de CID pode ser difícil nas AHIM, pois grande parte

1 das alterações hemostáticas também é observada nos animais apenas com
2 tromboembolismo pulmonar ⁸.

3 Neste trabalho objetivou-se buscar uma correlação das possíveis
4 alterações hemostáticas e o risco tromboembólico nas anemias imuno-
5 mediadas regenerativas ou arregenerativas nos casos de AHIM e nas anemias
6 por outras etiologias, no município de Botucatu, SP.

7

8 **Material e Métodos**

9 Foram selecionados 76 cães atendendo aos seguintes critérios:
10 hematócrito inferior a 20%, configurando um quadro de anemia regenerativa ou
11 arregenerativa, sem históricos prévios de tratamento com corticóides ou
12 transfusão sanguínea recente, além de apresentarem ao menos um sinal
13 clínico (hepato ou esplenomegalia, icterícia, dispnéia, taquicardia, febre) ou
14 laboratorial (esferócitos, auto-aglutinação, hiperproteinemia, hiperglobulinemia,
15 bilirrrubinúria) comumente associado à AHIM, ou ainda possuir pré-disposição
16 racial (Cocker Spaniel, Old English Sheepdog, Doberman, Pinscher miniatura,
17 Collie e Setter Irlandês). Foram excluídos os animais com outras causas
18 conhecidas de anemia, como doença renal crônica, aplasia medular induzida
19 por drogas como estrógeno ou agentes quimioterápicos e casos de verminose.

20 Os animais foram submetidos ao teste de citometria de fluxo (CF) para o
21 diagnóstico de AHIM e avaliados quanto ao perfil hemostático (tempo de
22 protrombina - TP^A, tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPA^A, tempo de
23 trombina - TT^B, antitrombina - AT^B, produto da degradação da fibrina - PDF^B e
24 Dímeros D^B) de acordo com as normas do fabricante, contagem de plaquetas,
25 VPM, PDW (Hemascreen 18 - Ebram Produtos Laboratoriais Ltda, SP),

1 pesquisa de hematozoários em sangue periférico, além dos testes para
2 *Ehrlichia* sp e leptospirose (apenas para os positivos para AHIM), pela técnica
3 de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorologia, respectivamente. Para
4 a avaliação do prolongamento de TP, TTPA e TT e diminuição da atividade de
5 AT adotou-se um valor de corte com base na média dos valores encontrados
6 em cães saudáveis (n=19) + 2 DP (desvio padrão). Para o estudo do perfil
7 hemostático foi formado um grupo controle composto por 26 cães saudáveis
8 selecionados com base nos exames físico e laboratoriais, provenientes do canil
9 do Hospital Veterinário da FMVZ UNESP- Botucatu. Todos os cães anêmicos
10 foram obtidos a partir da casuística do atendimento no Hospital Veterinário da
11 FMVZ Unesp Botucatu SP.

12 Para se constatar um estado tromboembólico os cães deveriam
13 apresentar ao menos três das seguintes alterações: trombocitopenia,
14 prolongamento do TP, TTPA ou TT, diminuição da AAT, aumento das
15 concentrações de PDF e dímeros D. Para a avaliação da hemostasia terciária
16 foram considerados animais realmente positivos os que apresentaram aumento
17 nas concentrações de PDF e Dímeros D.

18 A CF foi realizada no equipamento FacScalibur (Becton Dickinson),
19 utilizando-se o software CELLQuest. 100µL do concentrado de hemácias foram
20 diluídos em 4,9mL de solução PBS. Esta solução foi centrifugada, em seguida
21 foi removido o sobrenadante e acrescentou-se 4,9mL de solução PBS para
22 uma nova lavagem e subsequente centrifugação. Este procedimento foi
23 realizado por mais duas vezes, obtendo uma solução de hemácias a 2%. Para
24 utilização na técnica de CF, obteve-se uma solução de hemácias a 1%. Foram
25 utilizados anticorpos policlonais monoespecíficos caprinos^C anti-IgG (anti-IgG

1 de cão marcado com fluoresceína – FITC) e anti-IgM (anti-IgM de cão marcado
2 com FITC). Foram utilizados três tubos, sendo o primeiro tubo, um tubo
3 controle contendo apenas 100µL da solução de hemácias a 1%, ao segundo e
4 terceiro tubos foi adicionado 1µL (1,0mg/mL) de antiglobulina policlonal caprina
5 anti-IgG ou anti-IgM de cão, respectivamente. Os tubos foram incubados por 20
6 minutos em ambiente escuro em temperatura ambiente. As hemácias foram
7 novamente lavadas com 1,0mL de PBS. A leitura foi realizada imediatamente
8 após a preparação da amostra.

9 A população de hemácias foi selecionada com base nos parâmetros
10 FSC (forward scatter – tamanho) e SSC (side scatter – granulosidade), e a
11 presença de IgG e IgM na superfície das células foi avaliada pela intensidade
12 de fluorescência (FL1). Foram adquiridos 20.000 eventos para confirmação do
13 diagnóstico de AHIM e classificação da classe de imunoglobulinas (IgG ou IgM)
14 envolvidas.

15 A seleção da população de hemácias foi realizada por meio de “gate”,
16 desenhado com base nos parâmetros FSC e SSC, conforme recomendado na
17 literatura ^{2,14,15}. A utilização de “gate” é importante para excluir qualquer sinal
18 oriundo de contaminação por plaquetas ou debris celulares ¹⁴. Adotou-se um
19 valor de corte para positividade com base na média das porcentagens de
20 células marcadas dos cães controles + 2 DP, baseado em estudos anteriores
21 ^{7,14}; sendo consideradas positivas para AHIM amostras com fluorescência para
22 IgG maior que 16,72% e para IgM maior que 9,56%.

23 O hemograma foi realizado no contador automático de células
24 HEMASCREEN 18 (Ebran) e incluiu os seguintes parâmetros: eritrograma
25 (hematócrito, contagem de hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM, RDW),

1 leucograma (leucócitos totais, valores relativos e absolutos), contagem de
2 plaquetas, VPM e PDW.

3 Os testes de PCR, sorologia e pesquisa de hematozoários em esfregaço
4 sanguíneo foram utilizados para classificação das AHIM em primária ou
5 secundária. As AHIM primárias foram confirmadas nos casos negativos para
6 estes testes e sem histórico de administração de medicamentos ou vacinas em
7 um período de quatro semanas, neoplasia ou outras doenças infecciosas.

8 Este estudo foi aprovado pela câmara de ética em experimentação
9 animal (CEEAA) sob protocolo de número 165/2008.

10 Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para a
11 avaliação da incidência das alterações hemostáticas, bem como da incidência
12 da classe de imunoglobulina envolvida. Os resultados foram agrupados de
13 acordo com os resultados encontrados na CF e quanto ao tipo de AHIM
14 (primária ou secundária). A comparação das médias das variáveis entre os
15 animais dos referidos grupos (positivos ou negativos para AHIM) foi analisada
16 pelo teste t ou Mann-Whitney, de acordo com o tipo de distribuição da variável,
17 no programa Sigmastat 3.1. Para as análises do perfil hemostático foi utilizado
18 o teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* Dunn, no programa BioEstat 5.0. Todas
19 as análises foram avaliadas ao nível de 5% de significância.

20

21 **Resultados**

22 Dos 76 cães avaliados, 59 foram positivos para AHIM. Não houve
23 predomínio de uma classe de Ig envolvida nas AHIM, pois 57 cães foram
24 positivos tanto para IgG quanto para IgM. Apenas um cão foi positivo somente
25 para IgM (27,43% de fluorescência) e um outro positivo somente para IgG

1 (34,63% de fluorescência), sendo que nestes casos a AHIM foi detectada
2 apenas pela técnica de CF.

3 As alterações clínico-laboratoriais mais comuns nos cães positivos
4 incluíram esplenomegalia, icterícia, febre, auto-aglutinação, hiperglobulinemia e
5 bilirrubinúria. A maioria dos cães não possuía raça definida e, dentro das raças
6 predispostas à AHIM, quatro eram Cocker Spaniel e um Collie, sendo três
7 casos de AHIM primária em cães da raça Cocker Spaniel.

8 74,6% (44/59) dos casos de AHIM foram secundários a doenças
9 infecciosas, em sua maioria associadas à *Ehrlichia* sp (88,6%). Também foram
10 diagnosticados casos associados à leptospirose, cinomose, babesiose e
11 neoplasia. No grupo dos animais negativos 64,7% (11/17) foram positivos para
12 *Ehrlichia* sp. Dentre as AHIM primárias (15 cães – 24,6%, sendo oito fêmeas)
13 12 cães apresentaram anemia regenerativa e 10 auto-aglutinação.

14 As AHIM se caracterizaram por anemia regenerativa, macrocítica,
15 hipocrômica e reticulocitose e, neste estudo, o grau de regeneração foi mais
16 intenso quando comparado com outras causas de anemias em cães, apesar da
17 intensidade da anemia não apresentar diferença estatística. 57,6% (34/59) dos
18 cães positivos apresentaram anemia regenerativa. Para as variáveis do
19 hemograma, os cães com AHIM apresentaram valores de metarrubríctos e
20 contagem de reticulócitos significativamente maiores ($p < 0,05$) que os animais
21 anêmicos negativos para AHIM. 10,2% dos cães com AHIM apresentaram
22 esferocitose, 30,5% leucocitose e 39% neutrofilia. A maioria dos cães negativos
23 (70,6%) apresentou uma anemia arregenerativa.

24 Os valores médios de plaquetas foram inferiores aos encontrados nas
25 anemias por outras etiologias, apesar da ausência de diferença estatística

entre os grupos de cães anêmicos. 72,9% dos cães positivos apresentaram trombocitopenia. A porcentagem de trombocitopenia no grupo dos cães negativos foi semelhante (64,7%). Houve uma diferença estatística para VPM, sendo que os cães positivos apresentaram plaquetas menores (media $11,88 \pm 2,93$; $p=0,034$) quando comparados com os cães negativos (media $13,78 \pm 2,9$).

As variáveis TTPA, AT e contagem de plaquetas revelaram-se significativamente diferentes ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, tanto para os cães positivos quanto para os negativos ($p<0,0001$). Na comparação entre os grupos negativo e positivo para AHIM não houve alterações significativas (Tabela 1).

25 cães positivos para AHIM apresentaram diminuição da atividade de AT (AAT), sendo que dois apresentaram AAT $<30\%$ e sete AAT $<60\%$. Dentre os cães negativos, oito cães apresentaram diminuição da AAT, sendo que três apresentaram AAT $<60\%$. (Tabela 2)

Para o TP houve diferença estatística apenas entre os cães negativos e saudáveis ($p=0,0194$). Não foram constatadas alterações significativas para o TT (Tabela 1).

No grupo dos cães positivos 46 cães apresentaram prolongamento do TTPA, nove do TP e três do TT (Tabela 2). 46 cães apresentaram aumento nas concentrações de PDF, sendo 19 cães com concentrações entre $5-20\mu\text{g/mL}$, 10 entre $20-40\mu\text{g/mL}$ e 17 com concentrações $\geq 40\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). 18 animais obtiveram aglutinação em látex positiva para Dímeros D (quatro com concentrações entre $250-500\mu\text{g/mL}$; cinco entre $500-1000\mu\text{g/mL}$, quatro entre

1 1000-2000µg/mL, dois entre 2000-4000µg/mL e três com concentrações
2 >4000µg/mL) (Tabela 4).

3 Dentre os cães negativos, 13 apresentaram prolongamento do TTPA,
4 três do TP e três do TT (Tabela 2). 14 cães apresentaram aumento nas
5 concentrações de PDF, sendo cinco com concentrações entre 5-20µg/mL, três
6 entre 20-40µg/mL e seis com concentrações ≥40µg/mL(Tabela 3). Cinco cães
7 obtiveram aglutinação em látex positiva para Dímeros D (dois com
8 concentrações entre 250-500µg/mL; um entre 500-1000µg/mL e dois com
9 concentrações >4000µg/mL) (Tabela 4).

10 Na avaliação do estado tromboembólico, 25 cães positivos (42,3%) e
11 sete cães negativos (41,2%) atenderam aos critérios, apresentando as
12 alterações laboratoriais compatíveis com o quadro.

13

14 **Discussão**

15 Neste estudo os cães anêmicos positivos e negativos para AHIM
16 apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle para
17 contagem de plaquetas, TP, TTPA, AT, PDF e Dímeros D. A maioria dos casos
18 de anemia foram associados à *Ehrlichia* sp. O risco tromboembólico foi
19 detectado tanto nos animais positivos quanto negativos para AHIM,
20 demonstrando a importância da avaliação hemostática especialmente em áreas
21 endêmicas para esta doença.

22 As alterações hematológicas e clínicas para cães com AHIM foram
23 semelhantes às relatadas em outros estudos ^{3,9,11,16,17,18}, incluindo anemia
24 regenerativa, macrocítica, hipocrômica e reticulocitose com um grau de
25 regeneração mais intenso quando comparado com outras causas de anemias

1 (grupo negativo), além de icterícia, febre, auto-aglutinação, hiperglobulinemia e
2 bilirrubinúria. 74,6% dos casos de AHIM foram atribuídos às doenças
3 infecciosas, a maioria associados à *Ehrlichia* sp. Em relação aos cães
4 negativos a maioria das anemias foram arregenerativas e 64,7% foram
5 positivos para *Ehrlichia* sp.

6 As alterações hemostáticas associadas às AHIM primárias incluem
7 trombocitopenia, diminuição da concentração do fibrinogênio e AT,
8 prolongamento do TP, TTPA, TC e TT e aumento dos PDF e Dímeros-D ^{6,19}.
9 Não existem relatos na literatura que relacionem as alterações hemostáticas
10 com as AHIM predominantemente secundárias. Portanto, este estudo alerta
11 para estas mesmas alterações nas AHIM secundárias.

12 A trombocitopenia é um achado laboratorial comum nas AHIM,
13 decorrentes da vasculite e da destruição imuno-mediada, além do consumo na
14 CID ⁶. Os valores médios de plaquetas foram inferiores aos encontrados nas
15 anemias por outras etiologias. A porcentagem de trombocitopenia foi
16 semelhante entre os grupos anêmicos.

17 A trombocitopenia intensa está associada ao alto risco de trombose em
18 cães com AHIM ¹¹. A porcentagem de cães com AHIM e trombocitopenia
19 associadas foi semelhante a estudos anteriores ^{6,11}, no entanto foi observado
20 um número maior de casos (54,2%) com uma contagem de plaquetas inferior a
21 50.000/ μ L, sendo esta associada ao aumento da mortalidade e risco de
22 trombose ^{6,11}.

23 As diferenças estatísticas observadas nos animais anêmicos em relação
24 ao grupo controle para contagem de plaquetas, TP, TTPA, AT, PDF e Dímeros
25 D podem ser atribuídas à causa base predominante para a anemia em

1 questão, ou seja, ao quadro infeccioso observado em ambos os grupos
2 (*Ehrlichia* sp). O quadro imuno-mediado parece não ser o fator determinante
3 para estas alterações, já que não foram observadas diferenças estatísticas
4 entre os grupos positivos e negativos para AHIM. Portanto, as anemias
5 associadas à erliquiose devem ser consideradas como fator de risco ou
6 incluídas no quadro de alterações clínicas relacionadas às possíveis alterações
7 hemostáticas.

8 Estudos anteriores apontam apenas alterações na função plaquetária de
9 cães com erliquiose ^{20,21,22,23}, sendo este o primeiro relato de alterações
10 hemostáticas em cães com erliquiose sem envolvimento imuno-mediado.

11 A diminuição da atividade de antitrombina (AAT) tem sido relacionada ao
12 risco tromboembólico e prognóstico desfavorável. Esta diminuição está
13 relacionada com um aumento do consumo, diminuição da produção ou perda
14 (renal, gastrointestinal ou sangramentos). Para cães, acredita-se que há um
15 risco iminente quando a AAT é <30% e um risco elevado com AAT <60%. Nos
16 casos de AHIM, a diminuição da AAT ocorre pelo aumento no consumo nos
17 estados de hipercoagulabilidade ²⁴, reafirmada neste estudo. Não foi possível
18 afirmar uma relação de perda renal com os casos de diminuição da AAT, pois a
19 mesma não foi avaliada na urina. A perda de AT pela urina também contribui
20 para o estado de hipercoagulabilidade ²⁵.

21 Independentemente da causa, a hemólise é uma importante condição
22 pró-coagulante. A liberação do estroma das hemácias durante a hemólise pode
23 ser o desencadeador da coagulação intravascular disseminada (CID). A
24 alteração das membranas dos eritrócitos e a presença de micro-partículas
25 aumenta a conversão de protrombina em trombina e ativa a via intrínseca da

1 cascata da coagulação, respectivamente. Fatores teciduais são produzidos e
2 liberados pelos leucócitos quando as hemácias estão sensibilizadas por auto-
3 anticorpos, sendo estes fatores de grande importância na CID. A presença de
4 hemoglobina e heme, como produto da destruição dos eritrócitos durante a
5 hemólise, estimula a expressão de moléculas de adesão pelas células
6 endoteliais ocasionando a obstrução dos vasos, hipóxia e morte tecidual. A
7 presença de hemoglobina livre também predispõe a estados de
8 hipercoagulabilidade atribuída à ligação com o óxido nítrico (NO) e ao aumento
9 da agregação plaquetária. O NO é vital para a vasodilatação e atua como um
10 potente inibidor da agregação plaquetária ^{11,26}.

11 A associação dos testes de hemostasia utilizados neste estudo (TTPA,
12 PDF, Dímeros D e contagem de plaquetas) confere maior confiabilidade ao
13 diagnóstico de um estado tromboembólico por determinar uma maior acurácia,
14 sensibilidade e especificidade ²⁷. Bateman et al (1998) mencionam os testes de
15 TP, TTPA, AT e contagem de plaquetas como sendo os mais indicados para o
16 diagnóstico de CID, entretanto não incluindo a avaliação de PDF e Dímeros D.

17 Dentre os animais positivos para PDF 28 cães com AHIM (60,9%) e
18 nove anêmicos negativos (62,3%) apresentaram resultados negativos para
19 Dímeros D. A possibilidade de resultados falsos positivos para PDF deve ser
20 considerada. A especificidade de PDF foi bem menor quando comparada com
21 estudos anteriores que relatam a especificidade do teste entre 72-90%,
22 semelhante para Dímeros D, mas este último possui maior sensibilidade ^{29,30,31}.
23 Os aumentos nas concentrações de PDF e Dímeros D associados confere
24 maior especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de um estado
25 tromboembólico ^{27,32}. Outros estudos demonstram o uso promissor de Dímeros

1 D para triagem de casos de CID e doença tromboembólica antes mesmo de
2 evidências clínicas^{6,32,33}. Uma concentração negativa para Dímeros D, de fato,
3 pode excluir uma suspeita de tromboembolismo¹³.

4 O risco tromboembólico semelhante evidenciado nos dois grupos de
5 cães anêmicos não exclui a relação do envolvimento imuno-mediado, mas
6 atenta para uma possibilidade do tromboembolismo em cães anêmicos com
7 *Ehrlichia* sp.

8 Desta forma, cães anêmicos que apresentam sinais clínicos associados
9 ao risco tromboembólico devem ser avaliados para tal complicação, hoje pouco
10 investigada na rotina clínica.

11

12 **Notas de rodapé**

13 A. Helena Laboratories

14 B. Diagnostica Stago, Inc.

15 C. Bethyl laboratories, Montgomery, TX, USA

16

17 **Referências**

18 1. MACKIN A. Immune-mediated haemolytic anaemia. In: DAY MJ,
19 MACKIN A, LITTLEWOOD JD. Manual of Canine and Feline
20 Haematology and Transfusion Medicine. 1thed Gloucester: BSAVA;
21 2000:67-77.

22 2. QUIGLEY KA, CHELACK BJ, HAINES DM, et al. Application of a direct
23 flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with
24 immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct
25 antiglobulin test. J Vet Diagn Invest 2001;13:297-300.

- 1 3. MCCULLOUGH S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding
2 the nemesis. Vet Clin Noth Am Small Anim Pract 2003;33:1295-1315.
- 3 4. GIGER U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In:
4 ETTINGER SJ, FELDMAN EC, eds. Textbook of Veterinary Internal
5 Medicine. 6thed St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2005:1886-1907.
- 6 5. HONECKMAN AL, KNAPP DW, REAGAN WJ. Diagnosis of canine
7 immune-mediated hematologic disease. Comp Cont Educ Pract Vet
8 1996;18:113-124.
- 9 6. SCOTT-MONCRIEFF JC, TREADWELL NG, MCCULLOUGH SM, et al.
10 Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated
11 hemolytic anemia. J Am Anim Hosp Assoc 2001;37:220-227.
- 12 7. PEREIRA PM. Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo,
13 teste da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esferócitos)
14 e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em
15 cães. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
16 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
17 Jaboticabal SP Brasil 2006;92.
- 18 8. BALCH A, MACKIN A. Canine immune-mediated hemolytic anemia:
19 treatment and prognosis. Comp Cont Educ Pract Vet 2007;29:230-238.
- 20 9. KLAG AR, GIGER U, SHOFER FS. Idiopathic immune-mediated
21 hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986- 1990). J Am Vet Med Assoc
22 1993;202:783-788.
- 23 10. MCMANUS PM, CRAIG LE. Correlation between leucocytosis and
24 necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34
25 cases (1994- 1999). J Am Vet Med Assoc 2001;218:1308-1313.

- 1 11.CARR AP, PANCIERA DL, KIDD L. Prognostic factors for mortality and
2 thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a
3 retrospective study of 72 dogs. J Vet Intern Med 2002;16:504-509.
- 4 12.WEINKLE TK, CENTER SA, RANDOLPH JF, et al. Evaluation of
5 prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-
6 mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). J Am Vet
7 Med Assoc 2005;226:1869-1880.
- 8 13.NELSON OL. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic
9 disease in the dog. J Am Anim Hosp Assoc 2005;41:145-149.
- 10 14.WILKERSON MJ, DAVIS E, SHUMAN W, et al. Isotype-specific
11 antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia.
12 J Vet Intern Med 2000;14:190-196.
- 13 15.KUCINSKIENE G, SCHUBERTH H, LEIBOLD W, et al. Flow cytometric
14 evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. Vet J
15 2005;169:303-307.
- 16 16.REIMER ME, TROY GC, WARNICK LD. Immune-mediated hemolytic
17 anemia: 70 cases (1988–1996). J Am Anim Hosp Assoc 1999;35:384-
18 391.
- 19 17.GOGGS R, BOAG AK, CHAN DL. Concurrent immune-mediated
20 haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. Vet Rec
21 2008;163:323-327.
- 22 18.PIEK CJ, JUNIUS G, DEKKER A, et al. Idiopathic immune-mediated
23 hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149
24 dogs. J Vet Intern Med 2008;22:366-373.

- 1 19.FELDMAN BF, MADEWELL BR, O'NEILL S. Disseminated intravascular
2 coagulation: Antithrombin, plasminogen and coagulation abnormalities in
3 41 dogs. J Am Vet Med Assoc 1999;179:151-154.
- 4 20.GAUNT SD, BAKER DC, BABIN SS. Platelet aggregation studies in dogs
5 with acute Ehrlichia platys infection. Am J Vet Res 1990;51:290-293.
- 6 21.HARRUS S, WANER T, ELDOR A, et al. Platelet dysfunction associated
7 with experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Rec 1996;139:290-293.
- 8 22.BRANDÃO LP, HASEGAWA MY, HAGIWARA MK, et al. Platelet
9 aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. Vet Clin
10 Pathol 2006;35:78-81.
- 11 23.CORTESE L, PELAGALLI A, PIANTEDOSI D, et al. Platelet Aggregation
12 and Haemostatic Response in Dogs Naturally Co-infected by *Leishmania*
13 *infantum* and *Ehrlichia canis*. J Vet Med A, Physiol Pathol Clin Med
14 2006;53:546–548.
- 15 24.KUZI S, SEGEV G, HARUVI E, et al. Plasma antithrombin activity as a
16 diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149
17 dogs. J Vet Intern Med 2010;24:587-596.
- 18 25.NELSON RW, COUTO CG. Small Animal Internal Medicine. 4thed. St.
19 Louis, MO: Mosby, 2009: 1504p.
- 20 26.CAPPELLINI MD. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic
21 anemias. Hematol 2007;1:74-78.
- 22 27.MACHIDA T, KOKUBU H, MATSUDA K, et al. Clinical use of D-dimer
23 measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation
24 in dogs. J Vet Med Sci 2010;72:1301-1306.

- 1 28. BATEMAN SW, MATHEWS KA, ABRAMS-OGG ACG. Disseminated
2 intravascular coagulation in dogs: review of the literature. J Vet Emerg
3 Critic Care 1998;8:29-45.
- 4 29. CALDIN M, FULANELLO T, LUBAS G. Sensitivity and specificity of
5 citrated plasma FDPs and D-dimer in the diagnosis of disseminated
6 intravascular coagulation (DIC) in dogs. J Vet Intern Med
7 1998;12:236;Abstract.
- 8 30. STOKOL T, BLUE JT, FRENCH TW. Idiopathic pure red cell aplasia and
9 non-regenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1998-
10 1999). J Am Vet Med Assoc 2000;216:1429-1436.
- 11 31. BOISVERT AM, SWENSON CL, HAINES CJ. Serum and Plasma Latex
12 Agglutination Tests for Detection of Fibrin(ogen) Degradation Products in
13 Clinically Ill Dogs. Vet Clin Pathol 2001;30:133-136.
- 14 32. NELSON OL, ANDREASEN C. The utility of plasma D-dimer to identify
15 thromboembolic disease in dogs. J Vet Intern Med 2003;17:830-834.
- 16 33. GRIFFIN A, CALLAN MB, SHOFR FS, et al. Evaluation of a canine D-
17 dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with
18 disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and
19 hemorrhage. Am J Vet Res 2003;64:1562-1569.
- 20

- 1 Tabela 1 Médias, desvios- padrão e valor de p para TP, TTPA, TT, AT e
 2 contagem de plaquetas dos cães positivos para AHIM, negativos e cães
 3 saudáveis.

	Positivo para AHIM	Negativo para AHIM	Cães Saudáveis	Valor de p
TP (s)	8,59±4,68ab	8,88±4,40b	6,73±1,28a	p=0,0194
TTPA (s)	20,10±13,95a	18,64±7,47a	11,81±0,75b	p=<0,000 1
TT (s)	14,66±2,19	15,70±3,64	15,54±1,33	p=0,8899
AT (%)	97,96±35,04a	96,88±35,37a	133,08±20,81b	p=<0,000 1
Plaqueta s (/ μ L)	111.072±134.518 a	138.994±150.018, 6a	323.788±94.795,7 5b	p=<0,001

- 4 Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem
 5 estatisticamente

- 6
 7 Tabela 2 Prolongamentos de TP, TTPA e TT e diminuição da atividade de AT
 8 em positivos e negativos para AHIM

	TP	TTPA	TT	AT
POS.	09/59 (15,2%)	46/59 (77,9%)	03/59 (5,1%)	25/59 (42,4%)
NEG.	03/17 (17,6%)	13/17 (76,5%)	03/17 (17,6%)	08/17 (47%)

9

10

1 Tabela 3 Concentrações de PDF ($\mu\text{g/mL}$) em cães positivos e negativos para
 2 AHIM

	Negativo	5-20	20-40	≥ 40
POS.	13/59 (22,0%)	19/59 (32,2%)	10/59 (16,9%)	17/59 (28,8%)
NEG.	03/17 (17,6%)	05/17 (29,4%)	03/17 (17,6%)	06/17 (35,3%)

3

4 Tabela 4 Concentrações de Dímeros D ($\mu\text{g/mL}$) em cães positivos e negativos
 5 para AHIM

	Negativo	250-500	500-1000	1000-2000	2000-4000	≥ 4000
POS.	41/59 (69,5%)	04/59 (6,8%)	05/59 (8,5%)	04/59 (6,8%)	02/59 (3,4%)	03/59 (5,1%)
NEG.	12/17 (70,6%)	02/17 (11,8%)	01/17 (5,9%)	0/17	0/17	02/17 (11,8%)

6

7

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

A auto-aglutinação em salina positiva é altamente sugestiva de AHIM, pois neste estudo todos os cães positivos para este teste também foram positivos na CF. Segundo estudos anteriores, a prevalência de auto-aglutinação nos casos de AHIM é de 40% a 87%; superior à prevalência deste estudo (27,58%) (Reimer et al., 1999; Scott-Moncrieff et al., 2001; Weinkle et al., 2005).

A especificidade do teste de Coomb's foi menor do que 100%, discordando de trabalhos anteriores (Wilkerson et al., 2000; Quigley et al., 2001; Pereira, 2006). Um dos principais fatores relacionados a resultados falsos positivos para o teste de Coomb's é a presença de hipergamaglobulinemia, observada tanto em pacientes com gamopatia monoclonal quanto policlonal. Acredita-se que este resultado esteja relacionado à ligação não específica das imunoglobulinas devido à alta concentração plasmática (Wardrop, 2005). Nos três casos falsos positivos deste estudo, os cães apresentaram hiperglobulinemia, podendo assim justificar esse resultado.

Este estudo reafirma a maior sensibilidade da técnica de CF para o diagnóstico de AHIM em relação aos testes de auto-aglutinação e de Coomb's, que apresentaram uma sensibilidade ainda menor quando comparados com estudos anteriores (Reimer et al., 1999; Scott-Moncrieff et al., 2001; Weinkle et al., 2005). No entanto, as porcentagens de positividade nos respectivos testes foram superiores quando comparadas às aquelas reportadas por Pereira (2006). Casos suspeitos de AHIM, mas negativos para os testes de auto-aglutinação e Coomb's não devem ser descartados, pois a CF pode ser conclusiva nestas situações.

Não houve predomínio de uma classe de Ig envolvida nas AHIM, portanto o predomínio dos casos de AHIM causados pela combinação de IgG e IgM reafirma os resultados encontrados em estudos anteriores (Quigley et al., 2001; Morley et al., 2008).

As AHIM se caracterizaram por um quadro de anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, reticulocitose e com média de hematócrito semelhante a estudos anteriores (Klag et al., 1993; Reimer et al., 1999; Carr, 2002; Goggs et al., 2008; Piek et al., 2008). Neste estudo, o grau de regeneração foi mais intenso quando comparado àquele observado em

anemias por outras etiologias em cães, apesar da intensidade da anemia não apresentar diferença estatística

Os 18 cães com leucocitose também apresentaram sinais de hemólise como icterícia, bilirrubinúria e/ou auto-aglutinação das hemácias. A combinação de diversos mecanismos pode resultar em leucocitose nos casos de AHIM, como necrose tecidual, a presença de citocinas que estimulam uma hiperplasia mielóide, somadas a uma maior liberação medular, demarginação de neutrófilos e diminuição da migração destas células para tecidos com baixa perfusão e com lesões necróticas (Mcmanus e Craig, 2001). Uma hemólise intravascular intensa pode acarretar em uma intensa leucocitose e uma resposta febril (Cotter, 1992).

Diversos autores relatam a trombocitopenia associada à AHIM (Reimer et al., 1999; Scott-Moncrieff, et al., 2001; Carr et al., 2002; Goggs et al., 2008). A trombocitopenia em cães com AHIM pode estar relacionada à concomitante destruição imuno-mediada das plaquetas, aumento do consumo devido à vasculite, processos inflamatórios generalizados, CID ou seqüestro (Scott-Moncrieff et al., 2001). Neste estudo a trombocitopenia observada (72,1%) provavelmente está relacionada à infecção por *Ehrlichia* sp, pois grande parte dos animais apresentaram PCR positivo, sendo esta diminuição relacionada ao consumo devido à vasculite ou mesmo destruição imuno-mediada observada nesta doença (Nelson e Couto, 2009).

Houve uma maior prevalência de AHIM secundária (75,4%). A presença de áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas pode contribuir para a maior prevalência de AHIM secundária.

Não foram encontrados relatos anteriores sobre a avaliação renal de cães com AHIM. Neste estudo, observou-se que os animais apresentaram sinais de lesão renal no momento do diagnóstico, evidenciada por proteinúria e cilindrúria. A proteinúria persistente de origem renal indica a existência de uma doença renal crônica (Stockham e Scott, 2002), no entanto como estes cães foram avaliados em um único momento, não foi possível confirmar este quadro. Somado a isso, o aumento, em média, discreto nos valores de uréia e creatinina não descarta a possibilidade de que cães com AHIM apresentem insuficiência renal, já que foram excluídos os casos de anemia associados à evidências de doença renal crônica prévia, pois o diagnóstico confirmatório de

AHIM somente foi realizado após a seleção prévia dos cães atendendo aos critérios determinados.

A proteinúria nos casos de AHIM secundária pode estar associada tanto a lesão renal causada pela *Ehrlichia* sp quanto a própria doença imuno-mediada, já que houve uma mesma proporção de casos de proteinúria nas AHIM primárias. O perfil bioquímico pode revelar a gravidade da lesão tecidual causada pela hipóxia, deposição de imuno-complexos e nefrotoxicidade causada pela hemoglobinemia (McCullough, 2003; Thrall et al., 2004).

Não existem relatos na literatura que relacionem as alterações hemostáticas com as AHIM predominantemente secundárias. De fato, houve uma alteração significativa para os testes dos cães positivos para esta enfermidade, entretanto, o quadro imuno-mediado parece não ser o fator determinante para os prolongamentos de TP e TTPA e diminuição da AAT nos animais anêmicos, já que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos positivos e negativos para AHIM.

Em parte, tais alterações semelhantes observadas nos dois grupos de cães anêmicos podem ser atribuídas à causa base predominante para a anemia em questão, ou seja, ao quadro infeccioso observado em ambos os grupos (*Ehrlichia* sp.).

Este é o primeiro relato de alterações hemostáticas em cães com erliquiose sem envolvimento de um quadro imuno-mediado. Estudos anteriores apenas apontam alterações na função plaquetária de cães com erliquiose (Gaunt et al., 1990; Harrus et al., 1996; Brandão et al., 2006; Cortese et al., 2006).

A possibilidade de resultados falsos positivos para PDF deve ser considerada (Caldin et al., 1998, Stokol et al., 2000 e Boisvert et al., 2001), pois a especificidade detectada para o PDF foi menor quando comparada com estudos anteriores que relatam a especificidade do teste entre 72-90%. Os Dímeros D apresentam maior sensibilidade. Os aumentos associados nas concentrações de PDF e Dímeros D conferem maior especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de um estado trombótico (Nelson & Andreasen, 2003 e Machida et al., 2010). Outros estudos demonstram o uso promissor de Dímeros D para triagem de casos de CID e doença tromboembólica antes mesmo de evidências clínicas (Scott-Moncrieff et al.,

2001; Griffin et al., 2003 e Nelson & Andreasen 2003). Uma concentração negativa para Dímeros D, de fato, pode excluir uma suspeita de tromboembolismo (Nelson, 2005).

O risco tromboembólico semelhante evidenciado nos dois grupos de cães anêmicos não exclui a relação do envolvimento imuno-mediado, mas atenta para uma possibilidade de tromboembolismo em cães anêmicos com *Ehrlichia* sp.

CONCLUSÕES GERAIS

A CF se confirmou como uma técnica mais sensível para o diagnóstico de AHIM quando comparada aos testes de auto-aglutinação e Coomb's. O teste de auto-aglutinação é mais específico que o teste de Coomb's, no entanto este último é mais sensível.

A igual prevalência de IgG e IgM nas AHIM não privilegia a escolha da classe de Ig envolvida para o diagnóstico pela técnica de CF.

Este estudo alerta para a alta prevalência de AHIM, principalmente secundária, relacionada à *Ehrlichia* sp em áreas endêmicas para esta doença infecciosa. Estas anemias são regenerativas e mais intensas quando comparadas com anemia por outras etiologias e, em grande parte dos casos, associadas a uma trombocitopenia importante.

O risco tromboembólico semelhante evidenciado nos dois grupos de cães anêmicos não exclui a relação do envolvimento imuno-mediado, mas atenta para uma possibilidade do tromboembolismo em cães anêmicos com *Ehrlichia* sp.

Desta forma, cães anêmicos que apresentam sinais clínicos associados ao risco tromboembólico devem ser avaliados para tal complicação, hoje pouco investigada na rotina clínica.

Existe um indício de lesão renal associado à AHIM, pois cães positivos para tal doença apresentaram proteinúria e aumento na relação proteína: creatinina urinárias no momento do diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. BALCH, A.; MACKIN A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian**. v.29, n.4, p.217-225, 2007a.
2. BALCH, A.; MACKIN A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: treatment and prognosis. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian**. v.29, n.4, p.230-238, 2007b.
3. BARKER, R.N.; ELSON, C.J. Red blood cell glycoporphins as B and T-cell antigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.47, n.3-4, p.225-238, 1995.
4. BATEMAN, S.W.; MATHEWS, K.A.; ABRAMS-OGG, A.C.G. Disseminated intravascular coagulation in dogs: review of the literature. **The Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v.8, n.1, p.29-45, 1998.
5. BOISVERT, A.M.; SWENSON, C.L.; HAINES, C.J. Serum and Plasma Latex Agglutination Tests for Detection of Fibrin(ogen) Degradation Products in Clinically Ill Dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v.30, p.133-136, 2001.
6. BRAUN, J-P.; LEFEBVRE, H.P. Kidney Function and Damage. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego, California: Academic Press, 6thed, 2008.p.485-528.
7. BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO, JR.J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**. v.35, p.141-146, 2004.
8. BRANDÃO, L.P.; HASEGAWA, M.Y.; HAGIWARA, M.K.; KOHAYAGAWA, A. Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. **Veterinary Clinical Pathology**. v.35, n.1, p.78-81, 2006.
9. CALDIN, M.; FULANELLO, T.; LUBAS, G. Sensitivity and specificity of citrated plasma FDPs and D-dimer in the diagnosis of disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.12, p.236, 1998. (Abstract)

10. CAPPELLINI, M.D. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. **Hematology**. v.1, p.74-78, 2007.
11. CARR, A.P.; PANCIERA, D.L.; KIDD, L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.16, n.5, p.504-509, 2002.
12. COOTER, S.M. Auto-immune hemolytic anemia in dogs. The Compendium (Small Animal). v.14, n.1, p.53-69, 1992.
13. CORTESE, L.; PELAGALLI, A.; PIANTEDOSI, D.; MASTELLONE, V.; MANCO, A.; LOMBARDI, P.; CIARAMELLA, P.; AVALLONE, L. Platelet Aggregation and Haemostatic Response in Dogs Naturally Co-infected by Leishmania infantum and Ehrlichia canis. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**. v.53, p.546–548, 2006.
14. DAY, M.J. Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. **Journal of Small Animal Practice**. v.37, p.523- 534, 1996.
15. DUVAL, D.; GIGER, U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.10, n.5, p.290-295, 1996.
16. FELDMAN, B.F.; MADEWELL, B.R.; O'NEILL, S. Disseminated intravascular coagulation: Antithrombin, plasminogen and coagulation abnormalities in 41 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.179, p.151-154, 1999.
17. FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.
18. GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet aggregation studies in dogs with acute Ehrlichia platys infection. **American Journal of Veterinary Research**. v.51, n.2, p.290-293, 1990.
19. GIGER, U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6ed St. Louis Missouri: Elsevier Saunders, 2005. p. 1886-1907.
20. GOGGS, R.; BOAG, A.K.; CHAN, D.L. Concurrent immune-mediated haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. **Veterinary Records**. v.163, n.11, p.323-327, 2008.

21. GRIFFIN, A.; CALLAN, M.B.; SHOFER, F.S.; GIGER, U. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. **American Journal of Veterinary Research.** v.64, n.12, p.1562-1569, 2003.
22. HARRUS, S.; WANER, T.; ELDOR, A.; ZWANG, E.; BARK, H. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Records.** v.139, n.12, p.290-293, 1996.
23. HENDRIX, C.M. **Laboratory procedures for veterinary technicians.** 4ed St Louis, Missouri: Mosby, 2002. 559p.
24. HONECKMAN, A.L.; KNAPP, D.W.; REAGAN, W.J. Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian.** v.18, n.2, p.113-124, 1996.
25. ISHIHARA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUCHI, A.; TAKAHASHI, M.; NAKASHIMA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Evaluation of prognostic factors and establishment of a prognostic scoring system for canine primary immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Medical Science.** v.72, n.4, p.465-470, 2010.
26. JONES, D.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Investigation into factors influencing performance of the canine antiglobulin test. **Research in Veterinary Science.** v.48, p.53-58, 1990.
27. JONES, D.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Use of a direct enzyme-linked antiglobulin test for laboratory diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. **American Journal of Veterinary Research.** v.53, p.457-465, 1992.
28. JOHNSON, L.R.; LAPPIN, M.R.; BAKER, D.C. Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.13, n.4, p.338-345, 1999.
29. KLAG, A.R.; GIGER, U.; SHOFER, F.S. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986- 1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.202, n.5, p.783-788, 1993.
30. KUCINSKIENE, G.; SCHUBERTH, H.; LEIBOLD, W.; PIESKUS, J. Flow cytometric evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. **The Veterinary Journal.** v.169, p.303-307, 2005.

31. KUZU, S.; SEGEV, G.; HARUVI, E.; AROCH, I. Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.24, p.587-596, 2010.
32. MACHIDA, T.; KOKUBU, H.; MATSUDA, K.; MIOSHI, K.; UCHIDA, E. Clinical use of D-dimer measurement for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science.** v.72, n.10, p.1301-1306, 2010.
33. MACKIN, A. Immune-mediated haemolytic anaemia. In: DAY, M.J.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J.D. **Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine.** 1ed Gloucester: BSAVA, 2000. p.67-77.
34. MCCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice.** v.33, n.6, p.1295-1315, 2003.
35. MCMANUS, P.M.; CRAIG, L.E. Correlation between leucocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994- 1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.218, n.8, p.1308-1313, 2001.
36. MILLER, S.A.; HOHENHAUS, A.E.; HALE, A.S. Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.224, n.2, p.232-235, 2004.
37. MODOLO, J.R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; SHIMABUKURO, F.H.; MENDONÇA, A.O.; VICTORIANA, C.; SILVA, W.B. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v.43, n.5, p.598-604, 2006.
38. MORLEY, P.; MATHES, M.; GUTH, A.; DOW, S. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.22, p.886-892, 2008.
39. NELSON, O.L. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association.** v.41, n.3, p.145-149, 2005.

40. NELSON, O.L.; ANDREASEN, C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.17, p.830-834, 2003.
41. NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Small Animal Internal Medicine**, 4th ed. Mosby: St. Louis Missouri, 2009. 1504p.
42. NEER, T.M.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections in: Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia infection. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3thed. Elsevier Saunders: St. Louis Missouri, 2006. p.203-216.
43. NOBLE, S.J.; ARMSTRONG, J. Bee sting envenomation resulting in secondary immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.214, n.7, p.1026-1027, 1999.
44. OVERMANN, J.A.; SHARKEY, L.C.; WEISS, D.J.; BORJESSON, D.L. Performance of 2 microtiter canine Coombs' tests. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, n.2, p.179-183, 2007.
45. PEREIRA, P.M. **Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esferócitos) e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em cães**. 2006. 92 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 2006.
46. PIEK, C.J.; JUNIUS, G.; DEKKER, A.; SCHRAUWEN, E.; SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.22, p.366-373, 2008.
47. 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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.13, n.4, p.297-300, 2001.

48. RODRIGUES-LAINZ, A.; FRITZ, C.L.; MCKENNA, W.R. Animal and human health risks associated with Africanized honeybees. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.215, n.12, p.1799-1804, 1999.
49. REIMER, M.E.; TROY, G.C.; WARNICK, L.D. Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988–1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.35, p.384-391, 1999.
50. SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; TREADWELL, N.G.; MCCULLOUGH, S.M.; BROOKS, M.B. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.37, n.3, p.220-227, 2001.
51. SHAW, N.; HARRELL, K. IMHA: diagnosing and treating a complex disease. **Veterinary Medicine**. Peer Reviewed, p.660- 672, 2008.
52. STEWART, A.F.; FELDMAN, B.F. Immune-mediated hemolytic anemia. Part I. An overview. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian**. v.15, n.3, p.372-381, 1993.
53. STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Urinary system. In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, 1th ed.** Blackwell Publishing Company: Iowa State Press, 2002. p.277-336.
54. STOKOL, T.; BLUE, J.T.; FRENCH, T.W. Idiopathic pure red cell aplasia and non-regenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1998-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.216, n.9, p.1429-1436, 2000.
55. TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology - An Introduction**. 7ed, W B Saunders, 512p., 2004.
56. THRALL, M A., et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1ed Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 518p., 2004.
57. WARDROP, K.J. The Coombs' test in veterinary medicine: past, present and future. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.4, p. 325-334, 2005.
58. WEINKLE, T.K.; CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F.; WARNER, K.L.; BARR, S.C.; ERB, H.N. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.226, n.11, p.1869-1880, 2005.

59. WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.2, p.72-82, 2002.
60. 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.14, p.190-196, 2000.
61. WYSOKE, J.M.; BERG, P.B.V.; MARSHALL C. Bee sting-induced haemolysis, spherocytosis and neural dysfunction in three dogs. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.61, n.1, p.29-32, 1990.

ANEXOS

ANEXO 1

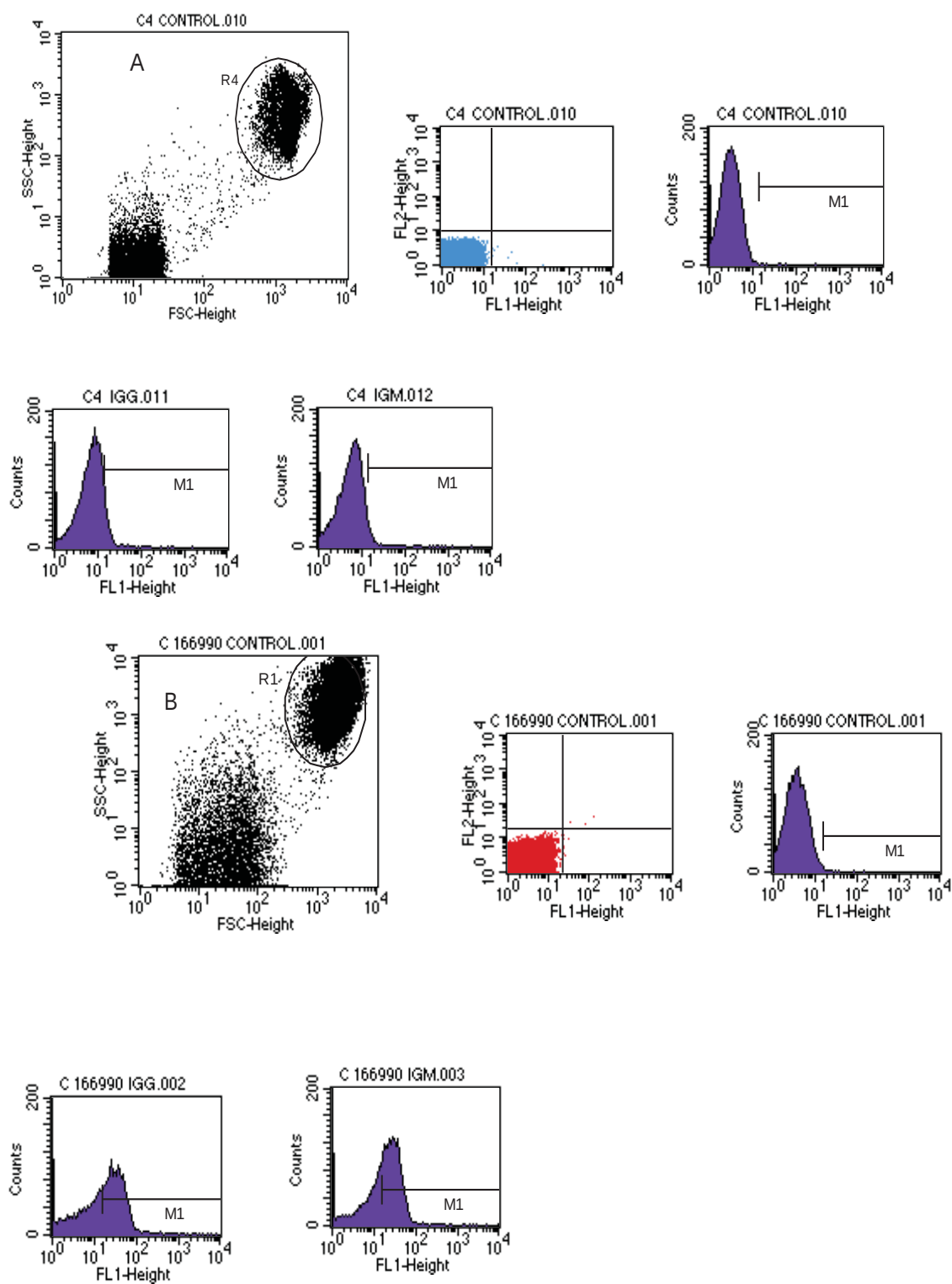
Tabela 1. Percentual de células marcadas, intensidade média de fluorescência (IMF) de IgG e IgM na citometria de fluxo, médias e desvios padrão (DP) dos 19 cães controle.

Animal	IgG (%)	IgM (%)	IMF IgG	IMF IgM
1	1,17	0,79	19,54	21,67
2	7,36	2,81	12,98	12,52
3	9,69	7,21	11,76	11,65
4	2,78	1,55	18,27	17,62
5	8,7	2,39	13,22	15,26
6	19,02	14,81	19,81	19,63
7	1,1	1,66	30,23	27,14
8	3,49	2,53	26,9	26,9
9	18,06	2,22	23,5	19,63
10	2,94	1,47	15,26	14,86
11	9,33	4,24	17,47	18,19
12	4,63	1,78	16,85	16,7
13	8,3	2,65	13,95	13,46
14	0,83	0,64	22,47	27,63
15	2,61	1,58	17	17,94
16	8,63	3,59	13,95	13,95
17	3,94	4,24	15,12	15,12
18	3,43	1,15	16,7	16,25
19	3,66	1,28	14,99	15,26
Média	6,30	3,08	17,89	17,97

DP	5,21	3,24	4,91	4,83
Média + 2DP	16,72%	9,56%	27,71	27,63

ANEXO 2

Figura 1 Representação de um controle negativo (A) e um animal positivo (B) para AHIM pela técnica de citometria de fluxo.



ANEXO 3

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes

para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos. **Autores.** Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões. **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados. **Referências bibliográficas.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. **Citações bibliográficas** Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não

consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas: São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40,p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20,1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em:<<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

ANEXO 4

Normas para publicação da Revista Journal of Veterinary Internal Medicine
(Capítulo 2)

B.1.1. Manuscript Preparation

Manuscripts should be prepared as described below. Manuscripts that do not follow the specified format will be returned for correction before being sent out for review.

1. Manuscripts must be double-spaced, using US (8½" x 11") page settings (A4 page settings not accepted), and leaving at least 1-inch margins.
2. Page numbers must be included in the upper right-hand corner of each page.
3. Manuscripts must be formatted with line numbers in the left hand margin.
4. Figures and graphs must conform to the JVIM guidelines (see B.1.4., B.1.5., B.1.8. and B.1.9.).
5. Manuscripts must be submitted in English using American spelling and must be grammatically correct. Authors whose native language is not English are advised to seek assistance in manuscript preparation from someone fluent in written English, or use professional services (www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp).

B. 1.2. Standard Paper

The length of a standard paper must not exceed 5000 words including text, references, tables, figure legends and footnotes.

Title page: The first page of the manuscript must include the following (in addition to this information being entered at the JVIM submission website):

Title of the manuscript. Names of the authors with their institutions and affiliations. Short title (maximum 6 words) for use as a running head. Keywords (maximum 4 words) not already used in the manuscript title. List of abbreviations used in the manuscript. Name, address, and e-mail address of the corresponding author. Separate paragraphs for the following: Where the work was done. Whether the study was supported by a grant or otherwise. Meeting, if any, at which the paper was presented. Acknowledgments

Abstract: The abstract must not exceed 250 words. The abstract must be included in the manuscript as well as uploaded to the submission website. They must be identical and must be constructed using the following subheadings:

Background – A brief explanation of why the study was performed.

Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.

Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g., research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g., disease status).

Methods – A statement of overall study design (e.g., randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.

Results – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.

Conclusions and clinical importance – A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

Introduction: The introduction should not exceed approximately 500 words. The introduction is untitled. Please provide a clear statement of the objective and rationale of the study, and provide only pertinent references. A brief overview of the topic is appropriate in setting the context for the study. Do not review basic physiology, pathophysiology, medical principles, or aspects of the disease that were not studied. An extensive review of the subject will not be accepted.

Materials and Methods: The materials and methods should be provided in sufficient detail that another investigator could replicate the study:

1. Study design should be clearly described using accepted terminology (e.g., randomized double-blind placebo controlled study, retrospective review of medical records).
2. Common methods or procedures need not be described in detail, and where possible citation should be made to techniques that have been reported elsewhere. A statement of animal care must be made (e.g., animals were cared for according to the principles outlined in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). A concise description of the statistical methods should be provided including analytical software and citation of sources for unusual methods. Additional guidelines are included in the Statistical Guidelines for The Journal of Veterinary Internal Medicine online at

<http://mc.manuscriptcentral.com/society>
GUIDELINES_JVIM.pdf.

images/jvim/STATISTICAL

Results: State concisely, in logical sequence, the results of the study using the following guidelines:

1. Subheadings may be used for particular sections (e.g., clinical findings, radiographic findings)
2. Tables are a concise means of presenting large amounts of numerical data in a logical format. Do not reproduce the same data in both tables and figures.
3. Tables containing raw data for a number of variables for each individual animal are not appropriate. Such data should be provided, either in a table or in the text, using summary or descriptive statistics.
4. Tables should not contain only two rows with two or more columns or two columns with two or more rows (e.g., a table providing hematologic data for one group of animals). Such data should be reported in the text.
5. Do not editorialize or discuss the implication or importance of results in the "Results" section.

Discussion: The discussion should explain the relevance and importance of the study. Excessive detail can obscure important findings. The first paragraph of the discussion should provide an overview of the results and a brief description of the importance of these results. The discussion must be concise. Focus on the novel and innovative aspects and discuss the results of your study in light of earlier studies. Do not discuss aspects of the topic that you did not study (e.g., treatment options if you did not study treatment). Address any limitations of your study so that the reader is aware of constraints to interpretation of your results.

Text: In order to insure consistency in the JVIM, authors are requested to adhere to the following guidelines:

1. When referring to a drug, use the generic name approved by the US Food and Drug Administration or recognized as the US-adopted name. The trade name (if one exists), manufacturer's name, city and state abbreviation should be provided in an endnote the position of which is marked in the text by a superscripted lower case letter. Begin superscripts with letter "a" and label endnotes (including references to abstracts) alphabetically in the order in which they appear in the text. For products not approved by the United States

Food and Drug Administration (FDA), the final concentration of the active ingredient or ingredients, identity of excipients, and name and address (as an endnote) of the compounder or manufacturer must be provided in the text.

2. Laboratory values should be reported in conventional (US) units. Système Internationale (SI) units can be used in addition to conventional units.
3. With the exception of laboratory values as discussed above, all measurements should be expressed in metric units. Analyte concentrations should be expressed in conventional units (e.g., mg/dL, g/dL) but authors may also include Système International (SI) units (e.g., mmol/L, μ mol/L). If confusion could result, include other measurement systems in parentheses.
4. The JVIM adheres to the principles specified in *Nomina Anatomica*, *Nomina Histologica*, *Nomina Embryologica*, *Nomina Anatomica Veterinaria* and *Nomina Anatomica Avium* where appropriate. The JVIM strictly follows the American Medical Association *Manual of Style: A Guide for Authors and Editors*, 9th edition.
5. When describing products or equipment, the generic name should be used in the text and the details of the product (brand name, manufacturer, city and state) should be provided in an endnote. The endnotes should be labelled with superscripted letters, beginning with "a."

B.1.3. References

References are cited in the text and details provided in a numbered list at the end of the manuscript. Number references consecutively in the order in which they are first cited in text (or tables and legends), using Arabic numerals. References must be verified by the author against the original documents. Unpublished observations, personal communications, submitted papers not yet accepted, and abstracts cannot appear in the reference section. Citations to abstracts should be made in the text using superscripted letters (see #1 under "Text" for details) with the reference details provided in an endnote. References with 5 or more authors may include the names of the first 3 authors followed by "et al."

Please see a recent issue of the JVIM for examples of reference format. A complete listing of formatting guidelines for references is provided online at http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

B.1.4. Tables

Place each table on a separate page, double-spaced. Number tables consecutively, as cited in text, and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Put explanatory matter in footnotes, not the heading: for example - ELISA, enzyme-linked immunoabsorbant assay; HR, heart rate. Do not provide tables of values from individual animals. Tables can be included at the end of the article file, after References, or submitted as a separate file.

B.1.5. Legends for Illustrations

Legends should be double-spaced, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain clearly in the legends any symbols, arrows, numbers, or letters used to identify parts of the illustrations. For photomicrographs, identify method of staining and magnification. Legends should be included at the end of the article file, after References.

B.1.6. Abbreviations

Spell out any term that will be abbreviated the first time it is used followed by the abbreviation in parentheses. Example: gestational diabetes mellitus (GDM). Use only the abbreviation from that point forward in the manuscript. Supply a list of abbreviations and definitions unique to the article at time of submission. The editor will decide at the time of editing which abbreviations will be included in an "abbreviation table" for the published article. The editor reserves the right to determine when, and how often, an abbreviation is used. The following abbreviations do not need to be spelled out or included in an "abbreviation table." IM, IV, SC, PO, CC, PCV, ACTH, ELISA, ECG, EKG, PQ interval, PR, QRS duration, QT interval, ST, T wave, Pwave, aVR, aVL, aVF.

B.1.7. Numbers

Use a leading zero on values less than 1. Example: 0.3 instead of .3 Do not express numbers using excessive precision. Use the appropriate number of significant digits. For further details concerning manuscript preparation consult the American Medical Association's *Manual for Authors & Editors: Editorial Style and Manuscript Preparation* and/or *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*.

B.1.8. Illustrations

For the electronic submission of your manuscript, the illustrations must be submitted as separate files. The system will merge the manuscript and figures together and create a PDF. Submit artwork in digital format. Save line artwork (vector graphics) as Encapsulated PostScript (EPS) files and bitmap files (halftones or photographic images) as Tagged Image Format (TIFF), with a resolution of at least 300 dpi at final size. Do not send native file formats. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>. Black-and-white illustrations, in the form of glossy prints, will be reproduced free of charge, but the editor reserves the right to establish a reasonable limit. Color illustrations may be published, but the editor reserves the right to decide if color is needed to convey meaning and will establish a reasonable limit.

The following instructions are provided to guide authors in the preparation of figures and graphs for publication in JVIM. Figures and graphs must conform to these guidelines in order for the manuscript to be considered for publication in JVIM. For preparation of graphs, the use of purpose-designed software is usually necessary. Graphs created by Microsoft Excel rarely meet the requirements set out below. Do not use color in graphs unless it is absolutely necessary (the editors will make the final assessment about the reproduction of color figures).

Sizing: Authors should size graphs to 1 column width (8 cm) and half tone images to 2 column width (16 cm). The height of the image should be proportional to its width (it is unlikely that height would ever be more than 1.5 times width).

Legend: The figure legend should stand alone and be explanatory of the graph or figure. The legend should include a statement of the number of animals, intervention, variables depicted, an explanation of the symbols (key) used in the graph including those used to identify groups of animals or variables, or statistical significance. Do not include figure legends in the graph. Do not include interpretation of results in the figure legend.

Photographs: Photomicrographs: Photomicrographs must be of good visual quality (focus, clarity, color) and must include a scale bar. Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained tissues will be published in black and white. Photomicrographs of tissues stained with other stains may be

published in color, at the editor's discretion. **Photographs of animals, organs, or gross lesions:** Photographs of animals are rarely useful, but if used must be of excellent quality. Photographs of animals must be aesthetically pleasing. Photographs of animals that are in obvious pain or discomfort or undergoing experimental procedures should not be used. Line drawings are often preferable and a better means of depicting abnormalities or procedures. Photographs that are limited to lesions are preferred to those of the animal or whole organs. The photograph must be of excellent quality and the lesion must be readily apparent. Use of arrows or other means of identifying the lesion is recommended.

Graphs: **Boxes:** Do not include boxes around graphs. **Graph type:** Continuous data should be depicted as scatter plots or box plots. Bar graphs, either horizontal or vertical, should be reserved for depiction of frequency data (e.g., counts) and are not an appropriate means of depicting continuous data. Do not use lines connecting data points if doing so implies a temporal relationship between the connected points, when such a relationship does not exist. Do not use the "spline" function to produced smoothing or interpolation of lines between data points. **Axes:** Include only those axes necessary for presentation and interpretation of the data in the graph. Usually, this means that graphs should have only left and bottom axes, and no top or right axes. There will be graphs in which more than one vertical axis is needed, for example when the graph includes 2 dependent variables of different units, but this is the only instance in which multiple vertical axes are required. **Grid lines:** Do not include grid lines (horizontal, vertical, or both) in graphs. **Data:** All graphs that include an estimate of central tendency (mean, median) must include an estimate of variance (standard deviation, range, or confidence intervals). **Symbols:** Symbols should be unequivocal when reproduced in black and white. Lines should be readily identified and discernible in black and white. In bar graphs in which there are multiple bars of different fill, the fill and pattern should be such that bars are readily identified in black and white. Shades of grey reproduce poorly and are not easily differentiated. Please use solid fill (black or white), with or without bold patterns (stripes, lines, cross hatch).

Font type, size, and color: Use Arial font in all graphs. Internal labels for axis labels, tick labels, symbols (e.g., *, †), and notations on the graph should

be 8 point font (combination of capitals and lower case as necessary). 10 point capital letters (upper case) should be used for designating multiple images or graphs within a figure (i.e., A, B, C, D). These designations should be BOLD and placed in the UPPER LEFT corner of the individual image within the multiple-image figure.

B.1.9. Supporting Information (formerly known as Supplementary Material) and Video

The Journal, through Wiley-Blackwell, is able to host online approved supporting information that authors submit with their paper. Supporting information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the Journal. Supporting information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supporting information published. Supporting information may also be displayed on an author or institutional website. Such posting is not subject to the Journal's embargo date as specified in the Copyright Assignment or Exclusive License form. In such cases, it is the author's responsibility to ensure that the supplied URL for the supporting information remains valid for the lifetime of the article. Neither the Journal nor Wiley-Blackwell provide technical support for the creation of supporting information. If technical support is required to output supporting information in a suitable format and size as outlined below, authors should seek the assistance of their local IT department. All supporting information must be supplied with a legend stating what it is, what format it is, and where necessary how it was created. Further details regarding the format of supporting materials is available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

C.1.1. Other Submissions

The guidelines for letters to the editor, brief communications, case reports, and review articles as they relate to title page, illustrations, references, etc., are the same as those for the standard paper.

D.1.1. Permissions

Permissions of author and publisher must be obtained for the use of previously published material (e.g., text, photographs, drawings) and must accompany the manuscript when it is submitted for publication.

E.1.1. Editing and Inclusion of Additional Material to Final Draft

The final draft of the manuscript will be edited by one of the Editors-in-Chief. The manuscript must be revised to incorporate all of the recommended editorial changes. Furthermore, no additional material, except where specifically requested by the Editor-in-Chief, may be added to the manuscript during the final revision or galley proof stages. All material contained within the manuscript must have been subject to peer review. For this reason, inclusion of additional material (including data, figures, tables and text) is not permitted after review of the manuscript.

F.1.1. Submission

Manuscripts may be submitted only through the JVIM website <http://mc.manuscriptcentral.com/jvim>.

Authors must submit cover letters, manuscripts and figures as separate files. The system will create a PDF when merging the manuscript and figures into one file.

F.1.2. Submission Fee

A \$50.00 non-refundable fee (payable in US funds only) is required at the time of submission. The fee can be paid by check/money order (payable to the ACVIM and funds drawn on an American Bank), Visa, MasterCard, American Express or university purchase order. Payment information MUST be included in a cover letter submitted with the manuscript (as a separate file), or e-mailed to JVIM@ACVIM.org at the time of submission. Manuscripts will not be processed unless the submission fee is paid. Payment guidelines are online at http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jvim/Payment_Options.pdf. You can contact JVIM through the ACVIM office: American College of Veterinary Internal Medicine, 1997 Wadsworth Blvd., Suite A, Lakewood, CO 80214-5293, Toll free (US and Canada): 800-245-9081 Phone: 303-231-9933 Fax: 303-231-0880, JVIM@ACVIM.org

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO**

Moraes, Lívia Fagundes.

Avaliação do risco tromboembólico e de complicações renais e hematológicas em cães com AHIM/ Lívia Fagundes Moraes. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50503030

1. Cão - Doenças. 2. Rins - Doenças. 3. Trombose. 4. Doenças hematológicas

Palavras-chave: Anemia hemolítica imuno-mediada; Cães; Doença renal; *Ehrlichia* sp; Hematologia; Hemostasia; Trombose.