

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES INDUTORES E SUPRESSORES DA  
ERITROPOIESE EM CANINOS DOENTES RENAI  
S CRÔNICOS**

**Sofia Borin Crivellenti**

Médica Veterinária

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES INDUTORES E SUPRESSORES DA  
ERITROPOIESE EM CANINOS DOENTES RENAIIS  
CRÔNICOS**

**Sofia Borin Crivellenti**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

**2014**

B734f Borin-Crivellenti, Sofia  
Fatores indutores e supressores da eritropoiese em caninos  
doentes renais crônicos / Sofia Borin Crivellenti. -- Jaboticabal, 2015  
ix, 45 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Daniela Gomes da  
Silva, Thiago Demarchi Munhoz, Geórgia Modé Magalhães.

Bibliografia

1. Citocinas. 2. Hormônios. 3. Mielograma. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.61:636.7

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



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

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

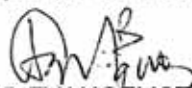
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** FATORES INDUTORES E SUPRESSORES DA ERITROPOIESE EM CANINOS DOENTES RENAI CRÔNICOS

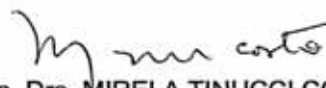
**AUTORA:** SOFIA BORIN CRIVELLENTI

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

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

x   
Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

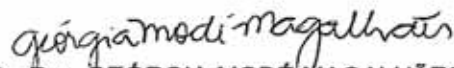
x   
Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

x   
Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ  
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP

x   
Profa. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

x   
Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES  
Universidade de Franca / Franca/SP

Data da realização: 14 de janeiro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**SOFIA BORIN CRIVELLENTI** – nascida em 29 de junho de 1983 na cidade de Lençóis Paulista – SP, filha de Luiz Anselmo Borin e Regina Maria de Souza Borin. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 2006. Durante os anos de 2007-2009 participou do Programa de Residência Médico-Veterinária em Clínica Médica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal. No ano de 2011 adquiriu o título de Mestre em Clínica Médica pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal (Bolsista FAPESP - Mestrado). No mês de março de 2011 ingressou no doutorado em Clínica Médica na mesma instituição, realizando estágio e pesquisa internacional na Faculdade de Medicina Veterinária da “*The Ohio State University*”, Ohio, Estados Unidos (Bolsista FAPESP – doutorado/BEPE). Desde o início da pós-graduação integrou os Serviços de Patologia Clínica Veterinária (2009 – atual) e de Oncologia Veterinária (2009-2013) do Hospital Veterinário da Unesp – Jaboticabal. Autora dos livros “Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais” (MedVet, 2012) e “Bulário Médico-Veterinário - Cães e Gatos” (MedVet, 2013). Possui experiência clínica e acadêmica nas áreas de clínica médica de pequenos animais, patologia clínica, endocrinologia e hematologia veterinária.

**“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”**  
Cora Coralina

**Dedico**

*A todos aqueles que lutam por um mundo melhor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente pela minha vida, mas também pelas pessoas, animais, oportunidades e adversidades que coloca no meu caminho. Todos, sem exceção, contribuem diariamente para que eu me torne uma pessoa melhor.

Ao meu eterno orientador Prof. Tit. Dr. Aureo Evangelista Santana, que ao me receber por sua orientanda me deu a oportunidade de conhecer o verdadeiro sentido da palavra “professor”. Este homem é, para mim, a personificação da frase que escolhi como epígrafe desta tese. Com humildade e modéstia ele é capaz de transferir o que sabe e vivenciar o que ensina. Serei eternamente grata à sua presença em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro por meio da concessão da Bolsa de Doutorado (2011/08601-8), Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (2013/0027-6) e Auxílio à Pesquisa Regular (2011/20581-2).

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal pela oportunidade e receptividade.

Ao meu “orientador americano” Prof. Dr. Chen Gilor da Faculdade de Medicina Veterinária da “*The Ohio State University*” pela confiança em mim depositada e pela incalculável experiência profissional e pessoal que me proporcionou.

A equipe do Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário da Unesp – Jaboticabal pelo apoio, amizade, profissionalismo e companheirismo nestes oito anos de convívio. Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial ao Eugênio Campos Filho, nosso querido “Geninho”, que por anos a fio ajudou na elaboração e na realização de tantos e tantos projetos de pesquisa, sempre tão disposto e solícito.



Aos meus contemporâneos de república, residência, pós-graduação, professores, funcionários e estagiários do Hospital Veterinário e do Serviço de Oncologia da Unesp de Jaboticabal, com os quais convivi durante minha Residência em Clínica Médica de Pequenos Animais, Mestrado e Doutorado. Não estaria sendo justa se não fizesse um agradecimento especial às minhas irmãs (e irmão) de República Tathiana Motheo, Marcy Lancia Pereira, Alexandre Pinto Ribeiro e Caroline Pigatto De Nardi; aos meus contemporâneos de residência Giuliana D'Angelo, Fábio Nelson Gava, Amanda Cristiane Ondani e Mariana Rondelli; à minha orientadora de residência Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, e aos queridos funcionários do HV Maria José Agostine (Zezé), Lauro Cesar, Douglas Ludovério e Matheus Yamazaki.

À banca de qualificação do doutorado, composta pela Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Profa. Dra. Lizandra Amoroso, Profa. Dra. Daniela Gomes da Silva e pela Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi, pela disponibilidade e pela contribuição com suas considerações.

Aos pesquisadores do laboratório de patologia clínica Nathan Cruz, Letícia Anai, Mônica Chaves, Andressa Nogueira, Caroline Miranda, Catarina Contin, Stefanie Coelho e Aline Tedesco pelo excelente convívio, por toda ajuda, e pelo critério no auxílio de alguns experimentos envolvendo este trabalho.

Aos meus queridos pacientes e seus proprietários que tornaram esse experimento possível.

À minha mãe Regina Maria de Souza Borin, não somente por sua luta incessante para que eu viesse ao mundo, mas por todo apoio, amor, carinho, críticas, incentivo e busca pela minha felicidade. Não importa o que aconteça, eu sei que sempre a terei ao meu lado.

À “turma do lado de lá” que está sempre guiando meus passos e iluminando meu caminho. Ao meu pai Luiz Anselmo Borin pela minha vida, à minha avó Adelina

Cavalheiro de Souza por ter sido a melhor avó do mundo, e à minha avó Helena Martins Borin pelo belo exemplo de serenidade e fé.

À minha sogra Eliana Viccari Zuccolotto Crivellenti e ao meu sogro Hildebrando Crivellenti, por me acolherem como uma verdadeira filha no seio de sua linda família.

Às minhas famílias Souza, Cavalheiro, Martins, Borin, Crivellenti e Zuccolotto! Avós, avôs, tios, tias, cunhada e cunhado, primas e primos tão queridos! Agradeço a cada um por todos os incríveis momentos compartilhados!

E, finalmente, ao meu esposo Leandro Zuccolotto Crivellenti, por seu apoio incondicional, por seu amor, por me dar a sua mão e caminhar sempre ao meu lado, por compartilhar comigo meus sonhos, por lutar por mim e por me defender, por me incentivar e me motivar a ser uma pessoa melhor todos os dias. “*Euteamo*”, assim sem vírgulas, espaço e sem ponto final.

## SUMÁRIO

|                                                          | Página |
|----------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE TABELAS.....                                    | iii    |
| LISTA DE FIGURAS.....                                    | iv     |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                               | vii    |
| RESUMO.....                                              | viii   |
| ABSTRACT.....                                            | ix     |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                       | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                            | 3      |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                               | 10     |
| 3.1 Animais e grupos experimentais.....                  | 10     |
| 3.2 Obtenção das amostras .....                          | 13     |
| 3.3 Avaliação do quadro hematológico.....                | 13     |
| 3.3.1 Eritrograma e leucograma.....                      | 13     |
| 3.3.2 Reticulocitometria.....                            | 14     |
| 3.4 Bioquímica sérica e urinária.....                    | 14     |
| 3.5 Urinálise.....                                       | 15     |
| 3.6 Aferição da pressão arterial sistêmica.....          | 15     |
| 3.7 Avaliação citológica da medula óssea.....            | 16     |
| 3.8 Dosagens dos hormônios e citocinas séricos.....      | 18     |
| 3.9 Análise estatística.....                             | 19     |
| 4. RESULTADOS.....                                       | 20     |
| 4.1 Provas de função renal.....                          | 20     |
| 4.2 Eritrograma e leucograma.....                        | 21     |
| 4.3 Citologia da medula óssea .....                      | 23     |
| 4.4 Fatores indutores e supressores da eritropoiese..... | 29     |
| 5. DISCUSSÃO.....                                        | 31     |
| 6. CONCLUSÕES.....                                       | 36     |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                      | 37     |
| APÊNDICES.....                                           | 44     |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011861/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Concentrações séricas de fatores indutores (Eritropoietina e IL-3) e supressores (Paratormônio, IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) da eritropoiese em caninos doentes renais crônicos**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui  
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos  
Secretária - CEUA

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabela 1.</b> Nomenclatura da série eritróide.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 4      |
| <b>Tabela 2.</b> Estadiamento da doença renal crônica canina segundo a International Renal Interest Society (IRIS), 2009.....                                                                                                                                                                                 | 11     |
| <b>Tabela 3.</b> Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a International Renal Interest Society (IRIS), 2009.....                                                                                                                                                                              | 12     |
| <b>Tabela 4.</b> Cálculo das diferentes relações e índices para a investigação da eritropoiese.....                                                                                                                                                                                                           | 16     |
| <b>Tabela 5.</b> Valores médios e desvios-padrão obtidos para o perfil morfofuncional renal em cães controle (CG) e doentes renais crônicos nos estágios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.....                                                                                                | 20     |
| <b>Tabela 6.</b> Valores médios e desvios-padrão obtidos para o eritrograma e leucograma em cães controle (CG) e naqueles nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4) da doença renal crônica canina. Jaboticabal, 2014.....                                                                                   | 21     |
| <b>Tabela 7.</b> Valores médios e desvios-padrão obtidos para as variáveis citológicas da medula óssea com vistas à avaliação da eritropoiese em cães controle (CG) e naqueles nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4), da doença renal crônica canina. Jaboticabal, 2014 .....                            | 23     |
| <b>Tabela 8.</b> Valores médios e desvios-padrão obtidos para os fatores indutores (EPO e IL-3) e supressores (PTH, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ ) da eritropoiese avaliados em cães controle (GC) e doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014..... | 29     |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da eritropoiese nos mamíferos. A partir da CFU-E, unipotencial e comprometida com a série eritróide, tem início a produção de células eritróides na medula óssea, que sequencialmente inclui os estádios de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatofílicos, eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e eritrócitos maduros. Adaptado de Williams Hematology (PRCHAL, 2010). EPO, eritropoietina; GM-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos; IL-3, interleucina 3; CFU-E, unidade formadora de colônia eritróide; BFU-E, unidade formadora do burst eritróide; CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulócitos, eritrócitos, monócitos/macrófagos.....                                                                                                                                                                                                                   | 6      |
| <b>Figura 2.</b> Fotomicrografias de aspirado de medula óssea canina à microscopia de luz. Em A e B estão ilustrados monocamadas de hemácias, permeadas por precursores mielóides e eritróides, e importante componente adiposo (obj10x). Em C e D está destacada a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea (obj40x). Em E, F, G e H estão evidenciadas células precursoras eritróides e mielóides, em objetiva de imersão, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma e, em cujas ilustrações, diferentes estádios evolutivos eritrocitários estão identificados (seta): PE, proeritroblasto; EB, eritroblasto basofílico; EP, eritroblasto policromatofílico; EO, eritroblasto ortocromático (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014..... | 17     |
| <b>Figura 3.</b> Representação gráfica dos valores médios do eritrograma dos cães controle (GC) e doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 22     |
| <b>Figura 4.</b> Representação gráfica dos valores médios do leucograma dos cães controle (GC) e dos doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 22     |

- Figura 5.** Representações gráficas (mediana e intervalos interquartis) dos percentuais de precursores eritróides (A), relação mielóide/eritróide (M:E) (B), relação de precursores eritróides imaturos e maduros (I:Me) (C) e índice de maturação eritrocitário (EMI) (D) dos cães controle e com doença renal crônica nos estádios 2 (DRC2), e (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014..... 24
- Figura 6.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo controle à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em A (obj4x) e B (obj10x). O corpo da lâmina está representado em C (obj4x) e D (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em E, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014..... 25
- Figura 7.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC2 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em A (obj4x) e B (obj10x). O corpo da lâmina está representado em C (obj4x) e D (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em E, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014..... 26
- Figura 8.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC3 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em A (obj4x) e B (obj10x). O corpo da lâmina está representado em C (obj4x) e D (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando 27

visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em E, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.....

**Figura 9.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC4 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em A (obj4x) e B (obj10x). O corpo da lâmina está representado em C (obj4x) e D (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em E, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.....



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                                                    |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| BFU-E – <i>burst</i> eritróide                                     | MO – medula óssea                                                          |
| CFU-E – unidade formadora de colônia eritróide                     | PAS – pressão arterial sistólica                                           |
| CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média               | PE – proeritroblasto                                                       |
| CTH – célula tronco hematopoiética                                 | PTH – paratormônio                                                         |
| D.O. – densidade óptica                                            | rhEPO – eritropoietina recombinante humana                                 |
| DRC – doença renal crônica                                         | rhG-CSF – fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano |
| DRC2 – grupo DRC estágio 2                                         | TNF $\alpha$ – fator de necrose tumoral alfa                               |
| DRC3 – grupo DRC estágio 3                                         | UPC – razão proteína creatinina urinária                                   |
| DRC4 – grupo DRC estágio 4                                         | VCM – volume corpuscular médio                                             |
| DU – densidade urinária                                            |                                                                            |
| EB – eritroblasto basofílico                                       |                                                                            |
| EFNa – excreção fracionada de sódio                                |                                                                            |
| EMI – índice de maturação eritrocitário                            |                                                                            |
| EO – eritroblasto ortocromático                                    |                                                                            |
| EP – eritroblasto policromatofílico                                |                                                                            |
| EPO – eritropoietina                                               |                                                                            |
| GC – grupo controle                                                |                                                                            |
| GM-CSF – fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos |                                                                            |
| I:Me – relação de precursores eritróides imaturos e maduros        |                                                                            |
| IFN $\gamma$ – interferon gama                                     |                                                                            |
| IL-1 $\beta$ – interleucina 1 beta                                 |                                                                            |
| IL-3 – interleucina 3                                              |                                                                            |
| IRIS – <i>International Renal Interest Society</i>                 |                                                                            |
| LLD – limite inferior de detecção                                  |                                                                            |
| M:E – relação mielóide eritróide                                   |                                                                            |

## **FATORES INDUTORES E SUPRESSORES DA ERITROPOIESE EM CANINOS DOENTES RENAIIS CRÔNICOS**

**RESUMO** – Este estudo teve como objetivo a quantificação sérica de hormônios e citocinas indutores (eritropoietina e IL-3) e supressores (paratormônio, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) da eritropoiese, correlacionando-os com as variáveis eritrocitárias periféricas e centrais. Amostras de sangue periférico, urina e medula óssea foram obtidas de 10 cães com doença renal crônica estágio 2 (DRC2), 10 cães com DRC estágio 3 (DRC3), 10 cães com DRC estágio 4 (DRC4) e 10 cães adultos saudáveis (grupo controle) com vistas à realização de hemograma, análise bioquímica sérica e urinária, urinálise, ensaios imunoenzimáticos e análise citológica da medula óssea. As concentrações dos fatores indutores e supressores da eritropoiese, assim como os resultados do mielograma dos cães do DRC2 assemelharam-se aos do grupo controle, e apesar de não terem manifestado anemia, a presença de reticulocitose alerta para o fato de fatores externos a medula óssea estarem precocemente causando perda ou destruição dos eritrócitos. A anemia em cães com DRC está relacionada ao aumento nas concentrações de paratormônio e TNF $\alpha$ , e a exacerbação dos referidos fatores supressores, bem como à hipoplasia da série eritróide, representada principalmente pela redução da população de eritroblastos policromatofílicos e ortocromáticos, constituem, parcialmente, a base da gênese e do agravamento do estado anêmico nas fases mais avançadas da DRC em cães.

**Palavras-chave:** eritropoietina, IFN $\gamma$ , interleucinas, mielograma, paratormônio, TNF $\alpha$

## **ERYTHROPOIESIS STIMULATOR AND SUPPRESSOR FACTORS IN DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate bone marrow precursor cells, circulating concentrations of cytokines and hormones that can stimulate (erythropoietin and IL-3) and suppress (parathyroid hormone, IL-1 $\beta$ , TNF and IFN) erythropoiesis, and make their correlation with the peripheral and central erythrocyte variables. Peripheral blood samples, urine and bone marrow were obtained from 10 dogs with chronic kidney disease stage 2 (CKD2), 10 dogs with CKD stage 3 (CKD3), 10 dogs with CKD stage 4 (CKD4), and 10 healthy adult dogs (control group) for complete blood count (CBC), serum and urinary biochemical analysis, urinalysis, immunoassays and cytological analysis of bone marrow. The concentrations of erythropoiesis stimulator and suppressor factors, and cytological bone marrow results from CKD2 dogs were similar to those of the control group. This group also exhibited reticulocytosis even though not have expressed anemia, which means that extrinsic factors are early cause of blood loss or destruction of red blood cells. The anemia in dogs with CKD is related to increased parathyroid hormone and TNF $\alpha$  serum concentrations. The increases of such suppressor factors in association with erythroid hypoplasia are considered as part of the genesis and the aggravation of the anemic state in the end stages of CKD in dogs.

**Keywords:** erythropoietin, IFN $\gamma$ , interleukins, myelogram, parathyroid hormone, TNF $\alpha$

## 1. INTRODUÇÃO

Há relativamente pouco tempo se reconhece que a eritropoiese é um processo muito mais complexo do que se pensava. Embora a eritropoietina (EPO) ainda seja o principal estímulo para diferenciação e proliferação das células eritróides, bem como de prevenção da apoptose, a ação da EPO pode ser influenciada positiva ou negativamente tanto por outros hormônios, quanto por citocinas e fatores de crescimento.

O estado anêmico evidenciado no plano clínico-patológico da doença renal crônica trata-se, indiscutivelmente, de uma síndrome multifatorial, a qual pode ser agravada pelas inúmeras lesões causadas pela uremia ao longo do trato gastrointestinal, levando à hematêmese, melena e hematoquesia; modificação da proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana dos eritrócitos, o que aumenta sua fragilidade e diminui seu tempo de vida; hiporexia e poliúria, levando ao consumo insuficiente e a perda, respectivamente, de minerais e vitaminas importantes à eritropoiese, dentre outras causas. Entretanto, a exata natureza das toxinas urêmicas ainda se mantém obscura, e o paratormônio, assim como citocinas tais como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), o interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), têm sido amplamente investigados como potenciais fatores supressores da eritropoiese em humanos, em diferentes tipos de doenças crônicas.

Diante dos dados obtidos na dissertação de mestrado conduzida pelo grupo de estudos em hematologia veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal (BORIN, 2011), e após a devida correlação dos achados da citologia de medula óssea e o hemograma de cães com doença renal crônica, constatou-se que as variáveis hematológicas periféricas e centrais comportaram-se de distintas formas nos diferentes estádios da doença renal crônica. O momento exato, cujos fatores indutores e supressores da eritropoiese atuam, isoladamente ou em conjunto, não pareceu claro, no grupo de pacientes estudados. Diante de tais resultados, aventou-se que uma investigação mais aprofundada da eritropoiese, especialmente com relação ao comportamento dos hormônios eritropoietina e paratormônio, bem como de conhecidas citocinas indutoras (IL-3) e supressoras (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) da eritropoiese, contribuirá não somente para um melhor entendimento da gênese da

anemia nos pacientes com doença renal crônica canina em suas distintas fases, mas para, talvez futuramente, se alcançar meios mais eficazes de tratamento desta importante alteração.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo pelo qual as células progenitoras hematopoiéticas produzem eritrócitos é chamado de eritropoiese. A dinâmica da diferenciação, proliferação e amadurecimento de células eritrocitárias engloba quatro compartimentos distintos que incluem o das células-tronco hematopoiéticas (CTH), das células progenitoras eritróides, das células precursoras eritróides e dos eritrócitos maduros (CAR, 2000).

Dois progenitores comprometidos com a linhagem eritróide já estão bem estabelecidos com base nos estudos envolvendo culturas celulares *in vitro*, ou sejam, as chamadas unidades formadoras de *burst* eritróides (BFU-E) e unidades formadora de colônias eritróides (CFU-E). A diferenciação das CTH multipotenciais em BFU-E, bem como destas em CFU-E, e, derradeiramente, destas últimas em precursores eritróides, é regulada, principalmente, pela interleucina 3 (IL-3) e pelo fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (JAIN, 1993).

As BFU-E primitivas têm intensa capacidade proliferativa e são dependentes de grande quantidade de eritropoietina por expressarem baixa densidade de receptores para eritropoietina (EPO). Na medida em que as BFU-E evoluem e se diferenciam, na direção ao estágio das CFU-E, sua capacidade proliferativa diminui e sua sensibilidade à eritropoietina (EPO) aumenta, expressando cada vez mais receptores de membrana à eritropoietina. Inicialmente, são também responsivas a outros fatores de crescimento hematopoiético, coletivamente denominados de atividade promotora de *burst* (BPA), que incluem a IL-3 (estimulação de multilinhagens celulares) e o GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de CTH multipotencial e de linhagens granulocítica e macrofágica). Já, as CFU-E não possuem grande capacidade proliferativa e são dependentes, obrigatoriamente, da eritropoietina (OHLS et al., 1990).

A unidade formadora de colônia de eritrócitos (CFU-E) dá origem ao proeritroblasto, primeiro precursor reconhecível da série eritróide, que, após divisão mitótica dá origem ao eritroblasto basofílico. Este se divide dando origem ao eritroblasto policromatofílico, que por sua vez, dá origem ao eritroblasto ortocromático, precursor este já considerado não proliferativo. Em condições normais, não há mais atividade mitótica a partir do eritroblasto ortocromático. Por

outro lado, com relação à hemoglobina, sua biossíntese tem início precocemente no citoplasma dos precursores eritróides, já no estágio de eritroblasto basofílico e, incrementa, na medida em que o eritroblasto evolui para os estádios de eritroblasto policromatofílico e ortocromático, momento este último em que atinge seu apogeu, e no qual há cariofagocitose do eritroblasto por parte do macrófago, topograficamente situado no centro da ilhota eritroblástica. O estágio seguinte, já anucleado, é denominado reticulócito, que exhibe grau de hemoglobinação muito próximo daquele de uma hemácia madura, mas que ainda apresenta organelas intracitoplasmáticas e resíduos de RNA para continuidade da síntese protéica, inclusive de hemoglobina. Após a saturação intracitoplasmática máxima de hemoglobina, atinge-se, enfim, o estágio de eritrócito, morfofuncionalmente maduro (OHLS et al., 1990). Devido aos diferentes sistemas de denominação para os precursores eritrocitários (Tabela 1), optou-se por utilizar o Sistema Eritroblasto como forma de padronização durante todo o texto.

**Tabela 1.** Nomenclatura da série eritróide.

| SISTEMA ERITROBLASTO               | SISTEMA NORMOBLASTO               | SISTEMA RUBRÍCITO           |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Proeritroblasto                    | Pronormoblasto                    | Rubriblasto                 |
| Proeritroblasto basofílico         | Normoblasto basofílico            | Prorrubricito               |
| Eritroblasto basofílico            | Normoblasto basofílico            | Rubricito basofílico        |
| Eritroblasto policromatofílico     | Normoblasto policromatofílico     | Rubricito policromatofílico |
| Eritroblasto ortocromático inicial | Normoblasto ortocromático inicial | Rubricito normocrômica      |
| Eritroblasto ortocromático tardio  | Normoblasto ortocromático tardio  | Metarrubricito              |

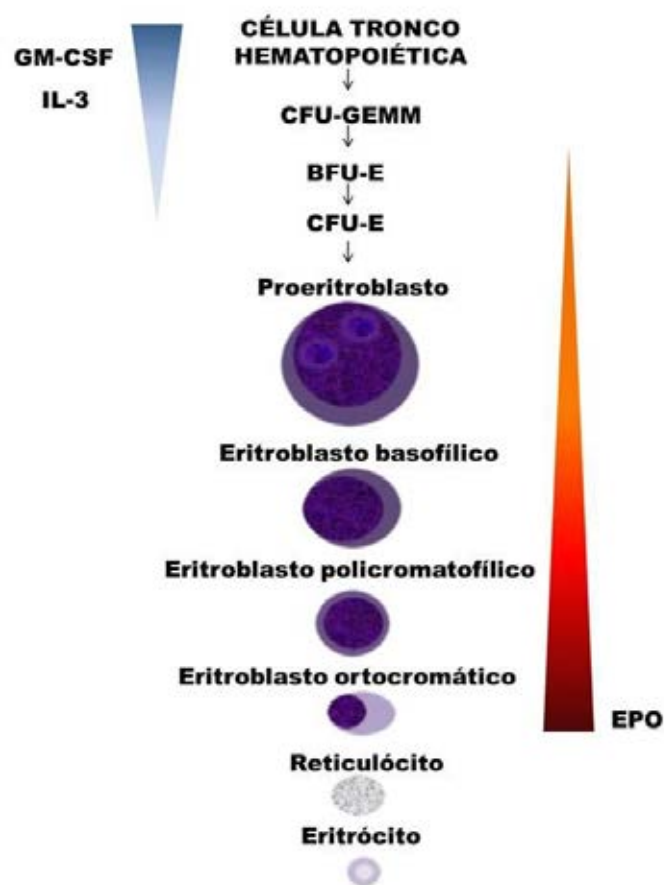
\* Adaptado de Stockham e Scott (2011).

A EPO é o fator de crescimento hematopoiético responsável pela estimulação da eritropoiese em resposta à anemia. É uma glicoproteína de 30,4 kDa, que possui meia-vida de 6 a 10 horas na circulação, produzida, em sua maior parte, pelas células peritubulares intersticiais renais, sendo o fígado responsável por cerca de 10 a 15% da sua produção total (CAR, 2000). O principal sinal para o desencadeamento da síntese de EPO é a hipoxemia renal. Por outro lado, a hipersaturação de oxigênio tecidual resulta na diminuição de sua produção (GIGER, 1992).

A maneira pela qual a EPO estimula a diferenciação, proliferação e maturação das células da linhagem eritrocitária, na medula óssea, tem relação com a sua faculdade de estabelecer ligação com receptores específicos presentes na superfície das células eritrocitárias (GIGER, 1992). A EPO é, também, considerada o principal fator promotor da sobrevivência dos precursores eritrocitários (KOURY; BONDURANT, 1988), pois além de estimular a produção de pró-eritroblastos a partir das células tronco hematopoiéticas unipotenciais (CFU-E), também é capaz de aumentar a velocidade de divisão e maturação dos diversos estádios eritroblásticos em face de uma demanda aumentada (ERSLEV; BESARAB, 1997).

De outra parte, a IL-3, também conhecida como fator estimulador de multilinhagens (multi-CSF), é um fator de crescimento produzido pelas células T CD4<sup>+</sup>, que ao atuar sobre as CTH, dá suporte à proliferação de várias células hematopoiéticas. Suas ações de regulação são mediadas por um complexo receptor da membrana citoplasmática, presente nas células específicas da linhagem hematopoiética, e em vários estágios de sua diferenciação (McCUBREY et al., 1991). A influência dos fatores indutores da eritropoiese IL-3 e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e, de outra parte, do hormônio eritropoietina (EPO), se dá em momentos diametralmente opostos, no processo de evolução da célula eritrocitária, como ilustrado na Figura 1. A diferenciação das células-tronco hematopoiéticas pluripotenciais em unidades formadoras de *burst* eritróides (BFU-E) e destas para as unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) é regulada, principalmente, pela IL-3 e pelo GM-CSF. Por outro lado, se as BFU-E primitivas são dependentes de grande quantidade de eritropoietina, à medida que se diferenciam, suas capacidades proliferativas diminuem e sua sensibilidade à EPO aumenta (PRCHAL, 2010).





**Figura 1.** Esquema ilustrativo da eritropoiese nos mamíferos. A partir da CFU-E, unipotencial e comprometida com a série eritróide, tem início a produção de células eritróides na medula óssea, que sequencialmente inclui os estádios de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatofílicos, eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e eritrócitos maduros. Adaptado de *Williams Hematology* (PRCHAL, 2010). EPO, eritropoietina; GM-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos; IL-3, interleucina 3; CFU-E, unidade formadora de colônia eritróide; BFU-E, unidade formadora do *burst* eritróide; CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulócitos, eritrócitos, monócitos/macrófagos.

Com relação aos valores do mielograma, a partir de preparações microscópicas coradas e obtidas por citoaspiração da medula óssea, tem sido reportado por vários autores que para cães saudáveis, adultos, machos ou fêmeas, o total de células eritróides situa-se em torno de 38,5% e, ademais, que os precursores da referida série eritróide distribuem-se de acordo com os seguintes valores médios percentuais: proeritroblastos – 0 a 3,4%, eritroblastos basofílicos – 0,4 a 11,6%, eritroblastos policromatofílicos – 3,5 a 27,0% e eritroblastos

ortocromáticos – 0 a 25,8%. Além disso, que as células granulocitárias totais perfazem cerca de 54,5% da celularidade medular. Também tem sido reportado valores para linfócitos de 0 a 15,1%, plasmócitos de 0 a 4,3%, monócitos de 0 a 0,4%, megacariócitos de 0 a 1,0% e, finalmente, relação mielóide:eritróide (M:E) normal é de em média 1,25:1 (JAIN, 1993).

O excesso de paratormônio (PTH), considerado atualmente como a principal toxina urêmica (POLZIN, 2011), pode conduzir a graves alterações sistêmicas, incluindo osteodistrofia renal (CHEW; DIBARTOLA, 1992), calcificação de tecidos moles, hemorragias, intolerância a glicose, prurido, hiperlipidemia, entre outras (MASSRY; GOLDSTEIN, 1979). Todavia, sua atuação direta ou indireta na modulação da eritropoiese tem sido objeto de debates interessantes no meio científico, sendo que alguns autores sugerem que o PTH seja capaz de suprimir a eritropoiese tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MEYTES et al., 1981; MACDOUGALL, 1995; POLZIN, 2011). Rao, Shih e Mohini (1993) reportaram correlação positiva entre a resistência à eritropoietina e o aumento do PTH, simultâneos à fibrose da medula óssea.

O interferon gama (IFN $\gamma$ ), produzido por linfócitos T ativados e por células *natural killer*, é um potente inibidor da hematopoiese. Tal linfocina possui importante papel na fisiopatogenia das desordens hematopoiéticas associadas com aplasias medulares e anemias aplásicas (SELLERI et al., 1995). Tem-se demonstrado que o IFN $\gamma$  é capaz de inibir as unidades formadoras de colônia (CFU) na medula óssea e interferir na progressão dos precursores eritropoiéticos, dentro do ciclo celular, ou de induzi-los à apoptose (SELLERI et al., 1996). Ademais, o IFN $\gamma$  pode reduzir a densidade de receptores de eritropoietina na superfície membranária das unidades formadoras de colônia eritróides imaturas (MUTA; KRANTZ, 1993). Tais fatos sugerem que o IFN $\gamma$  inibe o crescimento dos progenitores hematopoiéticos, possivelmente via apoptose (DAI; KRANTZ, 1999; CHOI et al., 2000).

Outras pesquisas têm demonstrado que a severidade da anemia nas doenças inflamatórias crônicas está relacionada ao aumento da concentração de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Assim, a redução da produção de EPO tem sido observada em doenças associadas com excessiva produção de IL-1 $\beta$ . A IL-1 $\beta$  suprime a produção de eritropoietina hepática e antagoniza seu efeito estimulador na proliferação dos

precursores eritróides na medula óssea (DINARELLO, 1992). Ademais, outros trabalhos evidenciam que a IL-1 $\beta$  é capaz de inibir o crescimento *in vitro* de unidades formadoras de colônias de eritrócitos humanos (CFU-E), na presença de IFN $\gamma$  (DINARELLO, 1996).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) é considerado um regulador bifuncional da hematopoiese, que, em doses pequenas e infrequentes, estimula o desenvolvimento de células imaturas e, que, em doses altas e frequentes, induz um decréscimo de progenitores eritrocitários (ZHANG et al., 1995). Semelhantemente ao IFN $\gamma$ , o TNF $\alpha$  também guarda relação com resposta medular eritropoiética inadequada, nas anemias inflamatórias crônicas, suscitando síntese inadequada de EPO, bem como inibindo a proliferação dos progenitores eritrocitários e reduzindo a expressão de receptores membranários à EPO (MEANS JUNIOR, 1999).

A doença renal crônica (DRC), principal afecção renal dos cães (FINCO, 1995; POLZIN; OSBORNE, 1995; POLZIN, 2011), reflete-se na perda da capacidade excretora e concentradora dos rins, com redução da filtração glomerular e consequente aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias indesejáveis que, no estado de higidez morfofuncional renal, são eliminadas (POLZIN et al., 2005).

Do ponto de vista diagnóstico, tanto para fins clínicos quanto experimentais, a *International Renal Interest Society* (IRIS, 2009)<sup>1</sup>, determinou e padronizou o estadiamento da DRC em 4 estádios: 1 – ausência de azotemia, 2 – azotemia leve, 3 – azotemia moderada e 4 – azotemia severa. Além disso, instituiu o subestadiamento da DRC, tomando como base os valores obtidos para a razão proteína/creatinina urinária (UPC) e pressão arterial sistêmica, do paciente.

O estado anêmico, de origem multifatorial, invariavelmente compõe o quadro do binômio morbidade-mortalidade, evidenciado no plano clínico-patológico por pacientes caninos portadores de DRC (WALLNER et al., 1976). Ademais, sabe-se que os rins são os principais sítios de produção da eritropoietina nos cães (MORITZ et al., 1997), e que várias substâncias presentes no soro de pacientes com DRC são capazes de inibir a eritropoiese *in vitro* (POLZIN et al., 2005).

Com base nos resultados obtidos em estudos precedentes, observou-se que a maioria dos cães em estágio 2 da DRC não apresentou anemia, e que apesar

---

<sup>1</sup> <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS%202006%20Staging%20of%20CKD.pdf>

disso, verificou-se a existência de reticulocitose. Anemia normocítica normocrômica leve manifestou-se inicialmente nos cães em estágio 3, apresentando correlação positiva com azotemia e hiperfosfatemia. Já o estágio 4 da DRC foi marcado por severa anemia normocítica normocrômica arregenerativa, associada tanto aos marcadores bioquímicos séricos creatinina e fósforo, quanto à presença de marcante hipoplasia da série eritróide na medula óssea. Diante dos achados acima referidos observou-se que, caninos doentes renais crônicos, provavelmente apresentaram anemia normocítica normocrômica em decorrência de uma ação sinérgica entre toxinas urêmicas e inibição da eritropoiese, *in vivo* (BORIN, 2011).

Com base na revisão de literatura precedente, esta tese teve por objetivo geral aprofundar o estudo da anemia de cães nos diferentes estágios da doença renal crônica por intermédio da quantificação de hormônios e citocinas indutores e supressores da eritropoiese, correlacionando-os com as variáveis eritrocitárias periféricas e centrais. Para tal, objetivou-se especificamente quantificar sericamente eritropoietina e paratormônio, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 3, interferon gama e interleucina 1 beta, assim como realizar a avaliação hematológica completa dos cães incluídos neste experimento, utilizando-se do hemograma, da contagem de reticulócitos e pela realização da análise citológica da medula óssea (mielograma) para obtenção das populações de precursores eritróides e dos índices eritrocitários importantes para a avaliação global da eritropoiese.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e grupos experimentais

Neste ensaio foram incluídos 40 cães adultos, oriundos do canil experimental e da rotina do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (GLN) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal. A utilização dos animais seguiu o protocolo previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo nº 011861/11) da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, e nenhum paciente fez parte deste estudo senão após consentimento expresso do proprietário, por intermédio de preenchimento e subscrição de ficha de consciência e de concordância com as condições do protocolo experimental. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, como a seguir:

- **Grupo Controle (GC):** O grupo controle compôs-se de três fêmeas e sete machos, todos sem raça definida e cujo peso oscilou entre  $17,54 \pm 7,11$  kg. Apresentaram idades que variaram de seis a 12 anos ( $8 \pm 1,75$  anos), sendo que 75% dos animais encontravam-se na faixa etária de seis a nove anos, e cujo bom estado de saúde foi aquilatado com base em exames clínicos gerais, laboratoriais de rotina e pela estimativa da taxa de filtração (*clearance*) de creatinina endógena de 24 horas. Salienta-se que foi adotada a idade acima de cinco anos para os animais do grupo controle, no sentido de se buscar homogeneidade e validação dos achados hematológicos e medulares, pois a morbidade é predominante nos pacientes caninos com DRC em idade mais avançada (LEES, 2004) e a medula óssea pode sofrer alterações em sua composição com o envelhecimento (SANTANA, 2000).
- **Grupo de Doentes Renais Crônicos:** o grupo de doentes renais crônicos compôs-se de 30 cães, de quaisquer gêneros, raça e idade, com diagnóstico de DRC e sem histórico ou alterações clínicas e clínico-patológicas de outras doenças. Tais cães foram sublocados segundo a classificação da IRIS para DRC em um dos estádios 2, 3 ou 4 (Tabela 2) (IRIS, 2009), propiciando a constituição dos grupos DRC2 (10 cães), DRC3 (10 cães) e DRC4 (10 cães),

respectivamente. As raças que integraram o grupo DRC foram Poodle (n=6), Cocker spaniel (n=2), Weimaraner (n=2), Labrador retriever (n=1), Fox terrier (n=1), São Bernardo (n=1), Chow Chow (n=1), Shih Tzu (n=1), Boxer (n=1) e Maltês (n=1); sendo os 13 cães remanescentes sem raça definida. O grupo de doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2) compôs-se de quatro fêmeas e seis machos, cujo peso oscilou entre  $10,66 \pm 8,21$  kg, com idades entre quatro e 15 anos ( $11 \pm 3,53$  anos), sendo 50% situados na faixa etária entre oito e 10 anos. No grupo DRC3 foram incluídos cinco fêmeas e cinco machos, cujo peso oscilou entre  $21,73 \pm 18,68$  kg com idades variando entre quatro e 15 anos ( $10 \pm 3,8$  anos), sendo que 50% deles encontravam-se na faixa etária de 10 a 15 anos. Os cães doentes renais crônicos classificados no estágio 4 (DRC4) perfizeram três fêmeas e sete machos, cujo peso oscilou entre  $17,91 \pm 14,05$  kg com idades variando entre quatro e 16 anos ( $9,5 \pm 4,24$  anos), sendo 50% situado na faixa etária de nove a 16 anos.

A idade e o peso foram considerados como critério de seleção dos animais do grupo controle, os quais foram pareados com os animais dos grupos DRC; não havendo, portanto, diferença significativa entre estas variáveis nos grupos estudados considerando o grupo DRC como um todo ( $P=0,8358$ ;  $P=0,3818$ , respectivamente) ou subestadiando-o de acordo com a IRIS ( $P=0,3956$ ;  $P=0,2106$ , respectivamente).

Como critério de inclusão no grupo DRC, foram levados em consideração a evolução clínica da doença de mais de 15 dias e a constatação de valores de creatinina sérica superiores a 1,4 mg/dL, após devida hidratação do paciente, valores estes obtidos em dois ou três momentos diferentes e ao longo de algumas semanas.

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

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

Ainda, seguindo a classificação proposta pela IRIS (2009), as unidades experimentais integrantes deste ensaio foram avaliadas quanto à proteinúria de origem renal, bem como à hipertensão arterial sistólica (Tabela 3). A categorização do paciente proteinúrico foi estabelecida somente após a exclusão de fatores pré e pós-renais, de aumento da proteína na urina, além da confirmação e persistência da proteinúria, com base na determinação do valor da razão proteína/creatinina urinária (UPC), em diferentes momentos ou atendimentos clínicos (duas a três ocasiões com intervalo mínimo de 15 dias). Da mesma maneira, os valores da pressão arterial sistólica foram confirmados após três aferições realizadas em momentos ou atendimentos diferentes.

**Tabela 3.** Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a *International Renal Interest Society* (IRIS), 2009.

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

Aqui vale ressaltar que, diante das dificuldades impostas ao diagnóstico da DRC em pacientes não azotêmicos, pela ausência de sinais clínicos e necessidade da realização de exames que comprovassem a redução progressiva da taxa de filtração glomerular, o grupo de pacientes DRC estágio 1 não foi incluído nesse delineamento experimental. De outra parte, diante do fato dos pacientes DRC estágio 2 não apresentarem sinais clínicos relacionados com a disfunção renal, à exceção de poliúria e polidipsia, e estas serem manifestações comuns a diversas doenças do trato geniturinário e sistêmicas, realizou-se prévia mensuração da excreção fracionada de sódio afim de confirmar a presença de DRC nestes pacientes.

Não foram incluídos no grupo controle e nos grupos de doentes renais crônicos, pacientes que já tivessem sido submetidos a transfusões sanguíneas ou ao tratamento com quaisquer fármacos indutores de hematopoiese, tais como nandrolona, rhG-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos recombinante

humano), timomodulina e/ou rhEPO (eritropoietina recombinante humana), assim como portadores de quaisquer comorbidades, incluindo hemoparasitose, neoplasia, cardiopatias, dermatopatias, endocrinopatias, etc.

### **3.2 Obtenção das amostras**

As amostras de sangue periférico foram obtidas por venipunção jugular e envasadas em tubos a vácuo contendo K<sub>2</sub>-EDTA para realização das análises hematológicas, e em tubos a vácuo sem anticoagulante para obtenção do soro, após centrifugação, por 15 minutos à 800 G, em centrífuga refrigerada. As amostras de soro, assim obtidas, foram congeladas a 80° C negativos para posteriores análises bioquímicas, hormonais e quantificação de citocinas. Após anestesia local (lidocaína a 0,2% sem vasoconstritor), amostras de medula óssea (0,5 mL) foram obtidas por punção aspirativa do esterno com auxílio de agulhas hipodérmicas e recolhidas em seringas contendo K<sub>2</sub>-EDTA. As amostras de urina, de cada parcela experimental, foram obtidas preferencialmente por micção espontânea ou cateterização uretral.

### **3.3 Avaliação do quadro hematológico**

Todas as análises laboratoriais referentes ao quadro hematológico, dos animais experimentais, foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário GLN/FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP.

#### **3.3.1 Eritrograma e leucograma**

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos, teor de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram obtidos com o auxílio de um contador automático de células<sup>2</sup>. A partir da contagem leucocitária global e da fórmula leucocitária relativa, obteve-se a fórmula leucocitária absoluta, por uma regra

---

<sup>2</sup> ABC Vet – HORIBA ABX – São Paulo/Brasil.



de três simples e os valores foram comparados com os valores de referência para a espécie canina adotados no LPCV/FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal (Apêndice A).

### **3.3.2 Reticulocitometria**

Alíquotas de sangue total (100  $\mu$ L) foram incubadas com igual quantidade de Azul Brilhante Cresil, em banho-maria, à 37°C, por 15 minutos. Após a incubação esfregaços sanguíneos foram confeccionados e contracorados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa. As contagens de reticulócitos foram, então, conduzidas em ensaio cego, por profissional treinado e experiente. Com o auxílio de um microscópio, objetiva de imersão (obj10x), foram realizadas contagens de hemácias maduras e de reticulócitos em 20 campos uniformemente distribuídos. A contagem absoluta dos reticulócitos foi obtida a partir da contagem global de hemácias por uma regra de três direta.

### **3.4 Bioquímica sérica e urinária**

As provas bioquímico-séricas e urinárias foram igualmente conduzidas junto ao LPCV “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “GLN” da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP e os valores foram comparados com os valores de referência para a espécie canina (Apêndice B).

As amostras de soro foram processadas para determinação das concentrações de creatinina (método Jaffé modificado), ureia (método enzimático), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), cálcio total (reação cromogênica com cresoltaleína complexona) e fósforo (método de Daly e Ertingshausen modificado). Nas amostras de urina foram determinadas as concentrações de creatinina (método Jaffé modificado) e proteína (método vermelho de pirogalol). Tanto no caso das provas bioquímico-séricas, como urinárias, utilizou-se o sistema Labtest para diagnóstico e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil.

Para o cálculo da razão proteína/creatinina urinária (UPC) utilizou-se a fórmula:

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

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

As concentrações séricas e urinárias de sódio foram determinadas utilizando-se método íon-seletivo<sup>4</sup>. Para os cálculos da excreção fracionada de sódio utilizou-se a fórmula que se segue:

$$EF_{Na} = \frac{U_{Na} \text{ (mEq/L)} \times S_{Cr} \text{ (mg/dL)}}{U_{Cr} \text{ (mg/dL)} \times S_{Na} \text{ (mEq/L)}} \times 100$$

\*Sendo:  $EF_{Na}$  = Excreção fracionada de sódio;  $U_{Na}$  = concentração urinária de sódio;  $S_{Cr}$  = concentração sérica de creatinina;  $U_{Cr}$  = concentração urinária de creatinina;  $S_{Na}$  = concentração sérica de sódio.

### 3.5 Urinálise

Os caracteres físicos da urina tais como coloração e aspecto foram avaliados macroscopicamente. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital<sup>5</sup>. Para a sedimentoscopia as amostras foram centrifugadas a 800 G durante cinco minutos, sendo o sobrenadante reservado para análise da UPC e o sedimento para confecção da lâmina com vistas à sedimentoscopia. A preparação entre lâmina e lamínula foi analisada a fresco, empregando-se objetivas secas com aumento de 10 a 40x, para realização das contagens de cada tipo de elemento organizado, por campo.

### 3.6 Aferição da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida, e sempre que possível foi avaliada em três momentos distintos, por método indireto, utilizando-se de manguito inflável aplicado ao redor do membro torácico direito, entre o cotovelo e o punho, para ocluir o fluxo sanguíneo. Com auxílio de contenção física do paciente foi obtida a média de cinco aferições. O manguito utilizado correspondeu a 40-50% da

<sup>4</sup> ISLAB – Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil.

<sup>5</sup> ATAGO – Tóquio/Japão.

circunferência da extremidade envolvida, e para tanto foi empregado manguito habitualmente utilizado na área de medicina pediátrica, tamanho infantil e neonatal. A PAS foi então aferida por meio da detecção do fluxo sanguíneo nas artérias superficiais do carpo utilizando-se de um aparelho ultrassônico com *doppler* vascular<sup>6</sup>.

### 3.7 Avaliação citológica da medula óssea

As preparações citoscópicas de medula óssea (MO), devidamente fixadas e coradas, foram avaliadas em ensaio cego, por profissional treinado e experiente.

Qualitativamente, e utilizando-se de objetiva seca (aumento de 10x), as preparações microscópicas de MO foram analisadas e classificadas, segundo sua celularidade, em normo, hiper ou hipocelular e quantidade de gordura (normal, aumentada ou diminuída).

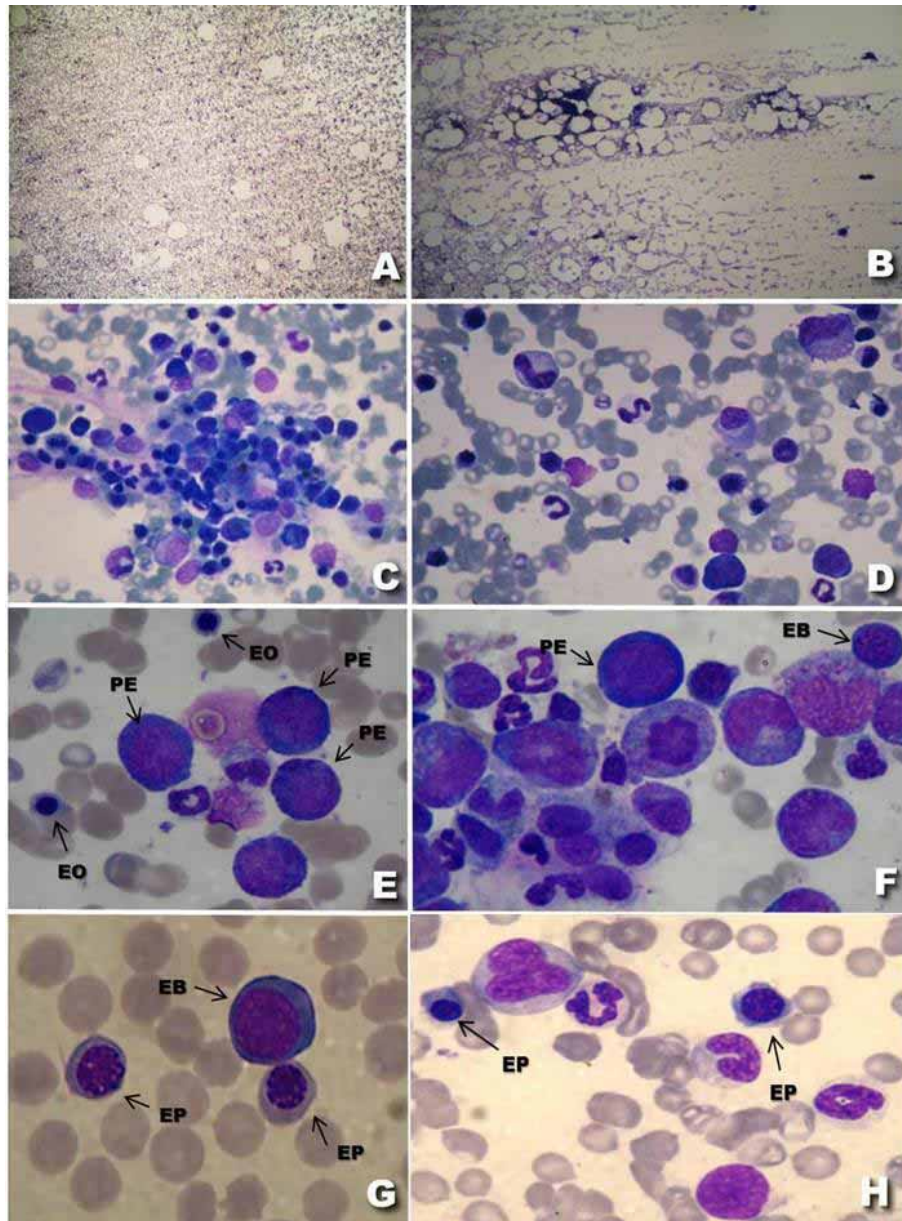
Quantitativamente, e utilizando-se de objetivas de imersão (aumento de 1000x) procederam-se as contagens absolutas de 500 precursores celulares das séries eritróide (proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos) e mielóide, e de outras células diferenciadas (linfócitos, plasmócitos e monócitos) e seus precursores (Figura 2), para enfim, estabelecer-se as contagens relativas e absolutas da população total eritróide, mielóide e de outras células diferenciadas, assim como o índice de maturação eritrocitária (EMI), relação mielóide eritróide (M:E) e relação dos precursores eritróide imaturos e maduros (I:Me) utilizadas para avaliação da eritropoiese, como apresentado na Tabela 4, justo a seguir.

**Tabela 4.** Cálculo das diferentes relações e índices para a investigação da eritropoiese.

|                     | FÓRMULA EMPREGADA                                                                                                        |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Relação M:E</b>  | Número de células mielóides (incluindo precursores eosinofílicos e basofílicos) / Número de células eritróides nucleadas |
| <b>Relação I:Me</b> | Número de proeritroblastos + eritroblastos basofílicos / Número de eritroblastos policromatófilos e ortocromáticos       |
| <b>EMI (1/I:Me)</b> | Número de eritroblastos policromatófilos e ortocromáticos/ Número de proeritroblastos + eritroblastos basofílicos        |

\* Adaptado de Mischke e Busse (2002). M:E, relação mielóide eritróide; I:Me, relação dos precursores eritróides imaturos e maduros; EMI, índice de maturação eritrocitária.

<sup>6</sup> MICROEM – Ribeirão Preto, SP/Brasil



**Figura 2.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea canina à microscopia de luz. Em **A** e **B** estão ilustrados monocamadas de hemácias, permeadas por precursores mielóides e eritróides, e importante componente adiposo (obj10x). Em **C** e **D** está destacada a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea (obj40x). Em **E**, **F**, **G** e **H** estão evidenciadas células precursoras eritróides e mielóides, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma e, em cujas ilustrações, diferentes estádios evolutivos eritrocitários estão identificados (seta): PE, proeritroblasto; EB, eritroblasto basofílico; EP, eritroblasto policromatófilico; EO, eritroblasto ortocromático (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.

### 3.8 Dosagens dos hormônios e citocinas séricos

Os testes pilotos e as dosagens de eritropoietina<sup>7</sup> e paratormônio<sup>8</sup>, bem como de IL-1 $\beta$ <sup>9</sup>, IL-3<sup>10</sup>, TNF $\alpha$ <sup>11</sup> e IFN $\gamma$ <sup>12</sup> foram conduzidas utilizando-se de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante, nas dependências do Laboratório Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP.

Os referidos *kits* são ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA sanduíche para determinações quantitativas *in vitro* de EPO, IL-1 $\beta$ , IL-3, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , e inibição competitiva para determinação do PTH no soro canino. As placas de microtitulações fornecidas nestes *kits* são pré-revestidas com anticorpos monoclonais específicos para cada variável. Resumidamente, padrões e amostras foram adicionados aos poços da placa de microtitulação com anticorpo policlonal conjugado à biotina. Em seguida, as microplacas foram incubadas após a adição do conjugado de avidina e peroxidase de rábano (HRP). Uma solução de substrato TMB foi adicionada a cada poço e apenas os poços que continham a variável analisada, anticorpo conjugado à biotina e enzima conjugada à avidina apresentaram mudança de cor. As reações foram finalizadas pela adição de uma solução de ácido sulfúrico e as mudanças de cor medidas espectrofotometricamente<sup>13</sup> em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações dos hormônios e citocinas séricos dos cães com DRC e do grupo controle foram, então, determinadas através de análises por regressão linear pela comparação das densidades ópticas (D.O.s) das amostras com as curvas padrões no momento das análises estatísticas.

A sensibilidade para os ensaios acima referidos, ou limite inferior de detecção (LLD), foi definida como a menor concentração de proteína que pode ser diferenciada a partir de zero (determinada a partir da média das D.O.s de 20 repetições do padrão zero e seus desvios-padrão). Nenhuma reatividade cruzada significativa ou interferência entre os parâmetros caninos e análogos foi observada

---

<sup>7</sup> E90028Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>8</sup> E90866Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>9</sup> E90563Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>10</sup> E0076Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>11</sup> E90133Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>12</sup> E90033Ca ELISA KIT, Uscn Life Science Inc., Wuhan, China.

<sup>13</sup> Leitora de microplacas, iMark, Bio-Rad, Japão.

nos kits utilizados de acordo com o fabricante. Os limites de detecção para PTH, IL-1 $\beta$ , IL-3, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e EPO foram 2,8 pg/mL, 7,3 pg/mL, 7,8 pg/mL, 13,8 pg/mL, 6,9 pg/mL e 0,042 U/L, respectivamente. A exemplo do trabalho realizado por Pereira et al. (1994), também neste caso, às amostras cujas concentrações encontraram-se abaixo do limite de detecção, atribuíram-se lhes valores equivalentes aos referidos limites de detecção.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância do programa estatístico JMP<sup>®</sup> (SAS) e GraphPad Prism software. Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e análise de via única ou teste de Friedman, com posterior avaliação pelo teste *t* student ou Tukey, quando mais de duas variáveis foram avaliadas. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. As correlações entre as concentrações dos fatores estimuladores e supressores da eritropoiese com as variáveis eritrocitárias periféricas e centrais, bem como com os marcadores bioquímico-séricos da funcionalidade renal, foram obtidas pelo teste de Pearson para as variáveis que se apresentaram normalmente distribuídas e pelo teste de Spearman para os dados não paramétricos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Provas de função renal

As variáveis utilizadas na definição do perfil bioquímico-sérico para fundamentação, avaliação e classificação dos pacientes portadores de DRC, de acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS), revelaram-se apropriadas, posto que os níveis de creatinina, ureia e fósforo sérico, revelaram-se significativamente, e gradativamente, crescentes com a progressão da doença quando comparados àqueles dos animais controle. Da mesma forma, a bioquímica urinária confirmou o crescente aumento da excreção fracionada do sódio, UPC e pressão arterial sistólica com a progressão do quadro nos pacientes com DRC e, por outro lado, valores compreendidos dentro do intervalo de normalidade para os controle ( $EFNa \leq 1\%$ ;  $UPC < 0,3$ ; PAS entre 120-160 mmHg). Adicionalmente, no caso da densidade urinária, ela também se manteve dentro do intervalo fisiológico para animais controle e significativamente reduzida nos animais acometidos por DRC (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores médios e desvios-padrão obtidos para o perfil morfofuncional renal em cães controle (CG) e doentes renais crônicos nos estágios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.

|                               | GC          | DRC2         | DRC3         | DRC4         | p                 |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <b>Creatinina</b> (mg/dL)     | 1,04±0,04a  | 1,79±0,06a   | 3,46±0,13b   | 7,33±0,97c   | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Ureia</b> (mg/dL)          | 29,93±3,61a | 93,61±9,47a  | 154,3±11,94b | 233,7±23,66c | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Fósforo</b> (mg/dL)        | 4,40±0,20a  | 4,52±0,36a   | 6,39±0,74ab  | 9,64±2,43b   | <b>0,0166</b>     |
| <b>Cálcio total</b> (mg/dL)   | 10,01±0,23  | 9,80±0,42    | 10,84±0,33   | 10,83±0,33   | 0,0792            |
| <b>Proteína total</b> (mg/dL) | 7,13±0,18   | 6,67±0,40    | 6,18±0,16    | 6,47±0,22    | 0,0719            |
| <b>Albumina</b> (mg/dL)       | 3,01±0,26   | 2,50±0,35    | 2,52±0,52    | 2,66±0,43    | 0,0667            |
| <b>DU</b>                     | 1,041±0,08a | 1,018±0,02b  | 1,013±0,03bc | 1,011±0,02c  | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>PAS</b> (mmHg)             | 133,8±7,44a | 172,5±13,09b | 184,4±30,41b | 193,6±34,73b | <b>0,0002</b>     |
| <b>UPC</b>                    | 0,07±0,01a  | 0,91±0,28ab  | 1,39±0,47b   | 1,39±0,28b   | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>EFNa</b> (%)               | 0,43±0,06a  | 0,94±0,11ab  | 3,16±0,74b   | 6,85±1,18c   | <b>&lt;0,0001</b> |

DU, densidade urinária; UPC, razão proteína/creatinina urinária; PAS, pressão arterial sistólica; EFNa, excreção fracionada de sódio. Variáveis seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre os grupos estudados ( $P < 0,05$ ).

## 4.2 Eritrograma e leucograma

Os dados obtidos para o eritrograma dos cães controle e naqueles acometidos por DRC evidenciaram que a severidade da anemia progride nos cães em estádios mais avançados da DRC, sendo tal severidade traduzida por valores significativamente decrescentes do hematócrito, hemoglobina e hemácias. A resposta reticulocitária afigurou-se como regenerativa no grupo DRC estágio 2 e arregenerativa nos demais estádios da doença renal (estádios 3 e 4 – contagens absolutas de reticulócitos abaixo de 50.000 céls/ $\mu$ L). Salienta-se que os índices eritrométricos VCM e CHCM apresentaram-se dentro da estreita faixa de normalidade para a espécie canina, achado que permite classificar, morfolologicamente, um estado de anemia normocítica normocrômica.

Por outro lado, ainda que não tenham sido verificados leucopenia e, tampouco, alterações nos valores absolutos de granulócitos e monócitos nos grupos estudados, observou-se significativa redução na contagem de linfócitos nos cães do estágio 4 da DRC quando comparado aos cães do grupo controle (Tabela 6).

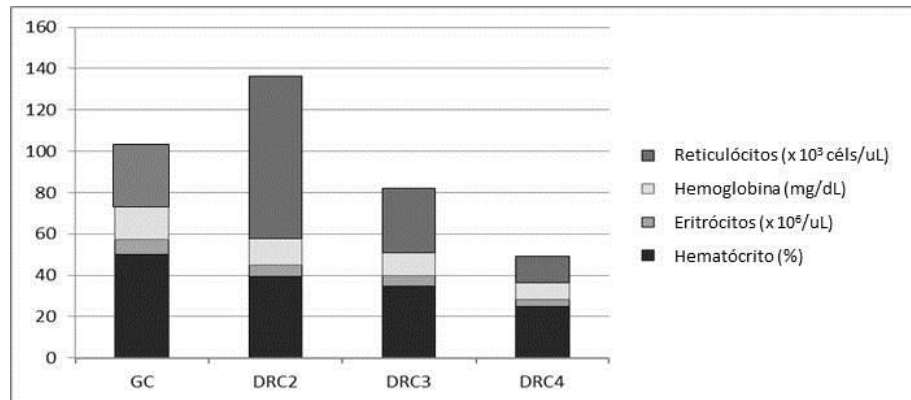
**Tabela 6.** Valores médios e desvios-padrão obtidos para o eritrograma e leucograma em cães controle (CG) e naqueles nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4) da doença renal crônica canina. Jaboticabal, 2014.

|                                                               | GC                  | DRC2                 | DRC3                | DRC4                | p                 |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| <b>ERITROGRAMA</b>                                            |                     |                      |                     |                     |                   |
| <b>Hematócrito (%)</b>                                        | 50,48 $\pm$ 4,36a   | 40,99 $\pm$ 7,80b    | 33,74 $\pm$ 5,88bc  | 28,87 $\pm$ 5,83c   | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Hemácias (<math>\times 10^9</math>/ <math>\mu</math>L)</b> | 7,27 $\pm$ 0,67a    | 5,99 $\pm$ 1,14b     | 4,88 $\pm$ 1,01bc   | 4,16 $\pm$ 1,01c    | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>                                     | 16,25 $\pm$ 1,98a   | 13,03 $\pm$ 2,45b    | 10,89 $\pm$ 1,57bc  | 9,11 $\pm$ 1,77c    | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Reticulócitos (céls/<math>\mu</math>L)</b>                 | 40.943 $\pm$ 7.887a | 94.606 $\pm$ 22.973b | 39.824 $\pm$ 7.929a | 20.138 $\pm$ 8.102a | <b>0,0033</b>     |
| <b>VCM (fL)</b>                                               | 69,49 $\pm$ 3,02    | 68,41 $\pm$ 3,71     | 69,47 $\pm$ 3,92    | 69,88 $\pm$ 3,97    | 0,8766            |
| <b>CHCM (g/dL)</b>                                            | 32,10 $\pm$ 1,40    | 31,79 $\pm$ 1,17     | 32,41 $\pm$ 1,35    | 31,62 $\pm$ 1,08    | 0,6424            |
| <b>LEUCOGRAMA</b>                                             |                     |                      |                     |                     |                   |
| <b>Leucócitos totais (céls/<math>\mu</math>L)</b>             | 9.425 $\pm$ 2.801   | 9.388 $\pm$ 2.524    | 7.700 $\pm$ 2.584   | 7.000 $\pm$ 1.971   | 0,1718            |
| <b>Monócitos (céls/ <math>\mu</math>L)</b>                    | 375,5 $\pm$ 91,30   | 265,1 $\pm$ 52,01    | 168,4 $\pm$ 30,84   | 211,6 $\pm$ 70,40   | 0,1442            |
| <b>Granulócitos (céls/ <math>\mu</math>L)</b>                 | 7.653 $\pm$ 2.944   | 7.135 $\pm$ 2.322    | 6.136 $\pm$ 2.109   | 6.084 $\pm$ 2.265   | 0,5180            |
| <b>Linfócitos (céls/ <math>\mu</math>L)</b>                   | 1.615 $\pm$ 199,1a  | 1.374 $\pm$ 141,7ab  | 1.180 $\pm$ 119,8ab | 811,4 $\pm$ 115,3b  | <b>0,0127</b>     |

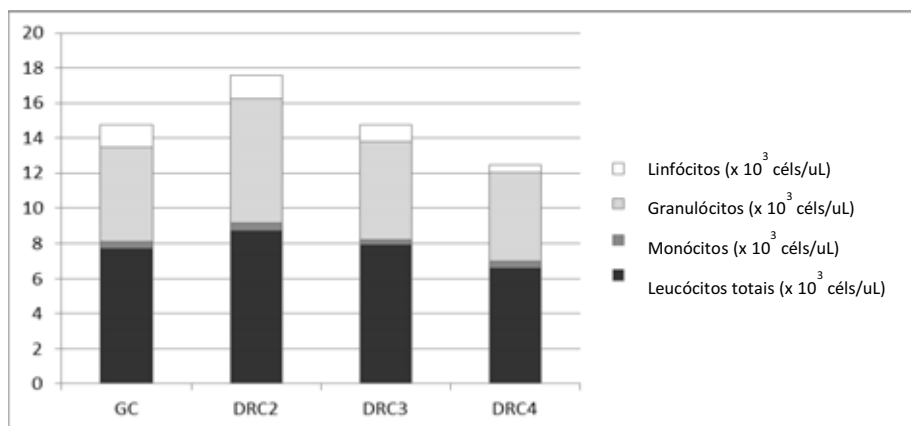
Variáveis seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre os grupos estudados ( $P < 0,05$ ).



Para melhor visibilização do comportamento das variáveis hematológicas, cujos valores médios foram obtidos de cães controle e daqueles acometidos por DRC, vide as Figuras 3 e 4, apresentadas a seguir.



**Figura 3.** Representação gráfica dos valores médios do eritrograma dos cães controle (GC) e doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4(DRC4). Jaboticabal, 2014.



**Figura 4.** Representação gráfica dos valores médios do leucograma dos cães controle (GC) e dos doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4(DRC4). Jaboticabal, 2014.

### 4.3 Citologia da medula óssea

Qualitativamente, as medulas dos animais controle apresentaram-se predominantemente com padrão normocelular (70%). Houve predomínio de medulas hipocelulares em todos os grupos de DRC, sendo esta leve em 62.5% dos DRC2, moderada em 37.5% dos DRC3 e severa em 62.5% dos DRC4. Ademias, não foi observado nenhum grau de mielodisplasia em nenhum cão deste estudo.

A população de precursores mielóides foi quantificada em sua totalidade, enquanto a linhagem eritróide foi quantificada em sua totalidade e quanto à ordem de maturação de seus precursores (proeritroblastos, eritroblastos basofílicos, policromatófilicos e ortocromáticos). Tais variáveis acrescidas dos cálculos dos índices e relações importantes à avaliação da eritropoiese podem ser apreciados na Tabela 7.

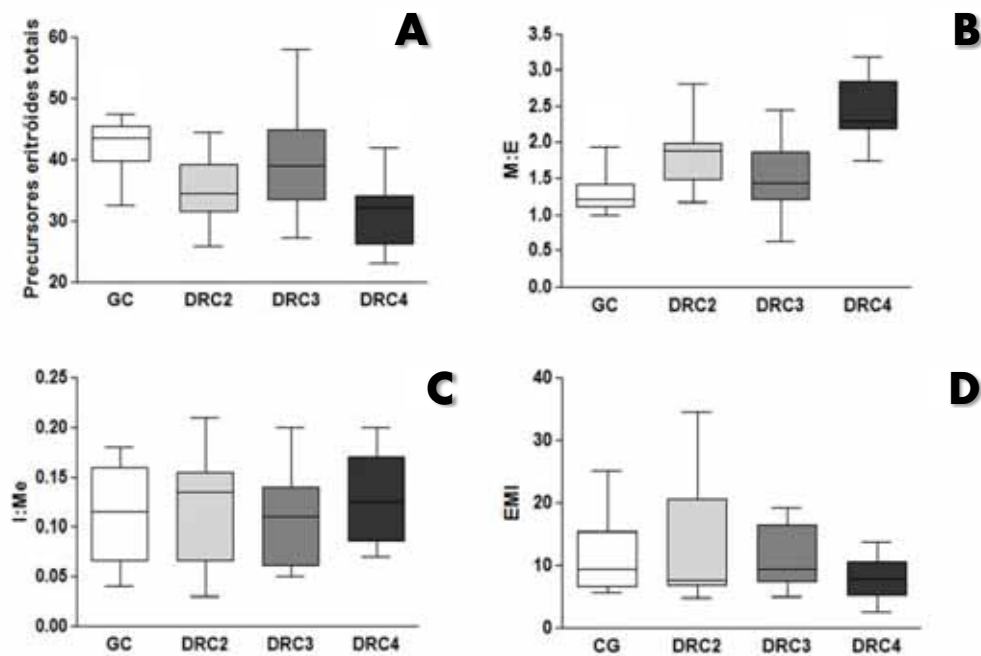
**Tabela 7.** Valores médios e desvios-padrão obtidos para as variáveis citológicas da medula óssea com vistas à avaliação da eritropoiese em cães controle (CG) e naqueles nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4), da doença renal crônica canina. Jaboticabal, 2014.

|                                         | GC          | DRC2         | DRC3         | DRC4        | <i>p</i>      |
|-----------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
| Proeritroblastos (%)                    | 0,49±0,15   | 0,69±0,19    | 0,58±0,16    | 1,37±0,62   | 0,2820        |
| Eritroblastos basofílicos (%)           | 2,32±0,57   | 3,94±0,69    | 3,88±0,78    | 2,58±0,36   | 0,1590        |
| Eritroblastos Policromatófilicos (%)    | 32,73±1,78a | 26,92±2,63ab | 28,74±1,90ab | 20,93±2,63b | <b>0,0201</b> |
| Eritroblastos Ortocromáticos (%)        | 5,90±0,42a  | 3,63±0,73ab  | 3,42±0,59b   | 3,52±0,56b  | <b>0,0181</b> |
| Total de Precursores Eritróides (%)     | 42,02±1,71a | 33,20±3,47ab | 39,84±3,35ab | 28,86±3,19b | <b>0,0170</b> |
| Total de Precursores Mielóides (%)      | 55,08±1,40  | 61,55±2,29   | 55,52±3,24   | 62,40±2,47  | 0,0790        |
| Relação M:E                             | 1,25±0,05a  | 1,63±0,13ab  | 1,49±1,12ab  | 2,79±0,46b  | <b>0,0009</b> |
| Relação I:Me                            | 0,11±0,05   | 0,11±0,06    | 0,11±0,05    | 0,12±0,04   | 0,9592        |
| Índice de maturação eritrocitária (EMI) | 11,54±2,44  | 13,55±4,23   | 10,82±1,96   | 7,86±1,35   | 0,5745        |

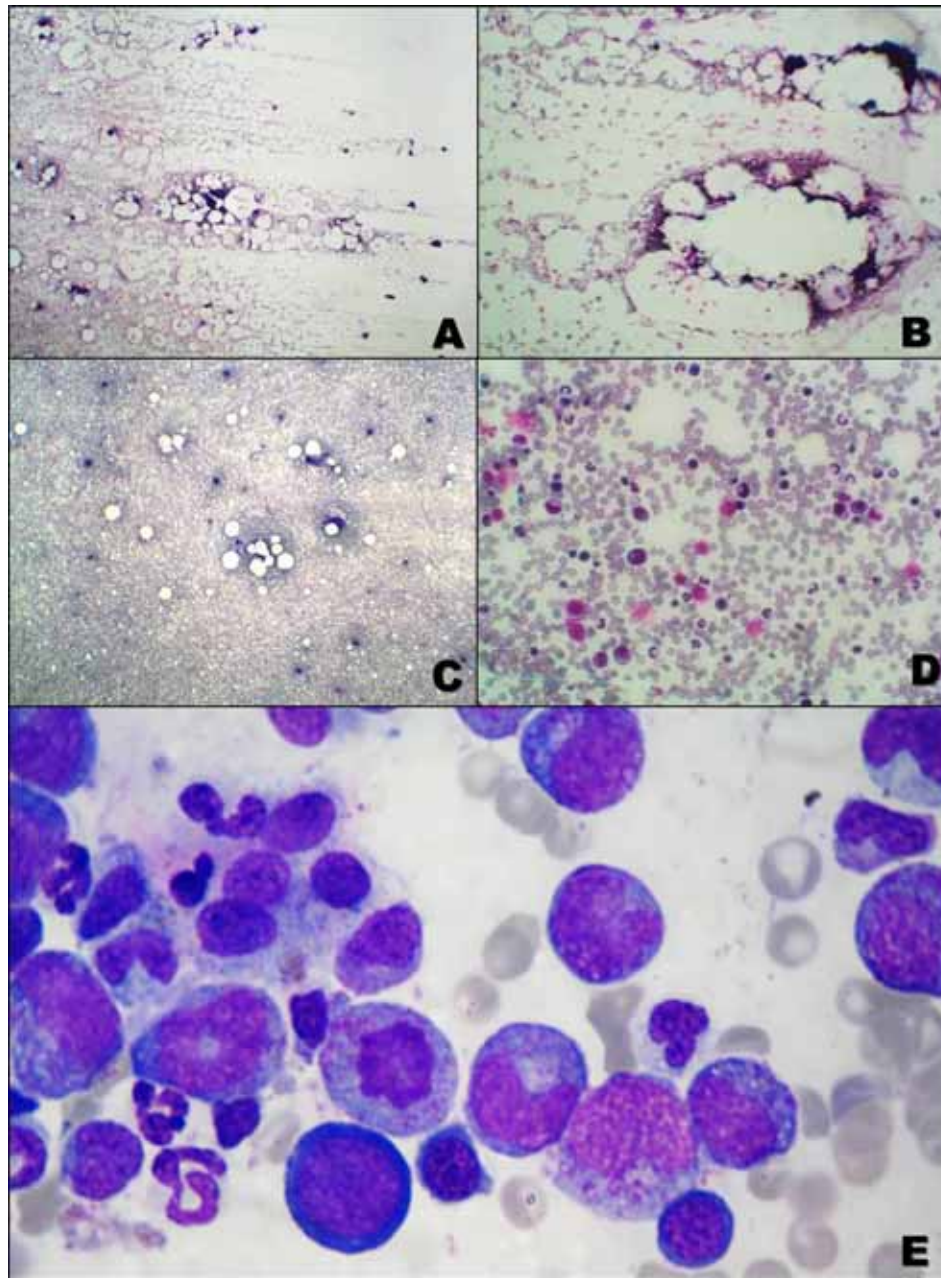
Variáveis seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre os grupos estudados ( $P<0,05$ ).

Verifica-se que houve redução no número de eritroblastos policromatófilicos, nos cães do grupo DRC4, assim como na população eritróide global, fato que corrobora o aumento crescente da relação M:E. A eritropoiese foi complementarmente avaliada por intermédio do índice de maturação eritróide (EMI – do inglês *erythroid maturation index*) e da relação dos precursores eritróides

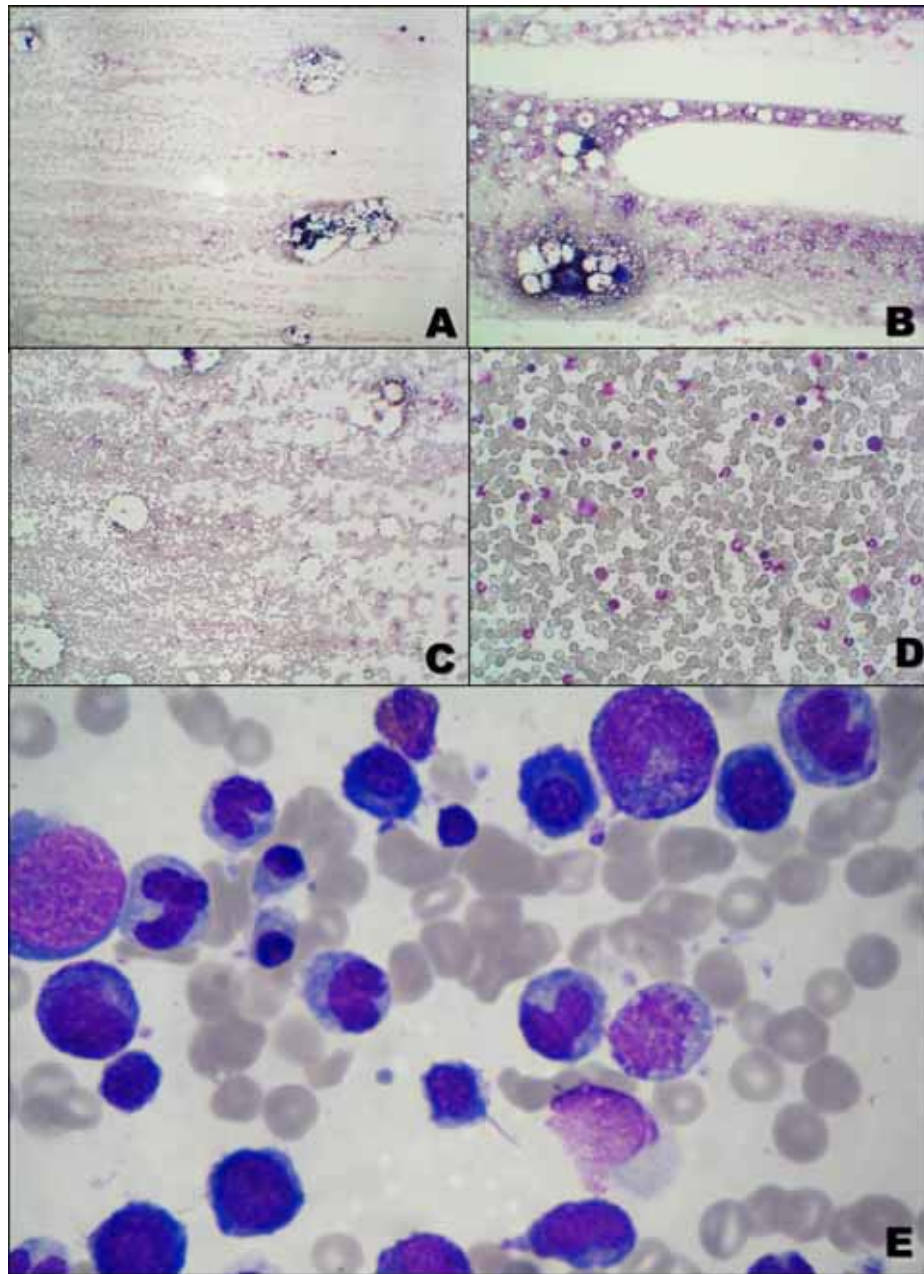
imaturos e maduros (I:Me). Neste sentido, embora de forma não significativa pôde-se observar redução relativa dos valores médios do EMI e aumento do I:Me nos cães em estágio terminal da DRC, quando comparados aos cães dos demais grupos. A distribuição das células precursoras eritrocitárias, bem como do comportamento dos índices eritrocitários de maturação podem ser melhor observados nas representações gráficas da mediana e dos intervalos interquartis que se seguem (Figura 5), quanto nas Figuras 6, 7, 8 e 9.



**Figura 5.** Representações gráficas (mediana e intervalos interquartis) dos percentuais de precursoras eritróides (**A**), relação mielóide/eritróide (M:E) (**B**), relação de precursoras eritróides imaturos e maduros (I:Me) (**C**) e índice de maturação eritrocitário (EMI) (**D**) dos cães controle e com doença renal crônica nos estádios 2 (DRC2), e (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.

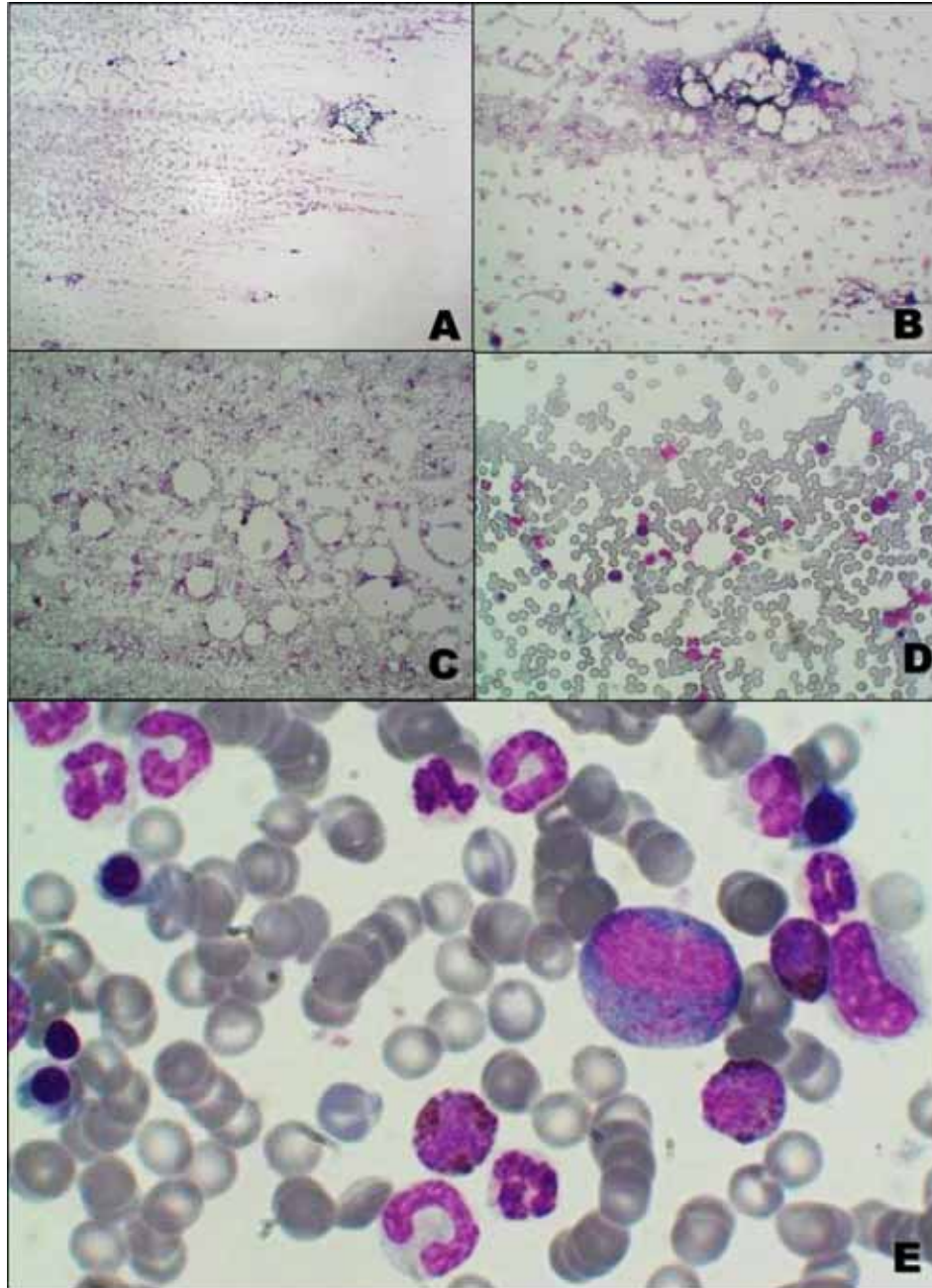


**Figura 6.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo controle à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em **A** (obj4x) e **B** (obj10x). O corpo da lâmina está representado em **C** (obj4x) e **D** (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em **E**, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.

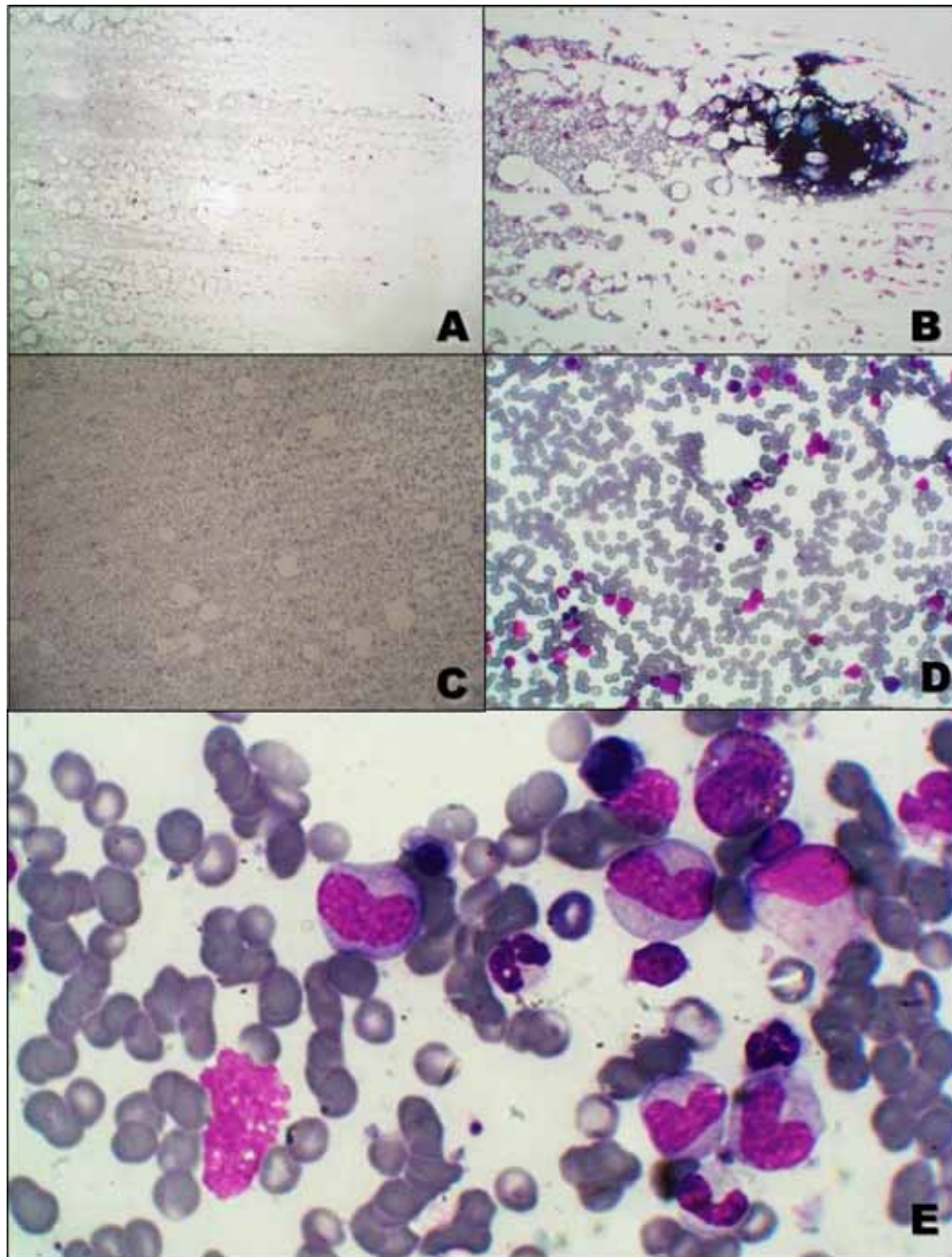


**Figura 7.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC2 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em **A** (obj4x) e **B** (obj10x). O corpo da lâmina está representado em **C** (obj4x) e **D** (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em **E**, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.





**Figura 8.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC3 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em **A** (obj4x) e **B** (obj10x). O corpo da lâmina está representado em **C** (obj4x) e **D** (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em **E**, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.



**Figura 9.** Fotomicrografias de aspirado de medula óssea de um exemplar do grupo DRC4 à microscopia de luz. Ilustrações da franja do esfregaço medular estão representadas em **A** (obj4x) e **B** (obj10x). O corpo da lâmina está representado em **C** (obj4x) e **D** (obj40x), destacando, nesta última, a monocamada de hemácias, formando visíveis cordões, e deixando antever a proporcionalidade e a distinção no padrão de cromatina das células precursoras eritróides e mielóides da medula óssea. Em **E**, estão evidenciadas as células precursoras eritróides e mielóides em grande aumento, na qual se estabelece a quantificação das células medulares com vistas à obtenção do mielograma (obj100x). Coloração May-Grünwald-Giemsa. Jaboticabal, 2014.

#### 4.4 Fatores indutores e supressores da eritropoiese

Na avaliação dos fatores considerados supressores da eritropoiese pode-se verificar aumento nas concentrações de PTH e TNF $\alpha$  nos cães do grupo DRC4 quando comparados àqueles do grupo controle, enquanto as concentrações de IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. Ademais, nenhuma alteração significativa foi verificada com relação aos fatores considerados indutores da eritropoiese, embora se possa admitir uma tendência à redução das concentrações de EPO e IL-3 à medida que ocorre a progressão da DRC (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores médios e desvios-padrão obtidos para os fatores indutores (EPO e IL-3) e supressores (PTH, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) da eritropoiese avaliados em cães controle (GC) e doentes renais crônicos nos estádios 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4). Jaboticabal, 2014.

|                                       | GC                | DRC2                | DRC3                | DRC4               | <i>p</i>     |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| <b>EPO</b> (U/L)                      | 1,83 $\pm$ 0,33   | 1,81 $\pm$ 1,09     | 1,24 $\pm$ 0,44     | 1,15 $\pm$ 0,29    | 0,783        |
| <b>IL-3</b> (pg/dL)                   | 13,42 $\pm$ 1,04  | 12,02 $\pm$ 0,64    | 12,00 $\pm$ 0,49    | 10,72 $\pm$ 0,72   | 0,143        |
| <b>PTH</b> (pg/dL)                    | 2,80 $\pm$ 0,00a  | 7,43 $\pm$ 2,62ab   | 12,85 $\pm$ 7,04ab  | 31,06 $\pm$ 11,91b | <b>0,026</b> |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/dL) | 8,74 $\pm$ 0,51   | 10,23 $\pm$ 0,80    | 9,96 $\pm$ 0,85     | 9,75 $\pm$ 0,46    | 0,391        |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> (pg/dL) | 11,06 $\pm$ 2,40a | 58,43 $\pm$ 10,16ab | 35,34 $\pm$ 16,00ab | 92,20 $\pm$ 26,82b | <b>0,009</b> |
| <b>IFN<math>\gamma</math></b> (pg/dL) | 27,99 $\pm$ 5,16  | 23,96 $\pm$ 5,85    | 22,80 $\pm$ 4,43    | 22,03 $\pm$ 5,63   | 0,865        |

Variáveis seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre os grupos estudados ( $P < 0,05$ ).

As concentrações séricas de creatinina apresentaram correlação positiva com o PTH ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,6409$ ) e com o TNF $\alpha$  ( $P = 0,0069$ ;  $r = 0,4755$ ), e negativa com a hemoglobina ( $P < 0,0001$ ;  $r = -0,6628$ ), reticulócitos ( $P = 0,0122$ ;  $r = -0,4518$ ) e com a interleucina 3 ( $P < 0,0177$ ;  $r = -0,4961$ ).

Com exceção da interleucina 1 beta, os demais fatores supressores e indutores da eritropoiese apresentaram graus variados de correlação com as variáveis citológicas da medula óssea, as quais se relacionam diretamente com a eritropoiese. Houve correlação positiva dos níveis de eritropoietina com os valores relativos e absolutos encontrados para os eritroblastos policromatófilicos ( $P = 0,0472$ ;  $r = 0,4091$ ) e com o Índice de Maturação Eritróide - EMI ( $P = 0,0228$ ;  $r = 0,4627$ ). De outra parte a IL-3 apresentou correlação positiva com os eritroblastos basofílicos ( $P = 0,0143$ ;  $r = 0,5518$ ). Já, os níveis de PTH correlacionaram-se negativamente com aqueles obtidos para taxa de hemoglobina ( $P = 0,0124$ ,  $r = -0,5126$ ), reticulócitos



( $P=0,0499$ ;  $r=-0,3477$ ), eritroblastos policromatófilicos ( $P=0,0359$ ;  $r=-0,4302$ ) e precursores eritróides totais ( $P=0,0383$ ;  $r=-0,4252$ ), bem como relação mielóide: eritróide M:E ( $P=0,0320$ ;  $r=-0,4388$ ). Adicionalmente, os níveis séricos de  $\text{TNF}\alpha$  correlacionaram-se negativamente com as taxas de hemoglobina ( $P=0,0268$ ,  $r=-0,4611$ ), número de eritroblastos ortocromáticos ( $P=0,0261$ ;  $r=-0,4357$ ). Por outro lado, os níveis de  $\text{IFN}\gamma$  apresentaram correlação negativa com os eritroblastos policromatófilicos ( $P=0,0131$ ;  $r=-0,4803$ ), Índice de Maturação Eritróide-EMI ( $P=0,0336$ ;  $r=-0,4180$ ), contagem total de precursores eritróides ( $P=0,0374$ ;  $r=-0,4102$ ), assim como com os precursores mielóides totais ( $P=0,0131$ ;  $r=-0,4801$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Esta tese teve como principal enfoque verticalizar o estudo da anemia de caninos portadores de doença renal crônica, posto que, mesmo tratando-se de tema mundialmente conhecido, a origem multifatorial do estado anêmico em vários mamíferos, inclusive no homem, e particularmente no cão, ainda suscita muitos questionamentos. Assim, tomando por base a hipótese de que a dinâmica dos hormônios e citocinas supressores e indutores da eritropoiese esteja alterada nos cães com DRC, foi aventada a possibilidade de se avaliar as concentrações dos hormônios EPO, PTH, bem como das citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  e interleucinas 3 e 1 $\beta$ , e de se estabelecer correlações entre tais fatores e diferentes variáveis eritrocitárias obtidas por intermédio do hemograma e do mielograma.

Foram verificados que os níveis séricos obtidos para os fatores IL-3 e IFN $\gamma$  não diferiram na comparação entre cães controle e aqueles em diferentes estádios da DRC. Da mesma forma, não foram verificadas diferenças com relação às contagens relativas e absolutas de proeritroblastos (PE) e eritroblastos basofílicos (EB). Levando-se em consideração que o IFN $\gamma$  tem sido apontado, dentre as citocinas, como um dos mais potentes inibidores da proliferação das CFU-E e das BFU-E (MUTA; KRANTZ, 1993; DAI; KRANTZ, 1999; CHOI et al., 2000) e que a interleucina 3 é um fator de crescimento hematopoiético de multilinhagens, atuando principalmente nas fases iniciais da hematopoiese em sinergismo com outras citocinas (McCUBREY et al., 1991; PRCHAL, 2010; AKDIS et al., 2011), conjectura-se que estes dois fatores não estejam particularmente envolvidos na gênese da anemia da DRC, e que a causa da hipoplasia eritróide não está diretamente relacionada ao desbalanço dos compartimentos de precursores eritróides imaturos.

Em contrapartida, verificou-se correlação negativa evidenciada por aumento sérico de PTH e TNF $\alpha$  e redução significativa nas contagens relativas e absolutas de eritroblastos policromatófílicos (EP) e ortocromáticos (EO) nos cães do grupo DRC4, observando-se inclusive que estes últimos já se encontravam reduzidos desde o estágio 3 da DRC. Tais achados alertam para o fato de que a exacerbação do processo inflamatório não participe apenas periféricamente, por meio das manifestações da uremia (YILMAZ et al., 2011), mas também interferindo no

processo proliferativo e de amadurecimento dos precursores eritróides, em face da DRC, reduzindo diretamente a população de precursores eritróides por força de uma ação hipoproliferativa. Outra questão que merece consideração é a possível diminuição da resposta dos receptores à EPO, em decorrência do processo inflamatório crônico e pelo excesso de PTH, como já observado *in vitro* (RAO; SHIH; MOHINI, 1993; MCDUGALL, 1995; MACDOUGALL, 2001; YILMAZ et al., 2011), já que não tem sido, convincentemente, documentada diminuição significativa da concentração de EPO, em cães com DRC. Nesta mesma linha de raciocínio e argumentação, outra evidência que dá suporte à teoria de resistência à EPO é o fato dos cães com DRC, e portadores de quadros graves de anemia, responderem, pelo menos temporariamente, à terapia de suplementação com eritropoietina (LANGSTON; REINE; KITTRELL, 2003; WAKI et al., 2010; POLZIN, 2011). Assim sendo, os resultados aqui obtidos apontam para o fato de que a anemia, nos estádios finais da DRC, esteja muito mais correlacionada à redução da resposta dos precursores eritróides à EPO do que propriamente à concentração sérica da EPO.

Apesar de tais indícios, não se pode ignorar a influência dos efeitos supressivos do TNF $\alpha$  sobre as células produtoras de EPO, como já descrito *in vitro* (BÉGUIN, 1992; CORAZZA et al., 1998; OZGUROGLU et al., 2000), bem como a relativa redução da capacidade de produção de EPO pela diminuição da massa funcional renal (POLZIN, 2011) e, além do mais, o fato de que a resposta das células eritróides à EPO ser altamente dependente do suprimento adequado de nutrientes, especialmente de ferro e vitaminas, condição geralmente prejudicada em pacientes com anemia da doença crônica (RODRIGUEZ et al., 2001) e cães com DRC (MCCOWN; SPECHT, 2011). Tais assertivas corroboram a origem da anemia normocítica normocrômica arregenerativa na DRC, apresentando-se inclusive como justificativas plausíveis à razão pela qual as concentrações de EPO em cães com DRC não se elevam com o advento da hipóxia renal, como esperado diante do quadro de anemia (BONAGURA, 1992; STRAIT; LATIMER; TARPLEY, 2005).

Terapias à base de eritropoietina tem sido indicadas a pacientes nos estádios 3 e 4 da DRC e que já apresentam diminuição significativa das variáveis eritrométricas, e que cujo quadro clínico exteriorize sinais atribuíveis à anemia, tais como hiporexia, letargia e fraqueza (POLZIN et al., 2005; MAY; LANGSTON, 2006;

NELSON; COUTO, 2009; POLZIN, 2011). Os resultados aqui obtidos, analisados e devidamente interpretados, evidenciaram que apesar da eritropoietina ser apontada na literatura como a principal vilã no desencadeamento da anemia na DRC, os fatores supressores PTH e TNF $\alpha$  são importantes coadjuvantes, atuando não somente na síndrome urêmica, mas provavelmente participando ativamente da gênese da hipoplasia eritróide na medula óssea de cães com DRC. Ademais, contrariando os insistentes informes de literatura, segundo os quais os anticorpos anti-EPO exógena devem ocupar uma posição central no universo de preocupações no tratamento da DRC, tanto em humanos (MACDOUGALL; COOPER, 2002) quanto em animais (NELSON; COUTO, 2009; POLZIN, 2011), acredita-se que estratégias utilizando-se de terapias adjuvantes anti-citocinas, especialmente anti-TNF $\alpha$ , possam ser úteis à redução da resistência à EPO e aos demais efeitos deletérios das citocinas proinflamatórias durante o tratamento da anemia de caninos portadores de DRC.

Embora não tenha sido observada anemia nos cães do grupo DRC2, sugere-se a possibilidade de que as agressões ao sistema hematopoiético já se iniciam nesta fase, dado aumento significativo da contagem absoluta de reticulócitos no sangue periférico. Entretanto, os resultados obtidos com a avaliação das concentrações dos fatores supressores e indutores da eritropoiese não foram suficientes para justificar tal ocorrência. O mesmo pode-se dizer da avaliação da medula óssea, cujas importantes alterações foram verificadas, principalmente, nos cães em estado mais avançado da DRC. Dentre as possibilidades, acredita-se que exista uma maior participação de lesões do trato gastrointestinal gerando a perda de sangue (POLZIN; OSBORNE, 1995; POLZIN, 2011) as quais, por sua vez, podem ser agravadas pelo defeito na adesão plaquetária ao subendotélio vascular (CASTILLO et al., 1986). Além do fenômeno acima referido, a literatura descreve que a modificação na proporção de fosfolípidos e colesterol na membrana dos eritrócitos, promova aumento da fragilidade osmótica eritrocitária - FOE e diminuição da meia-vida dos eritrócitos (AKMAL et al., 1985; SILVA, 2006). Estes resultados suscitaram investigações mais aprofundadas a cerca das perdas sanguíneas ocultas em cães com DRC, e embora estes sejam dados inéditos e ainda não publicados por este grupo de pesquisa, constatou-se que as perdas sanguíneas pelo trato

gastrointestinal têm início já a partir do estágio 2 da DRC e acentuam-se a medida que a DRC evolui.

Mesmo não tendo sido um dos objetivos deste estudo, verificou-se significativa redução nas contagens de linfócitos nos pacientes com DRC estágio 4. Utilizando-se de imunofenotipagem celular por meio da técnica de citometria de fluxo, a linfopenia em cães, severamente azotêmicos, já havia sido previamente documentada por Kralova, Leva e Toman (2010) e Borin-Crivellenti et al. (2014), corroborando a vulnerabilidade imunológica dos cães em estádios mais avançados da DRC e elicitando a necessidade de avaliação do quadro leucocitário periférico destes animais.

Os resultados deste ensaio contemplam pela primeira vez a descrição detalhada da população eritróide de cães portadores de DRC nas diversas fases da doença. Modificações na hematopoiese têm sido comumente associadas a infecções crônicas por patógenos virais, bacterianos e protozoários, tais como *Murine Cytomegalovirus*, *Salmonella Typhimurium* (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000), e *Leishmania* sp. (ABREU et al. 2011). Ainda que alguns estudos precedentes contemplem parâmetros e índices medulares aqui avaliados, a comparação dos resultados obtidos neste experimento com aqueles de outros autores fica comprometida ao considerar-se que a origem da anemia da doença renal crônica é multifatorial, na qual destacam-se a participação das toxinas urêmicas, da inflamação crônica e da deficiência no aporte de nutrientes necessários à eritropoiese (YILMAZ et al., 2011; POLZIN, 2011; MCCOWN; SPECHT, 2011). Dentre os índices avaliados, a relação M:E é considerada um importante componente da avaliação da medula óssea, e juntamente com a celularidade global e o hemograma, permite avaliar se a eritropoiese e/ou granulopoiese estão hipoplásicas, normais ou hiperplásicas (TYLER et al., 2009). Neste experimento, observou-se que os cães com anemia severa decorrente da DRC apresentaram elevações significativas na relação M:E em face da hipoplasia da série eritróide, sem comprometimento da linhagem mielóide.

No caso da punção aspirativa de medula óssea com vistas à obtenção do mielograma, procurou-se adotar as estratégias utilizadas em estudos anteriores (BORIN, 2011; BORIN-CRIVELLENTI et al., 2014), cuja escolha de acesso recaiu no

osso esterno, sob anestesia local, com base em dois fundamentos principais: primeiramente, pelo fato de cães com DRC serem considerados pacientes ASA 4 pela Sociedade Americana de Anestesiologia, ou seja, pacientes portadores de doença sistêmica grave que configura-se como uma ameaça constante à vida, e cuja realização de anestesia geral está contraindicada (FLEISHER, 2005); e, em segundo lugar, em razão das amostras de medula óssea obtidas do esterno serem equivalentes em qualidade às obtidas na crista ilíaca e úmero de cães saudáveis (DEFARGES et al., 2013). Em tais manobras de obtenção de fragmentos de medula óssea, foi verificado que os cães toleraram bem o procedimento e as amostras obtidas do esterno apresentaram excelente qualidade para confecção dos esfregaços sanguíneos, sua coloração e exames quali-quantitativos. Ademais, considerando-se a complexidade da execução do mielograma, os resultados obtidos neste ensaio permitem sugerir que a avaliação da medula óssea, com fito de se proceder às contagens globais dos diferentes precursores eritróides e mielóides para obtenção da relação M:E, seja realizada estritamente diante de pacientes severamente anêmicos e que não se enquadrem no estágio da DRC, segundo variáveis de classificação estabelecidas pela IRIS (2009), ou ainda quando se queira acompanhar a terapia com eritropoietina.

## 6. CONCLUSÕES

Tomando-se como base as condições de realização deste ensaio e em função dos resultados aqui alcançados, conclui-se que:

- As concentrações séricas dos fatores indutores e supressores da eritropoiese, assim como os resultados do mielograma dos cães do DRC2 assemelharam-se aos do grupo controle.
- A constatação de reticulocitose no grupo DRC2 alerta para o fato de fatores externos a medula óssea podem estar precocemente causando perda ou destruição dos eritrócitos.
- A anemia em cães com DRC está relacionada ao aumento nas concentrações de PTH e TNF $\alpha$ , e a exacerbação dos referidos fatores supressores, bem como a hipoplasia da série eritróide, representada principalmente pela redução da população de eritroblastos policromatófilicos e ortocromáticos, constituem, parcialmente, a base da gênese e do agravamento do estado anêmico nas fases mais avançadas da DRC em cães.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, R. T.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; OLIVEIRA, R. C.; REIS, A. B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2011.

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMARES, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTZIK, A.; VAN DE VEEN, W.; ZELLER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 127, n. 3, p. 701-21, 2011.

AKMAL, M.; TELFER, N.; ANSARI, A. N.; MASSRY, S. G. Erythrocyte survival in chronic renal failure. Role of secondary hyperparathyroidism. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 76, n. 4, p. 1695-1698, 1985.

BÉGUIN, Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. **Haematologica**, Pavia, v. 77, n. 1, p. 1-10, 1992.

BONAGURA, J. D. Moléstia cardíaca congênita. In: ETTINGER, S. J. (Ed.) **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Moléstias do Cão e do Gato**. São Paulo: Manole, 1992. p. 1026-1082.

BORIN, S. **Estudo da hipoplasia sanguínea e quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> no sangue e na medula óssea de cães com doença renal crônica**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

BORIN-CRIVELLENTI, S.; CRIVELLENTI, L. Z.; CARVALHO, M. B.; SANTANA, A. E. Bone marrow cytological evaluation in dogs with chronic kidney disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 6, p. 1751-1756, 2014.



CAR, B. D. Erythropoiesis and erythrokinetics. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN N. C. (Eds.) **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 18, p. 105-109.

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

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

CHOI, I.; MUTA, K.; WICKREMA, A.; KRANTZ, S. B.; NISHIMURA, J.; NAWATA, H. Interferon gamma delays apoptosis of mature erythroid progenitor cells in the absence of erythropoietin. **Blood**, New York, v. 95, n. 12, p. 3742-3749, 2000.

CORAZZA, F.; BEGUIN, Y.; BERGMANN, P.; ANDRE, M.; FERSTER, A.; DEVALCK, C.; FONDU, P.; BUYSE, M.; SARIBAN, E. Anemia in children with cancer is associated with decreased erythropoietic activity and not with inadequate erythropoietin production. **Blood**, New York, v. 92, n. 5, p. 1793-1798, 1998.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1840-1848, 2000.

DAI, C.; KRANTZ, S. Interferon g induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. **Blood**, New York, v. 93, n. 10, p. 3309-3316, 1999.

DEFARGES, A.; ABRAMS-OGG, A.; FOSTER, R. A.; BIENZLE, D. Comparison of sternal, iliac, and humeral bone marrow aspiration in Beagle dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 42, n. 2, p. 170-176, 2013.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, New York, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C. A. Cytokines: agents provocateurs in hemodialysis? **Kidney International**, New York, v. 41, n. 3, p. 683-694, 1992.

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

FINCO, D. R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. (Eds.) **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 29-46.

FLEISHER, L. A. Preoperative assessment of the patient with cardiac disease. **ASA Newsletter**, Park Ridge, v. 33, n. 1, p. 79-88, 2005.

GIGER, U. Erythropoietin and its clinical use. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yardley, v. 14, p. 25-34, 1992.

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

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

KOURY, M. J.; BONDURANT, M. C. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 137, n. 1, p. 65-74, 1988.

KRALOVA, S.; LEVA, L.; TOMAN, M. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 74, n. 2, p. 124-129, 2010.

LANGSTON, C. E.; REINE, N. J.; KITTRELL, D. The use of erythropoietin. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 1245-1260, 2003.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, p. 867, 2004.

MACDOUGALL, I. C. Poor response to erythropoietin: practical guidelines on investigation and management. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 607-614, 1995.

MACDOUGALL, I. C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney International**, New York, v. 59, n. 78, p. 67-72, 2001.

MACDOUGALL, I. C.; COOPER, A. The inflammatory response and epoetin sensitivity. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association**, Oxford, v. 17, n. 1, p.48–52, 2002.

MASSRY, S. G.; GOLDSTEIN, D. A. The search for uremic toxin(s) "X" "X"=PTH. **Clinical Nephrology**, New York, v. 11, p. 181-189, 1979.

MAY, S. N.; LANGSTON, C. E. Managing chronic renal failure. **Compendium on Continuing Education for The Practising Veterinarian-North American Edition**, v. 28, n. 2, p. 853-864, 2006.

McCOWN, J. L.; SPECHT, A. J. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 47, n. 3, p. 151-160, 2011.

McCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; MAYO, M. W.; ALGATE, P. A.; DELLOW, R. A.; KALEKO, M. Growth-promoting effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hematopoietic cells: overexpression of introduced IGF-1 receptor abrogates interleukin-3 dependency of murine factor-dependent cells by a ligand-dependent mechanism. **Blood**, New York, v. 78, n. 4, p. 921-929, 1991.

MEANS JUNIOR, R. T. Advances in the anemia of chronic disease. **International Journal of Hematology**, Amsterdam, v. 70, n.1, p. 7-12, 1999.

MEYTES, D.; BOGIN, E.; MA, A.; DUKES, P. P.; MASSRY, S. G. Effect of parathyroid hormone on erythropoiesis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 67, n. 5, p. 1263-1269, 1981.

MISCHKE, R.; BUSSE, L. Reference values for the bone marrow aspirates in adult dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 49, n. 10, p. 499–502, 2002.

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

MUTA, K.; KRANTZ, S. B. Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 156, n. 2, p. 264-271, 1993.

NELSON, R. W.; COUTO, G. C. **Small Animal Internal Medicine**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2009. p. 645-659.

OHLS, R. K.; CHRISTENSEN, R. D.; LIECHTY, K. W.; TURNER, M. C.; KIMURA, R. E. Erythroid "burst promoting" activity in serum of patients with the anemia of prematurity. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 116, n. 5, p.786-789, 1990.

OZGUROGLU, M.; ARUN, B.; DEMIR, G.; DEMIRELLI, F.; MANDEL, N. M.; BUYUKUNAL, E.; SERDENGECTI, S.; BERKARDA, B. Serum erythropoietin level in anemic cancer patients. **Medical Oncology**, Northwood, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2000.

PEREIRA, B. J. G.; SHAPIRO, L.; KING, A. J.; FALAGAS, M. E.; STROM, J. A.; DINARELLO, C. A. Plasma levels of IL-1 bold beta, TNF alpha and their specific inhibitors in unanalyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. **Kidney International**, New York, v. 45, p. 890-896, 1994.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 41, n. 1, p. 15-30, 2011.

POLZIN, D. J.; OSBORN, C. A.; BARTGRS, J. W.; JAMES, K. M.; CHURCHILL, J. A. Chronic kidney disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.) **Textbook of veterinary internal medicine**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 1756-1785.

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

PRCHAL, J. T. Erythrocyte production. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J. T. (Eds.) **Williams Hematology**. McGraw Hill Companies Inc, 2010. p. 449-454.

RAO, D. S.; SHIH, M. S.; MOHINI, R. Effect of serum parathyroid hormone and bone marrow fibrosis on the response to erythropoietin in uremia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 328, n. 3, p. 171-175, 1993.

RODRIGUEZ, R. M.; CORWIN, H. L.; GETTINGER, A.; CORWIN, M. J.; GUBLER, D.; PEARL, R. G. Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of the anemia of critical illness. **Journal of Critical Care**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 36-41, 2001.

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

SELLERI, C.; MACIEJEWSKI, J. P.; SATO, T.; YOUNG, N. S. Interferon-g constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. **Blood**, New York, v. 87, n. 10, p. 4149-4157, 1996.

SELLERI, C.; SATO, T.; ANDERSON, S.; YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. P. Interferon-g and tumor necrosis factor- $\alpha$  suppress both early and late stage of hematopoiesis and induce programmed cell death. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 165, n. 3, p. 538-546, 1995.

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

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Medula óssea e linfonodo. In:\_\_\_\_\_. (Ed.). **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 263-302.

STRAIT, K. R.; LATIMER, K. S.; TARPLEY, H. L. An Overview of Eritrocythosis in Dogs and Cats. **Veterinary Clinical Pathology**, Athens, v. 8, n. 1, p. 1- 9, 2005.

TYLER, R. D.; COWELL, R. L.; MEINKOTH, J. H. Bone marrow. In: COWELL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H. (Eds.) **Diagnostic Cytology and Haematology of the Dog and Cat**. St. Louis: Mosby, 2009. p. 284–304.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classification into stages of chronic kidney disease in dogs and cats: clinical, laboratorial and therapeutic approach. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, 2010.

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

YILMAZ, M. I.; SOLAK, Y.; COVIC, A.; GOLDSMITH, D.; KANBAY, M. Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory. **Blood purification**, Basel, v. 32, n. 3, p. 220–225, 2011.

ZHANG, Y.; HARADA, A.; BLUETHMANN, H.; WANG, J-B.; NAKAO, S.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF in vitro. **Blood**, New York, v. 86, n. 8, p. 2930-2937, 1995.

## APÊNDICES

### Apêndice A. Valores de referência para o eritrograma e leucograma canino.

**Tabela A1.** Parâmetros eritro-leucométricos de referência para a espécie canina.

| PARÂMETROS                                       | VALORES        |
|--------------------------------------------------|----------------|
| <b>Hemácias</b> ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )    | 5,5 - 8,0      |
| <b>Hemoglobina</b> (g/dL)                        | 12,0 - 18,0    |
| <b>Hematócrito</b> (%)                           | 37 - 55        |
| <b>VCM</b> (fL)                                  | 60 - 77        |
| <b>CHCM</b> (g/dL)                               | 31 - 34        |
| <b>Leucócitos totais</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ ) | 6.000 – 18.000 |
| <b>Basófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )         | 0              |
| <b>Eosinófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )       | 120 – 1.800    |
| <b>Bastonetes</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )        | 0 - 500        |
| <b>Segmentados</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )       | 3.600 – 13.800 |
| <b>Linfócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )        | 720 – 5.400    |
| <b>Monócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )         | 180 – 1.800    |

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital “Governador Laudo Natel”, FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal, SP.

**Apêndice B.** Valores bioquímicos de referência para a espécie canina.**Tabela B1.** Parâmetros bioquímicos de referência para a espécie canina.

| PARÂMETROS                    | VALORES    |
|-------------------------------|------------|
| <b>Creatinina</b> (mg/dL)     | 0,5 – 1,5  |
| <b>Ureia</b> (mg/dL)          | 15 – 65    |
| <b>Proteína total</b> (mg/dL) | 5,8 – 7,9  |
| <b>Albumina</b> (mg/dL)       | 2,6 – 4,0  |
| <b>Cálcio total</b> (mg/dL)   | 8,6 – 11,2 |
| <b>Fósforo</b> (mg/dL)        | 2,2 – 5,5  |

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital “Governador Laudo Natel”, FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal, SP.