

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA
HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA SECUNDÁRIA (AHIM)
RESPONSIVA E NÃO RESPONSIVA**

Fernanda Martinato

Médica Veterinária

Jaboticabal

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA
HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA SECUNDÁRIA (AHIM)
RESPONSIVA E NÃO RESPONSIVA**

Fernanda Martinato

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área Patologia Animal.

2020

M383a	<p>Martinato, Fernanda</p> <p>Alterações laboratoriais em cães com anemia hemolítica imunomediada secundária (AHIM) responsiva e não responsiva / Fernanda Martinato. -- Jaboticabal, 2022</p> <p>40 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Aureo Evangelista Santana</p> <p>1. Patologia Clínica Veterinária. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. Medicina Veterinária. 4. Anemias. 5. Reticulócitos. I. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

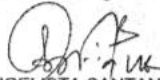
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

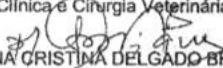
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA HEMOLÍTICA
IMUNOMEDIADA SECUNDÁRIA (AHIM) RESPONSIVA E NÃO
RESPONSIVA

AUTORA: FERNANDA MARTINATO

ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. HELENA CRISTINA DELGADO BRITO (Participação Virtual)
Centro Educacional e Técnico de Jaboticabal - CETEC / Jaboticabal/SP


Dra. LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN (Participação Virtual)
Médica Veterinária Autônoma-Clinica Veterinária Quatro Patas / Guariba/SP

Jaboticabal, 17 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernanda Martinato, nascida em 14 de dezembro de 1992 na cidade de Maringá – PR, filha de Tânia Aparecida Fávaro Martinato e Roberto Martinato. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em 2014. Durante os anos de 2015-2017 participou do Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária e Saúde Pública, com ênfase em Patologia Clínica Veterinária, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. No mês de agosto de 2017 ingressou no programa de mestrado em Medicina Veterinária, área Patologia Animal, na mesma instituição.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me abençoar nessa trajetória de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço ao meu Pai Roberto (papai Beto), por todo apoio aos meus estudos e reconhecimento dos meus esforços, desde o início da minha formação. Sem dúvidas, foi fundamental para meu progresso. É nítido todo amor e orgulho envolvido em cada palavra ministrada por ele, e isso me faz seguir em frente com máxima dedicação em todos os seguimentos da vida.

À minha Mãe Tânia, que foi fundamental para meu desenvolvimento, esteve presente em grande parte da minha vida, e hoje faz muita falta com sua presença em nossas novas conquistas.

Às minhas irmãs Ana Paula (Naná) e Gabriela (Bibi), por serem meu porto seguro em todos os momentos. Não há como explicar o tamanho do amor entre irmãs que carregamos dentro do peito. São meus exemplos e minhas inspirações diárias.

À minha amiga-irmã e eterna R1 Amanda Martinelli, que mesmo distante se faz presente na minha vida todos os dias, me oferece todo apoio, aconchego e felicidade que uma amizade verdadeira traz. Sou extremamente feliz por tê-la como amiga.

Ao meu namorado Vitor, que me acompanhou em todas as fases do mestrado, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial, que me fez crescer infinitamente e evoluir como ser humano.

Aos meus amigos Nathan e Helena, por todo conhecimento e ajuda ao longo desses anos compartilhados no laboratório. Lapidamos uma amizade, além de trocarmos conhecimentos científicos.

Aos meus amigos e companheiros do LPCV, que me acompanham desde a residência, os quais compartilhei muitas horas diárias, histórias, experiências e amizade...Ana Panosso, Matheus, Douglas, Carol, Talita, Amanda Bizare, Patrícia, Letícia Anai, Lívia Maria, Letícia Orsini, Jéssica, Larissa.

A todos do Hospital Veterinário que passaram pela minha vida, seja uma breve passagem ou não, mas que contribuíram com conhecimentos de vida e científicos. Lembro-me de muitos, mas não arrisco citá-los por aqui, para não ter a chance de esquecer de alguém...são muitos.

Ao meu orientador Prof. Aureo, que me acompanha desde a residência, acredita e aposta no meu potencial e me deu inúmeras oportunidades ao longo desse período, as quais me proporcionaram crescimento profissional e pessoal de forma imensurável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter concedido a bolsa de estudo para realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos os pacientes do Hospital Veterinário que ao longo desses anos nos ensinaram de forma tão singular e contribuíram para inúmeras teses, dissertações e estudos. Nossa dedicação é, sem dúvida, para eles e por eles...para que um dia consigamos prolongar a vida e amenizar o sofrimento ao máximo daqueles animais que tanto amamos e nos dão o amor mais verdadeiro que a gente possa conhecer nessa vida.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivos gerais.....	2
2.2 Objetivos específicos	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Conceito	3
3.2 Etiologia.....	3
3.3 Fisiopatologia	4
3.4 Hemólise intra e extravascular.	5
3.5 Predisposição.....	6
3.6 Manifestações clínicas.	6
3.7 Achados laboratoriais.....	7
3.7.1 Parâmetros hematológicos.....	7
3.7.2 Parâmetros bioquímicos.....	9
3.7.3 Parâmetros hemostáticos.....	9
3.8 Diagnóstico.....	9
3.8.1 Autoaglutinação em solução salina	10
3.8.2 Teste de Coombs direto	11
3.8.3 Citometria de fluxo no diagnóstico de AHIM.....	11
3.8.4 Medula óssea	12
3.9 Resposta Medular à anemia e contagem manual de reticulócitos.....	12
3.10 Contagem de reticulócitos por citometria de fluxo.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
7 CONCLUSÕES	22
7 REFERÊNCIAS.....	23

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de aula intitulado “Eritrocitometria em cães com Anemia Hemolítica Imunomediada”, protocolo nº 004339/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	16/04/2018 a 30/01/2019
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	30
Peso / Idade	Diferentes pesos e idades
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Animais atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

ALTERAÇÕES LABORATORIAIS EM CÃES COM ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA (AHIM) RESPONSIVA E NÃO RESPONSIVA

RESUMO. - A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é um dos tipos de anemia mais comumente diagnosticada em pequenos animais. A de origem secundária é mais prevalente em cães, a qual pode ser desencadeada por processos que culminam em resposta imunológica contra antígenos não-próprios opsonizados à membrana eritrocitária. Logo, a destruição dessas células ocorre devido uma reação de hipersensibilidade do tipo II, em que os anticorpos antieritrocitários atuam contra hemácias que possuem antígenos ligados à sua superfície. Algumas raças possuem predisposição para este tipo de anemia, além de estudos terem demonstrado predileção para sexo e idade. Para diagnóstico laboratorial, são levados em consideração a presença de esferócitos e autoaglutinação em solução salina, juntamente com o histórico clínico do animal, embora a negatividade desses testes não exclua a origem hemolítica da anemia. Uma das características deste tipo de anemia é a regeneração medular, marcada por presença de reticulócitos circulantes, apesar de uma grande parcela não apresentar regeneração no momento do diagnóstico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento hematológico de cães com AHIM secundária classificados como responsivos e não responsivos à anemia por meio da citometria de fluxo. Foi observado que 53,3% dos animais eram machos, enquanto 46,6% eram fêmeas, com a porcentagem de 6,25% e 21,4% abaixo de um ano de idade, respectivamente. A maior porcentagem (66,6%) dos cães foi de animais com idade igual ou maior a oito anos de idade. Quanto a responsividade medular, 73,3% dos animais tiveram anemia não regenerativa no momento do diagnóstico, sendo apenas 26,6% responsivos, os quais apresentaram menores resultados quanto aos valores de neutrófilos segmentados, bastonetes, eritroblastos e bilirrubina total, assim como menores índices de VCM e HCM, obtendo resultados superiores apenas nos valores de eritrócitos. Conclui-se que há possibilidade de diagnóstico deste tipo de anemia com testes laboratoriais aplicáveis na rotina e de baixo custo e que há diferença na avaliação laboratorial de animais com AHIM secundária responsiva e não responsiva, fazendo com que a investigação e determinação da não responsividade da anemia seja de extrema importância para melhor diagnóstico e tratamento do paciente.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, hemólise, reticulócitos, imunomediada.

LABORATORY CHANGES IN DOGS WITH SECONDARY IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA (IMHA) RESPONSIVE AND NON-RESPONSIVE

ABSTRACT- Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is one of the most commonly diagnosed types of anemia in small animals. A of secondary origin is more prevalent in dogs, which can be triggered by processes that culminate in immune response against opsonized antigens to the erythrocyte membrane. Therefore, the destruction of these cells occurs due to a type II hypersensitivity reaction, in which anti-erythrocyte antibodies act against erythrocytes that have antigens attached to their surface. Some breeds are predisposed to this type of anemia, in addition to studies showing a predilection for sex and age. For laboratory diagnosis, the presence of spherocytes and autoagglutination in saline together with the animal's clinical history are considered, although the negativity of these tests does not exclude the hemolytic origin of the anemia. One of the characteristics of this type of anemia is the medullary regeneration, marked by the presence of circulating reticulocytes, although a large portion does not present regeneration at the time of diagnosis. Thus, the objective of this study was to evaluate the hematological behavior of dogs with secondary AHIM classified as responsive and not responsive to anemia by means of flow cytometry. It was observed that 53.3% of the animals were male, while 46.6% were females, with a percentage of 6.25% and 21.4% under one year of age, respectively. The highest percentage (66.6%) of the dogs was from animals aged 8 years or more. As for spinal cord responsiveness, 73.3% of the animals had non-regenerative anemia at the time of diagnosis, and only 26.6% were responsive, which presented lower results regarding the values of segmented neutrophils, rods, erythroblasts and total bilirubin, as well as lower VCM and HCM indexes, obtaining superior results only in erythrocyte values. It is concluded that it is possible to diagnose this type of anemia with routine and low-cost laboratory tests and that there is a difference in the laboratory evaluation of animals with secondary non-responsive AHIM, causing the investigation and determination of non-responsiveness anemia is of utmost importance for better diagnosis and treatment of the patient.

Keywords: flow cytometry, hemolysis, reticulocytes, immune-mediated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de gates adotada para determinação da contagem de reticulócitos pela metodologia do Laranja de Thiazole. A. Determinação de população de aquisição única (*single cell*). B. População eritrocitária (RBC) em FSC x SSC, sendo que em rosa são eritrócitos maduros e em azul são reticulócitos marcados pelo corante fluorescente Laranja de Thiazole. C. Histograma do canal FITC com destaque para células positivas pelo corante fluorescente (reticulócitos). D. Hierarquia da população destacadas pela estratégia de *gates*.

1 INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é um dos tipos de anemia mais comuns em pequenos animais e o acometimento imuno-hematológico mais observado em cães (Swan & Skelly 2013). Pode ser de origem primária (idiopática) com a prevalência de 43%, ou secundária, a qual apresenta prevalência de 57% e pode ter como causa base uma série de processos, como doenças infecciosas, neoplasias, administração de fármacos, transfusões sanguíneas incompatíveis, vacinação, entre outros processos que desencadeiam uma resposta imunológica e atuam contra antígenos não-próprios que se associam à membrana eritrocitária (Balch & Mackin 2007; Scott-Moncrieff 2014).

A destruição eritrocitária na AHIM acontece devido à uma reação de hipersensibilidade do tipo II, em que anticorpos antieritrocitários destroem as hemácias que contêm antígenos ligados à superfície (Kjelgaard-Hansen et al. 2011). Os anticorpos que não ocasionam a lise das hemácias opsonizadas ativam o sistema complemento, o qual reconhecem anticorpos aderidos e culminam na deposição de complexo, que é o responsável pelo ataque à membrana celular e, assim, resultará em hemólise (Girello & Kuhn 2002). A hemólise com maior frequência em cães com este distúrbio hematológico é a extravascular, a qual apresenta melhor prognóstico para o paciente e as observações laboratoriais são a esferocitose e hiperbilirrubinemia (Scott-Moncrieff 2014).

Em cães, todas as raças e em qualquer idade podem desenvolver AHIM, porém algumas raças apresentam predisposição genética para o desenvolvimento desse tipo de anemia. Dentre elas, podemos destacar Cocker Spaniel, Poodle, Golden Retriever, Collies, Schnauzer miniatura, Spitz e Bichon Frisé (Balch & Mackin 2007; Scott-Moncrieff 2014).

Os sinais clínicos presentes nos pacientes diagnosticados com AHIM são inespecíficos e corroboram com os sinais de animais com anemia, em que há menor taxa de oxigenação nos tecidos, os quais podemos ressaltar: letargia, fraqueza, vômito, diarreia e anorexia e variam conforme o tipo de hemólise relacionada (Moraes et al. 2017). Além desses sinais clínicos, pode-se observar

variados graus de icterícia, principalmente nos pacientes com concentração de bilirrubina superior a 3 mg/dL (Balch & Mackin 2007).

Os testes diagnósticos considerados específicos para AHIM constituem a visualização de esferócitos em preparações sanguíneas, teste de Coombs e o teste de auto aglutinação em meio salino (Swann & Skelly 2015). Embora nenhum destes testes seja considerado padrão ouro para a obtenção do diagnóstico, a combinação clínica do animal, juntamente com os resultados laboratoriais e a positividade de um ou mais teste específico, evidencia a presença de AHIM no paciente (Piek 2011).

A maioria das AHIM é classificada como regenerativa, porém uma grande parcela dos pacientes pode apresentar um processo não regenerativo, devido a ação dos anticorpos antieritocitários que afeta a produção medular (Scott-Moncrieff 2014). Sendo assim, a contagem de reticulócitos é essencial para avaliação da resposta medular frente as anemias, a qual pode ser feita por meio da contagem manual por microscopia óptica, utilizando corantes supravitais. Entretanto, a metodologia da citometria de fluxo fornece maiores informações sobre características qualitativas, como tamanho, quantidade de hemoglobina e índice de maturação, quando comparada à metodologia manual, além de realizar maior número de eventos, o que garante maior precisão nos resultados. Sendo assim, a citometria de fluxo é a metodologia de mais eficaz para classificação das anemias responsivas ou não responsivas (Pierre 2002; Simionatto et al. 2009, De Carvalho et al. 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento hematológico de cães com AHIM secundária classificados em sua resposta medular (responsivos e não responsivos) por meio da técnica de citometria de fluxo.

2.1 Objetivos específicos

Avaliação de animais com anemia e identificação da AHIM por meio de técnicas laboratoriais de baixo custo e acessíveis à rotina laboratorial.

Utilização da técnica de contagem de reticulócitos por meio da citometria de fluxo.

Observação quanto à incidência de AHIM em cães de acordo com sexo e idade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conceito

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é um dos tipos de anemia mais comuns em pequenos animais (Swann; Skelly, 2013). Foi descrita pela primeira vez em cães por Miller et al. em 1954 e é, desde então, o acometimento imuno-hematológico mais observado nesta espécie (Quigley et al., 2001; Thrall et al., 2015). Este tipo de anemia é caracterizado pela opsonização de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária, o que leva à hemólise intra ou extravascular das hemácias e, conseqüentemente, à diminuição do número total de eritrócitos circulantes (Balch; Mackin 2007; Quigley; Mackin, 2008; Day, 2010)

3.2 Etiologia

A AHIM pode ser de origem primária (idiopática), podendo estar associada a outras alterações imunológicas, como trombocitopenia autoimune e lúpus eritematoso. As anemias hemolíticas imunomediadas primárias tem prevalência de 43%, fato que pode estar relacionado com a inabilidade de diagnosticar a causa base da AHIM (Tizard, 2002; Balch; Mackin, 2007).

A maior prevalência, no entanto, é da AHIM secundária, sendo responsável por 57% das AHIM em cães. Este tipo de anemia pode ter como causa base uma série de processos, como doenças infecciosas, neoplasias, administração de fármacos, transfusões sanguíneas incompatíveis, vacinação, entre outros eventos que desencadeiam uma resposta imunológica e atuam contra antígenos não-próprios que se associam à membrana eritrocitária (Balch; Mackin 2007; Quigley; Mackin 2008; Scott-Moncrieff, 2009).

Dentre as principais causas etiológicas, podem ser destacadas as doenças infecciosas, como a erliquiose, babesiose, leishmaniose e infecções bacterianas crônicas; as neoplasias, sendo as mieloproliferativas e hemangiossarcomas as mais comuns; as medicamentosas, como a administração de penicilinas, cefalosporinas, sulfas, acetaminofen, dipirona, tetraciclina, e outras drogas que podem causar a formação de imunocomplexos, adsorção do fármaco na membrana eritrocitária e, conseqüentemente, a formação de autoanticorpos e, por fim, AHIM (Day; Mackin, 2008; Scott-Moncrieff, 2009).

3.3 Fisiopatologia

A destruição eritrocitária na AHIM acontece devido à uma reação de hipersensibilidade tipo II (citotóxica), em que anticorpos antieritrocitários destroem as hemácias que contêm antígenos ligados à superfície (Miller, 2009; Kjelgaard-Hansen et al., 2011).

Os principais antígenos de superfície são componentes que integram a membrana eritrocitária, como glicoproteínas e glicolipídios, entre os quais, destacam-se a glicoforina, a espectrina e a banda 3, por serem os antígenos que mais comumente incitam a formação de autoanticorpos (Tizard, 2002).

Globulinas são anticorpos sintetizados por plasmócitos que interagem com imunógenos de maneira específica a partir de um estímulo. As classes de imunoglobulinas (Ig) presentes nas hemácias de cães diagnosticados com AHIM são IgG, IgM e IgA, sendo esta última menos frequentemente identificada (Calich, 2001; Scott-Moncrieff, 2014).

Os anticorpos podem não ocasionar a lise das hemácias opsonizadas, então o sistema complemento, que é um sistema formado por diversas proteínas solúveis no plasma ou ligadas à superfície de algumas células, reconhecem os anticorpos aderidos à membrana das hemácias e culminam na deposição de complexo responsável pelo ataque à membrana celular, que resultará em hemólise (Thompson, 1997; Isaac, 2001; Girello; Kuhn, 2002; Tizard, 2002).

A ativação do sistema complemento pode resultar em algumas outras alterações biológicas importantes, neste tipo de anemia, como a quimiotaxia de células inflamatórias, ocasionando uma resposta inflamatória aguda com leucocitose presente nos exames laboratoriais e aumento de proteínas de fase aguda (McManus & Craig, 2001; Mitchell et al., 2009)

3.4 Hemólise intra e extravascular

A hemólise intravascular é aquela na qual os eritrócitos são lisados dentro do vaso sanguíneo. Esse processo pode ser ocasionado pela ativação do sistema complemento devido à interação de IgM com as hemácias, lesão endotelial (trauma mecânico) ou agente infecciosos, que causam hemólise direta (Dhaliwal; Cornett; Tierney, 2004; Whitley & Day, 2011). Este tipo de destruição eritrocitária ocorre com menor frequência, representando apenas 10 a 20% dos casos de AHIM diagnosticados, porém é a forma mais grave de hemólise e com as piores manifestações no plano clínico (Balch; Mackin, 2007).

Já, na hemólise extravascular, entra em ação o sistema mononuclear fagocitário (SFM), que retira de circulação as hemácias recobertas por anticorpos e/ou sistema complemento opsonizados, ação está realizada no baço, fígado ou medula óssea. A imunoglobulina G está diretamente envolvida neste processo e, por si só, é incapaz de ocasionar a lise eritrocitária, ativando o SFM para realizar o processo (Balch; Mackin, 2007; Duffy et al., 2010). Este tipo de hemólise é mais frequente em cães com AHIM, porém tem melhor prognóstico, os sinais clínicos são mais brandos e as achados laboratoriais mais frequentes são a esferocitose e hiperbilirrubinemia (Scott-Moncrieff, 2014).

Embora seja possível definir os estados hemolíticos intra e extravasculares, este tipo de informação tem pouca relevância, pois geralmente tais eventos ocorrem simultaneamente (Brandão; Higihara; Franchini, 2003).

3.5 Predisposição

Em cães, todas as raças podem desenvolver AHIM, porém algumas raças apresentam uma predisposição genética para o desenvolvimento desse tipo de anemia. Dentre as raças, podemos destacar Cocker Spaniel, Poodle, Golden Retriever, Collies, Schnauzer miniatura e Spitz, Bichon Frisé (Balch; Mackin, 2007; Scott-Moncrieff, 2014).

Além da predisposição racial, há estudos que demonstram predisposições sexual e etária, em que fêmeas adultas são mais acometidas quando comparadas aos machos da mesma idade e quando a idade é inferior a um ano, os machos tendem a apresentar AHIM mais frequentemente que as fêmeas (Brandão; Hagiwara; Franchini, 2003; Scott-Moncrieff, 2009). No entanto, este tipo de anemia pode acometer cães em qualquer idade e a média de idade dos cães diagnosticados é de seis anos (Balch; Mackin, 2007).

3.6 Manifestações clínicas

Os sinais e sintomas manifestados por pacientes diagnosticados com AHIM são inespecíficos e traduzem um quadro de anemia, sobretudo caracterizado por uma menor taxa de oxigenação dos tecidos, em cujo quadro se evidenciam letargia, fraqueza, vômito, diarreia e anorexia, conforme o tipo e grau de hemólise relacionados (Piek et al., 2008; Kohn, 2011; Moraes; Takahira; Golim, 2017).

A palidez das mucosas, taquicardia, taquipneia, sopro cardíaco sistólico, petéquias, equimoses, melena e dor abdominal, esta última relacionada à hepatoesplenomegalia, são achados relativamente comuns (Burgess et al., 2000; Piek et al., 2011). Além dos sinais clínicos relacionados à anemia, pode-se observar variados graus de icterícia, principalmente nos pacientes com concentração de bilirrubina superior a 3 mg/dL (Balch; Mackin, 2007).

A icterícia e estado anêmico intenso são achados bem comuns na hemólise intravascular, cuja lise das hemácias ocorre de forma aguda. Por outro lado, sinais clínicos brandos e icterícia transitória ocorrem na AHIM decorrente da hemólise extravascular crônica ou quando há aplasia pura de células vermelhas (PRCA) (Day; Mackin, 2008).

Animais com AHIM possuem uma predisposição para tromboembolismo por apresentarem dano endotelial, estase venosa, trombocitopenia, leucocitose, diminuição da albumina sérica, hiperbilirrubinemia, além do estado de hipercoagulabilidade, caracterizado pela deficiência de anti-trombina, diminuição do fibrinogênio e aumento dos dímeros-D, que são produtos de degradação da fibrina (Scott-Moncrieff et al., 2001; Piek et al., 2008).

3.7 Achados laboratoriais

3.7.1 Parâmetros hematológicos

O grau de anemia pode variar de moderado a intenso, cujo valor do hematócrito encontra-se entre 20 a 29% e 13 a 19%, respectivamente. É comum a observação de indícios de regeneração, como policromasia, anisocitose e eritroblastemia, apesar de uma grande porcentagem dos animais diagnosticados não apresentarem contagens de reticulócitos elevadas no dia do diagnóstico (Weiss, 2008; Piek, 2011; Scott-Moncrieff, 2014)

A AHIM pode ter um caráter arregenerativo, na sua fase inicial, uma vez que são necessários de três a quatro dias para que ocorra a liberação e consequente aumento de reticulócitos no sangue circulante (Meyer, Harvey, 2004). Logo, a falta de resposta à anemia, depois de cinco dias, é atribuída a anticorpos direcionados contra os precursores da série eritroide na medula óssea (Weiss, 2008). Embora outros estudos tenham demonstrado que nos casos de não regeneração, há outras disfunções da medula óssea, como a aplasia pura de células vermelhas (PRCA) (Stokol et al., 2000; Day; Mackin, 2008), hiperplasia eritroide e a impossibilidade de continuação da maturação das

células vermelhas, em que há a ação de anticorpos contra vários estágios de maturação eritroide (Stokol et al., 2000; Weiss, 2008).

Cães com AHIM arregenerativa representam cerca de um terço dos casos, acompanhados por uma anemia normocítica, normocrômica, com contagem baixa de reticulócitos (Day; Mackin, 2008). Esses casos devem ser cuidadosamente acompanhados e avaliados quanto à ausência de reticulocitemia (Balch; Mackin, 2007).

A regeneração eritrocitária é caracterizada por contagens de reticulócitos circulantes acima de 60.000/ μ L e geralmente as AHIM regenerativas possuem grau de reticulocitemia marcante (Weiss; Tvedten, 2004; Thrall et al., 2012).

Os esferócitos presentes não são, por si só, patognomônicos para diagnóstico de AHIM, porém, são altamente sugestivos, principalmente se estão em quantidade significativa (Balch; Mackin 2007). Essas células são hemácias que perderam sua palidez central por meio de fagocitose de macrófagos contra anticorpos ou complemento que opsonisaram a membrana eritrocitária (Thrall et al., 2012). No caso de aparecimento de hemácias “fantasmas”, os eritrócitos sofreram danos à membrana pelos complexos formados na fixação do complemento, ocorrendo, assim, a lise intravascular destas células (Scott-Moncrieff, 2009).

No que diz respeito ao quadro leucocitário, animais acometidos com AHIM podem apresentar tanto leucopenia, como leucocitose. A leucocitose está intimamente ligada às citocinas pró-inflamatórias liberadas no processo hemolítico ou estimulação da medula óssea tanto para série eritroide, quanto mielóide (Balch; Mackin, 2007). Enquanto a leucopenia está relacionada a imunomediadores contra a série mielóide ou depressão medular (Brandão; Hagiwara; Franchinl, 2003).

A trombocitopenia de leve a grave é relatada em 60% dos casos e está relacionada com a presença de anticorpos contra a linhagem de eritrócitos e plaquetas, coagulação intravascular disseminada (CID) e/ou sequestro esplênico (Swann; Skelly, 2011; Scott-Moncrieff, 2014).

3.7.2 Parâmetros bioquímicos

Não há correlação dos exames bioquímicos séricos com o diagnóstico de AHIM. Os animais acometidos ocasionalmente apresentam hemoglobinemia, devido à hemólise, e bilirrubinemia, pela diminuição da *clearance* da bilirrubina hepática, taxa de hemólise e comprometimento da função do fígado pela hipóxia tecidual (Carr; Panciera; Kidd, 2002; Scott-Moncrieff, 2014).

A icterícia está presente em 75% dos casos de AHIM, mas, muito embora seja um achado clínico marcante, a ausência da mesma não descarta o diagnóstico, e seu aparecimento se dá quando a concentração de bilirrubina sérica ultrapassa 3 mg/dL (Brandão; Higiwara; Franchini, 2003; Balch; Mackin, 2007).

Outros achados laboratoriais, como aumento de globulinas, hipoalbuminemia e azotemia renal, também podem ser observados, embora sejam menos característicos da AHIM. Estão relacionados, respectivamente, com a resposta inflamatória, reações da fase aguda e lesão renal devido à isquemia ou CID (Carr; Panciera; Kidd, 2002; Brandão; Hagiwara; Franchini, 2003; Thrall et al., 2012).

3.7.3 Parâmetros hemostáticos

As alterações hemostáticas são sugestivas de CID e são caracterizadas pelo aumento do tempo de protrombina (TP), aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), aumento dos produtos de degradação da fibrina, bem como hiperfibrinogenemia e diminuição da atividade anti-trombina (Scott-Moncrieff et al., 2001; Piek et al., 2008).

3.8 Diagnóstico

Embora não haja um exame que seja padrão ouro para o diagnóstico definitivo de AHIM em cães, existem combinações de exames, juntamente com o histórico clínico dos pacientes, que permitem o fechamento do diagnóstico de

anemia por destruição imunomediada das hemácias (Piek, 2011). Dentre os exames acessíveis na rotina laboratorial, podemos citar o teste de autoaglutinação em solução salina e a observação de presença de esferócitos na leitura do esfregaço sanguíneo (Carr et al., 2002; Morley et al., 2008; Piek et al., 2008).

Segundo Couto (2014), o achado simultâneo de esferocitose, policromasia e teste de autoaglutinação positivo, em animal com histórico de anemia aguda, é patognomônico para AHIM, dispensando outros testes de difícil acesso na rotina, como teste de Coomb's, citometria de fluxo (Morley et al., 2008) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Morley et al., 2008; Piek et al., 2011).

3.8.1 Autoaglutinação em solução salina

Cerca de 40 a 89% dos cães com AHIM apresentam autoaglutinação macroscópica, que pode ser visualizada diretamente no tubo de colheita, bem como microscópicamente, observada à leitura do esfregaço sanguíneo (Scott-Moncrieff, 2014). Tal aglutinação espontânea de eritrócitos se dá pelas ligações cruzadas dos anticorpos (IgM ou IgG) opsonizados na membrana das hemácias. Embora seja um achado comum sugestivo de AHIM, a diferenciação da formação de *rouleaux* eritrocitário por desidratação e/ou hiperproteinemia deve ser feita por meio de adição de soro fisiológico para dispersão das hemácias (Balck; Mackin, 2007; Zabolotzky et al., 2014).

Para a realização do teste de aglutinação, deposita-se sobre uma lâmina de microscopia, limpa e desengordurada, uma gota de sangue total com EDTA, diluída em igual quantidade de solução salina (NaCl 0,9%), seguido da deposição de uma lamínula sobre tal mistura. A observação é realizada ao microscópio óptico e obtém-se o resultado positivo ou negativo. A persistência do fenômeno de autoaglutinação, mesmo diante do aumento da diluição da gota de sangue total, sugere intensa AHIM e está associada a elevados índices de mortalidade (Brandão; Hagiwara; Franchini, 2003; Balch; Mackin, 2007).

3.8.2 Teste de Coombs direto

O teste de Coombs direto detecta imunoglobulinas e/ou complemento por meio de anticorpos antiglobulinas que se ligam a estas moléculas opsonizadas na membrana eritrocitária (Balch; Mackin, 2007; Scott-Moncrieff, 2014).

Este teste tem baixas especificidade e sensibilidade, pois revelam anticorpos e/ou complemento aderidos à membrana das hemácias, porém não há a confirmação de que estes estejam atuando contra os eritrócitos e causando a hemólise. Apesar disso, é usado para confirmação de AHIM quando não há autoaglutinação e esferocitose (Scott-Moncrieff, 2014).

O resultado do teste de Coombs é dado em número de cruces (+), quando positivos, variando entre 1 + a 4 +. Em média, 70% dos cães com AHIM apresentam teste positivo, embora possa ocorrer resultados falso-positivos em animais doentes e sem evidência de hemólise (Overmann et al., 2007; Scott-Moncrieff, 2014). Sendo assim, apenas a positividade do teste de Coombs não é confirmatório para este tipo de anemia, sendo necessário um conjunto de alterações laboratoriais e histórico clínico do paciente (Brandão; Hagiwara; Franchini, 2003).

3.8.3 Citometria de fluxo no diagnóstico de AHIM

A citometria de fluxo no diagnóstico de AHIM tem maior sensibilidade para detecção de imunoglobulinas (IgM e IgG) e complemento, quando comparada com o teste de Coombs, pois utilizam imunofluorescência, identificando níveis muito baixos de opsonização nos eritrócitos, o que garante maior sensibilidade e menor possibilidade de falsos negativos (Quigley et al., 2001)

3.8.4 Medula óssea

As AHIM não regenerativas requerem exames como mielograma e/ou biópsia de medula óssea para apuração da causa da não regeneração. Geralmente há hiperplasia da série eritroide, porém um impedimento de amadurecimento dessa linhagem de células ou o decréscimo da mesma pode ocorrer, devido à ação da resposta imune diretamente na medula óssea, o que pode resultar em lesão medular e mielofibrose (Brandão; Hagiwara; Franchini, 2003; Balch; MACKIN, 2007; Weiss, 2008; Scott-Moncrieff; 2014).

3.9 Resposta medular à anemia e contagem manual de reticulócitos

As anemias são classificadas quanto à resposta da medula óssea como regenerativas e arregenerativas (Neiger et al., 2002). As anemias classificadas como arregenerativas, não se regeneram em função de causas medulares e/ou extra medulares, como hipoplasia de células precursoras de eritrócitos, insuficiência renal crônica e doença inflamatória (Couto, 2014). Enquanto as anemias regenerativas apresentam regeneração adequada da eritropoiese, independentemente da severidade e duração dos episódios hemolítico-hemorrágicos (Tvedten, 2010).

O método de eleição para a avaliação da regeneração eritropoietica, na maioria das espécies, é a contagem de reticulócitos, que são eritrócitos imaturos, presentes no sangue circulante (Jain; 1979; Christopher & Harvey, 1992; Thrall, 2014). Esses estádios de desenvolvimento dos eritrócitos contêm resquícios de RNA que se aglomeram quando corados com corantes supravitais, tais como Azul de Metileno e Azul de Cresil Brilhante, corantes estes que foram descobertos em 1865 por Erb, embora sua utilidade clínica, na evidência de reticulócitos, tenha sido remarcada apenas em 1932 por Heilmeyer e Westhaeuser (Pierre, 2002).

Em cães e gatos, os resquícios de RNA aparecem no estágio desenvolvimental de reticulócitos sob a forma de agregados e pontilhados. Em

cães, os agregados são de mais comum visualização. Já em gatos, visualiza-se ambos os reticulócitos, porém a avaliação quanto à resposta medular é feita mediante a contabilização dos reticulócitos agregados, uma vez que estes permanecem mais tempo na circulação (Jain, 1993; Cowgill; Neel; Grindem, 2003).

Os reticulócitos são lançados na corrente sanguínea devido um aumento de eritropoietina, como resposta a hipóxia tecidual. A produção de eritropoietina, em cães, é exclusivamente renal, onde é produzida no córtex interno e medula externa, por células intersticiais (Reece, 2006 Maiese; Chong; Shang, 2008), agindo principalmente nas CFU-E e prevenindo a morte de células precursoras, o que estimula e garante a divisão e maturação da série eritroide (Riley et al., 2001; Cowgill et al., 2003).

Observa-se reticulocitemia entre o quarto e sétimo dia após o estímulo, e cujo decaimento da referida reticulocitemia é verificado entre duas e três semanas, nos cães, desde que o status de equilíbrio seja alcançado (Fernandez; Grindem, 2006).

A contagem de reticulócitos é realizada utilizando-se de corantes supravitais, tais como referidos precedentemente, sejam eles Novo Azul de Metileno ou Azul de Cresil Brilhante, os quais propiciam a formação de retículos, com fundamento na precipitação de resquícios de organelas e RNA ainda presentes no eritrócito jovem (Pierre, 2002). Para a contagem dos estádios reticulocíticos, enumeram-se 1000 hemácias, considerando-se hemácias maduras e reticulócitos, posteriormente estabelece-se a quantidade absoluta de estádios reticulocíticos, tendo como base uma regra de três simples. Este método manual é o mais utilizado na rotina laboratorial, embora possa comprometer a exatidão da contagem, uma vez que os campos escolhidos são aleatórios, não há uniformidade na distribuição das células e a contagem é subjetiva (Pierre, 2002; Cowgill et al., 2003; Moritz; Tvedten, 2010; Weiser, 2012).

A porcentagem de reticulócitos, após obtida, deverá ser corrigida de acordo com a espécie, aplicando-se uma fórmula pré-estabelecida, em que se multiplica a porcentagem encontrada pelo hematócrito do animal e divide-se por 45, para

cães e 37 para gatos, em que estes dividendos são a média do valor de hematócrito normal para estas espécies (Cowgill et al, 2003; Fleischman, 2012).

3.10 Contagem de reticulócitos por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia que usa feixes de lasers para identificar partículas dispersas em uma solução salina tamponada, as quais geram diferentes refrações que serão interpretadas conforme o tamanho, volume (forward scatter ou FSC) e complexidade (side scatter ou SSC) das células (Shapiro, 2003; WEISS; Wilkerson, 2010). Além destas análises, a citometria de fluxo permite a marcação de células por meio de corantes ou fluorocromos específicos, que permitem a identificação de populações de células de acordo com diferentes relevâncias. A partir dessas análises, são feitos gráficos (plots) que são interpretados pelos gates (desenhos) e, assim, identifica-se as células em questão (Davis et al., 2002).

Este método está em ascensão na medicina veterinária para animais de companhia para análises como imunofenotipagem de linfócitos e plaquetas, avaliação de citocinas e interleucinas, identificação de células-tronco hematopoiéticas, além da contagem de reticulócitos e diferencial de células da medula óssea (Tarrant, 2005; Nakage et al., 2005).

Para avaliação da reticulocitemia, enquanto um marcador da atividade regenerativa do tecido eritropoietico, a citometria de fluxo é o método mais eficaz de se realizar a contagem de reticulócitos, quando comparada com a metodologia manual. Pois utiliza-se de um corante (laranja de thiazole) para revelar o RNA residual do eritrócito jovem (reticulócito) e são contados 10.000 eventos por meio da excitação destas células pelo laser azul (FL1 – FITC - 488 nm) e emissão de fluorescência. Enquanto, na contagem manual enumeram-se apenas e tão somente 1.000 eventos (Lee et al., 1986; de Carvalho et al., 2017).

Os estudos com citometria de fluxo para contagem de reticulócitos evidenciam que este método é mais preciso e sensível, podendo resultar numa contagem 1,5 vezes maior que a manual (Lacombe et al, 1999), porém há variações conforme a espécie estudada, e urge ensaios que possam levar à

validação da reticulocitometria pela técnica de contagem automatizada com o uso do citômetro de fluxo (Pereira et al., 2008).

Os corantes utilizados para marcação pode ser tanto o laranja de thiazole, quanto o acridina laranja, posto que ambos têm boa afinidade pelo RNA e DNA, assim eritrócitos nucleados na circulação serão marcados (Riley et al., 2001; Viana et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 203 cães com diagnóstico laboratorial de anemia, oriundos da rotina do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, Campus Jaboticabal. Dentre eles, 30 animais foram diagnosticados laboratorialmente com AHIM.

Os pacientes considerados positivos para Anemia Hemolítica Imunomediada do Tipo Secundária foram aqueles que apresentaram anemia em combinação com a evidência da destruição imunomediada dos eritrócitos por meio de dois resultados positivos: presença de esferocitose e teste de autoaglutinação positivo.

Foram realizadas análises hematológicas dos pacientes positivos para AHIM, como hemograma, pesquisa de esferócitos na leitura do esfregaço sanguíneo, dosagens de bilirrubinas, teste de autoaglutinação em solução salina e contagem de reticulócitos por citometria de fluxo, para analisar a responsividade da anemia. Para a realização destes parâmetros, as amostras foram coletadas por venopunção jugular e condicionadas em tubo de sistema à vácuo sem anticoagulante e com anticoagulante (EDTA-K2).

Os hemogramas foram realizados por metodologia automática por meio de analisador automático ABCVet Counter (Horiba, Montpellier, 2004), obtendo os seguintes resultados: contagem total de eritrócitos (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice

de anisocitose, contagem de leucócitos totais, contagem total de plaquetas e volume plaquetário médio).

Todos os hemogramas tiveram o diferencial leucocitário em esfregaço sanguíneo do sangue periférico por meio de microscopia óptica, conforme metodologia descrita por Thrall (2015). Nos mesmos esfregaços foi realizada a pesquisa de esferócitos, conforme metodologia descrita por Harvey (2012) para determinação de portadores de processos imunomediados antieritrócitos.

Para a avaliação de processos hemolíticos, foi feita a observação de presença de hemólise em plasma e dosagem de bilirrubina total, direta e indireta por meio de kits comerciais Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, 2011), em espectrofotômetro semiautomático Labquest (Biobius, São Paulo, 2004).

Para a determinação de processo de eritroaglutinação realizou-se o teste de autoaglutinação em solução salina 0.9%, conforme a metodologia descrita por Hackner (2007), que quanto mais forte a ligação entieritrocitária, maior é a diluição em salina para desfazer a eritroaglutinação.

A quantificação dos reticulócitos por meio da citometria de fluxo foi efetuada no Citômetro de Fluxo FACS Canto II (BD Bioscience, 2013), conforme metodologia do corante de Laranja de Thiazole ($C_{26}H_{24}N_2O_3S_2$, Sigma-Aldrich, 2019), proposta por Lee et al (1986), nos mesmos dias em que foram realizadas as quantificações de reticulócitos pelo Azul de Cresil Brilhante.

Nesta metodologia, utilizou-se um tubo que marcação negativa com 5 μ L de sangue total, adicionou-se tampão PBS (0,002 M EDTA e 0,02% Azida Sódica, sem Laranja de Thiazole), e utilizou-se outro tubo para marcação positiva para reticulócitos, com 5 μ L de sangue total de cada amostra adicionadas a solução contendo o corante para marcação dos reticulócitos diluído (1 mg/mL LT em metanol, diluído 1:10.000 em tampão PBS).

Ambos os tubos tiveram suas amostras adquiridas no citômetro (Acquired = 10.000 eventos) em escala de log nas leituras de tamanho (forward scatter – FSC), complexidade (side scatter – SSC) e avaliação do reticulócitos marcados com Laranja de Thiazole no canal de fluorescência de 488 nm (FL1 – Laser Azul – FITC).

Os citogramas obtidos seguiram a seguinte estratégia de gates: aquisição em escala de log, por representação gráfica em dotplot de tamanho em medição de área e altura (FSC-A vs FSC-H) com fito de priorizar aquisições únicas, dotplot com eixos cartesianos de tamanho dos eritrócitos (FSC) por complexidade (SSC) com gate grid determinado na população eritrocitária; e, histograma no canal de FITC para análise da população positiva (reticulócitos) em relação a população negativa (eritrócitos maduros) com população reticulocitária representados em uma frequência populacional à direita, expressos em porcentagem pela diferença de eventos da população positiva para reticulócitos subtraído da população negativa (não marcada pelo corante de Laranja de Thiazole) (Figura 1).

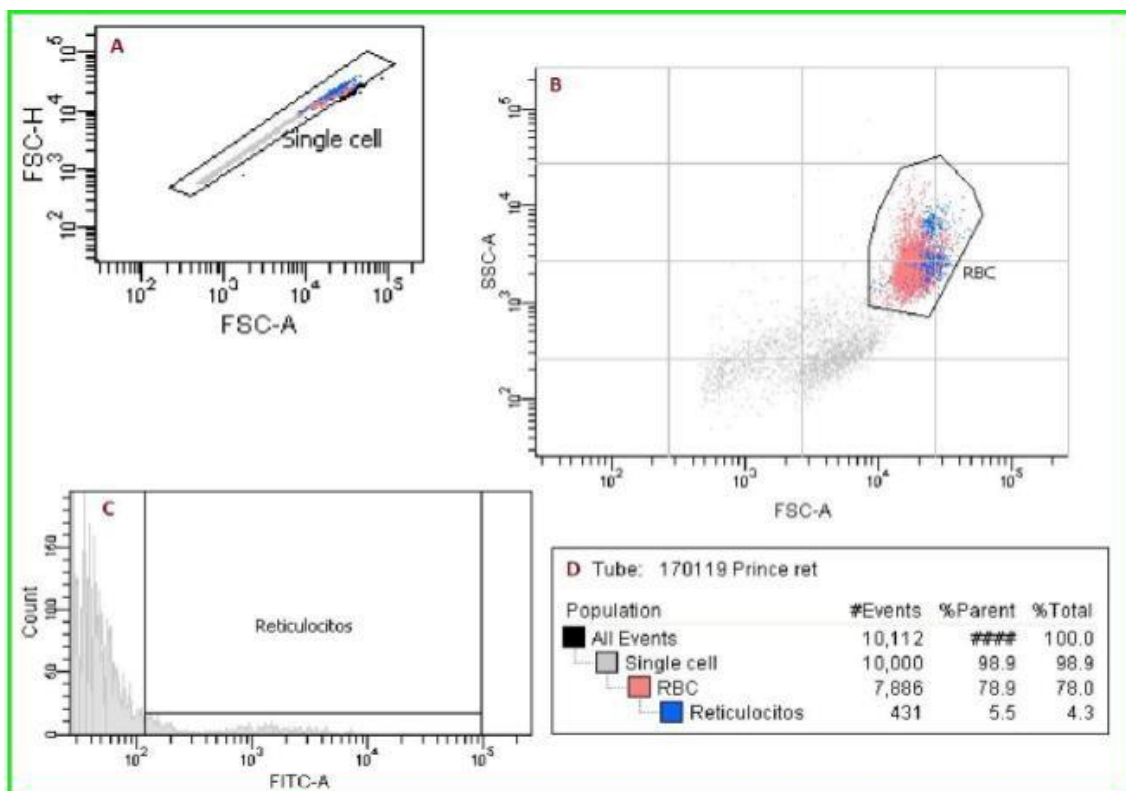


Figura 1. Estratégia de gates adotada para determinação da contagem de reticulócitos pela metodologia do Laranja de Thiazole. A. Determinação de população de aquisição única (*single cell*). B. População eritrocitária (RBC) em FSC x SSC, sendo que em rosa são eritrócitos maduros e em azul são reticulócitos marcados pelo corante fluorescente Laranja de Thiazole. C. Histograma do canal FITC com destaque para células positivas pelo corante

fluorescente (reticulócitos). D. Hierarquia da população destacadas pela estratégia de *gates*.

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo eles: responsivos (n=8) e não responsivos (n=22). Para a determinação desses grupos, utilizou-se a contagem de reticulócitos por Laranja de Thiazole em Citometria de fluxo, considerando valores $<1,0$ para não responsivos e $\geq 1,0$ para animais responsivos.

Além disso, realizou-se a dosagem de bilirrubina total, direta e indireta por meio de espectrofotômetro automático Labmaxx Pleno (Bioplus, São Paulo, 2018), em que foram utilizados kits de reagentes comerciais Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, 2011).

Utilizou-se teste rápido 4Dx® da marca Idexx para avaliação quanto a presença de anticorpos contra *Ehrlichia* spp.

Foi realizada a análise de normalidade em todos os dados por meio do teste de Cramer von-Mises ($p \leq 0,05$), variância pelo teste sigma ($p \leq 0,05$) e a maioria das observações foram significativas no teste de normalidade (não-paramétricos), sendo assim, os dados foram apresentados em mediada (máximo e mínimo) (Quadro 1).

O teste de contingência de Qui-quadrado (X^2) ($p \leq 0,05$) foi aplicado para verificar a diferença estatística em relação a estratificação dos grupos pelo sexo, positividade para *Ehrlichia* spp, presença de corpúsculo de Howell-Jolly, anisocitose eritrocitária e macroplaquetas.

Quadro 1. Comparação de medianas (mínimo-máximo) de cães com anemia hemolítica imunomediada secundária (AHIM) classificados em relação a resposividade medular considerando quantidade de reticulócitos circulantes.

Variáveis	Não responsivos (n=22)	Responsivos (n=8)	Wilcoxon (p)
Reticulócitos (%)	0,2 (0-0,6)a	1,15 (1-2,4)b	3,67x10 ⁻⁰⁵
Bilirrubina total (mg/dL)	0,18 (0,05-1,06)a	0,27 (0,14-0,38)b	0,01
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,09 (0,01-0,57)a	0,13 (0,03-0,21)a	0,09
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,08 (0,01-0,49)a	0,13 (0,04-0,21)a	0,06
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	4,21 (1,38-5,59)a	2,91 (2,13-4,40)b	0,05
Hemoglobina (g/dL)	9,65 (3,2-12,9)a	7,3 (5,9-11,7)a	0,26
Hematócrito (%)	27,35 (9-35,6)a	20,55 (16,5-33,4)a	0,24
VCM (fL)	67,4 (60,6-74,5)a	73,9 (63,3-81,8)b	0,02
HCM (pg)	23,9 (20,6-26,2)a	25,6 (23,9-28,1)b	0,01
CHCM (%)	35,3 (32,9-38,4)a	35,7 (31,7-37,8)a	0,76
Eritroblastos (x10 ⁶ /μL)	0 (0-242)a	0 (0-10480)b	0,05
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	9950 (300-24900)a	26671 (6100-46300)b	0,005
Basófilos (x10 ³ /μL)	0a	0a	0
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	118,5 (0-912)a	0 (0-1389)a	0,24
Bastonetes (x10 ³ /μL)	0 (0-912)a	324 (0-1309)b	0,002
Neutrófilos (x10 ³ /μL)	8059 (180-23655)a	22277 (4941-39355)b	0,007
Linfócitos (x10 ³ /μL)	909 (116-2700)a	1925 (185-4364)a	0,21
Monócitos (x10 ³ /μL)	167 (0-655)a	711 (0-2315)a	0,06
Plaquetas (x10 ³ /μL)	345 (35-806)a	464 (134-889)a	0,52

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 203 cães anêmicos testados não havia suspeita clínica de que a anemia era de origem hemolítica, sendo um achado laboratorial de 30 animais (14,7%) com

AHIM do tipo secundária por meio do achado de esferócitos na leitura do esfregaço sanguíneo e autoaglutinação em solução salina positiva. Segundo Piek (2011), apesar de não haver um exame que seja padrão ouro para o diagnóstico de AHIM em cães, a combinação de exames e o histórico clínico dos pacientes permitem a conclusão de anemia por destruição imunomediada das hemácias. Os exames de fácil acesso na rotina laboratorial são os supracitados utilizados para o fechamento do diagnóstico (Carr et al. 2002; Morley et al. 2008; Piek et al. 2008).

Não houve diferença estatística para estratificação dos grupos pelo sexo, presença de corpúsculo de Howell-Jolly, anisocitose eritrocitária e macroplaquetas, quando comparados os grupos responsivos e não-responsivos.

Dos 30 animais positivos para AHIM, 16 (53,3%) foram machos e 14 (46,6%) fêmeas. Dentre eles, apenas um (6,25%) macho e três (21,4%) fêmeas com idade inferior a um ano. Esses dados contradizem os estudos que demonstram predisposição etária, em que fêmeas adultas são mais acometidas quando comparadas aos machos da mesma idade e quando a idade é inferior a um ano, os machos tendem a apresentar AHIM com maior frequência (Brandão et al. 2003; Scott-Moncrieff 2014). Além disso, a média de idade dos animais foi de 8,6 anos, sendo que 20 (66,6%) foram animais com idade igual ou maior a 8 anos. Resultados que se contrapõem aos estudos realizados por Weinkle et al (2005) e Balch & Mackin (2007), em que descrevem a prevalência em cães de meia idade, com a média de idade entre 6 a 7 anos. Embora afirmam que este tipo de anemia pode acometer cães em qualquer idade.

A não responsividade da anemia de acordo com a contagem de reticulócitos pela citometria de fluxo foi de 73,3% (22/30), enquanto as anemias responsivas corresponderam 26,6% (8/30) dos animais. Apesar das AHIM serem consideradas regenerativas, é comum uma grande porcentagem dos animais diagnosticados não apresentarem contagens de reticulócitos elevadas no dia do diagnóstico (Weiss 2008; Piek 2011; Scott-Moncrieff 2014). Este caráter não regenerativo pode ser indício de que seja a fase inicial da anemia, uma vez que são necessários de três a quatro dias para que ocorra a liberação e consequente aumento de reticulócitos no sangue circulante (Day & Mackin 2008). Então, o acompanhamento desses animais e a constatação de não regeneração depois de cinco dias, é atribuída a anticorpos direcionados contra precursores da série

eritroide na medula óssea (Weiss 2008). Embora outros estudos tenham demonstrado que nos casos de não regeneração, há outras disfunções da medula óssea, como aplasia pura de células vermelhas (PRCA), hiperplasia eritroide e a impossibilidade de continuação na maturação das células vermelhas, em que há ação de anticorpos contra vários estágios de maturação eritroide (Day & Mackin 2008), ou ainda a deficiência de ferro associada a nutrição e/ou sequestro pela inflamação (Schaefer & Stokol 2016).

O grupo não responsivo apresentou maior número de eritrócitos quando comparados ao grupo responsivo, portanto, esses animais podem ter sido investigados na fase inicial da anemia, em que a quantidade de eritrócitos e porcentagem de hematócrito decaíram de forma mais branda, geralmente associadas com hemólise extravascular, pois este tipo de hemólise depende da ação de fagócitos do sistema mononuclear fagocitário (SFM), presentes no baço, fígado e medula óssea para retirar da circulação as hemácias opsonizadas por anticorpos e complemento (Brandão et al. 2003; Balch & Mackin 2007). A imunoglobulina G (IgG) está diretamente envolvida neste processo, porém, por si só, é incapaz de ocasionar a lise eritrocitária, sendo necessária a ativação do SFM para realizar este processo e dentre os achados laboratoriais mais frequentes, estão a esferocitose e hiperbilirrubinemia (Balch & Mackin 2007; Duffy et al. 2010; Scott-Moncrieff 2014).

Em contrapartida, as hemólises intravasculares ocorrem quando os eritrócitos são lisados dentro dos vasos sanguíneos. Esse processo pode ser ocasionado pela ativação do sistema complemento devido à interação de IgM com as hemácias, lesão endotelial (trauma mecânico) ou agentes infecciosos, que causam hemólise direta (Dhaliwal et al. 2004; Whitley & Day 2011). Apesar de ocorrerem com menor frequência, são mais graves, com piores manifestações clínicas e os principais achados laboratoriais são hemoglobinemia, hemoglobinúria e icterícia. O aumento de bilirrubina sérica é um achado comum na AHIM com hemólise intravascular, extravascular ou associadas, porém não são todos os animais que irão apresentar esta característica e a ausência dela não descarta este tipo de anemia, já que existem fatores que influenciam neste aumento, como a taxa de hemólise e a função hepática (Scott-Moncrieff 2014). Sendo assim, os animais responsivos apresentaram um aumento de bilirrubina direta quando comparados com os animais não responsivos, porém os dados

bioquímicos são inespecíficos quando se trata de AHIM, principalmente quando é do tipo secundária, pelo aumento de enzimas renais e hepáticas poderem estar aumentadas devido a afecção primária (Carr et al. 2002; Brandão et al. 2003).

As AHIM secundárias responsivas apresentaram sinais de regeneração significativos nos parâmetros hematológicos, como volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), além de características de regeneração na leitura do esfregaço sanguíneo, como presença de eritroblastos circulantes. Achados hematológicos sugestivos de regeneração, como macrocitose, policromasia, presença de eritroblastos circulantes são considerados muito comuns na AHIM, além da presença de anemia de grau de moderado a intenso, com a média de 25% a 13% de hematócrito, respectivamente (Piek 2011; Scott-Moncrieff 2014), concordando com o presente estudo em que a média de hematócrito dos cães com AHIM foi de 25%.

No presente estudo, cães com AHIM secundária com resposta medular apresentaram mais número total de leucócitos, assim como aumento de bastonetes e neutrófilos segmentados. A leucocitose neste tipo de anemia pode ser desencadeada por mediadores e citocinas pró-inflamatórias decorrentes do processo hemolítico, por processo inespecífico de estimulação da série mieloide frente a grave anemia, bem como necrose tecidual devido à hipóxia, sendo observado aumento de neutrófilos com ou sem desvio à esquerda (Balch & Mackin 2007; PIEK et al. 2008; Helmond et al. 2010). Todavia, nas AHIM secundárias, as respostas leucocitárias podem ser influenciadas pela doença primária do animal, não sendo uma avaliação laboratorial expressiva.

6 CONCLUSÕES

O diagnóstico de AHIM secundária pode ser obtido facilmente por meio de testes laboratoriais aplicáveis na rotina e de baixo custo.

Existe diferenças na avaliação laboratorial de animais com AHIM secundária regenerativa e não regenerativa no momento do diagnóstico, sendo de extrema importância o acompanhamento do paciente para a observação da progressão da doença, assim como sua remissão.

7 REFERÊNCIAS

- Balch A., Mackin A (2007). Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. **Compend**, 29:217-225.
- Brandão LP, Hagiwara MK, Franchini ML (2003) Anemia hemolítica imunomediada em cão: diagnóstico e tratamento. **Clínica Veterinária** 8:46-54.
- Burgess KA, Moore W, Rand ESM, Cotter (2000). Treatment of Immune-Mediated Hemolytic Anemia in Dogs with Cyclophosphamide. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine** 14:456–62.
- Calich VLG (2001) Imunoglobulinas: estrutura e função. In: Calich V, Vaz C. **Imunologia**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora RevinteR, p.55-84.
- Carr AP, Panciera DL, Kidd L (2002). Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. **Journal of veterinary internal medicine** 16:504–9.
- Christopher MM, Harvey JW (1992). Specialized hematology tests. In **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**. p.301-310.
- Couto, CG (2014). Hematology. In R. W. Nelson & C. G. Couto, eds. **Small Internal Medicine**. PA: Elsevier, p.1207–1212.
- Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB (2003). Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 33: 1223-1244.
- Davis EG, Wilkerson MJ, Rush BR (2002). Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 16(4):404–410.
- Day MJ, Mackin AJ (2008). Immune-mediated haematological disease. In: DAY MJ **Clinical Immunology of the dog and cat**. 2^a ed. London: Manson Publishing. p.94-121.
- Day MJ. (2010) Immune-Mediated Anemias in the dog. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. **Schalm's veterinary hematology**. Ames: Wiley-Blackwell. Cap. 2. p.102-106.

de Carvalho LA L, Cruz NDRN, Bueno PJ, Santana AE (2017). Avaliação eritrocitária através da biotecnologia de citometria de fluxo. **Investigação**. 16.

Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM (2004). Hemolytic anemia. **American family physician**, 69:2599-2606.

Duffy, A. L., Olea-Popelka, F. J., Euchner, J., Rice, D. M., & Dow, S. W. 2010. Serum concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 in healthy and critically ill dogs. **Veterinary clinical pathology**, 39:302-305.

Fernandez F, Grindem C (2006). Reticulocyte response. In: Feldman, BF Zinkl JG Jain NC, Schalm OW. **Schalm's Veterinary Hematology** p.110-116).

Fleischman W (2012). Anemia: Determining the Cause. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, 34:E1.

Girello AL, Kuhn TIBB (2002) Anemia hemolítica auto-imune (AHAI): aspectos laboratoriais. In: **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: SENAC. p.167-191

Hackner SG (2007). Haematological emergencies. In LG King, A. Boag, eds. **BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care**. p.192–205.

Harvey JW (2012). *Veterinary Hematology: a diagnostic guide and colors atlas*. Missouri. Elsevier Saunders.

Helmond SE, Polzin DJ, Armstrong PJ, Finke M, Smith SA (2010). Treatment of immune-mediated hemolytic anemia with individually adjusted heparin dosing in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, 24:597-605.

Isaac L (2001) Sistema Complemento. In: Calich V, Vaz C. **Imunologia** 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, p.99-118.

Jain NC (1979). Hematologic characteristic of anemia, part II: interpretive aspects. **California Veterinarian**, 33, 15-18.

Jain NC (1993). **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger.

Kjelgaard-Hansen M, Goggs R, Wiinberg, B, Chan DL. (2011). Use of serum concentrations of interleukin-18 and monocyte chemoattractant protein-1 as prognostic indicators in primary immune-mediated hemolytic anemia in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, 25(1):76-82.

Kohn B (2011) Management of canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia. In: **Proceeding of the 36 World Small Animal Veterinary Congress**. WSAVA. 583-596.

Lacombe F, Lacoste L, Vial JP et al. (1999). Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurement. Comparison of ABX PENTRA 120 Retic, Sysmex R-2000, flow cytometry, and manual counts. **American Journal of Clinical Pathology**. 112:677–686.

Lee LG, Chen CH, Chiu LA (1986). Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. **Cytometry: the journal of the international society for analytical cytology**. 7:508-517.

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC (2008). Raves and Risks for erythropoietin. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 19:145-155.

McManus PM, Craig LE (2001). Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 218:1308-13.

Meyer DJ, Harvey JW (2004) Evaluation of erythrocytic disorders. In: _____. **Veterinary laboratory medicine**. 3th ed. Philadelphia: Elsevier, p.47-81.

Miller E (2009). Immune-Mediated Hemolytic Anemia. In JD Bonagura, DC Twedt, eds. **KIRK'S Current Veterinary Therapy XIV**. Saunders, Elsevier.

Miller SA, Hohenhaus AA, Hale AS (2004) Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dog with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 224:232-235.

Mitchell KD. et al. (2009). Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. **Journal of veterinary internal medicine/ American College of Veterinary Internal Medicine**, 23:585-91.

Moraes LF, Takahira RK. de Assis Golim, M (2017) Avaliação hematológica e da função renal em cães com AHIM. **Acta Scientiae Veterinariae**, 45:1-12.

Moritz A, Tvedten H (2010). Reticulocyte and Heinz Body Staining and enumeration. In Weiss DJ, Wardrop KJ, **Schalm's Veterinary Hematology**. p 1067-1073.

Morley P, Mathes M, Guth A, DOW S (2008). Anti-erythrocyte antibodies and disease associations in anemic and nonanemic dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, 22:886-892.

Nakage APA, Santana AE, Cápuá MLB et al. (2005). Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**. 35:966-973.

Neiger R, Hadley J, Pfeiffer DU (2002). Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. **Veterinary Record**, 150:431-434.

Overmann, J. et al., (2007). Performance of 2 microtiter canine Coombs' tests. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, 36:179-83

Pereira PM, SEKI MC, PALMA PVB, MORAIS FR, SANTANA AE, PEREIRA GT (2008) Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 66-70.

Piek CJ (2011). Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research. **Veterinary quarterly**. 31:129–141.

Piek CJ, Junius G, Dekker A, Schrauwen E, Slappendel, RJ, Teske E (2008). Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: Treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. **Journal of veterinary internal medicine**. 22:366-373.

Pierre RV (2002). Reticulocytes: their usefulness and measurement in peripheral blood. **Clinics in laboratory medicine**. 22:63-79.

Quigley KA, Chelack BJ, Haines DM. Jackson ML (2001). Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 13:297-300.

Reece WO (2006). **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Riley RS, Bem-Ezra JM, Goel R, Tidwell A (2001). Reticulocytes and reticulocyte enumeration. **Journal of clinical laboratory analysis**. 15:267.

Schaefer DMW, Stokol T (2016). Retrospective study of reticulocyte indices as indicators of iron-restricted erythropoiesis in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. 28:304-308.

Schaefer DMW, Stokol T (2016). Retrospective study of reticulocyte indices as indicators of iron-restricted erythropoiesis in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. 28:304-308.

Scott-moncrieff J, Catharine R (2014). Immune-Mediated Disorders. In: Nelson Richard W. e C. Guillermo Couto. **Small Animal Internal Medicine**. 5^a ed. Elsevier Mosby. p.1407-1424

Scott-Moncrieff JC. (2009). Diagnostic Testing for Autoimmune Disease. In: Nelson RW, Couto CG. **Small Animal Internal Medicine**. 4. Ed. St Louis: Mosby Elsevier, 1407-1428.

Shapiro HM (2003). Overture. In:_____. **Practical Flow Cytometry**. 4. ed. New York: Wiley- Liss, 2003. p.1-60.

Simionatto M, Paula JP, Nascimento AJ, Leonart MSS, Cicchetti D (2009). Analysis of manual reticulocyte counts in the clinical laboratories of Ponta-Grossa and Campos Gerais, PR, Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. 31:315-320.

Stokol T (2010). Immune-Mediated Anemias in the Cat. In Weiss DJ, Wardrop KJ, **Schalm's Veterinary Hematology**, p.226-232.

Swann JW, Skelly BJ (2011). Evaluation of Immunosuppressive Regimens for Immune-Mediated Haemolytic Anaemia: A Retrospective Study of 42 Dogs. **The Journal of Small Animal Practice** 52:353–58.

Swann JW, Skelly BJ (2013). Systematic review of evidence relating to the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**. 27:1–9.

Swann, JW, Skelly BJ (2015) Systematic review of prognostic factors for mortality in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of veterinary internal medicine**, 29:7-13.

Tarrant JM. (2005). The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **The Veterinary Journal**. 170:278–288.

Thompson, JP. (1997) Moléstias Imunológicas . In: Ettinger, SJ, Feldman, EC. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole. p.2766-2802.

Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell T (2015). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Tizard IR (2002). *Imunologia Veterinária: uma introdução*. Editora Roca. p.532.

Tvedten, H (2010). Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In Weiss DJ, Wardrop KJ. **Schalm's Veterinary Hematology**. p. 152-161.

Valenciano, A., Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat (4th ed., p. 458). St. Louis: Elsevier **Veterinary Medicine and Surgery**, 7:301-310.

Viana KA, Carvalho MG, Dusse LMS et al. (2014). Flow cytometry reticulocyte counting using acridine orange: validation of a new protocol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 50:189-199.

Weinkle TK, Center SA, Randolph JF, Warner KL, Barr SC, Erb HN (2005). Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993–2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 226:1869-1880.

Weiss D, Tvedten H (2004) Erythrocyte disorders. In. Willard MD, Tvedten H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 4. ed. St. Louis: Saunders. p.38-62.

Weiss DJ (2008). Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. **Journal of comparative pathology**. 138:46–53.

Weiss DJ, Wilkerson MJ (2010). Flow cytometry. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's: Veterinary Hematology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. p.1074-1081.

Whitley NT, Day MJ (2011). Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. **Journal of small animal practice**. 52:70–85.

Zabolotzky SM, Walker DB (2014). Peripheral Blood Smears. Cowell R. Valenciano A, **Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**, 458.