

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

**FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E  
RETICULOCITOMETRIA EM CÃES ACOMETIDOS POR  
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Amanda Bizare  
Médica Veterinária**

**2020**

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

**FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E  
RETICULOCITOMETRIA EMCÃES ACOMETIDOS POR  
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Amanda Bizare**

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

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marileda Bonafim Carvalho - Coorientadora**

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 de Clínica Médica.

**2020**

Bizare, Amanda

B625f      Fragilidade osmótica eritrocitária e reticulocitometria de cães  
acometidos por doença renal crônica. / Amanda Bizare. -- Jaboticabal,  
2020

41 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Coorientadora: Marileda Bonafim Carvalho

1. Citofluorometria. 2. Hemácias. 3. Hemólise. 4. Nefropatia  
crônica.    I.Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca  
da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados  
fornecidos pela autora.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**AMANDA BIZARE** – nasceu em Colina, interior do Estado de São Paulo, no dia dois de maio de 1992. Filha de Ulisses Ricardo Bizare e Maria Valéria Paro Bizare. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2015, pela Universidade Federal de Uberlândia –UFU, Uberlândia-MG. Durante a graduação integrou o Programa de Educação Tutorial (PET) de 2013 a 2015 e foi monitora nas disciplinas de genética e anatomia veterinária durante o ano de 2013. Participou do Programa de Residência em Medicina Veterinária do MEC junto ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFU, de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2018. Ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Clínica Médica Veterinária da FCAV-Unesp em março de 2018 sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e coorientação da Prof. Dra. Marileda Bonafim Carvalho. Durante o mestrado foi integrante do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária – GPNUV coordenado pela Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho e do Grupo de Pesquisa em Citologia Veterinária – GECITO coordenado pelo Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, período em que participou ativamente da rotina de análises clínico-patológicas desenvolvidas junto ao Laboratório de Patologia Clínica do HV/ FCAV/ UNESP, rotina consagrada, sobretudo, ao ensino, pesquisa e extensão.

*Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida. Basta que lute e aguarde um novo amanhecer – Margaret Thatcher*

À minha família e ao meu noivo, com todo meu amor e gratidão, por serem minha base, meu porto seguro, por sempre torcerem e me apoiarem nas minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto aqui minha sincera gratidão:

Primeiramente a Deus por me amparar e guiar meus passos, me dar paciência e discernimento para concretizar mais esta etapa de minha vida;

Ao meus pais, Ulisses e Maria Valéria, e ao meu irmão João pelo amor incondicional em todos os momentos. Agradeço pela paciência, dedicação, compreensão e apoio em todas as minhas escolhas profissionais, obrigada por estarem sempre por perto mesmo quando a distância física era grande.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, por ter me recebido como a sua orientada, por toda a confiança depositada, por me apoiar e motivar em todas as fases desta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marileda Bonafim Carvalho, professora responsável pelo Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária da UNESP de Jaboticabal, por ter aberto as portas do seu setor e por ter me ensinado tanto, desde clínica, estatística e até mesmo sobre a vida.

Ao meu noivo, Mateus Junqueira Napolitano Nogueira, pelo apoio, companheirismo, paciência e compressão, sempre entendendo tão carinhosamente minha ausência em alguns momentos e angústias.

A todos aqueles que integram o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *campus* de Jaboticabal-SP, inclusive pós-graduandos, técnicos, residentes e estagiários pelo auxílio nas análises, correções, motivação diária, companheirismo e amizade.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta caminhada, alguns de longa data e outros que conheci nesta instituição que, generosamente, tornaram minha caminhada mais leve e prazerosa.

Às “meninas” da nefrologia, Giovanna Sarri Silva e Ana Maria Ramirez por toda a parceria na execução desse projeto.

Aos meus grandes amigos que me acompanharam nessa jornada Laís Bernardes Molleiro, Gabriela Ribeiro, Bruna Couto, Wilson Oliveira (Xuxu), Flávia Prata Linhares, Patrícia Jabali, Fernanda Martinato, Letícia Orsini pelos

momentos de alegria, conversas, conselhos compartilhados, enfim, por todo o apoio. Vocês são inesquecíveis.

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

E por último, mas não menos importante, a todos os animais e seus tutores, que possibilitaram a realização deste estudo, minha gratidão eterna.



## SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3 OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo geral.....	5
3.2 Objetivos específicos .....	5
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1 Animais e grupos experimentais .....	6
4.2 Elegibilidade dos pacientes.....	8
4.3 Obtenção e análise das amostras biológicas.....	9
4.3.1 Hemograma .....	10
4.3.2 Bioquímica sérica.....	10
4.3.3 Urinálise e UP/C .....	11
4.3.4 Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) .....	11
4.3.5 Contagem de reticulócitos .....	12
4.3.5.1 Contagem de reticulócitos manual.....	12
4.3.5.2 Reticulocitometria.....	12
4.4 Análise estatística .....	14
5 RESULTADOS .....	15
6 DISCUSSÃO .....	21
7 CONCLUSÃO.....	24
8 REFERÊNCIAS.....	24



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



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Fragilidade osmótica eritrocitária de cães acometidos por doença renal crônica**", protocolo nº 012536/18, 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 06 de setembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 28/02/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	40
Peso / Idade	Diferentes pesos e idades
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Animais atendidos na rotina dos Serviços de Clínica Médica de Pequenos Animais e da Nefrologia e Urologia da FCAV-Unesp – Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de setembro de 2018.

*Fabiana Pilarski*  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

## FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA E RETICULOCITOMETRIA EM CÃES ACOMETIDOS POR DOENÇA RENAL CRÔNICA

**RESUMO-** A anemia é considerada um dos fatores para avaliar progressão da doença renal e diminuição da qualidade de vida do paciente. Conforme a doença renal progride, ocorre aumento gradativo na produção de toxinas urêmicas que reduz a meia vida dos eritrócitos circulantes por interferir na estabilidade da membrana eritrocitária. Para tanto, utiliza-se contagem de reticulócitos para classificar a anemia como regenerativa ou não regenerativa. Objetivou-se neste estudo avaliar a resistência da membrana das hemácias, utilizando-se do teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) em cães com doença renal crônica (DRC) e avaliação de reticulócitos. Foram avaliados 43 cães provenientes da rotina do Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - *campus* Jaboticabal. As referidas unidades experimentais foram distribuídas em três grupos, quais sejam, G0 (n=13), composto por cães hígidos e G1, DRC estádios 1 e 2 (n=14) e G2, DRC estádios 3 e 4 (n=16), classificados de acordo com o recomendado pela International Renal Interest Society. A fim de definir os critérios de inclusão dos cães foram feitos, além do exame físico, a avaliação de pressão arterial, hemograma, contagem de reticulócitos, exames bioquímicos, urinálise e relação proteína/creatinina urinária (UP/C). Para execução do teste de FOE as hemácias foram diluídas em concentrações decrescentes de cloreto de sódio e analisadas por citometria de fluxo. As concentrações de creatinina sérica (sCr), ureia sérica (sUreia), fosfato sérico (sP) e UP/C foram superiores no grupo G2 quando comparado ao G0 ( $p < 0,05$ ). Com relação às variáveis hematológicas, foram observadas diferença estatística entre o número de hemácias ( $p < 0,009$ ), hematócrito ( $p < 0,007$ ) e hemoglobina ( $p < 0,007$ ), que decresceu conforme a doença renal avançava. A FOE e os reticulócitos apesar de terem variado individualmente, dependendo do estágio da DRC de cada paciente, não apresentaram diferença estatística quando comparado aos animais controle e doentes, e tampouco quando foram confrontados os diferentes estádios de cães com DRC ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos neste estudo demonstram, portanto que, embora a reticulocitometria seja fiadora da contagem de reticulócitos, a contabilização manual de reticulócitos ainda é uma opção segura e somente com a FOE não é possível prever alterações na membrana do eritrócito em cães com DRC.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo, Hemácias, Hemólise, Nefropatia crônica.

## ERYTHROCYTE OSMOTIC FRAGILITY AND RETICULOCYTOMETRY IN DOGS AFFECTED BY CHRONIC KIDNEY DISEASE

**ABSTRACT-** Anemia is considered one of the factors to assess the kidney disease progress and the decrease in patient's quality of life. As kidney disease progresses, there is a gradual increase in urinary toxin production that shortens the circulating erythrocyte half-life by interfering with erythrocyte membrane stability. To do this, use a reticulocyte count to classify anemia as regenerative or non-regenerative. The objectives of this study were to evaluate the resistance of the red blood cells, using the Erythrocyte Osmotic Fragility test in dogs with chronic kidney disease (CKD) and to evaluate reticulocytes. Forty-three dogs were charged, followed by the routine of the Nephrology and Urology Service of the Governor Laudo Natel Veterinary Hospital of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences - UNESP - Campus Jaboticabal. The experimental units were divided into three groups, namely, G0 (n = 13), consisting of healthy dogs and G1, CKD stages 1 and 2 (n = 14) and G2, CKD stages 3 and 4 (n = 16), classification proposed by the International Renal Interest Society. In order to define the inclusion criteria of dogs made, in addition to physical examination, an assessment of blood pressure, blood count, reticulocyte count, biochemical tests, urinalysis, and urinary protein/creatinine ratio. To perform the erythrocyte osmotic fragility test, red blood cells were diluted in decreasing sodium chloride filters (0.9 to 0.0%) and analyzed by flow cytometry. As creatinine serum concentration (sCr), serum urea (sUL), serum phosphorus (sP) and urinary protein/creatinine ratio. were higher in group G2 when compared to G0 ( $p < 0.05$ ). Regarding hematological variables, statistical differences were observed between the number of red blood cells ( $p < 0.009$ ), hematocrit ( $p < 0.007$ ) and hemoglobin ( $p < 0.007$ ), which decreased according to the advanced kidney disease. A cross-referenced FOE despite varying the number of participants, depending on each patient's CKD stage, shows no statistical difference when it shows control animals and damage, and shows when it is confronted with different cases of dogs with CKD ( $p > 0, 05$ ) The results obtained in this study demonstrate, therefore, that although reticulocytometry is a guarantor of reticulocyte counting, manual reticulocyte counting is still a safe option and only with FOE it is not possible to predict changes in the erythrocyte membrane in dogs with CKD.

**Keywords:** flow cytometry, red blood cell, hemolysis, chronic nephropathy.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos grupos controle e doentes renais crônicos de acordo com a classificação estabelecida pela <i>IRIS staging of canine kidney disease (CKD)</i> – 2019. ....	8
<b>Tabela 2.</b> Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a <i>IRIS staging of canine kidney disease (CKD)</i> – 2019 para a razão proteína - creatinina urinária(UP/C). ....	8
<b>Tabela 3.</b> Subestadiamento da DRC de acordo com a pressão arterial sistólica (PAS) (IRIS, 2019). ....	9
<b>Tabela 4.</b> Variáveis bioquímico-sélicas e métodos analíticos utilizados para suas determinações laboratoriais. ....	9
<b>Tabela 5.</b> Características de acordo com raça, gênero e grupos dos 43 cães avaliados, distribuídos em quatro grupos – controle e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – <i>IRIS staging of CKD</i> - 2019). ....	15
<b>Tabela 6.</b> Concentrações sélicas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia) de 43 cães, distribuídos nos grupos: controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2).de acordo com o teste de kruskal-Wallis ( $p<0,05$ ). ....	16
<b>Tabela 7.</b> Concentrações sélicas de fosfato (sP) e da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) de 43 cães distribuídos nos grupos controle e doentes renais crônicos (DRC), estes reagrupados em dois grupos (DRC 1-2, G1; DRC 3-4, G2 – <i>IRISstaging of CKD</i> - 2019). ....	17
<b>Tabela 8.</b> Médias e desvios-padrões obtidos para variáveis hematológicas de 43 cães, distribuídos nos grupos controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2). ....	19

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Citograma ilustrando a quantidade de hemácias íntegras (pontos laranjas) e debris celulares (pontos azuis) em cada gradiente de concentração. Os glóbulos vermelhos (*RBCs*) estão representados no quadrante superior direito no gráfico de dispersão lateral (*side scatter - SSC*) versus detecção de dispersão frontal (*foward scatter - FSC*)..... 12
- Figura 2.** Quantificação de reticulócitos pela avaliação citométrica. Tubo com marcação negativa (2A) e tubo com marcação positiva (2B). *Dotplot* representativo do Gate para seleção de eventos únicos (2A1, 2B1). *Dotplot* representativo da população eritrocitária (2A2, 2B2). ..... 14
- Figura 3.** Representação gráfica dos resultados das análises estatísticas com distribuição dos dados em quartis (mediana, máximo e mínimo) das variáveis hematológicas de cães saudáveis (G0) e daqueles acometidos por doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e DRC 3-4 (G2). ..... 20
- Figura 1.** Representação gráfica dos resultados da análise estatística de Correlação de Spearman R. Comparação de reticulócitos entre os três grupos (cães controle- GC, DRC 1-2 – G1 e DRC 3-4 – G2)..... 19
- Figura 5.** Representação gráfica das curvas obtidas a partir das médias de percentual de hemólise em cada uma das diluições às quais os concentrados de hemácias dos cães controle, DRC1-2 e DRC 3-4 foram submetidos. .... 20

## 1 INTRODUÇÃO

Os eritrócitos podem sofrer alterações morfológicas diante de diversos estados patológicos, tais como doenças renais ou hepáticas (Elias et al, 2004), deficiências nutricionais e diabetes mellitus (Turchetti et al 1997; Della Porta et al 2006). Qualquer situação que provoque alteração de volume, tamanho ou tempo de vida, quantidade de hemoglobina, elasticidade da membrana eritrocitária ou viscosidade sanguínea, influencia diretamente a integridade de membrana (Makinde e Bodade, 1994; Jain, 2010). As hemácias são suscetíveis também às alterações de pH sanguíneo devido a modificações do equilíbrio ácido-base, como pode ocorrer em casos de doenças renais (Polzin et al, 2004). Tais condições podem causar diminuição da resistência celular e, conseqüentemente, ao aumento da fragilidade osmótica eritrocitária (Sant'ana et al 2001).

O volume celular da hemácia mantém-se em equilíbrio graças à estabilidade da membrana, que é composta por proteínas, lipídeos e carboidratos (Makinde e Bodade, 1994). Quarenta por cento da membrana do eritrócito é composta por lipídeos, sendo que o colesterol perfaz dezesseis por cento e os fosfolipídios, vinte por cento de sua composição (Bratosin et al, 1998). Como os lipídeos transitam facilmente entre as lipoproteínas plasmáticas e aquelas da membrana eritrocitária, a composição lipídica da membrana eritrocitária pode se alterar em resposta a mudanças das concentrações séricas de colesterol, afetando, assim, a sobrevivência dos eritrócitos na circulação (Meurs et al, 2005). A estabilidade da membrana pode ser afetada também por fatores como sais, etanol, ureia, oxidação celular e idade (Telen e Kaufman, 1999).

Na análise imediata de esfregaço sanguíneo corado, é possível observar alterações de forma dos eritrócitos, morfológicamente conhecidas como esquizócitos, que resultam do cisalhamento eritrocitário devido a traumas intravasculares. Os acantócitos, que estão associados à deficiência na síntese de colesterol e fosfolipídeos da membrana eritrocitária; os esferócitos, que são encontradas no sangue de cães com anemia hemolítica e os leptócitos, que são eritrócitos que sofreram alterações na razão superfície/volume (Trhall et al, 2015). Tais alterações podem estar associadas com a fragilidade osmótica



eritrocitária (FOE) e, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento de anemias (Makinde e Bodade, 1994; Jain, 2010).

A FOE pode ser testada *in vitro* como escopo de avaliar a resistência osmótica dos eritrócitos, quando submetidos a concentrações decrescentes (0,9 a 0,0%) de solução tamponada de cloreto de sódio (Selimet al, 2009; Jain, 2010).

Além disso, os cães com doença renal crônica (DRC) geralmente apresentam baixa contagem de reticulócitos. A concentração de reticulócitos é muito útil na avaliação de anemias. A taxa de liberação de reticulócitos da medula óssea é o melhor meio de avaliar a função dos componentes eritrocitários da medula óssea (Trhall et al, 2015).

O teste de FOE não deve ser interpretado isoladamente, mas sim em conjunto com os dados hematológicos e avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo (Trhallet al, 2015).

Embora o doente renal crônico apresente anemia normocítica normocrômica, mais frequentemente nos estádios 3 e 4 (Polzinet al, 2009), existem poucos estudos sobre a dinâmica dos eritrócitos na circulação durante o curso da doença, o que enseja a necessidade da condução de experimentos visando melhor compreensão desses eventos. Outro fato importante que justifica esta pesquisa são as dificuldades já conhecidas de se diagnosticar a doença renal crônica em pacientes que ainda não apresentam alterações nas hemácias evidenciadas no quadro eritrocitário (Macdougall, 2001) nos estádios 1 e 2 (IRIS, 2019).

São escassos os relatos envolvendo fragilidade osmótica eritrocitária aplicada às alterações hematológicas em cães com DRC, bem como, a descrição diagnóstica e evolução patológica da população eritrocitária avaliada pela citometria de fluxo.

Com base nas informações precedentes, tendo em vista a alta casuística de DRC em cães e, ademais, sabendo das alterações que esta doença pode provocar no quadro hematológico, este estudo teve como escopo avaliar a resistência da membrana eritrocitária a partir de diferentes concentrações de NaCl, em cães com doença renal crônica correlacionando às alterações clínicas e laboratoriais de tais pacientes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A doença renal crônica é capaz de impactar negativamente as capacidades excretora e de concentração dos rins, com redução da filtração glomerular e aumento da concentração plasmática de substâncias que são normalmente eliminadas na urina (Polzin et al, 2004).

Após a instalação das lesões renais ocorrem mudanças estruturais e adaptativas nos néfrons remanescentes, como a hipertrofia e hipertensão glomerular, na tentativa de manter a taxa de filtração glomerular (TFG), o que gera aumento do fluxo tubular. Esse evento resulta em diminuição da capacidade de reabsorção tubular de água e solutos. Também, o aumento do fluxo na alça de Henle e nos ductos coletores, que impede que o mecanismo de contracorrente opere de forma efetiva, comprometendo, assim, a concentração urinária (Polzin et al, 2004; Hall, 2011).

De acordo com a classificação estabelecida pela *International Renal Interest Society* (IRIS, 2019), no que diz respeito à DRC, o cão pode ser categorizado em quatro estádios distintos de acordo com dados clínicos e laboratoriais.

No decorrer da evolução da DRC, a depender do grau de comprometimento da função renal, outros sistemas são afetados, incluindo digestório, nervoso (Polzin et al, 2004), cardiovascular e hematopoiético (Senior, 2001). Dentre as alterações laboratoriais destacam-se azotemia, anemia normocítica normocrômica com baixa contagem de reticulócitos, desequilíbrio natrêmico (Finco, 1995), baixa densidade urinária e acidose metabólica (Otsset al, 2000). O paciente, na maior parte dos casos, apresenta-se malnutrido, com carência de vitaminas e minerais e conseqüentemente, ocorre uma redução dos mecanismos antioxidantes, o que favorece o processo de estresse oxidativo (Locatelli et al, 2003).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ultrapassam a capacidade de defesa do sistema antioxidante, resultando em lesão tecidual (Cachoeiro et al, 2008). Outros fatores que agravam o quadro e elevam ainda mais a produção e acúmulo de EROs é o fato de que os pacientes com doença renal, geralmente, apresentam idade

avançada, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e desordens sistêmicas (Locatelli et al, 2003; Galvão, 2009).

Dentre as desordens sistêmicas, a anemia é um dos achados mais comuns em pacientes com DRC, o que predispõe ao estresse oxidativo, pois as hemácias possuem alta concentração de glutatona e, portanto, têm capacidade alta de metabolizar as EROs. A hipóxia tecidual aumenta a produção de EROs e a camada bilipídica da membrana fica susceptível às agressões oxidativas, o que resultará em hemólise (Schmid e Schiffl, 2010).

Suliman et al (2002) avaliaram as concentrações plasmáticas de glutatona em pacientes humanos renais crônicos, com diferentes graus de anemia e constataram que, quanto menor o hematócrito, menor a concentração de glutatona no interior das hemácias. Galvão (2014) mensurou a glutatona em cães e obteve a mesma correlação que Suliman et al (2002), indicando diminuição da capacidade de defesa antioxidante em pacientes renais.

Ao avaliar a FOE de gatos com DRC em diferentes estádios, Elias et al (2004) observaram que os gatos apresentavam maior FOE que os gatos hígidos. Acredita-se que outras espécies também apresentem fragilidade osmótica eritrocitária associada à doença renal, o que pode ser influenciado por alterações metabólicas e estresse oxidativo (Galvão, 2014).

A anemia, considerada um dos fatores para avaliar progressão da doença renal, implica diminuição da qualidade de vida do paciente (Lankhorst e Wish, 2010). Sabe-se que a anemia na DRC decorre de ações sinérgicas incluindo inibição da eritropoiese, mecanismos hemolíticos ou por perda de sangue e atuação de citocinas inflamatórias (Joske et al, 1956; Borin, 2011).

Em relação à avaliação da anemia, a contagem de reticulócitos é um teste útil e que apresenta baixo custo de realização. Os reticulócitos são liberados na circulação cerca de dois dias antes da maturação completa. Segundo Lankhorst e Wish (2010), na DRC a produção deficiente de eritropoietina resulta em diminuição da produção e liberação de células pela medula óssea e, conseqüentemente, do número de reticulócitos. Assim, a contagem de reticulócitos é uma das formas de avaliar regeneração e resposta à eritropoietina.

De 1940 até início dos anos 80, a contagem de reticulócitos somente era realizada por esfregaços sanguíneos corados com corantes supravitalis, como o

novo azul de metileno ou azul brilhante de cresil, e leitura por meio da microscopia de luz (Nobes e Carter, 1990; Riley et al, 2002). Atualmente, essa técnica ainda é o método mais usado para a contagem de reticulócitos nos animais domésticos. Contudo, o desenvolvimento de corantes fluorescentes específicos para RNA nos anos 80 propiciou o uso da citometria de fluxo na contagem de reticulócitos com aumento da sensibilidade e precisão (Riley et al, 2002; McCoy, 2002) e essa técnica ficou conhecida como reticulocitometria.

A reticulocitometria tem a vantagem de enumerar uma grande quantidade de células (10.000 a 50.000) em um curto espaço de tempo e com pouca variação de ordem técnica (Nobes e Carter, 1990; Riley et al, 2002). A maior desvantagem é o alto custo do equipamento (citômetro de fluxo). Também corre-se o risco da contagem de reticulócitos ser superestimada em casos de anemia regenerativa, devido a uma possível interferência de inclusões em eritrócitos, como os eritrócitos nucleados, os corpúsculos de Howell-Jolly, corpúsculo de Heinz e parasitas intracelulares, que podem ser marcados com o fluorocromo e serem lidos pelo aparelho como reticulócitos (Ferguson et al, 1990; Brow e Wittwer, 2000; Riley et al, 2001).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este ensaio foi idealizado com o objetivo geral de se estudar a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) e contagem de reticulócitos em cães acometidos por doença renal crônica (DRC), em diferentes estádios, cujas membranas eritrocitárias foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a FOE decães com e sem doença renal crônica (G1 e G2);
- Confrontar a FOE nos diferentes estadiamentos da DRC (IRIS, 2019);

- Comparar a contagem de reticulócitos manuais com as da citometria de fluxo dos cães portadores de DRC (G1 e G2) e controle (G0);
- Confrontar a contagem de reticulócitos dos grupos G0, G1 e G2.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e grupos experimentais

A utilização dos animais para o presente estudo foi aprovada pela CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV - Unesp – Jaboticabal (SP), sob o número de protocolo 012536/18. A inclusão dos pacientes foi feita sob consentimento livre e esclarecido, de cada proprietário.

Foram incluídos 43 cães adultos, atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV - Unesp (HV) distribuídos em três grupos experimentais, como a seguir.

**Grupo 0– Controle (G0):** constituído de 13 cães adultos (acima de 1 ano), hípidos, sem distinção de gênero e raça, cujo bom estado de saúde foi avaliado com base em exames clínicos gerais, exames complementares laboratoriais e de imagem.

**Grupo 1– DRC 1 e 2 (G1):** composto por 14 cães com doença renal crônica estadiados como DRC 1 e DRC 2, independentemente de gênero, raça e idade.

**Grupo 2 – DRC 3 e 4 (G2):** constituído por 16 cães com doença renal crônica estadiados como DRC 3 e DRC 4, independente de gênero, raça e idade.

Preliminarmente, como parte da rotina de atendimento a cães e gatos no Serviço de Nefrologia e Urologia do HV, fez-se o estadiamento do DRC, de acordo com os critérios da “International Renal Interest Society” (IRIS, 2019), padronizando-a em quatro estádios e propiciando assim a instituição dos subgrupos DRC estágio 1, DRC estágio 2, DRC estágio 3 e DRC estágio 4 (Tabela 1). A seguir, instituiu-se o subestadiamento da DRC com base nos valores obtidos para a razão proteína/creatinina urinária (UP/C) (Tabela 2),

pressão arterial sistêmica do paciente (Tabela 3) e exames de imagem, ultrassonográfico e radiográfico.

**Tabela 1.** Composição dos grupos controle e doentes renais crônicos de acordo com a classificação estabelecida pela IRIS *staging of canine kidney disease* (CKD) – 2019.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Características</b>
Controle	13	Cães hígidos
DRC-1	4	<u>Estádio 1</u> - não azotêmico; creatinina sérica <1,4mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-2	10	<u>Estádio 2</u> - azotemia renal leve; creatinina sérica 1,4 a 2,8mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-3	9	<u>Estádio 3</u> - azotemia renal moderada; creatinina sérica 2,9 a 5,0mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.
DRC-4	7	<u>Estádio 4</u> - azotemia renal severa; creatinina sérica >5,0mg/dL; diminuição da capacidade de concentrar a urina e existência de lesões renais crônicas.

## 4.2 Elegibilidade dos pacientes

Como critério de inclusão no grupo de DRC, consideraram-se os valores de creatinina sérica e demais requisitos (Tabela 1), após devida hidratação do paciente, obtidos em, pelo menos, dois momentos diferentes e ao longo de pelo menos 15 dias de acompanhamento.

De acordo com a classificação proposta pela IRIS (2019), os pacientes foram subestadiados quanto à proteinúria renal (Tabela 2). O subestadiamento do paciente proteinúrico foi estabelecido somente após a exclusão de fatores extrarrenais de perda urinária de proteína e, ainda, a confirmação de persistência dessa proteinúria pela determinação do valor da razão proteína/creatinina urinária (UP/C). Ainda de acordo com a supracitada classificação da IRIS (2019), os pacientes foram subestadiados com base na sua pressão arterial sistólica durante o atendimento (Tabela 3).

**Tabela 2.** Subestadiamento da doença renal crônica canina segundo a IRIS “staging of canine kidney disease” (CKD) – 2019 para a razão proteína creatinina urinária(UP/C).

<b>Subestádios</b>	<b>Valor de UP/C</b>
Não proteinúrico	< 0,2
Proteinúria limítrofe	0,2 – 0,5
Proteinúrico	> 0,5

**Tabela 3.** Subestadiamento da DRC de acordo com a pressão arterial sistólica (IRIS, 2019).

<b>Subestádios</b>	<b>Valor de PAS (mmHg)</b>
Risco mínimo (0)	< 150
Baixo risco (1)	150 – 159
Risco moderado (2)	160 – 179
Alto risco (3)	≥ 180

#### 4.3 Obtenção e análise das amostras biológicas

Todas as coletas de amostras foram realizadas. As amostras de sangue periférico foram obtidas por venopunção jugular, com o animal em jejum e envasadas em tubos a vácuo contendo ácido etileno-diamino-tetraacético dipotássico (EDTA-K<sub>2</sub>)<sup>1</sup>, preconizando-se a coleta de 2 mL, para análises hematológicas, incluindo hemograma, FOE, contagem de reticulócitos manual e citofluorométrica. Ademais, foram obtidos 3 mL de sangue total, em tubos estéreis a vácuo sem anticoagulante e com ativador de coágulo. Os tubos sem anticoagulantes foram centrifugados<sup>2</sup> a 720 g por 5 minutos e, após sinérese, as amostras de soro obtidas foram transferidas para microtubos<sup>3</sup> para posteriores análises bioquímicas.

Foram coletados 10 mL de urina, de cada uma das unidades experimentais, por cistocentese para realização do exame de urina – urinálise e UP/C, que foram analisados imediatamente após a coleta.

Todas as análises laboratoriais dos pacientes foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Unesp, *campus* de Jaboticabal, SP.

<sup>1</sup>BD Vacutainer EDTA K<sub>2</sub> - BD, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centrifuga EXCELSA® II Mod. 206 BL - FANEM®, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Criotubo 2,0 mL - Modelo 89020. Trasadingen, Suíça.



### 4.3.1 Hemograma

As variáveis hematológicas do eritograma, leucograma e trombograma foram obtidas com o auxílio de um analisador automático<sup>4</sup>, imediatamente após a coleta de sangue. Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados, fixados à temperatura ambiente e corados com uma mistura de May-Grunwald, Giemsa e Metanol, para posterior obtenção da fórmula leucocitária relativa (FLR), à microscopia óptica (objetiva de imersão).

Ainda, utilizando-se do esfregaço sanguíneo, foram avaliadas 1.000 hemácias aleatoriamente e contabilizadas aquelas que apresentavam variações na sua morfologia. Foram incluídas nas alterações contabilizadas: esquizócitos, acantócitos, esferócitos, codócitos e corpúsculo de Howell-Jolly.

### 4.3.2 Bioquímica sérica

Para a determinação dos constituintes bioquímicos séricos utilizou-se equipamento automático<sup>5</sup> e kits comerciais<sup>6</sup>. As variáveis bioquímico-sélicas ensaiadas encontram-se listadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Variáveis bioquímico-sélicas e métodos analíticos utilizados para suas determinações laboratoriais.

Variáveis bioquímicas	Metodologia
Proteína total (PT)	Biureto
Albumina (ALB)	Verde bromocresol
Alanina aminotransferase (ALT)	Cinético UV-IFCC
Cálcio total	Cresolftaleína complexona
Creatinina (Cr)	Cinético UV
Fosfatase alcalina (FA)	Cinético UV-IFCC
Fosfato (P)	Cinético UV
Ureia	Cinético enzimático UV

<sup>4</sup>ABX Micros ESV 60 -Horiba® Medical Ltda, Montpellier, França.

<sup>5</sup>Labmax Plenno- Labtest Diagnóstica. Lagoa Santa - MG, Brasil.

<sup>6</sup> Proteínas totais, ref. 99; Albumina, ref. ; ALT, ref.; Cálcio Total, ref. ; Creatinina, ref. ; Fosfatase alcalina, ref. ; Fosfato UV, ref.; Ureia UV, ref. - Labtest Diagnóstica. Lagoa Santa - MG, Brasil.

### 4.3.3 Urinálise e UP/C

Para urinálise foram analisados os seguintes parâmetros: avaliação física, química e sedimentoscopia urinária. A análise física compreendeu a observação macroscópica da coloração, aspecto, volume e a densidade urinária, sendo que esta última foi mensurada por refratometria. Para a análise química utilizou-se a fita de urinálise Labest®. Para a sedimentoscopia, as amostras foram centrifugadas a 320g, durante cinco minutos. O sedimento foi preparado entre lâmina e lamínula, para análise a fresco, empregando-se objetiva com aumento de 40x, para realização da contagem de cada tipo de elemento figurado por campo. O sobrenadante foi reservado para dosagem das concentrações urinárias de proteína e creatinina e obtenção da UP/C, que era realizada no mesmo dia da coleta.

### 4.3.4 Fragilidade Osmótica Eritrocitária

A FOE foi avaliada com o auxílio do citômetro de fluxo<sup>7</sup>.

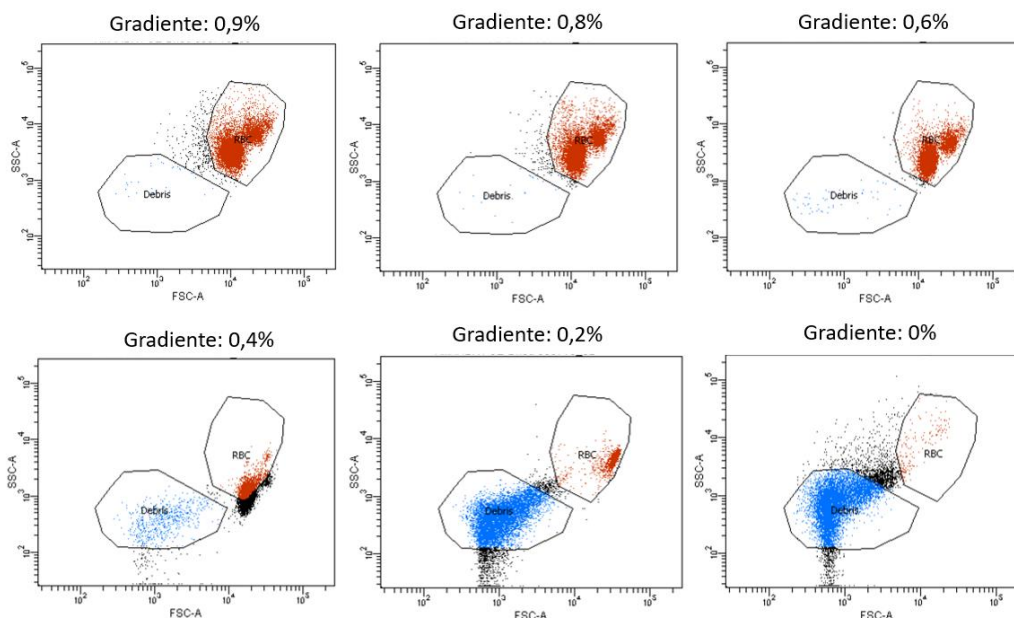
Primeiramente, o tubo com EDTA contendo sangue total foi centrifugado para separação do plasma. Após a separação, foram pipetados 2 mL de solução salina tamponada (PBS) 0,01M (1:10) e adicionadas no tubo com o concentrado de hemácias, até contínuo a solução era homogeneizada e centrifugada a 720 g durante 5 minutos, após o término da centrifugação, o precipitado era separado novamente, restando no tubo apenas o concentrado de hemácias. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, era pipetado em um tubo de ensaio seco, 1 mL de solução fisiológica<sup>8</sup> diluída em dez tubos com concentrações decrescentes de NaCl (0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 e 0,0%) e pH fixado em 7,4 (Yamamoto et al, 2014) e, até contínuo, adicionados 20 µL do concentrado de hemácias já lavadas. Em seguida, as amostras ficavam em repouso por 10 minutos e, logo após, em sequência, era realizada a aquisição das células em citometria de fluxo para obtenção da fragilidade osmótica dos eritrócitos.

---

<sup>7</sup>BD FACS CANTO™II – Becton-Dickinson, NJ, Estados Unidos.

<sup>8</sup>Solução fisiológica estéril 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda., Barueri, SP, Brasil.

À análise citométrica procedeu-se a aquisição de 10.000 eventos, conforme metodologia proposta por Stockham e Scott (2011) e Tvedten e Weiss (2012), e cujos resultados foram apresentados sob a forma de gráficos em escala de log (Figura 2), do tipo *dotplot* para avaliar o comportamento da população.



**Figura 2.** Citograma ilustrando a quantidade de hemácias íntegras (pontos laranjas) e debris celulares (pontos azuis) em cada gradiente de concentração. Os glóbulos vermelhos (RBCs) estão representados no quadrante superior direito no gráfico de dispersão lateral de dispersão lateral (*side scatter* - SSC) versus detecção de dispersão frontal (*forward scatter* - FSC).

#### 4.3.5 Contagem de reticulócitos

Dentre os métodos de contagem de citometria de fluxo existem os tradicionais com uso de corantes supravitais e aqueles mais sofisticados, como a reticulocitometria.

##### 4.3.5.1 Contagem manual de reticulócitos

A contagem de reticulócitos em esfregaços sanguíneos por microscopia de luz foi realizada usando 100µL de sangue total incubado com azul brilhante de cresil (100µl) em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, foi feito o esfregaço sanguíneo e que, após a devida secagem, foi contracorado

com uma mistura de May-Grunwald, giemsa e metanol. Realizaram-se as contagens de reticulócitos com o auxílio de objetiva de imersão (100X), sendo contadas 1.000 hemácias totais e dentre elas os reticulócitos encontrados, obtendo-se assim a contagem de reticulócitos relativa sem correção. Para encontrar a contagem de reticulócitos absoluta multiplicou-se o número total de reticulócitos relativo pelo número total de hemácias do paciente.

#### 4.3.5.2 Reticulocitometria

A quantificação de reticulócitos foi igualmente obtida por citometria de fluxo com auxílio do citômetro de fluxo<sup>7</sup>. A detecção e enumeração de reticulócitos caninos foram realizadas com o fluorocromo laranja de thiazole (LT)<sup>9</sup> (Abbot e Mcgrath, 1991; Evans e Fagg, 1994) que trata-se de um fluorocromo permeável à membrana dos reticulócitos e que se liga aos ácidos nucleicos, formando um complexo nucleotídeo-reagente com emissão de fluorescência (Ferguson et al, 1990). No ensaio de reticulocitometria foi utilizado um tubo de ensaio seco, de marcação negativa, com 10 µL de sangue total adicionado a 990 µL de solução tampão de PBS (0,002 M EDTA e 0,02% azida sódica, sem laranja de thiazole), e outro tubo, de marcação positiva para reticulócitos, com 10 µL de sangue total adicionados à solução contendo 20 µL de laranja de thiazole (1 mg/mL LT em metanolem 970 µL de solução tampão PBS, contendo 0,002 M EDTA e 0,02 de azida sódica). Em seguida, os referidos tubos foram incubados no escuro, em temperatura ambiente, por trinta minutos e, logo após, submetidos às respectivas aquisições em citometria de fluxo.

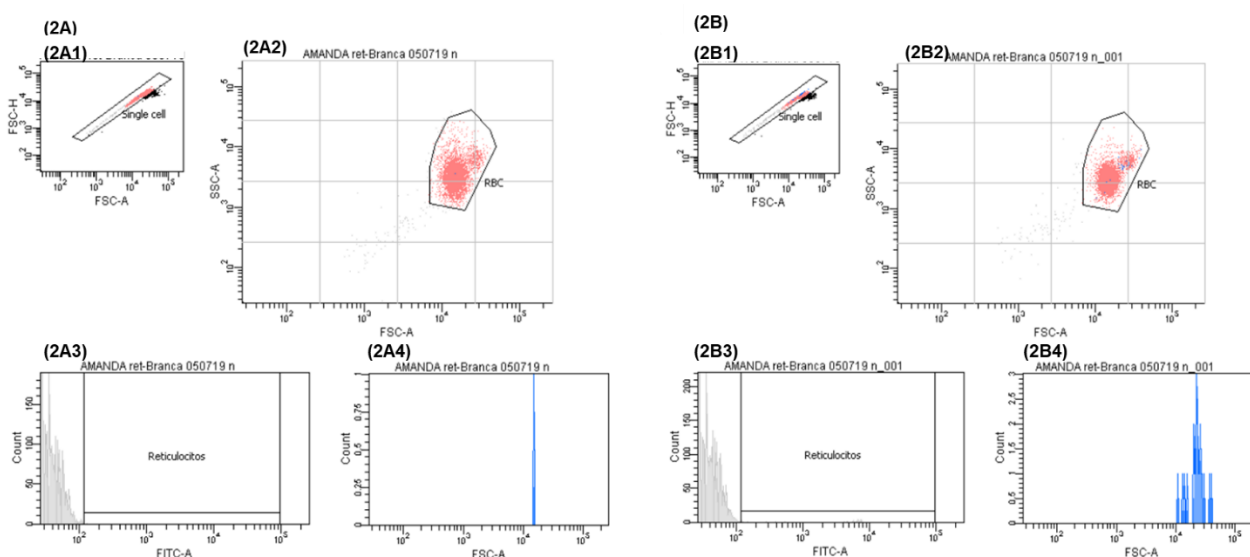
Em ambas as suspensões de células vermelhas foram adquiridos 50.000 eventos em escala de log e a avaliação dos reticulócitos marcados com laranja de thiazole no canal de fluorescência - 488 nm (FL1 – Laser Azul – FITC) (Figura 3).

Os citogramas obtidos seguiram a estratégia de *gates* com aquisição em escala de log, por representação gráfica em *dotplot* de tamanho em medição de área e altura (FSC-A vs FSC-H) (Figura 3A1, 2B1) com o objetivo de priorizar eventos únicos; *dotplot* com eixos cartesianos de tamanho (FSC) por complexidade (SSC) dos eritrócitos (Figura 3A2, 2B2); histograma no canal de

---

<sup>9</sup> Thiazole Orange, ref. 390062 - Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil.

FITC para análise da população positiva (reticulócitos - Figura 3A3, 2B3) em relação à população negativa (eritrócitos maduros - Figura 3A4, 2B4) com população reticulocitária representados em uma frequência populacional à direita. O valor de reticulócitos total foi calculado a partir da subtração do valor de porcentagem de reticulócitos do tubo marcado pelo corante de laranja de thiazole e do tubo não marcado (negativo).



**Figura 3.** Quantificação de reticulócitos pela avaliação citométrica. Tubo com marcação negativa (2A) e tubo com marcação positiva (2B). *Dotplot* representativo do *gate* para seleção de eventos únicos (2A1, 2B1). *Dotplot* representativo da população eritrocitária (2A2, 2B2).

#### 4.4 Análise estatística

O experimento seguiu um delineamento em blocos casualizados (DBC) com distribuição dos animais no grupo controle (animais hígidos) e portadores de DRC em diferentes estádios. Foi utilizado o teste de Anderson-Darling e teste de Levene para analisar a normalidade e homocedasticidade das variáveis.

Os grupos foram comparados por análise de variância e teste de Dunn para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com nível de significância de 5% para todas as análises realizadas.

Para confrontar entre os resultados obtidos na reticulocitometria automatizada e de forma manual utilizou-se o teste de t pareado. Já, no

contraste entre os grupos hígido e DRC, em diferentes estádios, a Correlação de Spearman R.

As análises estatísticas e todos os gráficos foram feitos por meio de software estatístico<sup>10</sup>.

## 5 RESULTADOS

Dos 43 cães incluídos neste estudo, 19 eram machos e 24 fêmeas e foram distribuídos, de acordo com o seu estado de higidez ou estágio da DRC, nos seguintes grupos: G0, grupo controle (n=13 cães), G1, grupo de DRC 1-2 (n=14 cães) e G2, grupo de DRC 3-4 (n=16 cães) (Tabela 5).

Considerando os parâmetros que constituem o foco principal do estudo, os resultados da primeira etapa de análises evidenciaram os perfis de distribuição de dados dentro de cada grupo (controle e com DRC 1-2, 3-4). Os dados da estatística estão dispostos nas 6, 7 e 8.

Observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) e gradativo nas concentrações séricas de creatinina e ureia quando comparados os grupos controle, DRC 1-2 e DRC 3-4 (Tabela 6). Alterações semelhantes também foram verificadas nas concentrações séricas de fosfato e relação proteína/creatinina urinária (Tabela 7).

---

<sup>10</sup>GraphPad Prism 8.2.1 - San Diego, California, USA.

**Tabela 5** - Características de acordo com raça, gênero e grupos dos 43 cães avaliados, distribuídos em grupos – controle (sadios) e doença renal crônica nos quatro estádios (DRC 1, DRC 2, DRC 3 e DRC 4 – IRIS *staging ofCKD* - 2019).

N	Raças	Grupo (n)	C (13)		DRC1 (4)		DRC2 (10)		DRC3 (9)		DRC4 (7)	
			Gênero (n)	M (5)	F (8)	M (0)	F (4)	M (2)	F (8)	M (3)	F (6)	M (3)
1	American Pitt Bull											1
1	Boxer			1								
1	Bulldog Francês		1									
1	Cocker Spaniel								1			
1	Dachshund			1								
1	Dálmata						1					
1	Fila Brasileiro		1									
2	Golden Retriever		1		1							
1	Lhasa Apso											1
1	Schnauzer								1			
8	Pequinês		2	2	2		1		1			
4	Poodle			1				1		2		
1	Rottweiler				1							
3	Shit Tzu						1	2				
1	Spitz Alemão									1		
15	SRD			3			1	3	2	1	3	2

**Tabela 6.** Concentrações séricas de creatinina (sCr) e de ureia (sUreia) de 43 cães, distribuídos nos grupos: controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2), de acordo com o teste de kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ).

Estatística descritiva	sCr (mg/dL)			sUreia (mg/dL)			
	Controle	DRC 1-2	DRC 3-4	Controle	DRC 1-2	DRC 3-4	
	N	13	14	16	13	14	16
<b>Mínimo</b>	0,42	0,65	2,5	17,0	38,0	108,0	
<b>Percentil 25%</b>	0,57	1,1	3,9	28,0	58,0	156,0	
<b>Mediana</b>	0,87a	1,7b	4,9c	35,0a	77,0b	278,0c	
<b>Percentil 75%</b>	1,3	2,0	7,5	43,0	110,0	396,0	
<b>Máximo</b>	1,4	2,8	14,0	53,0	145,0	502,0	
<b>IC (95%)</b>	<b>Inf.</b>	0,49	0,84	3,8	28,0	56,0	156,0
	<b>Sup.</b>	1,3	2,3	7,6	47,0	121,0	411,0
<b>CV (%)</b>	39,0	40,0	48,0	28,0	39,0	46,0	

IC: Intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação; Inf: inferior; Sup: Superior. (a,b,c) Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados, teste de kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 7.** Concentrações séricas de fosfato (sP) e da razão proteína/creatinina urinária (UP/C) de 43 cães distribuídos nos grupos controle e doentes renais crônicos (DRC), estes reagrupados em dois grupos (DRC 1-2, G1; DRC 3-4, G2 – *IRIS staging of CKD - 2019*).

Estatística descritiva	sP (mg/dL)			UP/C			
	Controle	DRC 1-2	DRC 3-4	Controle	DRC 1-2	DRC 3-4	
	N	13	14	13	14	16	
<b>Mínimo</b>	2,5	2,3	2,6	0,04	0,07	0,39	
<b>Percentil 25%</b>	2,9	4,0	7,4	0,07	0,18	1,0	
<b>Mediana</b>	3,3a	5,2b	14c	0,16a	0,87b	2,4c	
<b>Percentil 75%</b>	5,1	6,5	19	0,20	1,3	11	
<b>Máximo</b>	5,9	11	33	0,63	7,7	25	
<b>IC (95%)</b>	<b>Inf.</b>	2,8	3,9	7,3	0,05	0,15	0,99
	<b>Sup.</b>	5,7	8,0	20,0	0,20	1,5	11,0
<b>CV (%)</b>	34,0	41,0	60,0	89	151	119	

IC: Intervalo de confiança da mediana; CV: coeficiente de variação; Inf: inferior; Sup: Superior. (a,b,c) Medianas seguidas de letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados, teste de kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ).

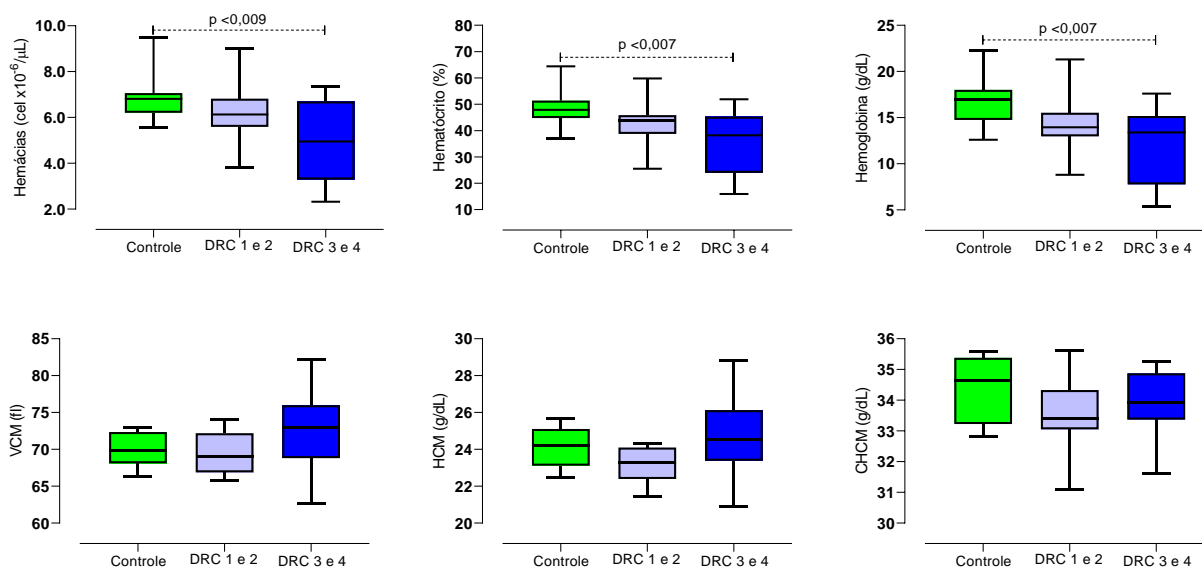
**Tabela 8.** Médias e desvios padrões obtidos para variáveis hematológicas de 43 cães, distribuídos nos grupos controle (G0), grupo de doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e grupo DRC 3-4 (G2).

N	Controle	DRC 1-2	DRC 3-4	Referências*
	13	14	16	
<b>Hemácias (10<sup>6</sup>/μL)</b>	6,9 ± 0,99 <b>a</b>	6,2 ± 1,2 <b>ab</b>	5,0 ± 1,7 <b>b</b>	5,5 – 8,5
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	17,0 ± 2,6 <b>a</b>	14,0 ± 2,9 <b>ab</b>	12,9 ± 3,9 <b>b</b>	12,0 – 18,0
<b>Hematócrito (%)</b>	48,0 ± 6,9 <b>a</b>	43,0 ± 8,3 <b>ab</b>	36,0 ± 11,0 <b>b</b>	37,0 – 55,0
<b>VCM (fl)</b>	70,0 ± 2,3	69,0 ± 2,8	72,0 ± 5,5	60,0 – 77,0
<b>CHCM (g/dL)</b>	34,0 ± 1,0	33,0 ± 1,2	33,0 ± 1,1	31,0 – 34,0
<b>HCM (pg)</b>	24,0 ± 1,1	23,0 ± 0,91	24,0 ± 2,1	19,0 – 23,0
<b>Leucócitos (10<sup>3</sup>/μL)</b>	9,5 ± 2,4	11,2 ± 4,6	12,2 ± 4,9	6,0 – 18,0
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/μL)</b>	325 ± 134	401 ± 184	356 ± 150	180 – 400
<b>Reticulócitos manual (%)</b>	0,33 ± 0,22	0,98 ± 2,47	0,46 ± 0,49	>1%**
<b>Reticulócitos citometria (%)</b>	0,25 ± 0,13	0,25 ± 0,14	0,59 ± 0,69	-

Fonte: \*TVEDTEN, H.; WEISS, D. J. (2012).

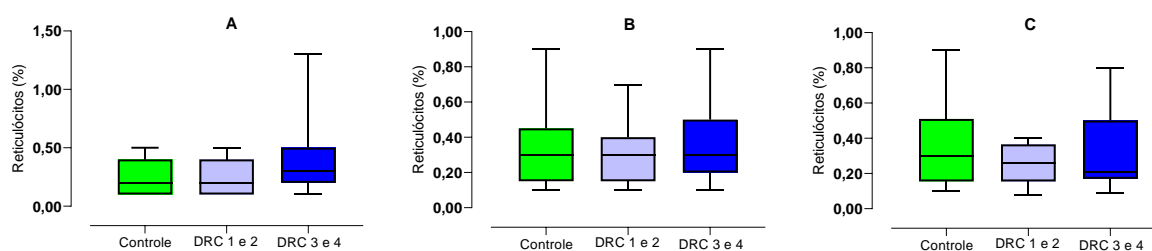
(ab) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha são estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados, de acordo com o teste de Dunn (p<0,05).

Com relação às variáveis hematológicas observaram-se diferenças estatísticas entre o número de hemácias (p<0,009), hematócrito (p<0,007) e hemoglobina (p<0,007) na comparação entre animais controle e DRC 3-4 (Figura 4). Ademais, apenas os animais DRC 3-4 apresentaram anemia normocítica normocrômica não regenerativa.



**Figura 4.** Representação gráfica dos resultados das análises estatísticas com distribuição dos dados em quartis (mediana, máximo e mínimo) das variáveis hematológicas de cães hígidos (G0) e daqueles acometidos por doença renal crônica (DRC) 1-2 (G1) e DRC 3-4 (G2).

Neste experimento, não foram observadas diferenças significativas ( $p=0,0360$ ) entre grupos ensaiados e, tampouco, com relação à forma de enumeração de reticulócitos, manual ou automatizada, como bem ilustrado na figura abaixo (Figura 5).



**Figura 5.** Representação gráfica dos resultados da análise estatística de Correlação de Spearman R. Comparação de reticulócitos entre os três grupos (cães controle- GC, DRC 1-2 – G1 e DRC 3-4 – G2).

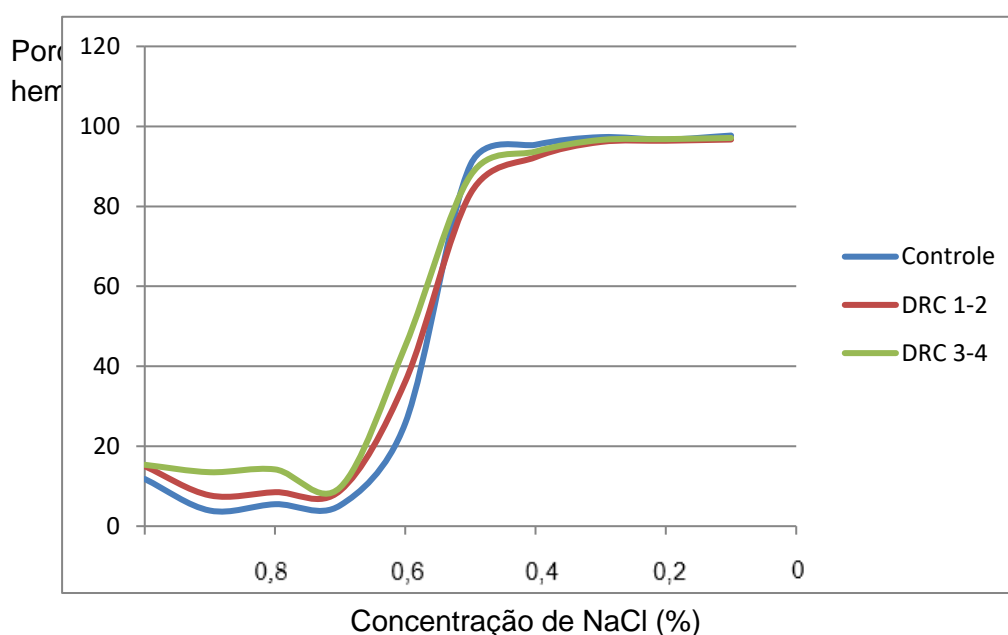
Na

Figura é possível apreciar que até na concentração de NaCl de 0,6% a hemólise é quase imperceptível, ponto chamado de resistência mínima. No intervalo entre 0,5 e 0,3% verifica-se que há um declínio abrupto na

percentagem de hemácias, o que caracteriza o ponto de resistência máxima a hemólise.

Ao confrontar os três grupos, não foi constatada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre a fragilidade osmótica eritrocitária. Tanto no grupo controle como nos grupos de DRC o percentual de hemólise é alto nas concentrações a partir de 0,4 e 0,5% de NaCl (

Figura ).



**Figura 5.** Representação gráfica das curvas obtidas a partir das médias de percentual de hemólise em cada uma das diluições a que os concentrados de hemácias dos cães controle, DRC1-2 e DRC 3-4 foram submetidos ao teste de fragilidade osmótica eritrocitária.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo todos os dados coletados foram adquiridos por meio de avaliação clínica e exames complementares minimamente invasivos. Assim, os diagnósticos foram baseados no histórico do paciente, exame físico, resultados de exames clínico-patológicos e ultrassonografia abdominal, além do monitoramento clínico dos doentes. O conjunto de dados obtidos dos 30 cães com DRC testemunham a adequação dos diagnósticos clínicos em

conformidade com o descrito na literatura (Finco, 1995; Polzin, 2011; Pressler, 2015, Phillipset al, 2015). Considerando as condições clínicas dos pacientes hígidos, DRC 1 e até daqueles com maior gravidade (DRC 4), as concentrações séricas de creatinina, ureia, fosfato resultaram em valores crescentes, enquanto os parâmetros densidade urinária, hemácias e hematócrito decresceram gradativamente. Buranakarl et al (2008) constataram uma diminuição progressiva do hematócrito e volume corpuscular médio (VCM) de cães com doença renal crônica.

Pessoa et al (2017) estudaram cães anêmicos antes de serem submetidos a transfusão sanguínea e concluíram que estes apresentavam maior FOE que aqueles do grupo controle. Elias et al (2004) analisaram a fragilidade osmótica dos eritrócitos em concentrações decrescentes de solução salina, em gatos hígidos e com enfermidades hepáticas ou com insuficiência renal. A hemólise de 50% foi notada de forma similar em todos os grupos. Em 100% de hemólise, os eritrócitos de gatos com insuficiência renal apresentaram maior fragilidade osmótica que os gatos controles e aqueles com doença hepática.

Porém Elias et al (2004) utilizou a metodologia proposta por Jain (1986), que mensura a estabilidade da membrana do eritrócito indiretamente a partir da quantidade de hemoglobina que é liberada no meio e não por avaliação das células viáveis como foi possível neste estudo com citometria de fluxo.

Buranakarl et al (2008) também asseveraram que a FOE se elevou proporcionalmente ao grau de azotemia do paciente, porém neste trabalho e em estudos realizados por King et al (1992) e Galvão (2010), em cães, não foram detectados aumentos da FOE. Já é bem conhecida a importância do teste de FOE no diagnóstico de pacientes humanos com esferocitose hereditária e talassemia, porém é contraditória a eficácia do referido teste para avaliação de pacientes com outras doenças, pois a FOE pode ser influenciada por fatores que vão além da alteração citoesquelética da membrana do eritrócito.

É importante ressaltar que as causas da anemia na doença renal crônica são multifatoriais e envolvem a diminuição de eritropoetina, aumento de

toxinas urêmicas, inflamação crônica e perda de sangue pelo trato gastrointestinal (Yilmaz et al, 2011; Polzin, 2011; Borin, 2011).

Hsu et al (2002) realizaram um estudo populacional com humanos acometidos por doença renal crônica e concluíram que a incidência de anemia é inferior a 10% nos estádios 1 e 2 da DRC, 20-40% no estágio 3, 50-60% no estágio 4. Os cães deste estudo também seguiram esse mesmo padrão: 5% dos cães apresentaram anemia nos estádios 1 e 2% da DRC, 30% no estágio 3 e 55% no estágio 4 da doença.

As contagens manuais e citométricas dos reticulócitos, neste ensaio, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, cujos resultados corroboram àqueles relatados por Peng et al (2001), que conseguiram uma melhor precisão utilizando-se da citometria, ainda que não significativamente. Portanto, os resultados aqui obtidos para reticulocitometria são fiadores de que a contabilização manual de reticulócitos ainda é uma opção segura, de execução fácil, rápida, de baixo custo. Buttarello et al (1996) observaram que a imprecisão do método manual aumenta com valores decrescentes da contagem de reticulócitos. Essas pesquisas encontraram um coeficiente de variação de 67% para amostras com reticulocitopenia, 28,9% para amostras com valor normal de reticulócitos e 13,0% para amostras com reticulocitemia. Neste estudo os cães, em sua totalidade, apresentaram quantidades de reticulócitos de normais a diminuídas, porém não foram observadas variações estatísticas significativas.

Chin-Yeet al (2008) avaliaram 72 pacientes humanos e não observaram diferença estatística quando compararam os dois métodos. Tais resultados coincidem com aqueles encontrados neste estudo com cães, que em sua totalidade, apresentaram quantidades de reticulócitos de normais a diminuídas, porém não foram observadas variações estatísticas significativas.

As análises automatizadas de reticulócitos dependem menos do julgamento humano e são muito reproduzíveis. Contudo, como a degradação do RNA nos reticulócitos é constante, a distribuição de fluorescência do RNA é contínua e a janela de fluorescência do reticulócito deve ser ajustada em um algoritmo. Além disso, dependendo da especificidade e rendimento do corante, o nível de detecção de reticulócitos pode variar, ou seja, um corante mais novo pode marcar mais que um mais antigo (Schimenti et al, 1992).

Pereira et al (2008) avaliaram 60 cães com anemia regenerativa e 40 com anemia não regenerativa e observaram contagens superiores de reticulócitos na citometria de fluxo, principalmente para cães com anemia regenerativa. Acredita-se que quando a medula óssea libera eritrócitos imaturos que podem conter corpúsculos de Howell-Jolly e uma maior quantidade de riboflavina gera uma maior autofluorescência, superestimando os valores da citometria (Chin-Yee et al 2008). Em contrapartida, neste experimento a contagem de reticulócitos era baixa, ou seja, a resposta medular era insatisfatória, com poucas células jovens na circulação, reduzindo os riscos dessas interferências.

Esses fatores são que os métodos automatizados são reprodutíveis e precisos, mas que a variação entre procedimentos pode ser considerável. Para um único citometria de fluxo, as fontes de imprecisão devem ser dependentes do algoritmo e debris celulares que entram em uma janela de fluorescência predefinida (Laharrague et al, 1990; Oyamatsuet al, 1990).

Schimenti et al (1992) reportaram que a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo com o uso do laranja de thiazole foi semelhante a contabilizada manualmente utilizando o corante azul de metileno.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, embora a reticulocitometria seja fiadora da contagem de reticulócitos, a contabilização manual de reticulócitos ainda é uma opção segura, de execução fácil, rápida, de baixo custo. Mesmo sendo frequente a incidência de anemia em pacientes com doença renal crônica, principalmente nos estádios mais avançados da referida enfermidade, a realização da FOE por citometria de fluxo contribui para a avaliação dos eritrócitos. Porém, somente com essa mensuração, não é possível predizer o status de resistência da membrana eritrocitária em cães com DRC, sendo necessário mais estudos com outros marcadores para um melhor entendimento da dinâmica membranária das hemácias.

## **8 REFERÊNCIAS**

Abbot DL, Mcgrath, JP (1991) Evaluation of a flow cytometric counting procedure for canine reticulocytes by use of thiazole orange. **American Journal of Veterinary Research** 52:723-727.

Borin S (2011) **Estudo da hipoplasia sanguínea e quantificação imunofenotípica de células CD45+ no sangue e na medula óssea de cães com doença renal crônica.** 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –Unesp, Jaboticabal.

Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J (1998) **Biochimie** 80:173-195.

Brow M, Wittwer C (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry** 46:1221-1229.

Buranakarl C, Trisiriroj M, Pondeenana T, Tungitpeanpong P, Jarutakanon R, Penchome R (2008) Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. **Research in Veterinary Science** 10:1010-1103.

Buttarelo M, Bulian P, Prá MD, Barbera P, Rizzoti P (1996) Reticulocyte quantification by Coulter MAXM VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. **Clinical Chemistry** 42:1930-1937.

Chin-Yee I, Keeney M, Lohmann RC (2008) Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. **Clinical laboratory Haematology** 13:177-188.

Cachofeiro V, Goicochea M, Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Lunõ J (2008) Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney International** 111:54-59.

Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, Gallí A, Boggi S, Pietra D, Vanelli L, Marseglia C, Levi S, Arosio P, Lazzarino M, Cazzola M (2006) Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 20:549-555.

Elias F, Lucas SRR, Hagiwara MK, Kogika MM, Mirandola RMS (2004) Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural** 34:413-418.



EvansGO, FaggR (1994) Reticulocytes counts in canine and rat blood made by flow cytometry. **Journal of Comparative Pathology**111:107-111.

Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA (1990) Evaluation of reticulocyte by flow cytometry in a routine laboratory. **American Journal of Hematology**33:13-17.

Finco DR(1995). Evaluation of renal functions. In: Osborne CA, FINCO DR. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Baltimore: Williams and Wilkins.29-49p.

Galvão ALB (2009). Estresse oxidativo nos estágios finais da doença renal crônica em pequenos animais. **Archives of Veterinary Science**14:178-186.

Galvão ALB (2010)**Avaliação clínico-laboratorial de cães com doença renal crônica sob tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína**,93f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Galvão ALB (2014)**Estresse oxidativo em cães com doença renal crônica**, 95f.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Hall JE (2011)**Tratado de Fisiologia Médica** Rio de Janeiro: Elsevier p. 422-433.

Hsu C, McCulloch CE, Curhan GC (2002) Epidemiology of Anemia Associated with Chronic Renal Insufficiency among Adults in the United States: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, **Journal of the American Society of Nephrology** 13:504-510.

International Renal Interest Society (IRIS) – staging system for chronic kidney disease (CKD), 2019. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>>. Acessado em 12 de agosto de 2019.

JAIN NC (1973) Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian** 63:411-423.

Jain NC (2010)**Hereditary Erythrocyte Enzyme Abnormalities**Editorial Office, Philadelphia:Lea & Febiger,179-185p.

Joske RA, McAlister JM, Pranker TAJ (1956) Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. **Clinical Science**15:511-522.

King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA (1992) Anemia of chronic Renal Failure in dogs, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 6:264-270.

Lankhorst CE, Wish JB (2010) Anemia in renal disease: Diagnosis and management. **Blood Reviews** 24:39–47.

Laharrague P, Corberand JX, Fillola G, Marcelino N (1990) Evaluation of an automatic analyzer of reticulocytes: The Sysmex R-1000. **Annales de Biologie Clinique** 48:253-258.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccatli C (2003) Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation** 18:1272-1280.

Macdougall IC (2001) Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney International** 59:62-72.

Makinde MO, Bobade PA (1994) Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science** 57:343-348.

McCOY JP (2002) Basic principles of flow cytometry. **Hematology Oncology Clinical North American** 6:229-243.

Meurs I, Hoekstra M, Wanrooij E, Hildebrandt RB, Kuiper J, Kuipers F, Hardeman MR, Van Berkel TJ, Van Eck M (2005) HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. **Experimental Hematology** 33:1309–1319.

Nobes PR, Carter AB (1990). Reticulocyte counting using flow cytometry. **Journal Clinical Pathology** 43:675-678.

Oyamatsu T, Shimizu N, Takeuchi K, Yamamoto M (1990) Automated measurement of reticulocyte count by flow cytometry. Analysis of the blood containing abnormal erythrocytes or giant platelets. **Rinsho Byori** 37:807-812.

Ots M, Pechter U, Tamm A (2000) Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**. International Journal of Clinical Chemistry 297:29-41.

Peng L, Yang H, Jiang H, Su J, Peng Z (2001) Automated reticulocyte counting using the Sysmex RAM-1. **Clinical & Laboratory Haematology** 23:97-102.

Pereira PM, Seki MC, Palma PVB (2008) Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:66-70.

Pessoa LF, Bär MM, Dalmas FE, Schneider M, Sacchi JO, Silva MM (2017) **Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos de cães após transfusão sanguínea**. XIII Semana Acadêmica de Medicina Veterinária e IX Jornada Acadêmica de Medicina Veterinária– CCA/UEM/Umuarama-PR.

Phillips JK, Boyd R, Krockenberger MB, Burgio G (2015) Progression of anemia and its relationship with renal function, blood pressure, and erythropoietin in rats with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology** 44:342–354.

Polzin DJ, Osborne CA, Bartges JW, James KM, ChurchillJA (2004) Insuficiência Renal Crônica. IN: Ettinger SJ, Feldman EC. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1721-1749.

Polzin DJ. et al **Calcitriol** In: Bonagura JD, Twedt DC (2009) Kirk's current veterinary therapy XIV. St. Louis: Saunders Elsevier, p.892-895.

Polzin, DJ (2011) Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice** 41:15-30.

Pressler, BM (2015) Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats **Clinics in Laboratory Medicine** 35:487-502.

RileyRS, Ben-ezra JM,GoelR (2001).Reticulocytes and reticulocyte enumeration, **Journal Clinical Laboratory Analysis** 15:267-294.

Riley RS, Ben-ezra JM, Tidwell A (2002) Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. **Hematology Oncology Clinical North American**, 16:373-420.

Sant'ana VAC, Birgel EH, Mourão GB, Mirandola MRS (2001) Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural** 31:609–614.

Schimenti, KJ,Lacerna K, Wamble, A (1992) Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. **Cytometry**,13:853-862.

Schmid H, Schiff H (2010) Erythropoiesis stimulating agents and anemia of end-stage renal disease. **Cardiovascular Hematology Agents**, San Francisco 8:164-172.

Selim N, Desouky OS, Seham MA, Ibrahim H, AshryHA, Nabila S (2009) Effect of gamma radiation on some biophysical properties of red blood cell membrane, **Romanian Journal Biophys**19:171–185.

Senior DF (2001) Doenças do sistema urinário, In: Dunn JK. **Tratado de medicina de pequenos animais**, São Paulo: Editora Rocca, 622-914p.

Stockham SL, Scott MA (2011)**Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 40-45p.

Suliman ME, Bárány P, Divino Filho JC, Qureshi AR, Stenvinkel P, Heimbürger O, Anderstam B, Lindholm B, BergströmJ (2002). Influence of nutritional status on plasma and erythrocyte sulphur amino acids, sulph-hydryls, and inorganic sulphate in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**17:1050-1056.

Telen MJ, Kaufman RE (1999) The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. et al**Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore: Williams & Wilkins. Cap.10, 193-227p.

Thrall MA (2015) Morfologia eritrocitária. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, CAMPBELL TW. In: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** Editora Rocca LTDA, 52-61p.

Tvedten H, Weiss DJ (2012) Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's: Veterinary Hematology**.Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 143-145p.

Turchetti V, De Matteis C, Leoncini F, Trabalzini L, Guerrini M, Forconi S (1997) Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. **Clinical Hemorheology and Microcirculation** 17:209-215.

Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, Takeda M, Ueki S, Itoga M, Kojima K, Kayaba H (2014) Flow Cytometric Analysis of Red Blood Cell Osmotic Fragility, **Journal Laboratory Automation**19:483-487.

Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M (2011) Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory, **Blood Purification** 23:97-102.