

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA E O METABOLISMO DO FERRO EM  
CÃES COM ANEMIAS DE DIFERENTES ETIOLOGIAS**

CURITIBA

2013

NINA DA CUNHA MEDEIROS

**RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA E O METABOLISMO DO FERRO EM  
CÃES COM ANEMIAS DE DIFERENTES ETIOLOGIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2013

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA E O METABOLISMO DO FERRO EM CÃES COM ANEMIAS DE DIFERENTES ETIOLOGIAS" apresentada pela Mestranda NINA DA CUNHA MEDEIROS declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 19 de março de 2013.

Professora Dr.<sup>a</sup> Rosângela Locatelli Dittrich  
Presidente/Orientador

Professora Dr.<sup>a</sup> Mara Regina Stipp Balarin  
Membro

Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar saúde e por ter escolhido para mim uma família tão maravilhosa.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais por sempre apoiarem minhas decisões e por serem responsáveis pelo que sou. Agradeço também aos meus irmãos, a Sabrina e aos meus cães: Joca e Cirilo.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica pela ajuda na execução dos exames, pelas fofocas durante as tardes, abstracts, idas à cantina, e risadas nos famosos “projetos com frangos”.

Agradeço à todos os professores que tive ao longo de minha vida pois sem eles hoje eu não estaria aqui.

Aos médicos veterinários residentes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio durante as coletas de amostras.

Agradeço aos funcionários da recepção do Hospital Veterinário por me ajudarem na difícil tarefa de encontrar fichas clínicas.

Meus agradecimentos ao Professor Fabiano Montiani-Ferreira, Professora Mara Regina Stipp Balarin e ao Professor Ivan Roque de Barros Filho por fazerem parte da banca avaliadora e por trazerem contribuições ao trabalho.

Agradeço à minha orientadora Professora Rosangela Locatelli Dittrich por todo conhecimento repassado e por aguentar minhas piadas sem graça há tantos anos.

## RESUMO

A anemia apresenta grande prevalência na clínica médica de pequenos animais e, independentemente da etiologia, está correlacionada ao metabolismo do ferro. Portanto, o estudo da resposta da medula óssea e do metabolismo do ferro em cães anêmicos é de fundamental importância. O presente estudo tem como objetivo geral, estabelecer as causas e classificar as anemias em cães com diferentes enfermidades. Foram determinadas a relação da intensidade da policromatofilia com o percentual de reticulócitos; os níveis séricos de ferro, capacidade total ligadora de ferro e capacidade latente ligadora de ferro em cães saudáveis e anêmicos; as anemias causadas por diferentes doenças foram classificadas como regenerativas ou não regenerativas pela contagem de reticulócitos. O primeiro capítulo é uma revisão bibliográfica sobre a eritropoese e o metabolismo do ferro. O segundo capítulo apresenta a correlação entre a intensidade da policromatofilia e a contagem de reticulócitos. O terceiro capítulo apresenta o estudo do metabolismo do ferro e da resposta da medula óssea em cães com anemias de diferentes etiologias. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR. Os resultados apresentados são: o número de dois policromatófilos por campo diferenciou a anemia não regenerativa da regenerativa, mas não foi possível associar ao número de reticulócitos e classificar a anemia quanto a intensidade de regeneração; a concentração média do ferro sérico e da TIBC em cães saudáveis foi de 196,4 µg/dl e 460,7 µg/dl, respectivamente; dos cães anêmicos, 71,63% apresentavam anemia não regenerativa, 71,63% apresentaram hipoferremia e 62,86% dos cães apresentaram TIBC baixa; anemias ocorrem em maior prevalência em cães apresentando doença crônica; alterações no metabolismo do ferro estão presentes nas anemias causadas por diferentes etiologias.

Palavras chave: anemia, metabolismo do ferro, ferro sérico, policromatofilia

## ABSTRACT

Anemia has a high prevalence in small animal clinical medicine and regardless its etiology it is correlated to iron metabolism. Therefore, the study of the bone marrow response and iron metabolism in anemic dogs has fundamental importance. The present study aims to establish the causes of anemia and classify it in dogs with different diseases. Additionally, we determined the relationship between the intensity of polychromatophilia and the reticulocyte percentage; we determined serum iron concentration, total iron bound capacity and unsaturated iron bound capacity in healthy and anemic dogs and classify anemias caused by different diseases as regenerative or not regenerative through the reticulocyte count. The first chapter is a literature review about erythropoiesis and iron metabolism. The second chapter presents the correlation between the intensity of polychromatophilia and reticulocyte counts. The third and final chapter presents the study of iron metabolism and the bone marrow response in dogs with anemia of different etiologies. The analyzes were performed in the Laboratory of Veterinary Clinical Pathology of the UFPR Veterinary Hospital. The results presented are: two polychromatophilic cells per 1,000x field differentiated the anemia as regenerative or nonregenerative, but it was not possible to associate it to the number of reticulocytes and classify anemia as the intensity of regeneration; the mean concentration of serum iron and TIBC in healthy dogs were 196.4 mg/dl and 460.7 mg/dl, respectively; 71.63% of the anemic dogs had non-regenerative anemia, 71.63% showed hypoferremia and 62.86% presented low TIBC; anemias occur with greater prevalence in dogs with chronic illness; changes in iron metabolism are present in anemia caused by different etiologies.

Key words: anemia, iron metabolism, serum iron; polychromatophilic cells

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DIAGRAMA DA ERITROPOESE ILUSTRANDO A LIBERAÇÃO DE RETICULÓCITOS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA DO CÃO. (Adaptado de MEYER & HARVEY, 2003) .....	16
FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MATURAÇÃO DO RETICULÓCITO SEGUNDO HEILMEYER (RILEY et al, 2001).....	18
FIGURA 3 - ETAPAS DO TRANSPORTE DO FERRO E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ENTRADA E SAÍDA DO FERRO DO INTERIOR DO ENTERÓCITO (GROTTO, 2008). .....	23
FIGURA 4 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE CÃO CORADA COM PANÓTICO RÁPIDO A SETA INDICA A PRESENÇA DE UM POLICROMATÓFILO. ....	44
FIGURA 5 – EXTENSÃO SANGUÍNEA DE CÃO CORADA COM AZUL DE CRESIL BRILHANTE E CONTRA CORADA COM CORANTE DE WRIGHT. AS FLECHAS INDICAM OS RETICULÓCITOS.....	45
FIGURA 6 – REGRESSÃO LINEAR SIMPLES ENTRE NÚMERO DE RETICULÓCITOS ( $\mu\text{L}$ ) E POLICROMATÓFILOS POR CAMPO (OBJETIVA DE 100X) EM CÃES ANÊMICOS.....	47
FIGURA 7 – SUBDIVISÃO DO GRUPO II DE ACORDO COM A ENFERMIDADE .....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ASSOCIAÇÃO ENTRE VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DE POLICROMATÓFILOS E RETICULÓCITOS EM CÃES APRESENTANDO DIFERENTES RESPOSTAS DA MEDULA ÓSSEA..... 46

TABELA 2 - VALORES MÍNIMOS, MÁXIMOS E MÉDIOS DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FERRO DE CÃES SAUDÁVEIS ..... 59

TABELA 3 - RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA, CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FERRO E DA CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO NAS ANEMIAS DE CÃES COM DIFERENTES ENFERMIDADES ..... 61



## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

CEUA-SCA	Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dCytb	Citocromo B duodenal
DMT-1	Proteína Transportadora de Metal Divalente
EPO	Eritropoetina
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de Sódio 10%
Fe <sup>2+</sup>	Ferro Ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Ferro Férrico
HCP-1	Proteína Transportadora do Heme 1
HFE	Proteína da Hemocromatose
Ht	Hematócrito
mg	Miligrama
Nu	Núcleo
PPT	Proteína Plasmática Total
r	Coefficiente de Correlação de Pearson
R	Coefficiente de Determinação da Equação
TfR	Receptor da Transferrina
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFCe	Unidade Formadora de Colônia Eritrocitária
UIBC	Capacidade Latente de Ligação do Ferro
VGM	Volume Globular Médio
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 SANGUE.....	14
2.1.1 Série eritrocitária.....	14
2.1.2 Eritropoese .....	15
2.2 FERRO .....	20
2.2.1 Absorção .....	20
2.2.2 Transporte .....	23
2.2.3 Armazenamento.....	24
2.2.4 Manutenção da homeostase.....	24
2.3 ANEMIA .....	26
2.3.1 Classificação da anemia .....	26
2.3.2 Diagnóstico .....	27
2.3.3 Anemia de doença crônica ou da inflamação.....	29
2.3.4 Anemia associada à doença renal crônica.....	31
2.3.5 Anemia associada à doenças endócrinas .....	31
REFERÊNCIAS .....	33
2 NÚMERO DE ERITRÓCITOS POLICROMATÓFILOS IDENTIFICA CORRETAMENTE A ANEMIA REGENERATIVA NO CÃO? .....	39
2.1 INTRODUÇÃO .....	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.2.1 Seleção dos Animais .....	42
2.2.2 Coleta das amostras .....	43
2.2.3 Análise Laboratorial .....	43
2.3 RESULTADOS.....	46
2.4 DISCUSSÃO .....	47
2.5 CONCLUSÃO .....	49
REFERÊNCIAS .....	50
3 RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA E O METABOLISMO DE FERRO EM CÃES COM ANEMIAS DE DIFERENTES ETIOLOGIAS.....	52
3.1 INTRODUÇÃO.....	54
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
3.2.1 Seleção dos Animais e coleta das amostras.....	55
3.2.2 Análises Laboratoriais.....	56
3.2.3 Exames de imagem .....	59

3.3 RESULTADOS .....	59
3.4 DISCUSSÃO .....	61
3.5 CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS .....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71
ANEXO .....	72

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As anemias ocorrem com grande frequência na rotina clínica de pequenos animais. Nos registros de 2008 do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, constatou-se anemia em 15,9% dos hemogramas realizados em cães, correspondendo a 87,8% de adultos e 12,2% de jovens (PIRES, 2009). As principais causas de anemias são as hemorragias agudas, hemólise intravascular, doenças crônicas, insuficiência renal, neoplasias, processos inflamatórios, deficiência nutricional de ferro e doenças da medula óssea (SCOTT-MONCRIEFF, 2007; FRY, 2010). Além de ocorrer com grande frequência, a anemia está ligada a diminuição da qualidade de vida do paciente e diminuição do período de sobrevivência (MILLER *et al*, 2009; CÁPUA *et al*, 2011).

Para realizar o diagnóstico e correto tratamento do quadro anêmico, é de grande importância a realização do hemograma, as avaliações da resposta da medula óssea e o metabolismo do ferro (GROTTO, 2008 a; TVEDTEN, 2010; GRIMES *et al*, 2012). A avaliação do metabolismo do ferro é fundamental, pois cerca de 60 a 70% do ferro presente no organismo está no interior do eritrócito. Por este motivo, qualquer alteração que cause diminuição na absorção ou na disponibilidade deste mineral, acarretará em alterações hematológicas (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2005; GANZ & NEMETH, 2006; HARVEY, 2008 b). Para a avaliação é importante realizar a determinação do ferro sérico, ferritina e transferrina. A concentração plasmática do ferro indica a quantidade do íon que está sendo transportado; a ferritina sérica reflete o estoque corpóreo total de ferro; e a transferrina é a proteína de transporte do ferro e é expressa pela capacidade latente de ligação (WEISS, 2010).

O presente estudo visou estudar a resposta da medula óssea e as alterações no metabolismo do ferro em cães com anemias de diferentes etiologias. O primeiro capítulo consiste em uma revisão bibliográfica sobre a eritropoese e como as alterações no metabolismo de ferro podem levar a anemia. Os dois capítulos seguintes estão em forma de artigo científico sendo que o capítulo dois tem como objetivo determinar a relação da intensidade da

policromatofilia com o percentual de reticulócitos e o capítulo três avaliar a resposta da medula óssea e do metabolismo do ferro em cães com anemias de diferentes etiologias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SANGUE

O sangue é um meio de transporte. Por seu intermédio, os leucócitos desenvolvem funções de defesa, eritrócitos carregam oxigênio, dióxido de carbono e íons bicarbonato até os tecidos, e os elementos presentes no plasma também chegam à todas as células. Ele é formado por uma parte líquida denominada plasma cuja constituição básica é a água. Aproximadamente 91,5% do plasma é constituído por água, 7% são proteínas e 1,5% sais inorgânicos, lipídios, carboidratos e hormônios. A fase sólida é composta por eritrócitos, leucócitos e plaquetas (HARVEY, 2008 a; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

As proteínas são os componentes mais abundantes do plasma. A albumina e o grupo das globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) são as principais representantes. As funções são inúmeras e incluem: formação da estrutura básica das células, tecidos e órgãos; manutenção da pressão coloidosmótica; catalisação de reações bioquímicas; equilíbrio ácido-básico (ECKERSALL, 2008). A albumina está presente em maior quantidade e representa de 35 a 50% das proteínas plasmáticas. As globulinas são formadas por um grupo heterogêneo de proteínas, sendo a ferritina, transferrina, haptoglobina e proteína C exemplos de globulinas (KERR, 2012; ECKERSALL, 2008).

Os eletrólitos presentes no plasma são sódio, potássio, magnésio, cloreto, bicarbonato, cálcio e fósforo. O mais abundante é o sódio seguido por cloreto e bicarbonato. O potássio e o magnésio estão presentes em pequena quantidade porque são íons essencialmente intracelulares (WELLMAN *et al*, 2012).

#### 2.1.1 Série eritrocitária

Os eritrócitos de todos os mamíferos são anucleados e a maioria possui um formato de disco bicôncavo. Esta biconcavidade resulta na palidez central observada nos eritrócitos corados em extensões sanguíneas (HARVEY, 2001).

Eritrócitos de animais da família dos Camelídeos (lhamas, vicunhas, alpacas e camelos) possuem forma elíptica, anucleada e fina, enquanto que eritrócitos de aves, répteis e anfíbios possuem eritrócitos maiores que o dos mamíferos e com a presença de núcleo (MEYER & HARVEY, 2003; CLARK *et al*, 2009).

A produção de eritrócitos é denominada eritropoese. Durante a vida embrionária dos mamíferos esta produção inicia-se no saco vitelínico, mas com o decorrer do tempo, fígado, baço e medula óssea se tornam os principais locais de produção. No indivíduo adulto, os ossos chatos e epífises de ossos longos se tornam os principais, e basicamente únicos, locais de produção eritropoética. Porém, em situações em que há aumento da eritropoese, fígado e baço podem retomar a produção (LOPES *et al*, 2007).

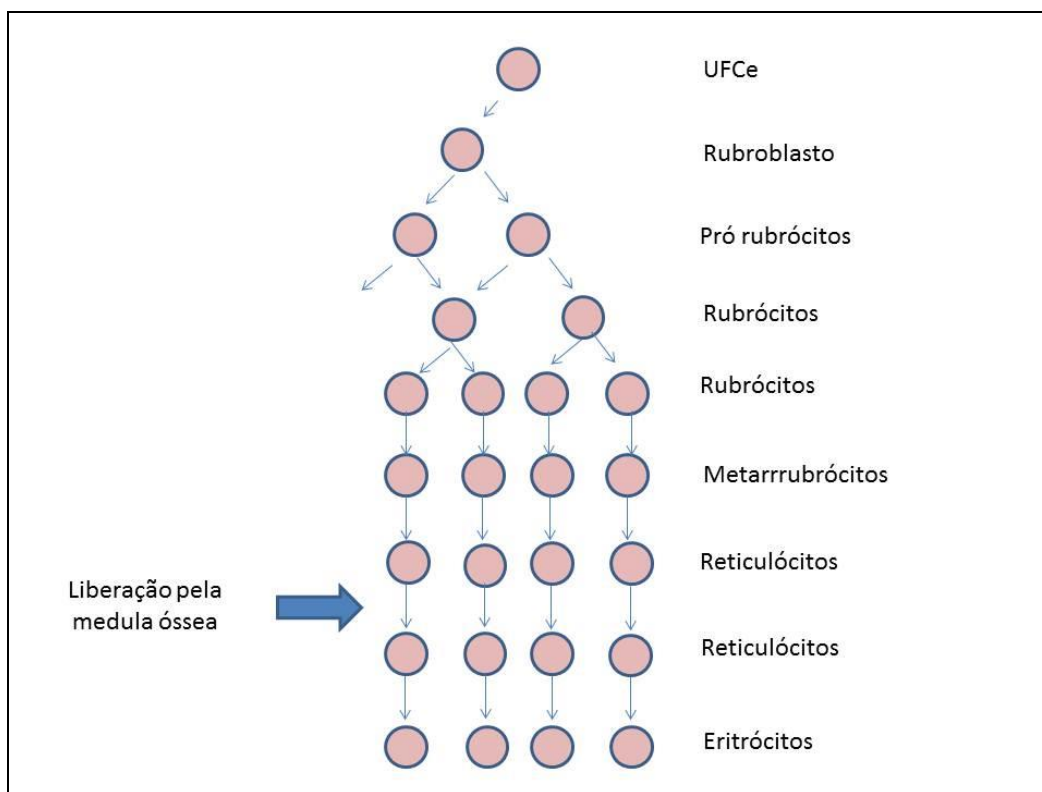
### 2.1.2 Eritropoese

Na medula óssea existe uma população de células precursoras não especializadas, as células tronco, que possuem a capacidade de se proliferar, de continuamente se regenerar e de se diferenciar em qualquer tipo de célula ou tecido (MEYER & HARVEY, 2004). Na medula óssea existem pelo menos três tipos de células, sendo que a célula tronco hematopoiética será o foco de discussão neste estudo por ser a precursora da linhagem eritrocitária (CAR, 2010). Ao se dividir, a célula tronco hematopoiética origina duas células filhas: uma igual a si própria e outra denominada de unidade formadora de colônias ou UFC. A unidade formadora de colônia eritrocitária (UFCe) é que durante toda a vida do animal origina as linhagens eritrocitárias (CAR, 2010).

Toda esta diferenciação celular depende de um microambiente medular local, estimulado por citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos T ativados e pela eritropoietina (EPO). A EPO é um hormônio produzido pelos rins, que estimula a UFCe a se diferenciar em rubroblasto, a primeira célula morfológicamente distinguível da série eritrocitária (LOPES *et al*, 2007). A produção de EPO é estimulada pela hipóxia do tecido renal, sendo que o sensor que detecta esta falta de oxigenação ainda não está bem definido (MEYER & HARVEY, 2004). Em animais saudáveis, para cada rubroblasto

produzido, existem 50 rubrócitos e 113 reticulócitos na medula óssea (OLVER *et al*, 2010). Na Figura 1 está ilustrado o processo de multiplicação e diferenciação da série vermelha.

FIGURA 1 - DIAGRAMA DA ERITROPOESE ILUSTRANDO A LIBERAÇÃO DE RETICULÓCITOS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA DO CÃO. (Adaptado de MEYER & HARVEY, 2003)



Quando a célula chega ao estágio de reticulócitos é que a medula óssea começa a liberar a célula para a circulação. Do estágio de UFCe até reticulócitos, o processo de multiplicação e maturação celular ocorre no interior da medula óssea.

### 2.1.2.1 Reticulócito

O reticulócito é o estágio de maturação da célula de linhagem eritrocitária entre o metarrubrócito e o eritrócito maduro. Não são células maduras e possuem no interior do seu citoplasma resquícios de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas. Quando corados com corantes supravitais, estes resquícios se tornam visíveis formando os retículos, palavra que dá

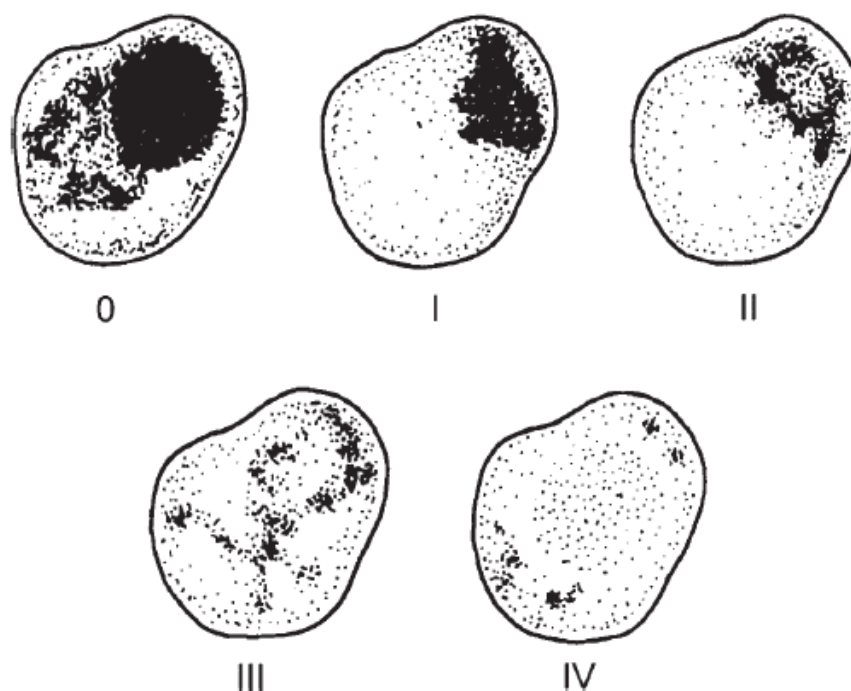


origem ao seu nome (COWGILL *et al*, 2003; TVEDTEN & MORITZ, 2010) . Quando estas células são coradas com corantes do tipo Romanowsky elas apresentam uma coloração mais azulada que o eritrócito maduro. Esta cor azulada é devido à presença dos resquícios das organelas no interior no citoplasma e nesta condição o eritrócito é classificado como policromatófilo ou policromatófilo. Ou seja, o reticulócito e o policromatófilo são exatamente a mesma célula e apresentam denominações distintas devido as diferentes técnicas de coloração. (THRALL, 2007).

A contagem de reticulócitos é realizada para obter informação sobre a integridade funcional da medula óssea, porque reflete sua atividade eritropoética. A reticulocitose é o aumento na quantidade de reticulócitos na circulação periférica e é observada em pacientes anêmicos com a medula óssea funcional (RILEY *et al*,2001). Em cães, a medula óssea demora cerca de três a cinco dias para iniciar a liberação de reticulócitos na circulação após sofrer estímulo pela eritropoietina (COWGILL *et al*, 2003)

Na medicina veterinária existem duas classificações para o reticulócito: puntuado ou agregado (FELDMAN & SINK, 2006). O agregado é maior, mais imaturo e quando corado com corantes do tipo Romanowsky apresenta coloração azulada (policromatófilica). O reticulócito puntuado é menor, mais maduro e apresenta menos do que três retículos em seu citoplasma (COWGILL *et al*, 2003; TVEDTEN & MORITZ, 2010). Na medicina humana, os reticulócitos são classificados em cinco estágios diferentes de acordo com a sua maturação e conseqüentemente quantidade de retículos (RILEY *et al*, 2001) (Figura 2).

FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MATURAÇÃO DO RETICULÓCITO SEGUNDO HEILMEYER (RILEY *et al*, 2001).



Grau 0 corresponde ao mais imaturo e grau IV ao estágio mais maduro do reticulócitos com raros retículos no citoplasma

#### 2.1.2.2 Eritrócito

O eritrócito é o último estágio de maturação da série eritrocitária. Possui uma membrana permeável e flexível composta por 61% de água, 32% de proteínas (hemoglobina é a principal), 7% de carboidratos e 0,4% de lipídeos (OLVER *et al*, 2010). O formato bicôncavo dos eritrócitos é mantido por proteínas estruturais do citoesqueleto. Este formato, presente na maioria dos eritrócitos dos mamíferos, proporciona grande superfície em relação ao volume, facilitando as trocas gasosas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Nos mamíferos, não possui núcleo e nem organelas e muito menos a habilidade de produzir proteínas. Sem organelas em seu interior, possui mais espaço para armazenar hemoglobina, uma proteína sem a qual o eritrócito não conseguiria desenvolver com a mesma eficiência a sua principal função: transportar oxigênio aos tecidos (OLVER *et al*, 2010).

O período de vida do eritrócito varia de acordo com a espécie, sendo que em cães é de aproximadamente 110 dias. Quando os eritrócitos estão velhos ou com danos estruturais, são fagocitados e removidos da circulação pelos macrófagos do baço e fígado devido a alterações em sua membrana plasmática ou nas enzimas presentes no citosol (HOSTETTER & ANDREASEN, 2004).

#### 2.1.1.3 Hemoglobina

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas e, portanto, não conseguiria ser transportado em quantidade suficiente aos tecidos se estivesse diluído no plasma (ROSKOSKI JR, 1997). Com o decorrer da evolução das espécies, os organismos multicelulares desenvolveram maneiras mais eficazes de transportar o oxigênio pelo corpo, sendo que a forma mais eficiente é através da ligação com uma proteína denominada hemoglobina (NELSON & COX, 2004). A hemoglobina é um complexo proteína-ferro-protoporfirina que possui função fisiológica central na ligação, transporte e entrega de oxigênio aos tecidos (OLVER *et al*, 2010). A formação deste complexo é muito conveniente ao organismo, porque otimiza a oxigenação dos tecidos e evita a presença do ferro livre na circulação. O ferro livre promove a formação de formas de oxigênio altamente reativas, como os radicais hidroxilas, que podem lesar o DNA e outras moléculas (NELSON & COX, 2004). Aproximadamente 75% do ferro presente no organismo compõem as moléculas de hemoglobina no interior das células da linhagem eritróide (MEYER & HARVEY, 2004; HARVEY, 2008 a).

A hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas de globina (2  $\alpha$  e 2  $\beta$ ) e quatro núcleos prostéticos de heme, que ligam-se através de pontes que se abrem facilmente, permitindo a ligação com o oxigênio ou gás carbônico (ROSKOSKI JR, 1997). Sua síntese acompanha o desenvolvimento dos eritrócitos na eritropoese, apresentando concentrações diminuídas nos precursores mais jovens e mais elevadas nas células mais maduras (HARVEY, 2008 a). À medida que as células vão se diferenciando, elas se tornam menores e com concentração de hemoglobina maior.

O heme é um grupo prostético, ou seja, um composto permanentemente ligado a uma proteína e que contribui para sua função (NELSON & COX, 2004). É uma molécula plana, composta por protoporfirina tetrapirrólica IX, contendo uma molécula central de ferro, proveniente da ferritina presente nas células precursoras (OLVER *et al*, 2010).

## 2.2 FERRO

Considerando que 75% do ferro presente no organismo dos mamíferos está no interior das células da linhagem eritróide, mais especificamente na molécula de hemoglobina, as alterações na concentração deste mineral podem desencadear alterações hematológicas (MEYER & HARVEY, 2004; HARVEY, 2008 b). Além disso, o ferro é um importante componente de muitas enzimas como a NADH desidrogenase, lipoxigenases, ribonucleotídeo redutase e fosfatases (OLVER *et al*, 2010).

Quando em solução, o ferro pode apresentar duas formas: a ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e a férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ocorre quando está sendo transportado através da membrana celular, e na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) quando está ligado a uma proteína de transporte ou armazenamento (HARVEY, 2008 b). Esta habilidade de alterar seu estado oxidativo faz com que o ferro, quando em quantidades plasmáticas elevadas, seja potencialmente tóxico aos tecidos, pois ele catalisa a geração de radicais livres que podem causar injúria e até mesmo morte celular (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004).

### 2.2.1 Absorção

A absorção do ferro ocorre no duodeno proximal. A quantidade de ferro absorvida é minuciosamente regulada pelo organismo, pois a absorção pode ser controlada mas a excreção não (GROTTO, 2008 a; HARVEY, 2008 b; OLVER *et al*, 2010). Apenas uma pequena quantidade de ferro é eliminada por descamação da pele, por pequenos sangramentos da mucosa intestinal, descamação dos enterócitos e urotélio (OLVER *et al*, 2010). Ou seja, em casos

de intoxicação por ferro, o organismo não dispõe de mecanismos eficientes de eliminação deste mineral, podendo causar danos ao organismo como o desenvolvimento de hemocromatose (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004; NAIRZ & WEISS, 2006). Portanto, um perfeito sincronismo entre a absorção, utilização e estoque de ferro é essencial para a manutenção do equilíbrio deste metal no organismo (GANZ & NEMETH, 2006; GROTTTO, 2008 a).

A maior parte do ferro presente no organismo provém da destruição dos eritrócitos senescentes ou defeituosos e da posterior degradação da hemoglobina. Praticamente toda quantidade de ferro requerida nas atividades fisiológicas diárias é proveniente da degradação da hemoglobina sendo que o intestino absorve uma pequena quantidade para repor a modesta perda diária deste elemento e manter a reserva (HARVEY, 2008 b; OLVER *et al*, 2010). Em humanos, uma dieta normal contém de 13 a 18 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos pelo intestino (GROTTTO, 2008 a). Nos animais a taxa de absorção do ferro varia de acordo com a espécie. Cães adultos absorvem de 0,2 a 4,5% do ferro ingerido enquanto que aves do paraíso chegam a absorver até 90% (FRANKENHUIS & ASSINK, 1989; NATHANSON *et al*, 1985).

Os enterócitos são responsáveis pela absorção do ferro ingerido na dieta. Basicamente, existem duas apresentações do ferro nos alimentos: a forma heme, presente principalmente na carne vermelha, pois é fruto da quebra da hemoglobina e mioglobina, e a forma inorgânica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) presente nos vegetais e sementes (HARVEY, 2008 b; GRIMES *et al*, 2012).

#### 2.2.1.1 Proteína transportadora do heme 1 (HCP-1)

A absorção do ferro heme é mais facilmente realizada pelos enterócitos pois depende apenas de uma proteína presente na membrana das vilosidades: a proteína transportadora do heme 1 ou HCP-1 (GROTTTO, 2008 a). Em humanos dois terços do ferro absorvido pelo intestino é na forma heme

(PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004). Após a entrada na célula, o ferro heme é reduzido à forma ferrosa pela enzima hemeoxigenase (HARVEY, 2008 b). A disponibilidade da HCP-1 na membrana da célula depende da concentração citoplasmática de ferro. Quando há hipóxia tecidual ou diminuição na concentração intracelular de ferro, mais moléculas de HCP-1 ficam disponíveis na membrana celular para absorver o ferro heme (GROTTO, 2008 a).

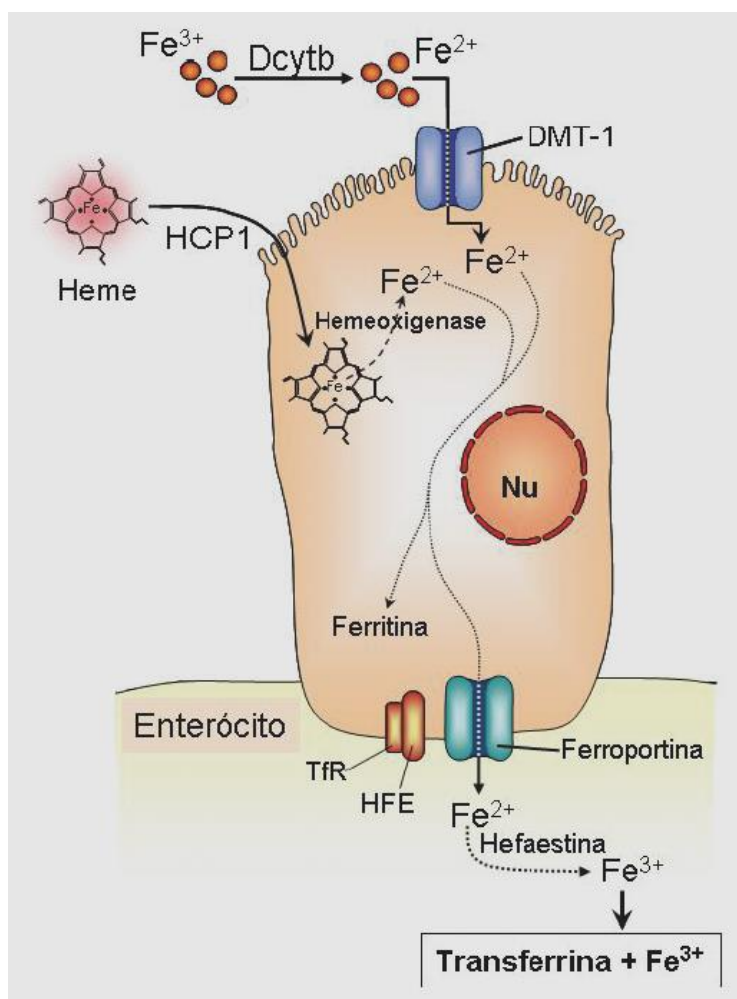
#### 2.2.1.2 Proteína transportadora de metal divalente-1 (DMT-1)

A absorção do ferro inorgânico é mais complicada pois depende de uma série de reações. Primeiramente o ferro é estabilizado na forma férrica pela acidez do suco gástrico (OLVER *et al*, 2010). Porém, para ser transportada para o interior do enterócito ou de qualquer outra célula, o ferro férrico precisa ser reduzido a ferro ferroso. Para isso entra em ação a enzima ferroredutase ou citocromo B duodenal (dCytb) (GANZ & NEMETH, 2006; GROTTO, 2008 a; OLVER *et al*, 2010). Após a reação de redução, o ferro é introduzido na célula através da proteína transportadora de metal divalente-1 ou DMT-1. O ferro ferroso é então estocado na forma de ferritina ou será transferido para o plasma através de outra proteína de membrana: a ferroportina (HARVEY, 2008 b).

#### 2.2.1.3. Ferroportina

A ferroportina localiza-se na região basal de diversos tipos celulares como hepatócitos, macrófagos, enterócitos e sinciciotrofoblastos placentários. A expressão da ferroportina aumenta com a diminuição da concentração sérica do ferro e com a hipóxia tecidual (OLVER *et al*, 2010). O ferro externalizado pela ferroportina está na forma ferrosa, porém, a proteína transportadora de ferro denominada transferrina possui afinidade pela forma férrica. Neste ponto a enzima hefaestina, uma oxidase oxida o ferro ferroso para a forma férrica para ser transportado através do plasma ligado a transferrina (MEYER & HARVEY, 2004; PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004).

FIGURA 3 - ETAPAS DO TRANSPORTE DO FERRO E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ENTRADA E SAÍDA DO FERRO DO INTERIOR DO ENTERÓCITO (GROTTO, 2008 a).



Dcytb: Ferroredutase; DMT-1: Proteína transportadora de metal divalente 1; HCP-1: Proteína transportadora do heme 1; TfR: Receptor da transferrina; HFE: Proteína da hemocromatose; Nu: núcleo.

### 2.2.2 Transporte

Após ser externalizado pela célula através da proteína ferroportina, o ferro na forma ferrosa é oxidado à forma férrica, pois como citado anteriormente, é nesta forma que este mineral interage com as proteínas de transporte ou armazenamento (HARVEY, 2008 b). O  $Fe^{3+}$  é então ligado a

proteína transferrina, uma  $\beta$  globulina com dois sítios de ligação para o ferro, sintetizada e excretada pelo fígado. Normalmente, 25 a 50% da transferrina plasmática está ligada ao ferro, sendo o seu principal destino o tecido hematopoiético (MEYER & HARVEY, 2004; OLVER *et al*, 2010).

Nos tecidos, a transferrina se liga ao receptor de transferrina (TfR) presente na superfície da célula, formando o complexo transferrina-TfR. Este complexo é internalizado e o ferro liberado para o interior do citoplasma (GANZ & NEMETH, 2006; GROTTTO, 2008 a).

### 2.2.3 Armazenamento

Aproximadamente 20 a 30% do ferro presente no organismo dos mamíferos está armazenado na forma de ferritina e hemossiderina, sendo o fígado, baço e medula óssea os principais locais de estoque (MEYER & HARVEY, 2004; GRIMES *et al*, 2012).

A porção protéica da ferritina denomina-se apoferritina, uma proteína formada por 24 subunidades que pode se ligar a até 4500 moléculas de ferro, ou seja, aproximadamente 31% do ferro presente no organismo (OLVER *et al*, 2010). O complexo apoferritina-ferro é denominado ferritina e é a forma solúvel de armazenamento (GROTTTO, 2008 a). Esta associação do ferro com a apoferritina é fundamental, pois desta forma o organismo está protegido da ação oxidativa do ferro livre (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004).

A hemossiderina é composta por agregados de proteína e ferro no interior dos lisossomos. É encontrada principalmente nos macrófagos e é resultado da degradação da ferritina (GROTTTO, 2008 a; HARVEY, 2008 b). A liberação do ferro estocado na forma de hemossiderina é mais lenta se comparado à ferritina (MEYER & HARVEY, 2004).

### 2.2.4 Manutenção da homeostase

A deficiência e o excesso de ferro têm consequências adversas ao organismo e para manter a homeostase do ferro, há um complexo mecanismo que regula as concentrações intracelular e extracelular (GANZ & NEMETH,



2006). O mecanismo intracelular é mais simples e se baseia na concentração de ferro presente no interior celular. O mecanismo extracelular é muito mais complexo e possui a hepcidina como principal hormônio regulador (GROTTO, 2008 a).

#### 2.2.4.1 Hepcidina

Recentemente descoberta, a hepcidina é a chave da regulação da homeostase sistêmica do ferro. É produzida pelo fígado, circula no plasma e é eliminada pela urina (GANZ & NEMETH, 2006). Sua função principal é de diminuir a concentração de ferro no plasma e sua expressão é regulada pela concentração de ferro intracelular e extracelular, demanda eritropoiética e resposta inflamatória (interleucinas e fator de necrose tumoral possuem papel fundamental) (GRIMES *et al*, 2012).

A hepcidina desempenha sua função reguladora da absorção e estoque de ferro regulando a função e expressão da ferroportina na membrana celular das células intestinais dos macrófagos (FRANCHINI *et al*, 2010). Sua síntese aumenta quando há concentração elevada de ferro sérico e diminui quando há anemia e hipóxia tecidual (OLVER *et al*, 2010). As concentrações reduzidas de hepcidina estimulam a absorção do ferro pelas células intestinais bem como a expressão da ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos. Desta forma, ocorre estímulo do transporte do ferro para a transferrina na corrente sanguínea aumentando a liberação deste metal a partir dos macrófagos do sistema retículo-endotelial. Quando a secreção de hepcidina aumenta, desencadeia uma reação inversa (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004; GANZ & NEMETH, 2006).

Além de ser regulada pela concentração sérica de ferro, anemia e hipóxia tecidual, a produção de hepcidina também é alterada por influência de mediadores da resposta inflamatória, principalmente o fator de necrose tumoral e as interleucinas (MEANS, 2004; RIVERA *et al*, 2005). Em casos de inflamação crônica, a concentração de hepcidina aumenta por influência dos mediadores inflamatórios e conseqüentemente ocorre o sequestro do ferro circulante levando a uma hipoferremia (FRANCHINI *et al*, 2010). Existe a teoria

de que o sequestro do ferro é uma forma de defesa inata do organismo, pois quase todos os microorganismos precisam de ferro para manter suas funções vitais. Indisponibilizar o ferro seria uma forma de controlar a infecção. Porém, a longo prazo, o sequestro do ferro leva a efeitos adversos ao organismo, sendo a anemia o principal (GANZ & NEMETH, 2006).

Em seres humanos, já foram realizados diversos estudos envolvendo a hepcidina, porém dentro da medicina veterinária ainda existem muitas questões a serem avaliadas. Badial *et al* (2011) induziram experimentalmente uma resposta inflamatória em ovinos e observaram que nestes animais houve um aumento na produção hepática de hepcidina. Em cães, existem poucos estudos sobre a hepcidina mas o gene expressor desta molécula já foi clonado e seqüenciado por Fry *et al* (2004), o que possibilita uma série de outros estudos. O conhecimento cada vez maior do hormônio hepcidina pode levar a aplicações clínicas na diferenciação de anemias, auxilia na decisão quanto a terapêutica a ser utilizada e pode servir como uma proteína de fase aguda pois aumenta sua concentração sérica em algumas horas (GRIMES *et al*, 2012).

## 2.3 ANEMIA

Mucosas pálidas, apatia, icterícia, intolerância ao exercício e, dependendo da gravidade, choque. As apresentações clínicas da anemia podem não variar muito, mas sua origem e tratamento podem ser muito diversos. A anemia corresponde à diminuição da quantidade de hemácias e é resultante de uma doença primária, responsável pela destruição de hemácias, pela perda de sangue decorrente de hemorragia, pela menor produção de hemácias ou pela associação de alguns desses eventos (WALKER, 2009). Indiferentemente da causa, todas as anemias resultam em menor oxigenação tecidual (THRAL, 2007). A gravidade dos sinais clínicos causados pela hipóxia tecidual geralmente está relacionada ao tempo de instalação do quadro anêmico, pois em animais com anemia de instalação gradativa há certo grau de compensação da hipoxemia (TVEDTEN, 2010).

### 2.3.1 Classificação da anemia

As anemias são classificadas pelos índices hematimétricos de acordo com o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A anemia é microcítica, normocítica ou macrocítica quando as hemácias apresentam tamanho menor, normal ou maior que o normal, respectivamente. Denomina-se anemia hipocrômica e normocrômica quando as hemácias contêm teor de hemoglobina diminuído e normal, respectivamente (THRALL, 2007). Os três padrões de anemia com importância diagnóstica são macrocítica hipocrômica (anemia regenerativa), normocítica normocrômica (anemia não regenerativa) e microcítica hipocrômica (anemia por deficiência de ferro). Alteração de hipercromia não possui correlação clínica e é considerado erro de técnica (TVEDTEN, 2010).

Apesar de ser amplamente difundida, a classificação do estado anêmico pelos índices hematimétricos é passível de erro, pois geralmente o número de células alteradas é muito pequeno para influenciar no VGM e CHGM (PALTRINIERI *et al*, 2010; TVEDTEN, 2010). A forma mais sensível de classificação da anemia é pela resposta da medula óssea (COWGILL *et al*, 2003). A anemia é classificada como regenerativa nos casos em que a medula óssea está respondendo e não regenerativa quando não está respondendo. As duas principais causas de anemia regenerativa são hemorragia e hemólise. As causas de anemias não regenerativas são mais numerosas e incluem: anemia da doença crônica, anemia por insuficiência renal crônica, anemia de origem endócrina, desordens da medula óssea, anemia causada por agentes químicos e infecções por microorganismos (WEISER & THRALL, 2006; THRALL, 2007).

### 2.3.2 Diagnóstico

Os exames laboratoriais rotineiramente utilizados no diagnóstico das anemias são: hemograma, hematócrito e concentração de hemoglobina. Em um animal anêmico, geralmente estes parâmetros estão proporcionalmente diminuídos (TVEDTEN, 2010). Além do diagnóstico e classificação, os exames também indicam a severidade da anemia.

Classificar o estado anêmico pela resposta da medula óssea é mais válido clinicamente, pois estabelece a distinção entre anemias regenerativas e

não regenerativas (WALKER, 2009). A avaliação desta resposta da medula óssea pode ser feita através da punção e avaliação da medula ou através da contagem de reticulócitos circulantes, método mais fácil e barato de ser realizado. A contagem dos reticulócitos pode ser feita por vários métodos, mas o padrão ouro é a contagem manual sob microscopia de luz (COWGILL *et al*, 2003).

Além da realização de análises hematológicas, é importante a avaliação do metabolismo do ferro com a determinação do ferro sérico, ferritina e transferrina (HARVEY, 2008 b).

#### 2.3.2.1 Concentração sérica de ferro

A concentração sérica do ferro indica a quantidade do íon que está sendo transportado ligado a transferrina. Estará aumentado nas anemias hemolíticas, aplásicas e hipoplásicas, intoxicação por ferro e em cães medicados com glicocorticoides ou com hepatopatia crônica; diminuído em deficiências de ferro e inflamação crônica e em animais que recebem hormônio eritropoietina, mas não recebem suplementação de ferro (HARVEY, 2008 b; ANDREWS, 2010).

O método mais utilizado para a determinação da concentração sérica do ferro é o colorimétrico. A amostra deve ser cuidadosamente manipulada para evitar a contaminação pelo ferro presente no ambiente, sendo recomendado o uso de tubos e ponteiros plásticos descartáveis (ANDREWS, 2010). As análises de amostras lipêmicas ou hemolisadas devem ser evitadas, pois estas alterações afetam o método colorimétrico e acabam levando ao falso aumento do resultado (MEYER & HARVEY, 2004; HARVEY, 2008 b).

#### 2.3.2.2 Capacidade total de ligação do ferro (TIBC)

Capacidade total de ligação do ferro é a quantidade de ferro que a transferrina sérica consegue se ligar quando todos os sítios de ligação com o ferro estão saturados. É calculada pela soma do ferro sérico com a capacidade latente de ligação do ferro (UIBC), que é determinado por método fotométrico

(ANDREWS, 2010). A TIBC estará diminuída nas doenças inflamatórias crônicas e aumentada em cães com hepatopatia crônica e anemias ferroprivas. Em humanos, porcos, coelhos, cavalos e bovinos, há um aumento na concentração de TIBC em quadros de deficiência de ferro (HARVEY, 2008 b; WEISS, 2010).

### 2.3.2.3 Ferritina sérica

A ferritina sérica reflete o estoque corpóreo total de ferro. Os métodos de mensuração da ferritina sérica utilizam métodos imunológicos e específicos para a espécie humana não sendo possível utilizar na rotina do laboratório clínico veterinário (ANDREWS, 2010; PIRES *et al*, 2011). A ferritina foi dosada em diversas espécies animais, inclusive no cão, e estará aumentada em animais com anemia hemolítica crônica, histiocitose maligna e cães com hemocromatose devido a transfusões sanguíneas seguidas. Estará diminuída nas deficiências de ferro (HARVEY, 2008 b). Pode se apresentar momentaneamente elevada em equinos submetidos a intenso exercício (WEISS, 2010).

Determinar a concentração de ferritina é útil para a diferenciação das anemias de origem inflamatória das por deficiência de ferro. Em ambas o ferro sérico estará abaixo do normal, mas na anemia de origem inflamatória a ferritina não se altera (NAIRZ & WEISS, 2006).

### 2.3.3 Anemia de doença crônica ou da inflamação

É uma síndrome clínica que se desenvolve em pacientes que apresentam doenças infecciosas crônicas, inflamatórias ou neoplásicas (CANÇADO & CHIATTONE, 2002). É caracterizada pela retenção de ferro no interior dos macrófagos induzida pelas citocinas inflamatórias e principalmente pelo hormônio hepcidina (THEURL *et al*, 2009). Apresenta-se como anemia não regenerativa associada à baixa concentração sérica de ferro e da capacidade total de ligação do ferro, porém com as reservas de ferro aumentadas (FRY, 2010). Em humanos, a anemia de doença crônica é relativamente comum sendo a segunda principal causa de anemia em

pacientes hospitalizados, principalmente idosos e crianças (ABSHIRE, 1996; CANÇADO & CHIATTONE, 2002; BARTH & HIRSCHMANN, 2010).

Os três principais mecanismos patológicos envolvidos na anemia de doença crônica são: diminuição da sobrevivência da hemácia, falha da medula óssea em aumentar a produção de glóbulos vermelhos para compensar o aumento da sua demanda e distúrbio da mobilização do ferro de depósito do sistema mononuclear fagocitário (CANÇADO & CHIATTONE, 2002). O aumento da produção das citocinas mediadoras da resposta inflamatória está implicado nos três processos. A diminuição do tempo de vida dos eritrócitos se deve a hiperatividade do sistema mononuclear fagocitário desencadeado pela resposta inflamatória. Também por interferência das citocinas inflamatórias, a EPO não é produzida pelos rins na quantidade esperada e a medula óssea não consegue mobilizar os estoques de ferro para a produção eritropoiética (MEANS, 2004). A mobilização do ferro sérico para o interior dos macrófagos também é devido às citocinas inflamatórias que, ao estimular a produção de hepcidina pelos hepatócitos, levam a uma hipoferremia (GANZ & NEMETH, 2006).

A anemia nos cães com neoplasia é um achado muito comum e tem sido correlacionada com a gravidade e prognóstico da doença (FRY, 2010). A frequência varia de acordo com a neoplasia. Cerca de 87 a 98% dos cães com leucemia aguda apresentam anemia no momento do diagnóstico enquanto que apenas 5 a 9% dos cães com mastocitoma localizado apresentam o mesmo quadro (CHILDRESS, 2012). Cápuia *et al* (2011) realizaram estudo com 18 cães com linfoma (multicêntrico e cutâneo) e relataram uma correlação positiva entre o valor do hematócrito e o tempo de sobrevivência para os cães. Miller *et al* (2009) associaram a anemia com o período de sobrevivência em cães com linfoma e osteossarcoma. O estudo avaliou 84 cães com linfoma e 91 cães com osteossarcoma. Os cães com linfoma e anemia possuem um decréscimo no período de sobrevivência enquanto que não foi observado efeito do estado anêmico no tempo de sobrevivência de cães com osteossarcoma. Em nenhum dos dois estudos foi avaliado o metabolismo do ferro e como a neoplasia poderia alterá-lo.

Além das alterações causadas pelo caráter crônico da neoplasia, existem outros fatores ligados à doença ou ao tratamento que podem levar a anemia. São eles: hemólise intravascular, hemorragias crônicas, infiltração de células neoplásicas na medula óssea além dos efeitos mielossupressores causados pelos quimioterápicos (GROTTO, 2008 b; PRIHIRUNKIT *et al*, 2010).

#### 2.3.4 Anemia associada à doença renal crônica

Anemia é um achado comum em cães que apresentam doença renal crônica e geralmente se desenvolve nos períodos finais da doença (POLZIN, 2011). Em um estudo com cães nefropatas crônicos, Chandler *et al* (2007) relataram a presença de anemia em 44% dos casos. Em gatos com insuficiência renal crônica, estima-se que a anemia está presente em 30-65% dos casos (CHALHOUB *et al*, 2011). A causa da anemia é atribuída a diversos fatores, sendo a diminuição da produção de EPO a principal delas. Entretanto, a presença de sangramentos espontâneos, diminuição do período de vida dos eritrócitos, deficiência nutricional, inflamação e efeitos anti-proliferativos das toxinas urêmicas também são causas conhecidas (FRY, 2010; POLZIN, 2011). É importante reconhecer a presença da anemia no paciente com doença renal crônica para instituir o melhor tratamento e promover melhora na qualidade de vida (CHALHOUB *et al*, 2011).

#### 2.3.5 Anemia associada à doenças endócrinas

A anemia está associada a uma série de doenças endócrinas que acometem os cães: diabetes mellitus, hipoadrenocorticism e hipotireoidismo (GRECO, 2003; FRY, 2010; SCOTT- MONCRIEFF, 2007). Assim como em humanos, a origem da anemia em pacientes diabéticos é multifatorial. Porém, muitas vezes está relacionada à deficiência de EPO decorrente de insuficiência renal crônica (BOSMAN *et al*, 2001) . Além disso, animais com cetoacidose, apresentam uma grande quantidade de corpúsculos de Heinz. Este processo oxidativo, diminui o período de vida dos eritrócitos e leva ao quadro anêmico (CALDIN *et al*, 2005).

Aproximadamente 30-40% dos cães hipotireoideus apresentam anemia leve (SCOTT- MONCRIEFF, 2007). A anemia é atribuída à uma diminuição na eritropoese, com um possível mecanismo que diminui a produção de EPO e que afeta o ritmo de produção das células progenitoras eritropoéticas (FRY, 2010). A presença da anemia não regenerativa é relatada em cães com hipoadrenocorticism e sua origem pode ser relacionada com os baixos níveis de cortisol, hormônio que possui importância no estímulo da eritropoese (GRECO, 2003; PARRY, 2013).



## REFERÊNCIAS

ABSHIRE, T.C. The anemia of inflammation - A Common Cause of Childhood Anemia. **Pediatric Hematology**.vol 43, n 3, p. 623 – 637, 1996.

ANDREWS, G.A. Measurement of Serum Iron Concentration, TIBC, and Serum Ferritin Concentration. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 1162 - 1164.

BADIAL, P.R.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; CUNHA, H.J. *et al.* Influence of experimental inflammatory response on hepatic hepcidin gene expression and plasma iron concentration in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 141, p. 157 – 161, 2011.

BARTH, D. & HIRSCHMANN, J.V. Anemia. In: Tkachuk, D.C. & HIRSCHMANN, J.V. **Wintrobe – Atlas Colorido de Hematologia**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2010. p. 1 - 47.

BOSMAN, D.R.; WINKLER, A.S.; MARSDEN, J.T. *et al.* Anemia With Erythropoietin Deficiency Occurs Early in Diabetic Nephropathy. **Diabetes Care**. v 24, p. 495–499, 2001.

CALDIN, M.; CARLI, E.; FURLANELLO, T. *et al.* A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, n 3, p. 224 – 231, 2005.

CANÇADO, R.D. & CHIATTONE, C.S. Anemia de Donça Crônica. **Rev. bras. hematol.hemoter**. v 24, n 2, p. 127-136, 2002.

CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F.E.D.; CANESIN, A.P.M.N. *et al.* Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**. v. 41 n 7, p. 1245 – 125, 2011.

CAR, B.D. The Hematopoietic System In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 27 - 35.

CHALHOUB, S.; LANGSTON, C.; EATROFF, A. Anemia of renal disease - What it is, what to do and what's new. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v 13, p 629–640, 2011.

CHANDLER, M.L.; ELWOOD, C.; MURPHY, K.F. *et al.* Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. **Journal of Small Animal Practice** v 48, p. 690–694, 2007.

CHILDRESS, M.O. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. **Vet Clin Small Animal**. v 42, p.123–155, 2012.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.S.J.; RAIDAL, S.R. Particular hematological characteristics of birds. In:\_\_\_\_. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Iowa: Wiley Blackwell, 2009. p. 69 - 112

COWGILL, E.S.; NEEL, J.A.; GRINDEM, C.B. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. **The Veterinary Clinics – Small Animal Practice**. v, 33. p. 1223 – 1244, 2003.

ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J. *et al.* **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders, 2008. p. 118 –155

FELDMAN, B.F. & SINK, C.A. Eritrócitos. In:\_\_\_\_ **Urinálise e Hematologia**. São Paulo: Roca, 2006. p.75 – 96.

FRANCHINI, M.; MONTAGNANA, M.; LIPPI, G. Heparin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. **Clinica Chimica Acta**. v. 411, p. 1565–1569, 2010.

FRANKENHUIS, M.T.; VAN EYK, H.; ASSINK, J.A.; ZWART, P. Iron storage in livers of birds of paradise. **Proc 2<sup>nd</sup> Eur Symp Avian Med Surg**, Utrecht, Netherlands, 1989, p.92-96.

FRY, M.M. Anemia of Inflammatory, Neoplastic, Renal, and Endocrine Diseases. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 246 – 250.

FRY, M.M.; LIGGETT, J.L.; BAEK, S.J. Molecular cloning and expression of canine hepcidin. **Veterinary Clinical Pathology**. v.33, p.223 – 227, 2004.

GANZ, T. & NEMETH, E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1763, p. 690 – 699, 2006.

GRECO, D.S. Hypoadrenocorticism in Small Animals. **Clin Tech Small Anim Pract** v. 22, p. 32-35, 2007.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 30. p. 390 – 397. 2008 a.

GROTTO, H.Z.W. Anaemia of cancer: an overview of mechanisms involved in its pathogenesis. **Med Oncol**. v. 25, p. 12–21, 2008 b.

GRIMES, C.N.; GIORI, L.; FRY, M.M. Role of Hepcidin in Iron Metabolism and Potential Clinical Applications. **Vet Clin Small Anim**. v 42, p 85–96, 2012.

HARVEY, J.W. Erythrocytes. In:\_\_\_\_\_ **Atlas of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Saunders Company, 2001. p.21 – 44.

HARVEY, J.W. The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders. In: KANEKO, J.J. *et al.* **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders, 2008 a. p. 173 – 240.

HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J. *et al.* **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders, 2008 b. p. 259 – 285.

HOSTETTER, S.J. & ANDREASEN, C.B. General Principles. In: COWELL, R.L. **Veterinary clinical pathology secrets**. Missouri: Elsevier, 2004. p. 1 – 3.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Células do Sangue. In:\_\_\_\_ **Histologia Básica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 222 – 236.

KERR, M.G. The plasma proteins. In:\_\_\_\_ **Veterinary Laboratory Medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Science, 2002. p.73 – 80.

LOPES, S.T.A; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3<sup>a</sup> ed. Santa Maria: UFSM, 2007. 117p.

MEANS JR, R.T. Hepcidin and anaemia. **Blood Reviews**. v 18, p 219–225, 2004.

MEYER, D.J. & HARVEY, J.W. Evaluation of Erythrocytic Disorders. In: \_\_\_\_ **Veterinary Laboratory Medicine – Interpretation and Diagnosis**. 3<sup>rd</sup> ed. Missouri: Saunders, 2004. p. 47 – 81.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S. *et al.* Anemia Is Associated with Decreased Survival Time in Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 116 – 122, 2009.

NAIRZ, M. & WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis. **Wien Klin Wochenschr** v 118, p 442–462, 2006.

NATHANSON, M. H., MUIR, A.; Mc LAREN, G. D. Iron absorption in normal and iron-deficient beagle dogs: mucosal iron kinetics. **Am. J. Physiol.** v 249 , p 439 – 448, 1985

NELSON, D.L. & COX, M.M. Funções das Proteínas. In:\_\_\_\_ **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 2004. p. 156 – 189.

OLVER, C.S.; ANDREWS, G.A.; SMITH, J.E. *et al.* Erythrocyte Structure and Function. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 123 – 130.

PALTRINIERI, S.; PREATONI, M.; ROSSI, S. Microcytosis does not predict serum iron concentrations in anemic dogs. **The Veterinary Journal**. v. 185, p. 341 – 343, 2010.

PAPANIKOLAOU, G. & PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 202, p. 199 – 211, 2004

PARRY, N.M.A. Diagnosis of hypoadrenocorticism in dogs. **Companion Animal**. v 18, p 42 – 46, 2013.

PIRES, L.S.A. **Determinação dos parâmetros do ferro em cães sadios e anêmicos**. 2009. 102f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

PIRES, L.S.A.; DITTRICH, R.L.; SOUZA, A.C. *et al.* Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro e cães. **Ciência Rural**. v. 41, p. 272 – 277, 2011.

POLZIN, D.J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. **Vet Clin Small Anim**. v. 41, p. 15–30, 2011.

PRIHIRUNKIT, K.; CHOOTHEA, A.; SALAKIJ, C. *et al.* Immune-mediated hemolytic anemia in a dog with acute monoblastic leukemia. **Comp Clin Pathol**. v 19, p 631–634, 2010.

RILEY, R.S.; BEN-EZRA, J.M.; GOEL, R. *et al.* **Reticulocytes and reticulocyte enumeration**. Journal of Clinical Laboratory Analysis. v.15, p. 267 – 294. 2001.

RIVERA, S.; LIU, L.; NEMETH, E. *et al.* Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. **Blood**. v 105, p 1797-1802, 2005.

ROSKOSKI JR, R. Aminoácidos e proteínas. In:\_\_\_\_ **Bioquímica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. P.37 - 51

SCOTT-MONCRIEFF, J.C. Clinical Signs and Concurrent Diseases of Hypothyroidism in Dogs and Cats. **Vet Clin Small Anim**. v. 37, p. 709–722, 2007.

THEURL, I.; AIGNER, E.; THEURL, M. *et al.* Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. **Blood**. v. 113, p 5277-5286, 2009.

THRALL, M.A. & WEISER, M.G. Hematologia. In: HENDRIX, C.M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários**. 4ª ed. São Paulo: Roca, 2006. p.31 – 78.

THRALL, M.A. Morfologia das Hemácias. In: THRALL, M.A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2007. p.65 – 77.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 152 – 161.

TVEDTEN, H & MORITZ, A. Reticulocyte and Heinz Body Staining and Enumeration. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 1067 – 1073.

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. In: COWELL, R.L. *et al.* **Diagnóstico Citológico e Hematologia**. São Paulo: Editora Med Vet, 2009. p 390 - 422

WELLMAN, M.L.; DiBARTOLA, S.P.; KOHN, C.W. Applied Physiology of Body Fluids in Dogs and Cats. In: DiBARTOLA, S.P. **Fluid, Electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice**. 4<sup>th</sup>ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 2 - 25

WEISS, D.J. Iron and Cooper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 167 – 171.

## **2 NÚMERO DE ERITRÓCITOS POLICROMATÓFILOS IDENTIFICA CORRETAMENTE A ANEMIA REGENERATIVA NO CÃO?**

### **RESUMO**

O método de quantificação de eritrócitos policromatófilos é utilizado na rotina dos laboratórios clínicos veterinários para identificar a resposta da medula óssea. Entretanto, não há padronização desse método em relação ao número absoluto de reticulócitos. No presente estudo foram avaliadas amostras sanguíneas de 135 cães anêmicos e de 21 cães saudáveis. Foram realizados hemogramas e quantificações de eritrócitos policromatófilos e reticulócitos. Os valores de policromatófilos por campo e a contagem absoluta de reticulócitos foram comparados por análises estatísticas para determinar se há correlação entre os dois métodos. Os valores da sensibilidade, especificidade e acurácia do número de policromatófilos foram, respectivamente, de 86,11%, 87,5% e 87,12%. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi de 0,8125 e o coeficiente de determinação da equação ( $R^2$ ) foi de 0,6603, entre o número de policromatófilos e de reticulócitos. O número de dois policromatófilos por campo diferenciou a anemia não regenerativa da regenerativa, mas não foi possível associar ao número de reticulócitos e classificar a anemia quanto a intensidade de regeneração.

Palavras chave: resposta da medula óssea, anemia, cães, policromatofilia, reticulócitos.

## ABSTRACT

The method of quantitation of polychromatophilic cell is routinely used in veterinary clinical laboratories to identify the bone marrow response. However, there is no standardization of this approach over the absolute reticulocyte count. The present study evaluated blood samples from 135 anemic dogs and 21 healthy dogs. CBC and quantification of reticulocytes and polychromatophilic cell were performed. The sensitivity, specificity and accuracy of the polychromatophilic cell count were, respectively, 86.11%, 87.5% and 87.12%. The Pearson correlation coefficient ( $r$ ) was 0.8125 and the coefficient of determination equation ( $R^2$ ) was 0.6603, between the number of polychromatophilic cell and reticulocytes. Two polychromatophilic cells per field was able to differentiate the regenerative and nonregenerative anemia, but it was not possible to associate it to the absolute reticulocyte count and classify the intensity of regeneration of anemia.

Key words: bone marrow response, anemia, dogs, polychromatophilic cell, reticulocytes.



## 2.1 INTRODUÇÃO

As anemias ocorrem com grande frequência na rotina clínica de pequenos animais. Nos registros de 2008 do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, constatou-se anemia em 15,9% dos hemogramas realizados em cães, correspondendo a 87,8% de adultos e 12,2% de jovens (PIRES, 2009). As principais causas de anemias são as hemorragias agudas, hemólise intravascular, doenças crônicas, insuficiência renal, neoplasias, processos inflamatórios, deficiência nutricional de ferro e doenças da medula óssea (THRALL, 2007). Independente da origem, os parâmetros hematológicos utilizados para diagnosticar e avaliar sua severidade são o volume globular, a contagem de eritrócitos totais, concentração de hemoglobina e alterações morfológicas dos eritrócitos. É importante classificar o estado anêmico para determinar a sua origem e avaliar o prognóstico do paciente (MEYER & HARVEY, 2004). O volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) são utilizados para classificar a anemia, mas a resposta da medula óssea é mais importante no diagnóstico e prognóstico (COWGILL *et al*, 2003; TVEDTEN, 2010).

Em anemias regenerativas, a medula óssea aumenta a produção eritrocitária e a liberação de eritrócitos imaturos. Em casos de anemias não regenerativas a medula óssea é incapaz de responder ao estado anêmico e as células jovens não são liberadas na circulação (THRALL & WEISER, 2006). Uma das formas de avaliar se a medula óssea está respondendo é pela contagem de reticulócitos. O reticulócito é um estágio de maturação das células eritróides que na coloração com corante supravital tem precipitações de RNA ribossomal, denominados retículos. Quando corados com corantes do tipo Romanowsky, devido a presença de hemoglobina, ribossomos e polirribossomos, os reticulócitos apresentam coloração vermelho azulada e são denominados policromatófilos (HARVEY, 2001).

Na medicina, a citometria de fluxo tem possibilitado monitorar as anemias por avaliações de subpopulações de reticulócitos e frações de

reticulócitos imaturos (JOÃO *et al*, 2008). Na medicina veterinária, a citometria de fluxo é utilizada na contagem de reticulócitos de cães em alguns estudos, mas esta não é a realidade brasileira (PEREIRA *et al*, 2008; HODGES & CHRISTOPHER, 2011; COLLICUTT *et al*, 2012). Na rotina dos laboratórios veterinários brasileiros, utiliza-se a contagem manual sob microscopia de luz, técnica que continua sendo o padrão ouro por não sofrer interferências pela presença de eritrócitos nucleados, hemoparasitas, corpúsculos de Howell Jolly e células leucêmicas (COWGILL *et al*, 2003; TVEDTEN, 2011).

A avaliação dos policromatófilos é utilizada pelos veterinários, entretanto, não existe uma padronização do método. A quantificação pode ser representada por cruzes (+), por campo, em porcentagem ou por análise subjetiva que classifica como ausente, leve, moderada ou intensa (HARVEY, 2001; FELDMAN & SINK, 2006; HODGES & CHRISTOPHER, 2011; COLLICUTT *et al*, 2012). Apesar de não haver uma padronização e consenso na literatura, a avaliação quanto à resposta da medula óssea no estado anêmico é realizada pelos clínicos pela observação de achados como policromatofilia, presença de metarrubrócitos, anisocitose e presença de corpúsculos Howell Jolly.

O presente trabalho objetivou estabelecer a associação entre o número de policromatófilos e de reticulócitos para a classificação das anemias quanto à resposta da medula óssea.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 1).

### 2.2.1 Seleção dos Animais

Foram utilizados 135 cães adultos que apresentavam anemia (hematócrito  $\leq 35\%$ ) e 21 cães adultos saudáveis. As amostras dos cães anêmicos foram provenientes do Serviço de Clínica Médica e Cirúrgica de

Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e foi proveniente de cães de raças variadas e ambos os sexos. O grupo de animais saudáveis foi composto por cães da raça Beagle provenientes do canil do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná. Para que estes fossem classificados como sadios, os mesmos foram submetidos a exame físico, avaliação do histórico e hemograma.

### 2.2.2 Coleta das amostras

A coleta de sangue dos animais sadios foi realizada em único dia no período da manhã. Já as coletas de sangue dos animais pertencentes ao grupo de cães anêmicos foram realizadas entre os dias 01/09/2011 e 25/06/2012. Todos os animais estavam em jejum mínimo de 8 horas.

### 2.2.3 Análise Laboratorial

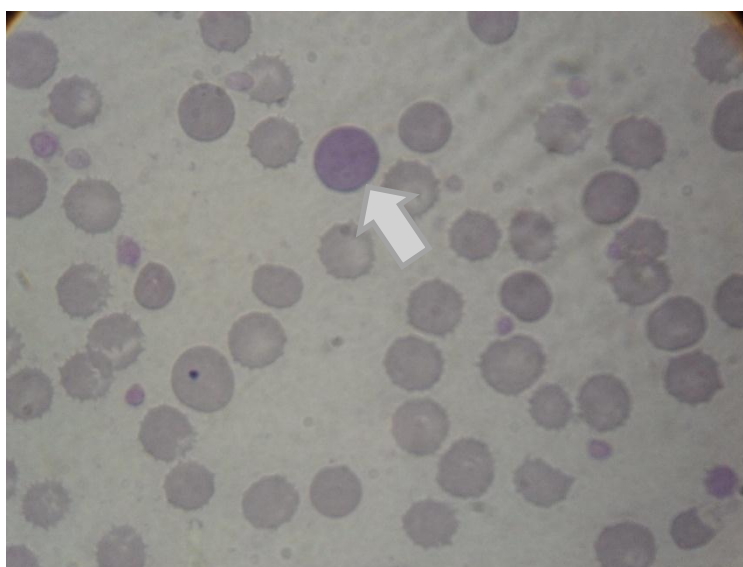
As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As coletas sanguíneas foram realizadas nos animais submetidos à contenção física e as amostras acondicionadas em tubos com EDTA, sendo que a contagem de reticulócitos e realização do hemograma foram realizadas em no máximo 6 horas após a coleta.

#### 2.2.2.1 Hemograma

As contagens de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e concentração de hemoglobina foram realizadas em contador automático de células sanguíneas da marca Mindray® modelo BC 2800 VET. O volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina média (CHGM) foram obtidos pelas fórmulas de Wintrobe (THRALL & WEISSER, 2006). As extensões sanguíneas foram realizadas imediatamente após a coleta sanguínea e coradas com panótico

rápido. Nas extensões sanguíneas coradas foi realizada contagem diferencial de leucócitos, avaliação da morfologia de eritrócitos e leucócitos e estimativa de número de policromatófilos. Para a estimativa de eritrócitos policromatófilos, foi realizada a contagem em objetiva de imersão do número médio de policromatófilos por campo, através da contagem em 10 campos homogêneos na franja de cada esfregaço sanguíneo (Figura 4).

FIGURA 4 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE CÃO CORADA COM PANÓTICO RÁPIDO A SETA INDICA A PRESENÇA DE UM POLICROMATÓFILO.

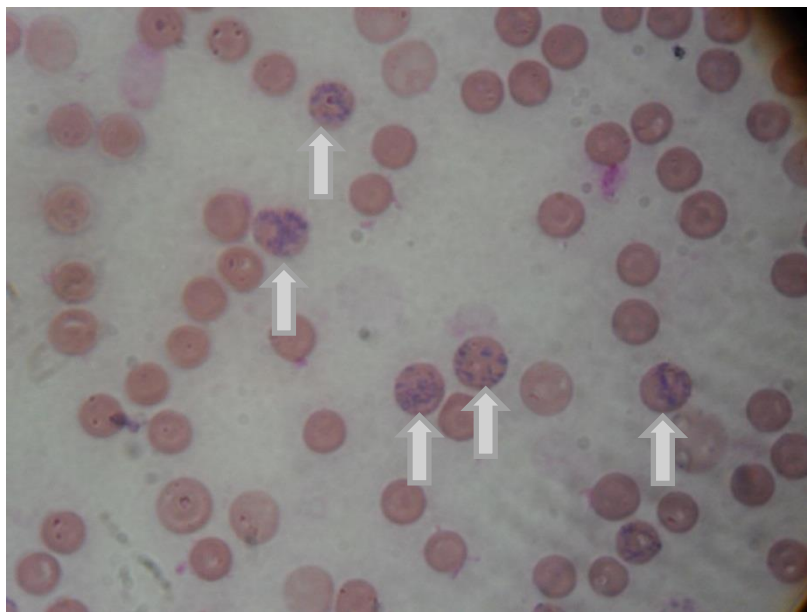


#### 2.2.2.2 Contagem de reticulócitos

As contagens de reticulócitos foram realizadas por técnica manual em microscopia ótica. Volumes iguais (150  $\mu$ L) de sangue total e azul de cresil brilhante foram homogeneizados em tubo de ensaio e mantidos em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Após este período, foram confeccionadas duas extensões sanguíneas. Depois de secas, as lâminas foram contra coradas com corante de Wright para facilitar a visualização dos retículos (Figura 2). A determinação do percentual de reticulócitos foi realizada por contagem de 1.000 eritrócitos consecutivos. Somente reticulócitos agregados foram considerados na contagem (TVEDTEN & MORITZ, 2010). A contagem absoluta de reticulócitos foi obtida por multiplicação do percentual de

reticulócitos pela contagem de eritrócitos, para correção do aumento relativo de reticulócitos nos cães anêmicos.

FIGURA 5 – EXTENSÃO SANGUÍNEA DE CÃO CORADA COM AZUL DE CRESIL BRILHANTE E CONTRA CORADA COM CORANTE DE WRIGHT. AS FLECHAS INDICAM OS RETICULÓCITOS.



#### 2.2.2.3 Classificação das anemias e análise estatística

As anemias foram classificadas como não regenerativas ( $< 70.000$  reticulócitos/ $\mu\text{L}$ ), pouco regenerativas (entre  $70.000$  e  $150.000$  reticulócitos/ $\mu\text{L}$ ), moderadamente regenerativas (entre  $150.000$  e  $300.000$  reticulócitos/ $\mu\text{L}$ ) e muito regenerativas ( $> 300.000$  reticulócitos/ $\mu\text{L}$ ) (COWGILL *et al*, 2003; RIZZI *et al*, 2010; TVDTEN, 2010). Para o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia da avaliação da resposta da medula óssea pela policromatofilia, anemias com mais de dois policromatófilos por campo foram classificadas como regenerativas (OIE, 2000; HARVEY, 2001; BARBOSA, 2011).

Os valores de policromatófilos por campo e a contagem absoluta de reticulócitos foram comparados por análise estatística no programa Graph.Prism. A análise de regressão linear e teste de Correlação de Pearson foram realizados para determinar se há correlação entre os dois métodos.

## 2.3 RESULTADOS

As anemias não regenerativas foram constatadas em 68% (92/135) dos cães e as regenerativas em 32% (43/135). Das anemias regenerativas, 60,5% (26/43) eram pouco regenerativas, 32,5% (14/43) eram moderadamente regenerativas e 7% (3/43) eram muito regenerativas. No grupo controle (21 cães saudáveis) a média foi de 13.413 reticulócitos/  $\mu\text{L}$  e de 0 a raros (<1) policromatófilos por campo.

Os valores da sensibilidade, especificidade e acurácia do método de avaliação pela policromatofilia foram, respectivamente, de 86,11%, 87,5% e 87,12%.

Na tabela 1 estão apresentados os valores de policromatófilos e reticulócitos obtidos no presente estudo. As anemias foram classificadas como não regenerativa, pouco regenerativa, moderadamente regenerativa e muito regenerativa de acordo com a literatura (COWGILL *et al*, 2003; RIZZI *et al*, 2010; TVDTEN, 2010).

TABELA 1 - ASSOCIAÇÃO ENTRE VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DE POLICROMATÓFILOS E RETICULÓCITOS EM CÃES APRESENTANDO DIFERENTES RESPOSTAS DA MEDULA ÓSSEA

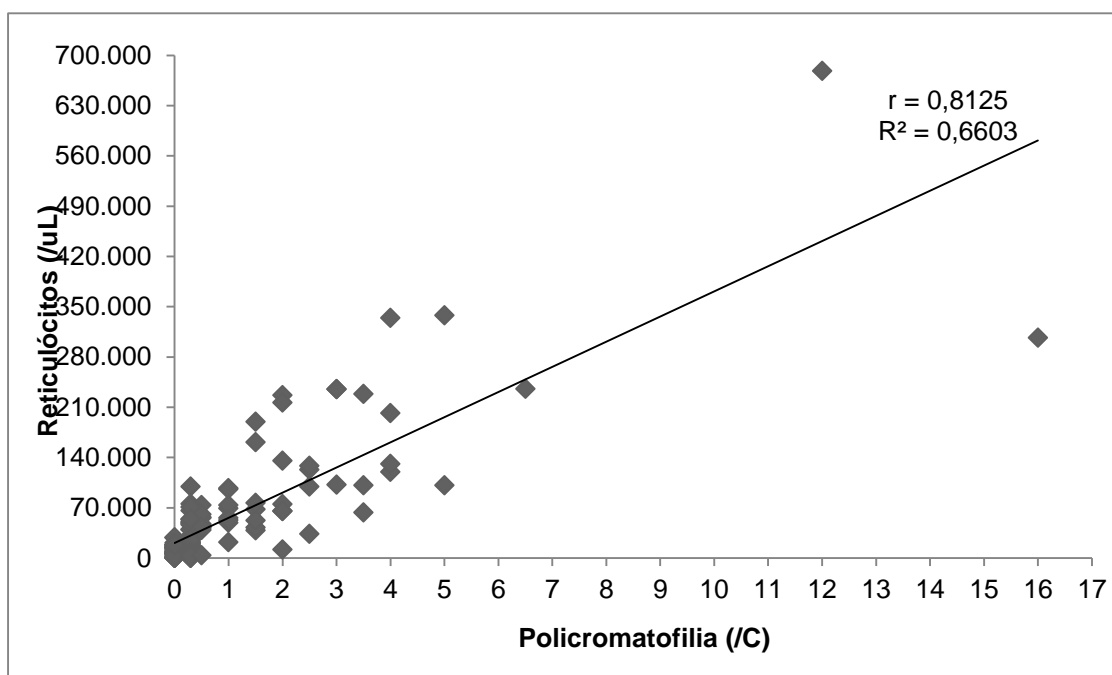
	<b>Não Regenerativa</b>	<b>Pouco regenerativa</b>	<b>Moderadamente Regenerativa</b>	<b>Muito Regenerativa</b>
<b>Policromatófilos (/C)</b>	0 a 1	0,5 a 3,0	1,5 a 4,5	3,5 a 15
<b>Reticulócitos (/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	5.447 a 46.842	77.902 a 119.990	188.735 a 240.049	237.914 a 590.771

\*Classificação da anemia: (COWGILL *et al*, 2003; RIZZI *et al*, 2010; TVDTEN, 2010)

O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e o coeficiente de determinação da equação ( $R^2$ ) entre o número de policromatófilos por campo e

a contagem absoluta de reticulócitos foram respectivamente de 0,8125 e 0,6603 (Figura 6).

FIGURA 6 – REGRESSÃO LINEAR SIMPLES ENTRE NÚMERO DE RETICULÓCITOS ( $\mu\text{L}$ ) E POLICROMATÓFILOS POR CAMPO (OBJETIVA DE 100X) EM CÃES ANÊMICOS.



$R^2$ = coeficiente de determinação da equação;  $r$ = coeficiente de correlação de Pearson

## 2.4 DISCUSSÃO

A associação entre policromatofilia e número de reticulócitos foi significativa considerando-se o coeficiente de correlação de Pearson de 0,8125. Os dois métodos não apresentaram uma linearidade perfeita e não é possível associar com exatidão o número de reticulócitos pelo número de policromatófilos por campo ( $R^2$  de 0,6603). No grupo de cães com anemia pouco regenerativa, o intervalo da policromatofilia variou de 0,5 (raros) a 3 por campo. Nos animais com anemia moderadamente regenerativa o valor mínimo encontrado foi de 1,5 policromatófilos por campo. Ou seja, se o único parâmetro utilizado for o número de policromatófilos, a resposta da medula

óssea será avaliada de maneira equivocada, pois 1,5 policromatófilos por campo pode tanto representar uma anemia pouco regenerativa como moderadamente regenerativa. Esta falta de linearidade ocorre provavelmente porque alguns reticulócitos não têm coloração policromatófílica devido à variação da quantidade dos retículos (THRALL, 2007).

Na medicina veterinária não há uma classificação dos graus de maturação do reticulócito e uma padronização dos graus de maturação para considerar como um reticulócito (RILEY *et al*, 2001). Em cães anêmicos existem poucos eritrócitos maduros na circulação causando um aumento relativo na quantidade de reticulócitos e conseqüentemente na quantidade de policromatófilos. Para anular este aumento relativo, COLLICUTT *et al* (2012) realizaram estudo retrospectivo em 30 cães saudáveis e 60 cães anêmicos, comparando o número absoluto de reticulócitos e de policromatófilos. Obtiveram uma correlação de Pearson de 0,98, superior a encontrada no presente estudo ( $r = 0,8125$ ). Entretanto, a contagem absoluta de policromatófilos exige tanto tempo e conhecimento quanto a contagem absoluta de reticulócitos e não é um método utilizado rotineiramente por exigir prática do executor.

A sensibilidade do método de policromatofilia por campo foi de 86,11%, especificidade de 87,5% e acurácia de 87,12%. Ou seja, o método de avaliação pela policromatofilia pode diagnosticar a ausência de regeneração em cães com anemia não regenerativa e a presença de regeneração em cães com anemia regenerativa. HODGES & CHRISTOPHER (2011) verificaram a acurácia do uso da policromatofilia para identificar anemias regenerativas em cães, obtendo valores de 89% de sensibilidade, 71% de especificidade e 77% de acurácia. A diferença entre valores da acurácia pode ser devido a diferenças de metodologia e no número de amostras analisadas, pois estes autores realizaram a contagem de reticulócitos utilizando citometria de fluxo, método que pode sofrer mais interferências do que a contagem manual sob microscopia de luz (COWGILL *et al*, 2003).



## 2.5 CONCLUSÃO

A contagem de policromatófilos é uma ferramenta diagnóstica de grande acurácia para diferenciar anemias não regenerativas de regenerativas utilizando o valor de dois policromatófilos por campo como ponto de corte. Porém, não é possível associar o número de reticulócitos e classificar a anemia quanto a intensidade de regeneração utilizando este método.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA, F.T. **Como escrever artigos científicos na área da saúde?** Maceió: UFAL, 2011.

COLLICUTT, N.B.; NEEL, J.A.; GRINDEM, C.D. **Comparison of manual polychromatophilic cell and automated reticulocyte quantification in evaluating regenerative response in anemic dogs.** *Veterinary Clinical Pathology* 41/2. P. 256 – 260. 2012.

COWGILL, E.S.; NEEL, J.A.; GRINDEM, C.D. **Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats.** *The Veterinary Clinics – Small Animal Practice.* v. 33. p. 1223 – 1244. 2003.

FELDMAN, B.F. & SINK, C.A. Eritrócitos. In:\_\_\_\_\_ **Urinalise e Hematologia.** São Paulo: Roca, 2006. p.75 – 96.

HARVEY, J.W. Examination of blood samples. In:\_\_\_\_\_ **Atlas of Veterinary Hematology.** Philadelphia: Saunders Company, 2001. p.03 – 20.

HODGES J. & CHRISTOPHER, M.M. **Diagnostic accuracy of using erythrocyte índices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs.** *J Am Vet Med Assoc* v. 11. p.1452 – 1458. 2011.

JOÃO, A.R.; PINTO, S.; COSTA, E. **Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* v. 30. p. 188 – 192. 2008.

MEYER, D.J. & HARVEY, J.W. Evaluation of Erithrocytic Disorders. In: \_\_\_\_\_ **Veterinary Laboratory Medicine – Interpretation and Diagnosis.** 3<sup>rd</sup> ed. Missouri: Saunders, 2004. p. 47 – 81.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Principles of Validation of Diagnostic Assays foe Infectious Diseases.** *Manual of Standards,* cap .3, 2000.

PEREIRA, P.M.; SEKI, M.C.; PALMA, P.V.B. *et al.* **Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos por citometria de fluxo.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 59, n.1. p. 66 – 70. 2008.

PIRES, L.S.A. **Determinação dos parâmetros do ferro em cães sadios e anêmicos.** 2009. 102f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

RILEY, R.S.; BEN-EZRA, J.M.; GOEL, R. *et al.* **Reticulocytes and reticulocyte enumeration.** Journal of Clinical Laboratory Analysis. v.15, p. 267 – 294. 2001.

RIZZI, T.E.; MEINKOTH, J.H; CLINKENBEARD, K.D. Normal Hematology of the Dog. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 799 – 810.

THRALL, M.A. & WEISER, M.G. Hematologia. In: HENDRIX, C.M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários.** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2006. p.31 – 78.

THRALL, M.A. Morfologia das Hemácias. In: THRALL, M.A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Roca, 2007. p.65 – 77.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 152 – 161.

TVEDTEN, H & MORITZ, A. Reticulocyte and Heinz Body Staining and Enumeration. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 1067 – 1073.

TVEDTEN, H. **What is your diagnosis? Discrepancy between Sysmex XT-2000iV reticulocyte count and polychromasia.** Veterinary Clinical Pathology 40/2. p 275-276. 2011.

### **3 RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA E O METABOLISMO DE FERRO EM CÃES COM ANEMIAS DE DIFERENTES ETIOLOGIAS**

#### **RESUMO**

A anemia é descrita em cães com diferentes doenças e possui impacto negativo na qualidade de vida e na resposta do paciente ao tratamento. A avaliação da resposta da medula óssea e do metabolismo do ferro é de fundamental importância para o diagnóstico e prognóstico. O objetivo do presente trabalho foi estudar a resposta da medula óssea, concentração sérica do ferro e da capacidade total de ligação do ferro em cães anêmicos apresentando diferentes enfermidades. Foram realizados hemogramas, contagem de reticulócitos e determinação da concentração sérica de ferro e da TIBC de 141 amostras de sangue de cães anêmicos e de 30 amostras de cães saudáveis. A concentração média do ferro sérico e da TIBC em cães saudáveis foi de 196,4 µg/dl e 460,7 µg/dl, respectivamente. Dos cães anêmicos, 71,63% apresentavam anemia não regenerativa, 71,63% apresentaram hipoferremia e 62,86% dos cães apresentaram TIBC baixa. As anemias ocorrem em maior prevalência em cães com doença crônica e as alterações no metabolismo do ferro estão presentes nas anemias causadas por diferentes etiologias.

Palavras chave: anemia, capacidade total de ligação do ferro, ferro sérico, resposta da medula óssea.

## ABSTRACT

Anemia is described in dogs with different diseases and has negative impact on life quality and treatment response. The evaluation of the bone marrow response and iron metabolism has fundamental importance for the diagnosis and prognosis. The objective of this work was to study the bone marrow response and the concentration of serum iron and iron binding capacity in anemic dogs presenting different diseases. CBC, reticulocyte count and determination of serum iron and TIBC concentrations of 141 blood samples from anemic dogs and 30 samples from healthy dogs were performed. The average concentration of serum iron and TIBC in healthy dogs was 196.4 µg/dl and 460.7 µg/dl, respectively. From the anemic dogs, 71.63% had non-regenerative anemia, 71.63% presented hypoferremia and 62.86% dogs showed low TIBC. Anemia occurs in higher prevalence in dogs with chronic illness and the changes in iron metabolism are present in anemia caused by different etiologies.

Key words: anemia, total iron binding capacity, serum iron, bone marrow response.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A anemia tem sinais clínicos conhecidos e não variam muito entre os indivíduos, porém, a fisiopatologia que desencadeia esta alteração hematológica pode ser bastante distinta de acordo com a doença primária (TVEDTEN, 2010). Neoplasias e insuficiência renal crônica são exemplos de doenças que podem levar ao quadro anêmico, e a anemia influencia na resposta do paciente ao tratamento e no seu período de sobrevivência (BARTH & HIRSCHMANN, 2010). Miller *et al* (2009) e Cápua *et al* (2011) relataram que cães com linfoma e anemia possuem menor tempo de sobrevivência quando comparados aos cães com linfoma não anêmicos. Em humanos há uma correlação negativa entre a concentração sérica de creatinina e o valor do hematócrito (KAZMI *et al*, 2001). Ou seja, quanto maior a concentração de creatinina sérica mais severa é a anemia e consequentemente menor é a qualidade de vida do paciente. Além de alguns tipos de neoplasia e da insuficiência renal crônica, a anemia é relativamente comum na diabetes mellitus, hipoadrenocorticismo, hipotireoidismo, inflamações crônicas e doenças hemolíticas e hemorrágicas (CANÇADO & CHIATTONE, 2002; GRECO, 2007; SCOTT-MONCRIEFF, 2007; FRY, 2010).

A avaliação da resposta da medula óssea e do metabolismo do ferro é imprescindível para auxiliar no correto diagnóstico e tratamento do paciente anêmico (COWGILL *et al*, 2003; GRIMES, GIORI & FRY, 2012). Segundo Fry (2010), na literatura clínica veterinária existem muitos relatos de anemia em animais com doenças crônicas mas que são tratados como sendo ocorrência comum nestes pacientes. Porém, com a descoberta do hormônio hepcidina no início do século XXI, muitas questões relacionadas ao metabolismo do ferro e sua relação com doenças crônicas foram esclarecidas e novos horizontes abertos para pesquisas (MEANS, 2004; FRANCHINI *et al*, 2010). A expressão gênica da hepcidina canina foi determinada e poderá ser empregada em diversos estudos futuros que irão auxiliar no diagnóstico e aperfeiçoar o tratamento de pacientes anêmicos (FRY *et al*, 2004).

O estudo do metabolismo do ferro em pacientes anêmicos já está bem avançado na medicina e muitas descobertas podem ser aplicadas na medicina veterinária. Porém, estudos envolvendo a resposta da medula óssea e o metabolismo do ferro em cães anêmicos são escassos, limitando os avanços no diagnóstico, tratamento e na melhora na qualidade de vida destes pacientes.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a resposta da medula óssea, concentração sérica do ferro e da capacidade total de ligação do ferro em cães anêmicos e correlacionar com as causas e diferentes enfermidades.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA-SCA) da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 1).

#### 3.2.1 Seleção dos Animais e coleta das amostras

Foram analisadas 171 amostras de sangue de cães subdivididos em dois grupos: o grupo I composto por cães sadios ( $n=30$ ) e grupo II composto por animais anêmicos ( $n=141$ ). O grupo I foi formado por cães da raça Beagle, pertencentes ao canil do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná. Os critérios de inclusão foram apresentar hematócrito  $>37\%$  e estar sadio. Anamnese, exame físico e exames laboratoriais (hemograma, perfil renal, hepático e proteinograma) foram realizados para avaliar o estado de saúde e certificar a higidez. O grupo II foi composto por cães atendidos pelo Serviço de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Os critérios de inclusão para este grupo foram a idade (acima de um ano) e o hematócrito ( $\leq 35\%$ ). Não houve separação nem predileção por raça ou sexo.

O grupo II foi subdividido de acordo com a enfermidade apresentada pelo paciente em: subgrupo inflamatório, oncológico, endócrino, insuficiência renal crônica, hemorrágica, multifatorial e de causa não determinada. Para

realizar a subdivisão foram analisadas as fichas clínicas dos pacientes. Os dados referentes ao histórico, exame físico, exames de imagem (ultrassom e/ou radiografia), sorológicos e laboratoriais foram utilizados para a subdivisão.

A coleta de sangue dos animais sadios foi realizada em um dia e os cães permaneceram em jejum de oito horas. As amostras dos indivíduos anêmicos foram coletadas entre o período de 01 de julho de 2011 a 18 de outubro de 2012.

Imediatamente após a coleta de sangue foram realizadas as extensões sanguíneas. O sangue foi acondicionado em dois tubos, um com anticoagulante etilenodiaminotetracetato de sódio 10% (EDTA) para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos e outro sem anticoagulante para a realização de exames bioquímicos.

### 3.2.2 Análises Laboratoriais

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.2.2.1 Hemograma

As amostras foram analisadas no contador automático da marca Mindray modelo BC-2800 VET, que determinou a contagem total de plaquetas, eritrócitos e leucócitos e a concentração de hemoglobina. Os esfregaços sanguíneos foram corados com Panótico Rápido. A contagem diferencial de leucócitos e a avaliação morfológica das células foram realizadas utilizando microscopia ótica. Pela técnica do microhematócrito foi determinado o hematócrito (Ht) e pela refratometria a proteína plasmática total (PPT).

Com os valores obtidos, foi realizado cálculo dos índices hematimétricos: volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Os cálculos foram realizados utilizando as fórmulas de Wintrobe (THRALL & WEISSER, 2006).



### 3.2.2.2 Contagem de reticulócitos

As contagens de reticulócitos foram realizadas por técnica manual em microscopia ótica. Volumes iguais (150  $\mu$ L) de sangue total e azul de cresil brilhante foram homogeneizados em tubo de ensaio e mantidos em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Após este período, foram confeccionadas duas extensões sanguíneas. Depois de secas, as lâminas foram contra coradas com corante de Wright para facilitar a visualização dos retículos (Figura 2). A determinação do percentual de reticulócitos foi realizada por contagem de 1.000 eritrócitos consecutivos. Somente reticulócitos agregados foram considerados na contagem (TVEDTEN & MORITZ, 2010). A contagem absoluta de reticulócitos foi obtida por multiplicação do percentual de reticulócitos pela contagem de eritrócitos, para correção do aumento relativo de reticulócitos nos cães anêmicos.

As anemias foram classificadas como não regenerativas (< 70.000 reticulócitos/ $\mu$ L), pouco regenerativas (entre 70.000 e 150.000 reticulócitos/ $\mu$ L), moderadamente regenerativas (entre 150.000 e 300.000 reticulócitos/ $\mu$ L) e muito regenerativas (> 300.000 reticulócitos/ $\mu$ L) (COWGILL, 2003; RIZZI et al., 2010; TVDTEEN, 2010)

### 3.2.2.3 Análises bioquímicas

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 minutos à 5000 rpm e o soro separado para análises bioquímicas. Os exames foram feitos no aparelho bioquímico automático da marca Mindray modelo BS-200. Foram realizados os seguintes testes bioquímicos: a) ALT (alanina aminotransferase) pelo método cinético UV; b) FA (fosfatase alcalina) pelo método cinético colorimétrico; c) creatinina, pelo método cinético do Picrato Alcalino; d) Uréia, pelo método liqui UV; d) Proteína Total pelo método de Biureto e e) Albumina, método de verde de Bromocresol.

#### 3.2.2.4 Ferro sérico

No soro foi realizada a determinação da concentração de ferro sérico, no aparelho bioquímico automático da marca Mindray modelo BS-200. O método utilizado foi o colorimétrico utilizando Ferene.

O Ferro ligado a Transferrina em meio ácido se libera na forma de Ferro Férrico e é reduzido para Ferro Ferroso na presença de Ácido Ascórbico. Ferro Ferroso forma um complexo azul com Ferene sendo que a absorbância a 595 nm é diretamente proporcional à concentração de Ferro.

#### 3.2.2.5 Capacidade Latente de Ligação do Ferro (UIBC)

A Capacidade Latente de Ligação do Ferro foi determinada no soro pelo método fotométrico usando Ferene. Uma concentração conhecida de íons Ferroso é incubada com o soro e irão se ligar especificamente com a Transferrina nos sítios de ligação do ferro insaturado. Os íons ferrosos não ligados são medidos pela reação com Ferene. A diferença entre a quantidade de ferro excedente e a quantidade total adicionada ao soro é equivalente à quantidade ligada a Transferrina. Essa será a UIBC (Unsaturated Iron Binding Capacity) da amostra.

#### 3.2.2.6 Capacidade Total de Ligação do Ferro (TIBC)

A Capacidade Total de Ligação do Ferro ou TIBC (Total Iron Binding Capacity) é dada pela soma do Ferro Sérico com a Capacidade Latente de Ligação do Ferro. Ela representa a quantidade total de transferrina (apotransferrina, monotransferrina e transferrina diférica) presente do plasma pois uma quantidade insignificante de ferro está ligada a outras proteínas.

### 3.2.3 Exames de imagem

Todos os pacientes oncológicos foram submetidos a exames de imagem para a realização do estadiamento da doença. Estes exames foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. As radiografias foram feitas no aparelho da marca Neo - diagnomax e os exames ultrassonográficos no aparelho Ultrasonix modelo EIZO – FLEXCAN L568.

### 3.3 RESULTADOS

Os valores obtidos para o ferro sérico e da Capacidade Total da Ligação do Ferro (TIBC) dos animais do grupo I (controle) foram utilizados como referência no presente estudo. Os valores mínimos, máximos e médias do ferro sérico e da TIBC em cães adultos saudáveis estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - VALORES MÍNIMOS, MÁXIMOS E MÉDIOS DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FERRO DE CÃES SAUDÁVEIS.

	<b>Ferro (µg/dl)</b>	<b>TIBC (µg/dl)</b>
<b>Média</b>	196,4	460,7
<b>Mínimo</b>	155,7	373,3
<b>Máximo</b>	237,2	548

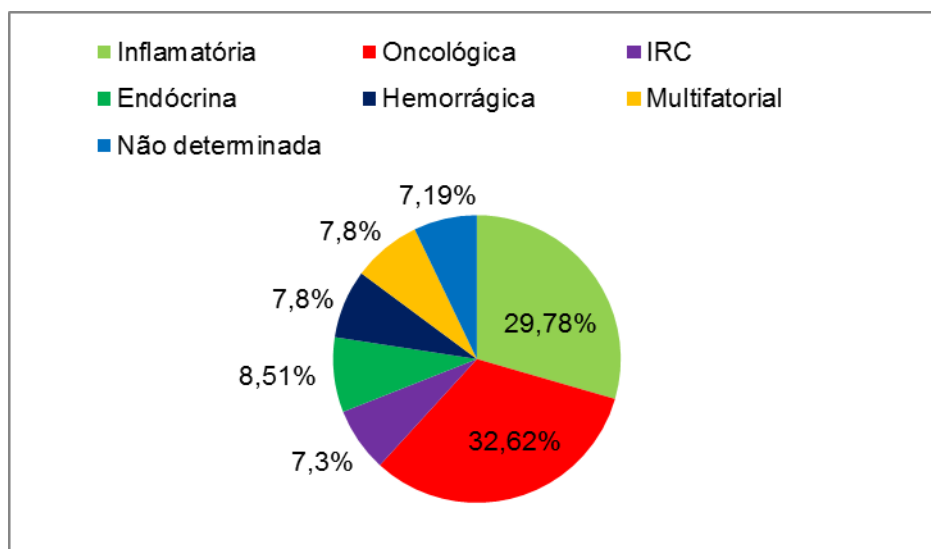
TIBC= Capacidade Total de Ligação do Ferro

O subgrupo de cães com doença inflamatória foi composto por pacientes que apresentavam processo inflamatório de origem variada como, por exemplo: abscessos, piometra, leishmaniose, hepatite crônica e rangeliose. No subgrupo de pacientes oncológicos, houve predomínio de neoplasia mamária representando 34,37% dos pacientes estudados (14/42) e a totalidade já se encontrava em estágio avançado (com ulcerações e/ou metástase pulmonar). A diabetes mellitus foi a alteração endócrina mais observada (8/12) sendo seguida pelo hipotireoidismo (1/12) e hipoadrencorticismismo (3/12).

Por questões financeiras ou pessoais do proprietário, em nove pacientes do grupo II o diagnóstico não foi estabelecido devido a falta de exames complementares. Estes animais foram identificados no subgrupo de cães anêmicos sem diagnóstico. O subgrupo de cães com doenças concomitantes e que a causa da anemia foi provavelmente multifatorial era composto principalmente por cães idosos que muitas vezes apresentavam problemas dermatológicos crônicos associados com alterações endócrinas, renais ou neoplásicas, por exemplo.

Segue abaixo gráfico apresentando subdivisão do grupo II de acordo com a enfermidade apresentada:

FIGURA 7 – SUBDIVISÃO DO GRUPO II DE ACORDO COM A ENFERMIDADE



IRC: Insuficiência renal crônica

Quanto à resposta da medula óssea, das 141 amostras avaliadas, 101 apresentavam anemia não regenerativa (71,63%), 22 com anemia pouco regenerativa (15,60%), 15 com anemia moderadamente regenerativa (10,63%) e três com anemia muito regenerativa (2,14%). Nos cães anêmicos a concentração sérica de ferro foi baixa em 71,63% (101/141), alta em 10,64% (15/141) e normal em 17,73% (25/141) dos cães anêmicos. De maneira semelhante, a concentração de TIBC foi baixa em 62,86% (88/141), alta em 4,29% (6/141) e normal em 32,85% (46/141) das amostras.

Os valores séricos do ferro e da Capacidade Total de Ligação do Ferro e a avaliação da resposta da medula óssea estão na Tabela 3.

TABELA 3 - RESPOSTA DA MEDULA ÓSSEA, NÍVEIS DE FERRO E DA CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO NAS ANEMIAS DE CÃES COM DIFERENTES ENFERMIDADES

Subgrupo	Resposta da medula óssea		[Ferro]		[TIBC]	
Inflamatória	Não regenerativas	71,42%	Baixa	79,19%	Baixa	70,73%
	Regenerativas	28,58%	Alta	16,67%	Alta	2,45%
			Normal	7,14%	Normal	26,82%
Oncológica	Não regenerativas	69,56%	Baixa	84,78%	Baixa	69,56%
	Regenerativas	30,44%	Alta	2,18%	Alta	2,18%
			Normal	13,04%	Normal	28,56%
Hemorrágica	Não regenerativas	63,63%	Baixa	45,46%	Baixa	45,45%
	Regenerativas	36,37%	Alta	27,27%	Alta	9,10%
			Normal	27,27%	Normal	45,45%
Endócrina	Não regenerativas	41,66%	Baixa	58,33%	Baixa	42,00%
	Regenerativas	58,34%	Alta	25,01%	Alta	0,00%
			Normal	16,66%	Normal	58,00%
Multifatorial	Não regenerativas	90,90%	Baixa	81,82%	Baixa	90,90%
	Regenerativas	9,10%	Alta	18,18%	Alta	9,10%
			Normal	0,00%	Normal	0,00%
IRC	Não regenerativas	100,00%	Baixa	30,00%	Baixa	30,00%
	Regenerativas	0,00%	Alta	30,00%	Alta	20,00%
			Normal	40,00%	Normal	50,00%
Sem diagnóstico	Não regenerativas	77,77%	Baixa	66,66%	Baixa	44,44%
	Regenerativas	22,23%	Alta	0,00%	Alta	0,00%
			Normal	33,34%	Normal	55,56%

IRC= Insuficiência renal crônica; TIBC= Capacidade Total de Ligação do Ferro

### 3.4 DISCUSSÃO

Os níveis séricos de ferro e da capacidade total de ligação do ferro de cães saudáveis foram superiores aos descritos por Pires *et al* (2011) e por Weeks *et al* (1989). Em ambos os estudos foi utilizado método colorimétrico com diluição e leitura manual das amostras, o que pode gerar erro no momento da diluição ou leitura. No presente estudo foi utilizado método automático de diluição e leitura o que proporciona maior acurácia. A determinação dos valores de referência a serem adotados no estudo é de extrema importância porque as diferenças na metodologia afetam os resultados (MEYER & HARVEY, 2004).

No presente trabalho, houve predomínio de anemias não regenerativas, provavelmente devido as causas serem mais numerosas que as de anemias

regenerativas (THRALL & WEISER, 2006; THRALL, 2007). Analisando o gráfico apresentado na Figura 7, observamos que 62,4% das amostras analisadas pertencem a animais que apresentam inflamação ou neoplasia. Ou seja, a anemia de doença crônica foi a mais prevalente no grupo estudado. Em humanos, a anemia de doença crônica é a segunda principal causa de anemia em pacientes hospitalizados, principalmente idosos e crianças (ABSHIRE, 1996; CANÇADO & CHIATTONE, 2002; BARTH & HIRSCHMANN, 2010).

Por ser um achado frequente em alguns tipos de neoplasias, a anemia é considerada uma síndrome paraneoplásica. Na medicina é bem relatada porém, na medicina veterinária, pouco estudada (BERGMAN, 2007; GROTTTO, 2008; CHILDRESS, 2012). Das amostras do subgrupo oncológico avaliado, a grande maioria (69,56%) apresentou anemia hipoproliferativa o que corrobora a teoria de que uma das causas da anemia do paciente oncológico é a superprodução de citocinas inflamatórias que afetam o metabolismo do ferro e consequentemente limitam a eritropoese (GROTTTO, 2008). Verificou-se no presente estudo que 84,78% dos cães do subgrupo com neoplasia apresentava hipoferremia. Ou seja, a fisiopatologia da anemia no paciente oncológico é semelhante a do paciente que apresenta um quadro inflamatório e o hormônio hepcidina possui papel central (CANÇADO & CHIATTONE, 2002). A concentração sérica de ferro foi normal em 13,04% e aumentada em 2,18% dos cães pertencentes a este subgrupo. Esta variação ocorre porque além das alterações de origem inflamatória, o paciente oncológico também pode desenvolver anemia devido à infiltração de células neoplásicas na medula óssea, hemólise intravascular, hemorragias e devido ao tratamento quimioterápico (GROTTTO, 2008; PRIHIRUNKIT *et al*, 2010). Estas outras etiologias podem justificar a presença de pacientes oncológicos com anemia regenerativa, como aconteceu com 30,44% dos cães deste subgrupo.

Verificou-se correlação entre a presença da anemia com o estado avançado do câncer, pois 54,34% (25/46) dos cães pertencentes a este grupo apresentavam metástases e/ou ulceração do tumor. Cápua *et al* (2011) realizaram estudo com 18 cães com linfoma (multicêntrico e cutâneo) e relataram uma correlação positiva entre o valor do hematócrito e o tempo de sobrevivência para os cães. Miller *et al* (2009) associaram a anemia com o período

de sobrevida em cães com linfoma e osteossarcoma. O estudo avaliou 84 cães com linfoma e 91 cães com osteossarcoma. Os cães com linfoma e anemia possuem um decréscimo no período de sobrevida enquanto que não foi observado efeito do estado anêmico no tempo de sobrevida de cães com osteossarcoma. Em nenhum dos dois estudos foi avaliado o metabolismo do ferro e como a neoplasia poderia alterá-lo.

Com prevalência semelhante à dos pacientes oncológicos, 71,42% das amostras analisadas de cães com quadro inflamatório apresentavam anemia não regenerativa e 76,19% hipoferremia. Como descrito anteriormente, este achado é resultado da interferência das citocinas inflamatórias no metabolismo do ferro. Ao estimular a produção de hepcidina pelo fígado, as citocinas levam à hipoferremia e conseqüentemente à anemia (GANZ & NEMETH, 2006; GROTTTO, 2008 a; FRY, 2010). Além disso, pacientes com inflamação podem apresentar diminuição da sobrevida da hemácia e falha da medula óssea em aumentar a produção de glóbulos vermelhos para compensar o aumento da sua demanda, justificando a presença de cães com níveis séricos de ferro normal ou elevado e com anemia regenerativa (WEISS & Mc CLAY, 1988; CANÇADO & CHIATTONE, 2002). Na Medicina Veterinária, existem poucos estudos avaliando o metabolismo do ferro e a resposta da medula óssea em cães apresentando processos inflamatórios e como essas alterações podem influenciar na qualidade de vida e no prognóstico do paciente. Marchetti *et al* (2010) avaliaram cães com enteropatia crônica e observaram anemia em 18% dos pacientes, hipoferremia em 4,54% e baixa concentração de TIBC em 18% dos animais estudados.

No subgrupo de animais com doença renal crônica, observamos que 100% dos animais apresentaram anemia não regenerativa. Chandler *et al* (2007) estudaram 37 cães da raça boxer com insuficiência renal crônica e observaram anemia em 44% dos casos, mas não avaliaram a resposta da medula óssea e o metabolismo do ferro. Em gatos a prevalência da anemia em insuficientes renais crônicos é de 30 a 65% mas também não existem relatos quanto ao metabolismo do ferro (CHALHOUB *et al*, 2011). A ausência da resposta da medula óssea é justificada principalmente pela produção insuficiente do hormônio eritropoietina (GANZ & NEMETH, 2011). Desta forma,

doentes renais crônicos podem apresentar anemia mesmo com os níveis séricos do ferro normais, como ocorreu em 40% das amostras analisadas. A concentração sérica do ferro foi baixa em 30% das amostras e alta também em 30% das amostras dos cães doentes renais. Além da diminuição da produção de EPO, nefropatas tem sangramentos intestinais espontâneos, deficiências nutricionais, redução do período de vida dos eritrócitos, inflamação e efeito toxêmico causado pela uremia, alterações que podem levar a hipoferremia (FRY, 2010; POLZIN, 2011).

A maior parte dos pacientes do subgrupo de doenças endócrinas apresentou anemia regenerativa (58,34%). A resposta da medula óssea não seria esperada, pois a anemia presente em pacientes com diabetes mellitus, hipotireoidismo e hipoadrenocorticismos parece estar ligada à alterações nas concentrações de EPO e são classicamente não regenerativas (SCOTT-MONCRIEFF, 2007; FRY, 2010). Porém, existem relatos da marcante presença de corpúsculos de Heinz em cães e gatos apresentando cetoacidose diabética, o que pode indicar que nestes animais ocorre a diminuição do período de vida do eritrócito levando a uma anemia regenerativa (CALDIN *et al*, 2005). Cães com hipotireoidismo podem apresentar uma diminuição no período de vida dos eritrócitos e são relatados casos de sangramentos intestinais espontâneos em cães com hipoadrenocorticismos, o que também poderia levar à anemia regenerativa (GRECO, 2007; FRY, 2010; SCOTT-MONCRIEFF, 2012). A concentração sérica do ferro foi normal em 40% dos cães pertencentes a este subgrupo. Nestes casos, a diminuição nos níveis de EPO justificaria a presença de anemia. Foi observada hipoferremia em 58,33% dos cães com alterações endócrinas e hiperferremia em 25,01%. A hipoferremia pode estar associada a processos inflamatórios, diminuição do período de sobrevivência do eritrócito e deficiências nutricionais enquanto que a hiperferremia pode estar associada ao uso de glicocorticoides empregados no tratamento do hipoadrenocorticismos (Mc GILL & BELL, 2006; HARVEY, 2008).

Apesar de ser classicamente uma causa de anemia regenerativa, a maioria das amostras provenientes dos cães pertencentes ao grupo das anemias hemorrágicas não apresentou resposta da medula óssea (63,63%). Deve-se ressaltar que a medula óssea demora até cinco dias para responder à



perda de sangue (CHRISTIAN, 2010). Como 54,54% dos cães avaliados apresentavam hemorragia aguda (atropelamento e torção esplênica, por exemplo), não houve tempo para a regeneração. Pelo mesmo motivo, a hipoferremia que seria esperada em todos os casos, foi observada em 45,46% dos cães pertencentes a este subgrupo. Na hemorragia aguda, o ferro é repostado através da mobilização do ferro estocado na forma de ferritina (GANZ & NEMETH, 2006). Os animais com concentração sérica de ferro abaixo do limite inferior apresentavam quadro hemorrágico crônico apresentando verminose e melena. Gazyagsi & Macun (2011) observaram alteração semelhante em um cão apresentando gastrite crônica. Neste estudo, os autores diagnosticaram anemia microcítica hipocrômica, o que indica hipoferremia.

No grupo de animais em que não foi possível determinar o diagnóstico e no de animais com enfermidades concomitantes, houve predomínio de anemias hipoproliferativas (77,77% e 90,90%, respectivamente) e hipoferremia (66,66% e 81,82%, respectivamente). Por não ser possível atribuir a causa destes quadros anêmicos, a suplementação mineral pode não alterar a concentração sérica de ferro, pois processos inflamatórios levam ao aumento da concentração de hepcidina e conseqüentemente à hipoferremia mesmo com as reservas de ferro com concentrações normais (GANZ & NEMETH, 2006; GROTTTO, 2008a; GANZ & NEMETH, 2011).

Os grupos que apresentaram um percentual maior de amostras com TIBC diminuída foram os de animais apresentando múltiplas enfermidades, seguido por pacientes com doenças inflamatórias e pelo grupo de pacientes oncológicos (90,90%, 70,73% e 69,56% respectivamente). Estes três grupos foram os que apresentaram também a maior porcentagem de amostras com baixa concentração de ferro, o que pode indicar que nesses animais o efeito das citocinas inflamatórias sobre a produção de hepcidina foi o principal fator desencadeador da anemia, hipoferremia e baixa concentração de ferro (FRANCHINI *et al*, 2010; GRIMES; GIORI & FRY, 2012). Ao contrário da concentração sérica do ferro, a concentração de transferrina, representada pela TIBC, é afetada por um número menor de fatores. Estará aumentado em cães

com hepatopatia e diminuído ou no limite inferior em animais apresentando inflamação (HARVEY, 2008; WEISS, 2010; PIRES *et al*, 2011).

Em cães não existem estudos que determinam a cinética na alteração das concentrações séricas de ferro e TIBC o que impossibilita um maior entendimento sobre o assunto. Um estudo em ratos induzidos experimentalmente a uma resposta inflamatória demonstrou que após 12 horas do início do estímulo inflamatório a concentração de ferro baixou drasticamente, mas após 48-60 horas havia reestabelecido valores normais. O mesmo aconteceu com a concentração de TIBC que atingiu seus níveis mínimos após 24 horas do início do estímulo, mas retornou a concentrações normais em aproximadamente 72 horas (BEAUMIER *et al*, 1984). Se a mesma cinética acontecer em cães, os pacientes que apresentaram níveis normais de ferro e TIBC podem ter apresentado níveis mais baixos anteriormente.

### 3.5 CONCLUSÃO

Nos pacientes anêmicos as principais causas de anemia foram as doenças inflamatórias e neoplásicas. As alterações como anemia não regenerativa, hipoferremia e TIBC diminuída estão presentes em maior prevalência nos cães anêmicos com doença inflamatória, oncológica, multifatorial e insuficiência renal crônica.

## REFERÊNCIAS

ABSHIRE, T.C. The anemia of inflammation - A Common Cause of Childhood Anemia. **Pediatric Hematology**.vol 43, n 3, p. 623 – 637, 1996.

BARTH, D. & HIRSCHMANN, J.V. Anemia. In: Tkachuk, D.C. & HIRSCHMANN, J.V. **Wintrobe – Atlas Colorido de Hematologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2010. p. 1 - 47.

BEAUMIER, D.L.; CALDWELL, M.A.; HOLBEIN, B.E. Inflammation Triggers Hypoferremia and De Novo Synthesis of Serum Transferrin and Ceruloplasmin in Mice. **Infection and immunity**. p. 489-494, 1984.

BERGMAN, P.J. Paraneoplastic Syndromes. In: WITHROW, J & MACEWEN'S. **Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Saunders Elsevier, 2007. P 77 – 94.

CALDIN, M.; CARLI, E.; FURLANELLO, T. *et al.* A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v.34, n 3, p. 224 – 231, 2005.

CANÇADO, R.D. & CHIATTONE, C.S. Anemia de Donça Crônica. **Rev. bras. hematol.hemoter**. v 24, n 2, p. 127-136, 2002.

CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F.E.D.; CANESIN, A.P.M.N. *et al.* Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. **Ciência Rural**. v. 41 n 7, p. 1245 – 125, 2011.

CHALHOUB, S.; LANGSTON, C.; EATROFF, A. Anemia of renal disease - What it is, what to do and what's new. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v 13, p 629–640, 2011.

CHANDLER, M.L.; ELWOOD, C.; MURPHY, K.F. *et al.* Juvenile nephropathy in 37 boxer dogs. **Journal of Small Animal Practice** v 48, p. 690–694, 2007.

CHILDRESS, M.O. Hematologic Abnormalities in the Small Animal Cancer Patient. **Vet Clin Small Animal**. v 42, p.123–155, 2012.

CHRISTIAN, J.A. Erythrokinetics and Erythrocyte Destruction. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 136 - 143.

COWGILL, E.S.; NEEL, J.A.; GRINDEM, C.B. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. **The Veterinary Clinics – Small Animal Practice**. v, 33. p. 1223 – 1244, 2003.

FRANCHINI, M.; MONTAGNANA, M.; LIPPI, G. Hepcidin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. **Clinica Chimica Acta**. v. 411, p. 1565–1569, 2010.

FRY, M.M. Anemia of Inflammatory, Neoplastic, Renal, and Endocrine Diseases. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 246 – 250.

FRY, M.M.; LIGGETT, J.L.; BAEK, S.J. Molecular cloning and expression of canine hepcidin. **Veterinary Clinical Pathology**. v.33, p.223 – 227, 2004.

GANZ, T. & NEMETH, E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1763, p. 690 – 699, 2006.

GANZ, T. & NEMETH, E. Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism. **Annu. Rev. Med.** V 62, p 347 – 360, 2011.

GAZYAGSI, S. & MACUN, C. Microcytic Anemia Due to Gastric Ulcer in a Dog. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. V 10, n 3, p 365 – 366, 2011.

GRECO, D.S. Hypoadrenocorticism in Small Animals. **Clin Tech Small Anim Pract** v. 22, p. 32-35, 2007.

GRIMES, C.N.; GIORI, L.; FRY, M.M. Role of Hepcidin in Iron Metabolism and Potential Clinical Applications. **Vet Clin Small Anim**. v 42, p 85–96, 2012.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 30. p. 390 – 397. 2008 a.

GROTTO, H.Z.W. Anaemia of cancer: an overview of mechanisms involved in its pathogenesis. **Med Oncol**. v. 25, p. 12–21, 2008 b.

HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J. *et al.* **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders, 2008 b. p. 259 – 285.

KAZMI, W.H.; KAUSZ, A.T.; KHAN, S. *et al.* Anemia: An Early Complication of Chronic Renal Insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**. v 38, n 4 (October), p 803-812, 2001.

MARCHETTI, V.; LUBAS; G.; LOMBARDO, A. *et al.* Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy. **Veterinary Medicine International**. P. 1 – 5, 2010.

McGILL J., Bell, D. Anemia and the role of erythropoietin in diabetes. **J Diabetes Complicat**. v 20, p 262 – 272 , 2006.

MEANS JR, R.T. Hcpidin and anaemia. **Blood Reviews**. v 18, p 219–225, 2004.

MEYER, D.J. & HARVEY, J.W. Evaluation of Erythrocytic Disorders. In: \_\_\_\_\_ **Veterinary Laboratory Medicine – Interpretation and Diagnosis**. 3<sup>rd</sup> ed. Missouri: Saunders, 2004. p. 47 – 81.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S. *et al.* Anemia Is Associated with Decreased Survival Time in Dogs with Lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 116 – 122, 2009.

PIRES, L.S.A.; DITTRICH, R.L.; SOUZA, A.C. *et al.* Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro e cães. **Ciência Rural**. v. 41, p. 272 – 277, 2011.

POLZIN, D.J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. **Vet Clin Small Anim**. v. 41, p. 15–30, 2011.

PRIHIRUNKIT, K.; CHOOTHESA, A.; SALAKIJ, C. *et al.* Immune-mediated hemolytic anemia in a dog with acute monoblastic leukemia. **Comp Clin Pathol.** v 19, p 631–634, 2010.

RIZZI, T.E.; MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal Hematology of the Dog. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 799 – 810.

SCOTT-MONCRIEFF, J.C. Clinical Signs and Concurrent Diseases of Hypothyroidism in Dogs and Cats. **Vet Clin Small Anim.** v. 37, p. 709–722, 2007.

SCOTT-MONCRIEFF, J.C. Thyroid Disorders in the Geriatric Veterinary Patient. **Vet Clin Small Anim.** v. 42, p. 707–725, 2012.

THRALL, M.A. & WEISER, M.G. Hematologia. In: HENDRIX, C.M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários.** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2006. p.31 – 78.

THRALL, M.A. Morfologia das Hemácias. In: THRALL, M.A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Roca, 2007. p.65 – 77.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 152 – 161.

TVEDTEN, H & MORITZ, A. Reticulocyte and Heinz Body Staining and Enumeration. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6<sup>th</sup>ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 1067 – 1073.

WEISS, D.J & McCLAY, C.B. Studies on the Pathogenesis of the Erythrocyte Destruction Associated with the Anemia of Inflammatory Disease. **Veterinary Clinical Pathology.** v 17, n 4, p 90 – 93, 1988.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; NORTHROP, J.K. Relationship of serum ferritin and iron concentrations and serum total iron-binding capacity to nonheme iron stores in dogs. **Am. J. Vet. Res.** v 50 , p 198 – 200, 1989.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A medicina veterinária está rapidamente se desenvolvendo e novas tecnologias e pesquisas agregam qualidade ao atendimento dos animais de companhia. Com o aumento da expectativa de vida dos cães, houve um aumento da prevalência de doenças típicas de animais idosos e a geriatria talvez seja a especialidade mais promissora dentro da clínica médica de pequenos animais.

Com o envelhecimento da população canina, surgiu a necessidade de conhecer mais profundamente as doenças com caráter crônico como inflamações, neoplasias e doenças endócrinas e que em muitos casos levam ao quadro anêmico. Para entender melhor a fisiopatologia da anemia presente nestes animais, é de fundamental importância estudos abordando o metabolismo do ferro e a avaliação da resposta da medula óssea. Dentro da medicina é reconhecida a importância que a anemia tem sobre a qualidade de vida das pessoas e como ela pode interferir negativamente no tratamento das doenças. Na medicina veterinária, a presença da anemia em pacientes apresentando diferentes enfermidades é conhecida, porém, muito pouco estudada. Os clínicos utilizam os exames hematológicos como auxílio diagnóstico mas não estão habituados a avaliar os parâmetros relacionados ao metabolismo do ferro.

O presente estudo contribui com importantes informações a respeito da avaliação da resposta da medula óssea pela intensidade da policromatofilia e sobre as alterações na concentração sérica do ferro e na TIBC em cães anêmicos e demonstrou a importância que os processos inflamatórios ou neoplásicos têm sobre o metabolismo do ferro.

Estudos envolvendo populações maiores de cães anêmicos, monitorando estes animais por um longo período de tempo são de fundamental importância para avaliarmos a relação entre a anemia e a interferência na qualidade de vida e no período de sobrevivência.

ANEXO





Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 009/2012, referente ao projeto “Classificação do estado anêmico em cães com diferentes enfermidades”, sob a responsabilidade de Nina da Cunha Medeiros, na forma em que foi apresentado (coleta de sangue de 150 animais), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 17 de julho de 2012.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 009/2012, regarding the project “Classification of the anemic state in dogs with different diseases”, in charge of Nina da Cunha Medeiros, in the terms it was presented (blood sampling of 150 animals), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on July 17 2012.

Curitiba, 17 de julho de 2012.

Patrick Schmidt  
Presidente

Rosangela Locatelli Dittrich  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.