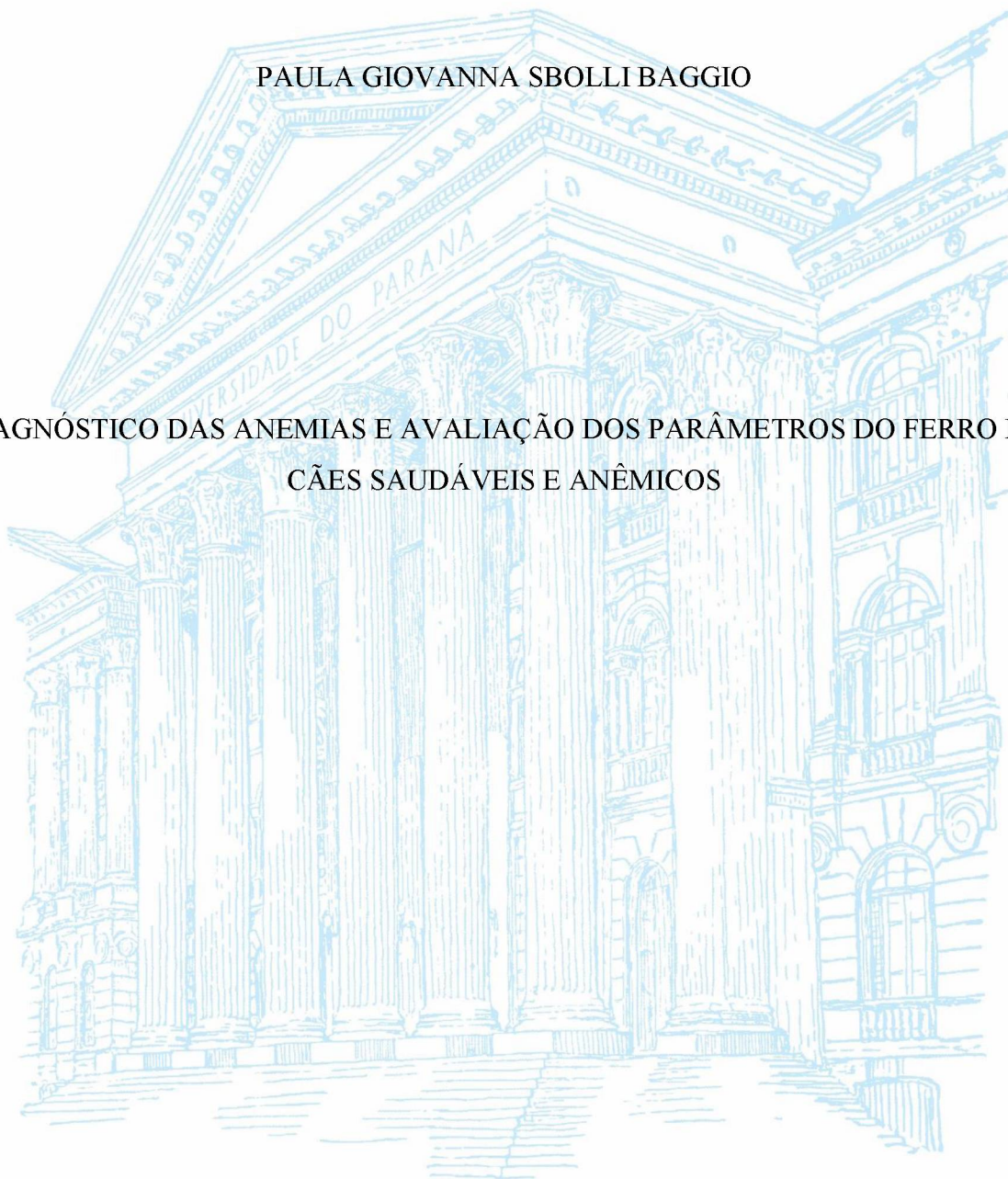


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA GIOVANNA SBOLLI BAGGIO

DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM
CÃES SAUDÁVEIS E ANÊMICOS



CURITIBA

2019

PAULA GIOVANNA SBOLLI BAGGIO

DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM
CÃES SAUDÁVEIS E ANÊMICOS

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: Prof^a. Dr^a. Rosangela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2019

B144d Baggio, Paula Giovanna Sbolli
Diagnóstico das anemias e avaliação dos parâmetros do ferro
em cães saudáveis e anêmicos / Paula Giovanna Sbolli Baggio. -
Curitiba, 2019.
93 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich

1. Cão. 2. Anemia. 3. Ferro no organismo. I. Dittrich,
Rosangela Locatelli (Orientadora). II. Título. III. Universidade
Federal do Paraná.

CDU 636.7:616.155.194



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PAULA GIOVANNA SBOLLI BAGGIO** intitulada: **DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS E A AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO FERRO EM CÃES SAUDÁVEIS E ANÊMICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SIMONE TOSTES DE OLIVEIRA STEDILE
Avaliador Interno (UFPR)

ANGELA PATRÍCIA MEDEIROS VEIGA
Avaliador Externo (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a todas as entidades espirituais por me guiarem e iluminarem nesta trajetória terrena, sempre em busca da evolução espiritual, com intuito de me tornar a minha melhor versão a cada dia.

Meus sinceros agradecimentos à minha querida orientadora Rosangela Locatelli Dittrich, que esteve todo tempo ao meu lado, aconselhando e ensinando, sempre com muita paciência e tranquilidade. Agradeço também por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer e por ter acreditado em meu potencial.

Sou muito grata à toda minha família: meu marido Francisco, meus pais Glicéia e Marco, meu irmão Bruno, minhas tias e avós. Agradeço todos os ensinamentos, as oportunidades que me deram em toda minha existência, ao amor incondicional, ao apoio em todas as minhas escolhas. Obrigada por caminharem sempre ao meu lado.

Sou imensamente grata por toda ajuda do Professor Daniel Moura de Aguiar (UFMT) e sua orientada Ísis, em meu projeto; por estar sempre disposto a me ajudar e sanar minhas dúvidas.

Agradeço à Professora Angela Veiga (UFSC) pelo envolvimento em meu projeto, por me enviar amostras e enriquecer meu trabalho.

Agradecimento especial ao Olair, funcionário do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR, pela ajuda essencial nas análises dos parâmetros do ferro.

A todos os residentes do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR (Morgana, Reinaldo, Johanna, Gabriela e Giovana) por ajudarem em minha coleta de amostras e pelo companheirismo. A todas mestrandas e doutorandas desta área, em especial a Bianca, que me deu todo apoio espiritual que eu necessitava.

A todos os meus amigos verdadeiros, em especial Ariele, Leticia e Caroline. Obrigada por me apoiarem, pelas palavras de incentivo, pelo companheirismo e amor. A minha sócia Débora, por cobrir minhas ausências no laboratório.

Agradeço aos animais que possibilitaram a realização desse projeto. E não posso deixar de agradecer a minha poodle Vicky, que permaneceu 19 anos ao meu lado, que me

ensinou a amar incondicionalmente os animais e foi responsável pela escolha da minha profissão.

RESUMO

A anemia está presente frequentemente na rotina laboratorial veterinária, é uma manifestação clínica oriunda de diversas causas que devem ser diagnosticadas com intuito de entender a patogênese e realizar tratamento específico. O ferro é fundamental para o bom funcionamento do organismo dos seres vivos, a mensuração e avaliação e dos parâmetros do metabolismo do ferro nos animais anêmicos, aliado aos resultados hematológicos, são importantes para definir a causa da anemia. Sabe-se que diversas patologias têm potencial de interferir no metabolismo do ferro nos animais, porém necessitam de mais estudos para comprovação. Infelizmente a mensuração destes parâmetros, principalmente ferritina, não é realidade nos laboratórios brasileiros pois kits espécie-específicos são necessários e não estão disponíveis comercialmente. Além disso, há carência de valores referenciais em cães saudáveis no Brasil. Os objetivos do presente trabalho visaram estabelecer valores referenciais para os parâmetros do ferro em cães saudáveis da região de Curitiba-PR; validar teste piloto da ferritina em cães utilizando reagente humano pelo método de turbidimetria; diagnosticar as causas de anemias em cães e avaliar o metabolismo do ferro; analisar a ocorrência das anemias e classificar conforme a gravidade, índices hematimétricos, resposta da medula óssea, presença de alterações morfológicas eritrocitárias e resposta leucocitária; realizar o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada por meio do teste de Coombs e estabelecer taxa de mortalidade nos animais positivos. O primeiro capítulo compreende a análise dos parâmetros do ferro em 43 cães saudáveis e padronização de metodologias para uso na rotina veterinária. O segundo capítulo consiste no diagnóstico das anemias em 219 cães e análise dos parâmetros do metabolismo do ferro nas diversas causas de anemia. O terceiro capítulo compreende o diagnóstico de hemólise imunomediada em 17 cães e a taxa de mortalidade observada nesta patologia. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR; Laboratório de Patologia Clínica My Pets, localizado na região metropolitana de Curitiba-PR; Laboratório de Análises Clínicas da Clínica Veterinária Escola da UFSC (Campus Curitiba); Laboratório de Virologia e Rickettsioses, e Biologia Molecular da UFMT. Os resultados apresentados são os seguintes: valores referenciais de cães saudáveis para ferro sérico, ferritina, capacidade de fixação do ferro e capacidade total de ligação do ferro; o teste piloto da ferritina canina com reagente específico humano foi validado para o uso em cães; elevação da concentração sérica da ferritina nas doenças infecciosas (hemoparasitoses e infecções bacterianas) e neoplásicas; diminuição da concentração plasmática de ferro em cães com cirrose em estágio terminal e hemorragia ativa; diagnóstico de *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*; diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada em 47% dos cães e taxa de mortalidade de 62,5%.

Palavras-chave: cães anêmicos, ferro sérico, transferrina, ferritina, capacidade de fixação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, hemoparasitoses, anemia hemolítica imunomediada.

ABSTRACT

Anemia is frequently present in the veterinary laboratory routine, it is a clinical manifestation from several causes that must be diagnosed in order to understand the pathogenesis and perform specific treatment. Iron is essential for the proper functioning of the body of living beings, measurement and evaluation and parameters of iron metabolism in anemic animals, together with hematological results, are important to define the cause of anemia. It is known that several pathologies have the potential to interfere in the metabolism of iron in animals, but they need more studies to prove it. Unfortunately, the measurement of these parameters, mainly ferritin, is not a reality in Brazilian laboratories because species-specific kits are necessary and not commercially available. In addition, there is a lack of reference values in healthy dogs in Brazil. The objectives of this study were to establish reference values for iron parameters in healthy dogs from the Curitiba-PR region; validate pilot test of ferritin in dogs using human reagent by turbidimetry method; diagnose the causes of anemia in dogs and evaluate the metabolism of iron; analyze the occurrence of anemia and classify according to severity, hematimetric indices, bone marrow response, presence of erythrocyte morphological alterations and leukocyte response; to perform the diagnosis of immunomediated hemolytic anemia using the Coombs test and to establish a mortality rate in positive animals. The first chapter includes the analysis of iron parameters in 43 healthy dogs and standardization of methodologies for use in veterinary routine. The second chapter consists of the diagnosis of anemia in 219 dogs and analysis of the parameters of iron metabolism in the various causes of anemia. The third chapter comprises the diagnosis of immunomediated hemolysis in 17 dogs and the mortality rate observed in this pathology. The analyzes were carried out at the Laboratory of Veterinary Clinical Pathology of the Veterinary Hospital of UFPR; Laboratory of Clinical Pathology My Pets, located in the metropolitan region of Curitiba-PR; Laboratory of Clinical Analysis of the Veterinary Clinic School of UFSC (Curitibanos Campus); Laboratory of Virology and Rickettsioses, and Molecular Biology of UFMT. The results presented are as follows: healthy dog reference values for serum iron, ferritin, iron binding capacity and total iron binding capacity; the canine ferritin pilot test with human specific reagent has been validated for use in dogs; elevation of serum ferritin concentration in infectious diseases (hemoparasitoses and bacterial infections) and neoplastic diseases; decreased plasma iron concentration in dogs with end-stage cirrhosis and active hemorrhage; diagnosis of *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* and *Ehrlichia canis*; diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in 47% of dogs and a mortality rate of 62.5%.

Key words: anemic dogs, serum iron, transferrin, ferritin, iron binding capacity, total iron binding capacity, hemoparasitoses, immune-mediated hemolytic anemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Histograma do ferro sérico em cães sadios sem transformação dos dados.....	29
FIGURA 2 - Histograma da ferritina em cães saudáveis sem transformação dos dados.....	29
FIGURA 3 - Histograma da transferrina em cães sadios após transformação Box Cox.....	30
FIGURA 4 - Histograma da Capacidade de Fixação do Ferro em cães sadios sem transformação dos dados.....	30
FIGURA 5 - Histograma da Capacidade Total de Ligação do Ferro em cães sadios após transformação Box Cox.....	31
QUADRO 1 - Diferenciação de ADI e Anemia Ferropriva de acordo com os parâmetros do ferro, adaptado de CANÇADO e CHIATTONE (2002)	39
QUADRO 2 - Classificação da resposta leucocitária em cães, adaptado de REBAR e METZGER, 2001.....	44
QUADRO 3 - Causas dos achados anormais nos valores do ferro sérico em 219 cães.....	50
QUADRO 4 - Causas dos achados anormais nos valores da ferritina em 219 cães.....	51
QUADRO 5 - Causas dos achados anormais nos valores da transferrina em 219 cães.....	51
QUADRO 6 - Causas dos achados anormais nos valores da capacidade de fixação do ferro em 219 cães.....	52
QUADRO 7 Causas dos achados anormais nos valores da capacidade total de ligação do ferro em 219 cães.....	52
FIGURA 6 – Presença de <i>Rangelia vitalli</i> (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	58
FIGURA 7 – Presença de <i>Rangelia vitalli</i> (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	59
FIGURA 8 - Observa-se <i>Rangelia vitalli</i> (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão (seta). Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	60

FIGURA 9 – Presença de <i>Rangelia vitalli</i> (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	61
FIGURA 10 – Presença de <i>Dirofilaria sp.</i> em esfregaço sanguíneo em cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	62
FIGURA 11 – Presença de <i>Ehrlichia canis</i> (seta) em monócito em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.....	63
FIGURA 12 - Microplaca estéril para microtitulação com fundo em U, utilizada no experimento para teste de Coombs, fabricante Olen, para cão.....	77
FIGURA 13 - Observar os poços vermelhos com amostra do controle (C) e pacientes (P1 e P2): hemácias lavadas homogeneizadas com solução salina e diluições do reagente de Coombs 1:2, 1:4 e 1:8. Amostras antes de serem incubadas em banho maria à 37°C por 30 minutos	77
FIGURA 14 - Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em canino, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.....	80
FIGURA 15 - Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em canino, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.....	80
FIGURA 16 - Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em cão, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.....	81
FIGURA 17 - Ausência de aglutinação eritrocitária no Teste de Coombs, indicando ausência de anticorpos na superfície das hemácias.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores estatísticos descritivos dos parâmetros do ferro em cães saudáveis.....	28
TABELA 2 - Classificação do grau de resposta medular baseada na porcentagem de reticulócitos em cães, desenvolvida por TVEDTEN (2010)	42
TABELA 3 - Classificação da gravidade da anemia baseado no valor do hematócrito em cães, desenvolvida por TVEDTEN (2010)	43
TABELA 4 - Classificação da anemia em 219 cães, de acordo com TVEDTEN (2010)	48
TABELA 5 - Classificação morfológica da anemia em 219 cães, de acordo com RIZZI <i>et al.</i> (2010)	49
TABELA 6 - Classificação da resposta da medula óssea em 219 cães anêmicos, de acordo com TVEDTEN (2010)	49
TABELA 7 - Avaliação da presença ou ausência de alterações morfológicas eritrocitárias em 219 cães anêmicos.....	49
TABELA 8 - Classificação da resposta leucocitária em 219 cães anêmicos.....	49
TABELA 9 - Avaliação do metabolismo do ferro em 219 cães anêmicos.....	50
TABELA 10 - Causas de anemia em 219 cães.....	53
TABELA 11 - Resultado do sequenciamento genético de amostras PCR positivas para hemoparasitas de 7 cães anêmicos.....	53
TABELA 12 - Comparação da sensibilidade e especificidade entre as técnicas de citometria de fluxo e teste de Coombs, desenvolvida por MORAES <i>et al.</i> (2017)	73
TABELA 13 - Variação do hematócrito (Ht) e gravidade da anemia em cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.....	78
TABELA 14 - Grau de resposta da medula óssea de cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.....	79
TABELA 15 - Classificação morfológica da anemia (VCM e CHCM) de cães positivos e negativos ao teste de Coombs direto.....	79

TABELA 16 - Resposta leucocitária de cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.....	79
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI – Anemia da Doença Inflamatória

ALT – Alanina Aminotransferase

AHIM – Anemia Hemolítica Imunomediada

AST – Aspartato Aminotransferase

ASVCP - Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária

CF – Citometria de Fluxo

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CO² - Dióxido de Carbono

CTLF – Capacidade Total de Ligação do Ferro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

HT – Hematócrito

IST – Índice de Saturação da Transferrina

LDH – Lactato Desidrogenase

GGT – Gama Glutamil Transferase

GLDH – Glutamato Desidrogenase

NADH – Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida

PBS – Solução Salina Tamponada

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

QALS - Comitê de Garantia de Qualidade e Padrões de Laboratório

UIBC – Capacidade de Fixação do Ferro

VCM – Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1	HIPÓTESES.....	17
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	Objetivo geral.....	17
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
	REFERENCIAS.....	19
2	CAPÍTULO 1: PARÂMETROS DE REFERÊNCIA DO METABOLISMO DO FERRO EM CÃES ADULTOS SAUDÁVEIS.....	20
2.1	INTRODUÇÃO.....	20
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1	Comitê de Ética.....	23
2.2.2	Amostras.....	24
2.2.3	Seleção de Animais.....	24
2.2.4	Análises Laboratoriais.....	24
2.2.4.1	Hemograma e avaliação do esfregaço sanguíneo.....	24
2.2.4.2	Análises bioquímicas.....	25
2.2.4.2.1	Uréia.....	25
2.2.4.2.2	Creatinina.....	25
2.2.4.2.3	ALT.....	25
2.2.4.2.4	Fosfatase alcalina.....	25
2.2.4.2.5	Proteínas Totais e Frações (albumina e globulina).....	26
2.2.4.2.6	Ferro sérico.....	26
2.2.4.2.7	Transferrina.....	26
2.2.4.2.8	Ferritina.....	26
2.2.4.2.9	Capacidade de Fixação do Ferro.....	27
2.2.4.2.10	Capacidade Total de Ligação do Ferro.....	27
2.2.4.2.11	Índice de Saturação da Transferrina.....	27
2.2.5	Análises estatísticas.....	27
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
2.4	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	35

3	CAPÍTULO 2: DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS EM CÃES E CORRELAÇÃO COM O METABOLISMO DO FERRO.....	37
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.2.1	Comitê de Ética.....	40
3.2.2	Amostras.....	40
3.2.3	Seleção de Animais.....	41
3.2.4	Análises Laboratoriais.....	41
3.2.4.1	Hemograma.....	41
3.2.4.2	Análise do esfregaço sanguíneo e da extensão da capa leucocitária.....	41
3.2.4.3	Contagem de reticulócitos e classificação da regeneração da medula óssea.....	42
3.2.4.4	Gravidade da anemia.....	43
3.2.4.5	Avaliação da resposta leucocitária.....	43
3.2.4.6	Análises dos parâmetros do ferro.....	44
3.2.5	Sorologia e Biologia molecular.....	44
3.2.5.1	Sorologia para <i>Ehrlichia canis</i> por Imunofluorescência Indireta.....	44
3.2.5.2	Sorologia para <i>Babesia canis</i> por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA).....	45
3.2.5.3	Snap 4DX Plus.....	45
3.2.5.4	Biologia molecular.....	45
3.2.5.5	Sequenciamento genético.....	46
3.2.6	Classificação da causa da anemia.....	46
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.4	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
4	CAPÍTULO 3: DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM CÃES.....	70
4.1	INTRODUÇÃO.....	71
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.2.1	Comitê de Ética.....	74
4.2.2	Amostras.....	74
4.2.3	Seleção de Animais.....	74
4.2.4	Análises laboratoriais.....	75
4.2.4.1	Hemograma.....	75

4.2.4.2 Análise do esfregaço sanguíneo.....	75
4.2.4.3 Contagem de reticulócitos e classificação da resposta da medula óssea.....	75
4.2.4.4 Gravidade da anemia.....	76
4.2.4.5 Avaliação da resposta leucocitária.....	76
4.2.4.6 Teste de Coombs direto.....	76
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.4 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
REFERÊNCIAS GERAIS.....	87
ANEXO.....	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

As hemácias, também denominadas glóbulos vermelhos ou eritrócitos, são revestidas por uma membrana flexível e permeável, composta por proteínas, lipídeos e carboidratos. Anormalidades na membrana eritrocitária, principalmente envolvendo os lipídeos (colesterol e fosfolipídeos), podem resultar em alterações no formato celular. As proteínas componentes da membrana formam o citoesqueleto e são responsáveis pela forma e integridade da célula. A função dos glóbulos vermelhos é carrear a hemoglobina, responsável pelos transportes de: oxigênio dos pulmões para os tecidos e CO² dos tecidos para os pulmões (PIRES, 2009).

A anemia, uma manifestação clínica vista com frequência na clínica de pequenos animais, ela consiste na diminuição do hematócrito (volume globular), número de hemácias e conseqüentemente da hemoglobina. Resulta da destruição de hemácias (hemólise); perda de sangue proveniente de uma hemorragia; insuficiência da produção destas ou até mesmo da associação destes eventos. Dentre os sinais clínicos destacam-se: palidez de mucosas; letargia; pouca tolerância ao exercício; aumento da frequência cardíaca e dependendo da gravidade, turbulências do sangue que podem induzir ao sopro cardíaco; aumento da frequência respiratória ou em casos mais graves, dispneia. Podem-se notar também alguns sinais inespecíficos como anorexia, febre, perda de peso e linfadenopatia. Particularmente nos casos de hemólise, observa-se icterícia, hemoglobinúria, bilirrubinúria e esplenomegalia (PIRES, 2009; CASTILHO *et al.*, 2006). Apesar de estar frequentemente presente na rotina clínica veterinária, a anemia é pouco estudada na Medicina Veterinária. Há poucos artigos relatando sua prevalência, causas, resposta da medula óssea e prognósticos.

O ferro é um componente essencial para o bom funcionamento do organismo, está presente na formação da hemoglobina e da mioglobina e é fornecido às células do corpo por três fontes: absorção intestinal, reciclagem de eritrócitos senescentes e mobilização do ferro armazenado no fígado (OLVER *et al.*, 2010).

O conhecimento da dinâmica do metabolismo do ferro (absorção, transporte e armazenamento) é fundamental no estudo das causas e efeitos da anemia. O ferro presente na circulação necessita estar ligado a proteínas, se estiver livre pode causar danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos, resultando em perda de função e morte celular (ORINO e WATANABE, 2008). Os parâmetros séricos do metabolismo do ferro importantes a serem mensurados são: ferro sérico, transferrina (proteína transportadora do ferro), capacidade de

fixação do ferro (ferro insaturado), capacidade total de ligação do ferro e ferritina (ferro armazenado).

Porém, infelizmente a mensuração dos parâmetros supracitados não é realidade na rotina laboratorial veterinária, por diversos motivos. O mais importante está relacionado com a falta de kit padronizado para ferritina canina, mas também há divergências nos valores referenciais e certa negligência dos clínicos ao constatarem anemia em seu paciente.

Existem diversas enfermidades que podem influenciar no metabolismo do ferro, como por exemplo anemia ferropriva e anemia da doença inflamatória (ADI). A deficiência do ferro pode apresentar níveis séricos normais e diminuição apenas no armazenamento (ferritina). Na inflamação associada a infecção, neoplasia e doenças imunomediadas ocorre diminuição do ferro sérico e redução da eritropoese, causando a anemia (CHIKAZAWA *et al.*, 2013). A anemia decorrente da doença inflamatória é considerada o tipo mais comum entre os animais domésticos e frequentemente apresenta-se como anemia discreta a moderada, normocítica e não regenerativa. A patogênese não está completamente elucidada, porém acredita-se que seja multifatorial; sabe-se que inibe o metabolismo do ferro, diminui a meia vida eritrocitária, além de diminuir a resposta medular ao estímulo da eritropoietina, causando consequentemente o quadro de anemia. Recentemente foi relatado que a hepcidina (proteína relacionada com o metabolismo do ferro) desempenha papel importante na anemia das doenças crônicas, sendo regulada por condições inflamatórias. A hepcidina, descoberta no ano de 2000, é um peptídeo que apresenta atividade antibacteriana e está presente no fígado, regula a absorção de ferro no trato gastrointestinal e liberação de ferro das células monocíticas-fagocitárias. Nos exames laboratoriais observa-se leucograma inflamatório; diminuição da concentração sérica de ferro, ferritina sérica normal ou aumentada, capacidade total de ligação do ferro normal ou diminuída e estoque de ferro medular normal ou aumentado (JACOBS e WORWOOD, 1975; GANZ, 2003; CHIKAZAWA *et al.*, 2013).

Apesar de não terem sido estabelecidos critérios de diagnósticos precisos para a anemia da doença inflamatória na Medicina Veterinária, para distinguir a anemia da doença inflamatória da anemia por deficiência de ferro propriamente dita, recomenda-se dosar a ferritina sérica ou analisar o ferro na medula óssea; características morfológicas das hemácias também podem auxiliar o diagnóstico. O metabolismo do ferro nos pacientes com anemia decorrente de doenças inflamatórias é alvo de muitas pesquisas em humanos; tendo em vista que o ferro sérico diminui e a reserva aumenta, acredita-se que a anemia ocorra devido à

indisponibilidade do mineral para os precursores eritróides, considerada vantajosa para o organismo, pois diminui a disponibilidade necessária para o crescimento bacteriano. Nota-se também a diminuição da secreção de eritropoetina, muito provavelmente pela ação das citocinas inflamatórias (CHIKAZAWA e DUNNING, 2016).

Há poucas publicações relacionando a causa da anemia com alterações da cinética do ferro e nenhuma publicação brasileira. Portanto, evidencia-se a importância de estudos avaliando o metabolismo do ferro nas diversas causas de anemia.

O presente trabalho foi desenvolvido e dividido em três capítulos. O primeiro capítulo compreende a análise dos parâmetros do ferro em cães saudáveis, com o intuito de validar reagentes de uso humano para uso em cães na rotina veterinária e estabelecer valores referenciais, com o título: "Parâmetros de referência do metabolismo do ferro em cães adultos saudáveis". O segundo capítulo aborda o diagnóstico das anemias em cães, com ênfase em hemoparasitoses, além da análise do parâmetro do ferro nas diversas causas de anemia, e o título é: "Diagnóstico das anemias em cães e a correlação com o metabolismo do ferro". No terceiro capítulo foram incluídos os cães com suspeita de anemia hemolítica imunomediada; com título "Diagnóstico e prognóstico da anemia hemolítica imunomediada em cães", refere-se à titulação de anticorpos anti-eritrocitários por meio do Teste de Coombs, índice de mortalidade e avaliação de fatores prognósticos da doença.

1.1 HIPÓTESES

Além da ADI, outras causas de anemia podem influenciar no metabolismo do ferro dos cães.

A AHIM em cães possui prognóstico ruim, com altos índices de mortalidade.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este estudo objetivou avaliar o metabolismo do ferro em cães saudáveis e estabelecer valores referenciais com intuito de compará-los com os resultados dos mesmos parâmetros em cães anêmicos por diversas causas.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1- Diagnosticar e classificar as anemias de acordo com a gravidade, resposta da medula óssea, índices hematimétricos e resposta leucocitária;
- 2- Destacar a importância da análise morfológica eritrocitária;
- 3- Detectar a presença do DNA de hemoparasitas nos cães;
- 4- Estabelecer a sequência genética de cepas de hemoparasitas diagnosticados por PCR;
- 5- Detectar anticorpos anti-eritrocitários por meio do Teste de Coombs.

REFERÊNCIAS

- CASTILHO, R.C.; LIMA, M.O.; CRUZ, M.F.R.; MARQUEZ, E.S.; CALDERÓN, C. Anemia hemolítica imunomediada em cães. **Sci. Elec. Arch.** v. 9, n.5, 2016.
- CHIKAZAWA, S.; NAKAZAWA, T.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. **J. Vet.Med.Sci.** v.75, n.11, p.1419-1426, 2013.
- CHIKAZAWA, S; DUNNING, M.D. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice.* v. 57, p. 348-353, 2016.
- GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, p. 783-788, 2003.
- JACOBS, A.; WORWOOD, M. Ferritin in serum: Clinical and biochemical implications. **N Engl J Med**, v. 292, p. 951–956, 1975.
- OLVER, C. S.; ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E.; KANEKO, J. J. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology: Erythrocyte Structure and Function.** 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 123-130 p.
- ORINO, K.; WATANABE K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage ferritin. **The Veterinary Journal**, v. 178, p.191-201, 2008.
- PIRES, L.S.A. **Determinação dos parâmetros do ferro em cães saudáveis e anêmicos.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 102p. Dissertação de Mestrado.

2 Capítulo 1: PARÂMETROS DE REFERÊNCIA DO METABOLISMO DO FERRO EM CÃES ADULTOS SAUDÁVEIS

RESUMO

A avaliação do metabolismo do ferro é importante no auxílio do diagnóstico e entendimento das causas de anemia e nas sobrecargas de ferro. Alguns parâmetros do ferro estão estabelecidos e são mensurados na rotina laboratorial veterinária, porém a ferritina sérica em cães foi quantificada por poucos pesquisadores pelo fato de necessitar de reagentes desenvolvidos especificamente para cada espécie, e que não estão disponíveis comercialmente. No presente estudo foram determinados os parâmetros do metabolismo do ferro em cães saudáveis. Amostras de sangue total e de soro de 43 animais foram utilizadas no estudo. As metodologias utilizadas para mensuração dos parâmetros do ferro foram colorimetria, fotometria e turbidimetria; os reagentes utilizados foram desenvolvidos para humanos pela fabricante Kovalent®. Os valores de referência estabelecidos foram: ferro sérico = 28,5 a 267,2 µg/dL; ferritina = 19,4 a 93,5 ng/mL; transferrina = 33,8 a 610,3 mg/dL; capacidade de fixação do ferro = 55,6 a 471,8 mg/dL; capacidade total de ligação do ferro = 48,3 a 871,8 µg/dL. O teste piloto da ferritina canina com reagente específico humano foi validado para o uso em cães.

Palavras-chave: ferro sérico, ferritina, transferrina, capacidade de fixação do ferro, capacidade total de ligação do ferro, cães saudáveis

ABSTRACT

The evaluation of iron metabolism is important aiding in the diagnosis and understanding of the causes of anemia and in iron overloads. Some iron parameters are established and are measured in veterinary laboratory routine, but serum ferritin in dogs has been quantified by few researchers because it requires reagents developed specifically for each species and are not commercially available. In the present study, the parameters of iron metabolism in healthy dogs were determined. Whole blood and serum samples from 43 animals were used in the study. The methodologies used to measure iron parameters were colorimetry, photometry and turbidimetry; the reagents used were developed for humans by the manufacturer Kovalent®. The established reference values were: serum iron = 28.5 to 267.2 µg / dL; ferritin = 19.4 to 93.5 ng / mL; transferrin = 33.8 to 610.3 mg / dL; iron fixing capacity = 55.6 to 471.8 mg / dL; total iron binding capacity = 48.3 to 871.8 µg / dL. The canine ferritin pilot test with specific human reagent has been validated for use in dogs.

Key words: serum iron, ferritin, transferrin, iron binding capacity, total iron binding capacity, healthy dogs.

2.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial para o organismo, pois participa da formação do colágeno, dos neurotransmissores, hemoglobina e mioglobina, síntese de DNA e RNA, enzimas (catalase e citocromos), entre outros; além de ser importante no metabolismo energético e

função do sistema imune. O ferro é oriundo da dieta e da degradação da hemoglobina, que ocorre no processo fisiológico monocítico-fagocitário (MCCOWN e SPECHT, 2011).

O ferro é absorvido no intestino delgado, e a sua absorção é mediada pelo hormônio hepcidina, no plasma o ferro liga-se às proteínas (principalmente transferrina) para ser transportado pelo organismo. Cerca de 75% do ferro é transportado para medula óssea para formação da hemoglobina no processo de eritropoese; a porcentagem restante será armazenada no fígado e baço, na forma de ferritina, e também na medula óssea como hemossiderina. No processo monocítico-fagocitário, os macrófagos lisam as hemácias senescentes, degradam a hemoglobina e liberam o ferro na circulação sanguínea, sendo pouca quantidade destinada ao armazenamento. A hepcidina é o hormônio regulador da absorção do ferro, e os fatores que influenciam sua concentração são: quantidade de ferro circulante e armazenado, eritropoiese, hipóxia tecidual e inflamação. (HARVEY, 2008; PANTOPOULOS, 2012; BOHN, 2015).

Uma pequena quantidade de ferro é necessária para todas as células, porém a maioria deste é utilizada para produção de hemoglobina pelos precursores eritróides, portanto uma deficiência deste mineral tem a anemia como principal consequência (MCCOWN e SPECHT, 2011). A sobrecarga de ferro é tóxica às células, pois por meio da reação de Fenton, elétrons são doados para produção de radicais hidroxilas, os quais quando livres causam danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos, resultando em perda de função e morte celular (ORINO e WATANABE, 2008).

Determinadas enfermidades têm como característica promover alteração do metabolismo do ferro, como por exemplo a doença inflamatória, desvio portossistêmico e anemia hemolítica, entre outras (HARVEY, 2008; CHIKAZAWA *et al.*, 2013).

O metabolismo do ferro é avaliado por meio de exames bioquímicos, que mensuram quantitativamente o ferro que está presente no soro, sendo transportado ou estocado no organismo (HARVEY, 2008).

A concentração plasmática do ferro sérico indica a quantidade deste na circulação ligado à proteína transportadora. O método colorimétrico é o mais utilizado para mensurar o íon; esta metodologia pode ser baseada em dois fatores: interação com um reagente formando um complexo colorido; ou então pela liberação de íons férricos pela transferrina seguida da redução dos mesmos por ácido ascórbico. Outro método possível de ser utilizado é a coulometria, que mensura em solução salina, a quantidade de carga elétrica necessária para oxidar o metal. A eletropositividade do ferro é um valor conhecido, portanto a concentração deste é proporcional

à quantidade de corrente utilizada. Apesar de ser muito sensível e utilizar pouca quantidade de amostra, não é utilizado atualmente, porque o equipamento necessário não é mais produzido (ANDREWS, 2010).

A ferritina é considerada a reserva corpórea intracelular do íon, sendo possível ser mensurada no soro do paciente. Já a hemossiderina, é uma forma de reserva insolúvel do ferro e só pode ser detectada em tecidos ou células coradas. Portanto, o ferro armazenado pode ser avaliado tanto pela dosagem de ferritina sérica quanto pela presença de hemossiderinas em macrófagos em aspirados da medula óssea. É importante ressaltar que a ferritina é espécie-específica e considerada uma proteína de fase aguda positiva, ou seja, tende a estar elevada em processos inflamatórios (CHIKAZAWA, 2013; THRALL, 2015). A ferritina é composta por duas subunidades com funcionalidades diferentes: a subunidade do tipo coração (H) possui atividade da ferroxidase e é essencial na incorporação do ferro; já a subunidade do tipo fígado (L) não possui ferroxidase e está relacionada com a habilidade de absorver mais ferro. Há alta homologia nas cadeias de aminoácidos entre a ferritina humana e canina (H=96% e L=86%), com diferente proporção entre as subunidades em cada espécie. (ORINO *et al.*, 2005). A quantificação da ferritina é importante principalmente para diferenciar anemias por deficiência do ferro de anemias de origem inflamatória, já que o valor do ferro sérico em ambos os casos estará diminuído (MEDEIROS, 2013).

A transferrina é a principal proteína plasmática transportadora do ferro, portanto é reportada indiretamente como a capacidade total de ligação deste e representa a concentração máxima em que as proteínas séricas são capazes de ligar; possui habilidade de ligação com um ou dois íons de ferro férrico (Fe^3). É considerada uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, tende a estar diminuída na presença de inflamação, e pode, portanto, mascarar a deficiência do ferro. Altas concentrações estão relacionadas à doença hepática crônica ou sobrecarga de ferro (PIRES *et al.*, 2011; BOHN, 2015).

A capacidade total de ligação do ferro propriamente dita indica a quantidade total de transferrina (apotransferrina, monotransferrina e transferrina diférrica) presente no soro, sendo importante ressaltar que existem quantidades insignificantes de ferro que estão ligadas a outros tipos de proteínas. Seu valor é um pouco mais elevado que o da transferrina pois uma mesma proteína pode estar ligada a mais de um íon. Na inflamação encontra-se normal ou diminuída e especialmente nos cães parece não sofrer interferência quando há deficiência de ferro, porém está elevada na hepatopatia crônica (HARVEY, 2008).

A capacidade de fixação do ferro determina a quantidade não-saturada do metal; e o índice de saturação da transferrina é calculado dividindo o ferro sérico pela capacidade total de ligação do mesmo e então multiplicando por 100 (HARVEY, 2008; BOHN, 2015).

No hemograma as alterações causadas pela deficiência de ferro estão principalmente relacionadas à anemia (hematócrito e hemoglobina abaixo do valor de referência), porém o diferencial está na observação das hemácias no esfregaço sanguíneo: hemácias microcíticas ou hipocrômicas, decorrentes da síntese deficiente de hemoglobina; além de alterações morfológicas das hemácias (queratócitos e esquistócitos) (HARVEY, 2008).

A determinação dos parâmetros do ferro é muito importante para o entendimento das causas e efeitos nos cães anêmicos. No Brasil, o tema ainda é pouco estudado, necessitando de mais publicações sobre a avaliação do metabolismo do ferro de cães saudáveis; além de não existirem reagentes específicos veterinários disponíveis comercialmente. O ferro sérico e capacidade de fixação do ferro já são dosados nos laboratórios veterinários brasileiros com reagentes desenvolvidos para humanos, validados para uso em cães em estudos científicos anteriores; porém a ferritina canina só foi detectada pelo método imunoenzimático (ELISA) por pesquisadores dos EUA (WEEKS *et al.*, 1988; ANDREWS e WEEKS, 1992), Espanha (LISTE *et al.*, 1994) e Japão (WATANABE *et al.*, 2000; CHIKAZAWA *et al.*, 2013), com kit diagnóstico espécie-específico desenvolvido especialmente para o estudo, não estando disponível para comercialização.

Os objetivos do presente estudo foram determinar a concentração sérica de ferritina utilizando reagente humano, por ensaio turbidimétrico, e estabelecer os intervalos de referência de todos os parâmetros do metabolismo do ferro em cães saudáveis adultos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), de acordo com o protocolo número 101/2017 (ANEXO).

2.2.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue de cães provenientes da rotina clínica do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, e do My Pets Laboratório Veterinário, localizado na região metropolitana de Curitiba – PR.

O paciente foi submetido à contenção física e a amostra de sangue foi coletada por venopunção jugular e acondicionada em frascos estéreis com anticoagulante (EDTA) para realização do hemograma; e frascos estéreis sem anticoagulante, para obtenção do soro. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados e os soros foram separados e congelados a -20°C para realização dos parâmetros do ferro.

Amostras de soro com lipemia e hemólise foram descartadas, para evitar erros pré-analíticos.

2.2.3 Seleção de animais

Foram selecionados para o estudo 43 cães adultos saudáveis, com idades entre 1 e 9 anos, ambos os sexos e diferentes raças. Amostras de sangue foram encaminhadas aos laboratórios citados com a finalidade de realizar exames de rotina destes pacientes ou para análise pré-operatória (ovariohisterectomia ou orquiectomia eletivas).

Os critérios de inclusão neste estudo foram: apresentar avaliação clínica (histórico, anamnese e exame físicos) sem alterações: ausência de inflamação e ectoparasitas, mucosas normocoradas, frequências respiratória e cardíaca normais, linfonodos normais, temperatura corpórea normal. Apresentar exames hematológicos e bioquímicos (hepático e renal) normais.

2.2.4 Análises Laboratoriais

2.2.4.1 Hemograma e avaliação do esfregaço sanguíneo

O hemograma foi realizado em analisador hematológico automático (Mindray BC 2800 Vet®), para determinação de número de eritrócitos e leucócitos, e da hemoglobina. A extensão sanguínea foi realizada em menos de 2 horas pós coleta e corada com Panótico Rápido (Newprov®). As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio óptico em objetiva de 100X. O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito e a proteína plasmática total foi determinada por refratometria.

Na extensão sanguínea foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos e estimativa da contagem plaquetária.

2.2.4.2 Análises bioquímicas

Os exames bioquímicos foram realizados em analisador bioquímico automático Mindray BS 200®, as metodologias empregadas foram: colorimetria, UV enzimático, UV cinético e imunoensaio turbidimétrico; foram utilizados reagentes das fabricantes Labtest® e Kovalent®. Como não há grande variedade de reagentes específicos veterinários disponíveis no mercado, optou-se pela utilização de reagentes de uso humano em caso de indisponibilidade.

Foram realizadas quantificações de uréia, creatinina, ALT, fosfatase alcalina, proteínas totais e frações, ferro sérico, transferrina, ferritina e capacidade de fixação do ferro.

2.2.4.2.1 Uréia

O sistema utilizado foi enzimático para determinação da uréia por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos (tempo fixo), da marca Labtest® de uso veterinário. A uréia é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com o 2-cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH), promovendo a oxidação do NADH a NAD.

2.2.4.2.2 Creatinina

O reagente utilizado foi Labtest® de uso exclusivo veterinário. A determinação quantitativa da creatinina é por meio de reação cinética de dois pontos, por método colorimétrico utilizando picrato alcalino – Jaffé. A creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha.

2.2.4.2.3 ALT

A metodologia cinética foi empregada para determinar a ALT nas amostras, utilizando reagente específico veterinário da marca Labtest®. A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que, a coenzima NADH é oxidada a NAD.

2.2.4.2.4 Fosfatase alcalina

Por meio de metodologia colorimétrica (Bowers e Mc Comb modificado) do reagente de uso veterinário da marca Labtest®, a fosfatase alcalina foi quantificada por modo cinético. A fosfatase alcalina do soro em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico.

2.2.4.2.5 Proteínas Totais e Frações (albumina e globulina)

Os reagentes utilizados foram Labtest®. A Albumina é específica veterinária e as Proteínas Totais de uso humano.

Na determinação da albumina foi utilizado o método colorimétrico (verde de bromocresol) para quantificação no soro por reação de ponto final. A albumina tem a propriedade de se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de mensuração baseia-se no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina.

As Proteínas Totais foram determinadas por método colorimétrico (Biureto), por reação de ponto final. Os íons cobres em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura.

2.2.4.2.6 Ferro sérico

A determinação do ferro sérico foi realizada por método colorimétrico utilizando Ferene, utilizando reagente Ferro Ferene da marca de uso humano, Kovalent®. O ferro ligado a transferrina é liberado em meio ácido na forma de ferro férrico e é então reduzido a ferro ferroso na presença de ácido ascórbico.

2.2.4.2.7 Transferrina

A determinação quantitativa da transferrina foi feita a partir de imunoensaio turbidimétrico. A reação é baseada em antígeno-anticorpo, por método de ponto final. O anticorpo utilizado é o policlonal de cabra anti-transferrina humana estabilizada em salina Azida sódica (0,95 g/dL). O reagente utilizado foi Kovalent® de uso humano.

2.2.4.2.8 Ferritina

O reagente utilizado (Kovalent®, de uso humano) para determinação quantitativa de ferritina é uma suspensão de partículas de látex de poliestireno de tamanho uniforme revestidas com IgG de coelho anti-ferritina humana. Quando uma amostra contendo ferritina é misturada com o reagente, uma reação nítida de aglutinação ocorre, que é mensurada pela técnica de imunoensaio turbidimétrico.

2.2.4.2.9 Capacidade de Fixação do Ferro

O reagente utilizado foi da marca Kovalent® de uso humano. A metodologia utilizada é fotométrica com Ferene. A reação baseia-se em uma concentração conhecida de íons ferrosos, que é incubada com o soro do paciente, 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.

2.2.4.2.10 Capacidade Total de Ligação do Ferro

A capacidade total de ligação do ferro foi obtida a partir do valor da transferrina, baseada na fórmula:

$$\text{Transferrina} = \text{CTLF} \times 0,7$$

2.2.4.2.11 Índice de saturação da transferrina

O índice de saturação da transferrina foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{IST} = \text{Ferro sérico} / \text{CTLF} \times 100$$

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do *freeware Reference Value Advisor V2.1*, seguindo os conceitos pré-estabelecidos pelo Comitê de Garantia de Qualidade e Padrões de Laboratório (QALS) da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP) (GEFFRÉ, A. *et al*, 2011). O software *Action Stat 3* foi utilizado para transformações dos dados que não foram realizados pelo *Reference Value Advisor V2.1*.

No *Reference Value Advisor 2.1* foram utilizados métodos paramétricos para estatística descritiva dos dados (média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo). Foi realizado o teste de normalidade por meio da estatística de Anderson-Darling para verificar se os dados seguem uma distribuição normal avaliando o valor do p; a distribuição não foi considerada normal se $p < 0,05$, e nestes casos específicos os dados foram transformados pelo método Box-Cox para obter o valor de $p > 0,05$. A identificação de possíveis *outliers* ocorreu pela análise dos histogramas e confirmada pelos métodos de Tukey e Dixon-Reed; histogramas foram delineados de acordo com os resultados obtidos.

Os intervalos de referência das variáveis foram determinados usando teste não paramétrico, com intervalo de confiança de 90%, por método de Bootstrap.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros do metabolismo do ferro estão apresentados na Tabela 1. Nas análises do ferro, ferritina e transferrina os testes de Tukey e Dixon-Reed não detectaram *outliers*. Porém, um *outlier* foi detectado pelo método de Tukey na análise da Capacidade de Fixação do Ferro, e optou-se por descartá-lo, mesmo sendo de um animal saudável, por ser realmente valor discrepante observado no histograma; cinco *outliers* foram detectados por ambos os testes para a o Índice de Saturação da Transferrina. Esse parâmetro foi excluído do estudo pois o número de amostras era incompatível (<40) com a utilização de métodos estatísticos não-paramétricos.

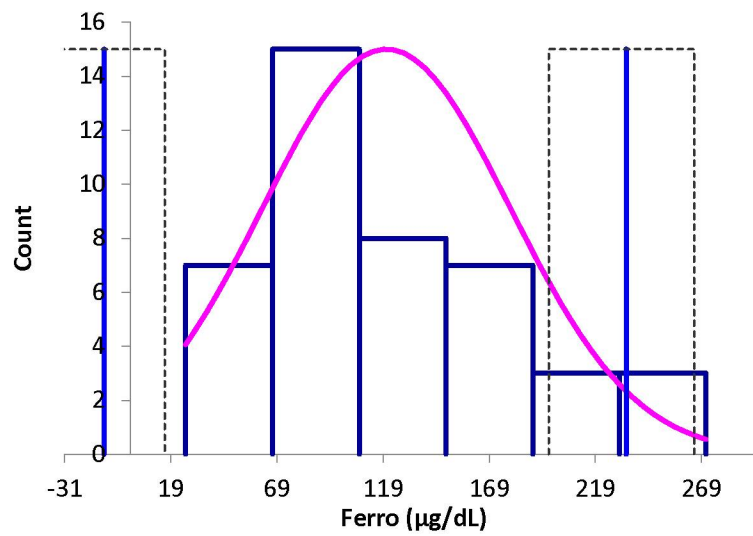
Tabela 1: Valores estatísticos descritivos dos parâmetros do ferro em cães saudáveis.

	Ferro Sérico (µg/dL)	Ferritina (ng/mL)	Transferrina (mg/dL)	UIBC (mg/dL)	CTLF (µg/dL)
N (amostras)	43	43	43	42	43
Média	120,6	43,8	185,4	252,6	264,9
Mediana	104,9	40,9	151,2	260,1	216
Desvio padrão	58,5	14,8	139,5	96,8	199,2
Mínimo	26	19,3	33,52	54,8	47,9
Máximo	271,2	96	621,14	477	887,3
Intervalo de Referência	28,5 - 267,2	19,4 - 93,5	33,8 - 610,3	55,6- 471,8	48,3 - 871,8

UIBC: Capacidade de Fixação do Ferro; CTLF: Capacidade Total de Ligação do Ferro.

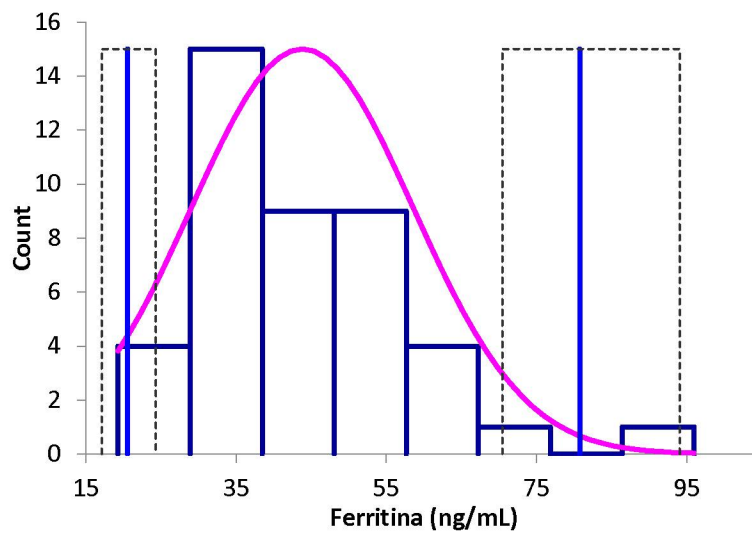
Os histogramas com distribuição normal dos dados estão apresentados nas figuras de 1 a 5.

Figura 1: Histograma do ferro sérico em cães sadios sem transformação dos dados.



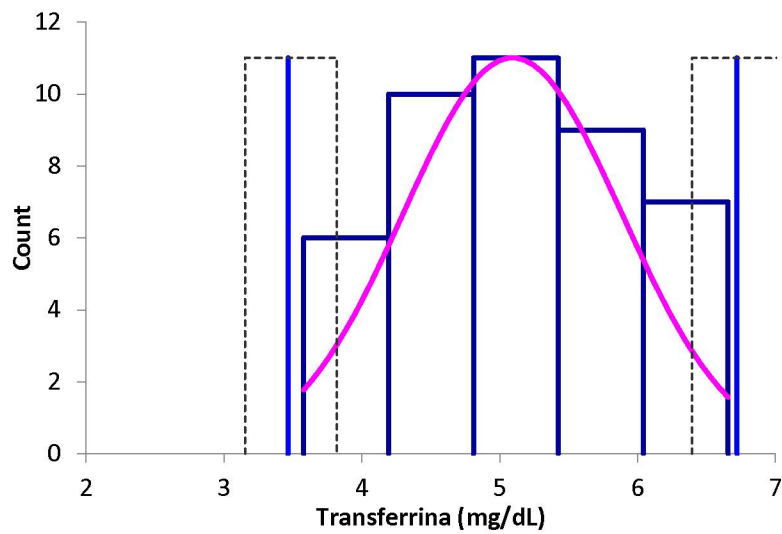
A linha cor-de-rosa (curva) representa a distribuição normal, barras verticais são limites de referência, com seus intervalos de confiança de 90% como linhas pontilhadas.

Figura 2: Histograma da ferritina em cães saudáveis sem transformação dos dados.



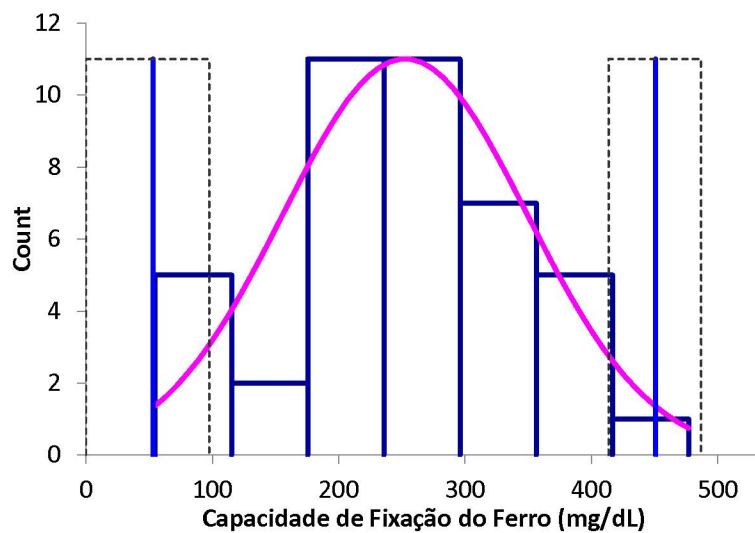
A linha cor-de-rosa (curva) representa a distribuição normal; barras verticais são limites de referência, com seus intervalos de confiança de 90% como linhas pontilhadas.

Figura 3: Histograma da transferrina em cães sadios após transformação Box Cox.



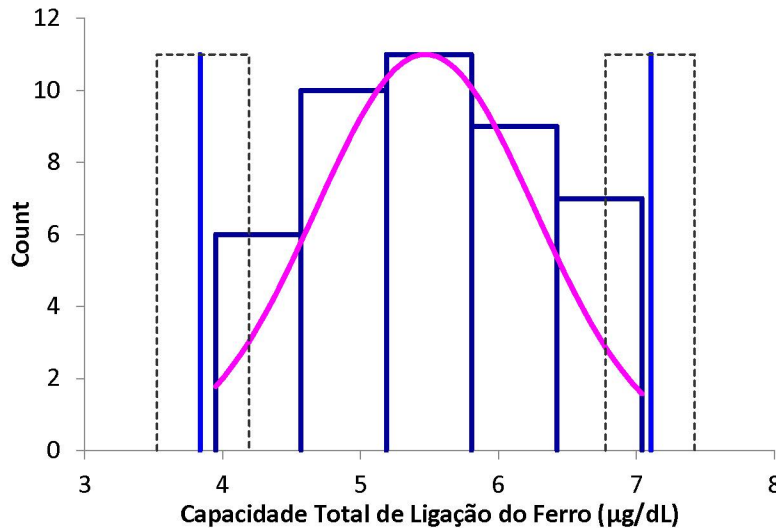
A linha cor-de-rosa (curva) representa a distribuição normal; barras verticais são limites de referência, com seus intervalos de confiança de 90% como linhas pontilhadas.

Figura 4: Histograma da Capacidade de Fixação do Ferro em cães sadios sem transformação dos dados.



A linha cor-de-rosa (curva) representa a distribuição normal; barras verticais são limites de referência, com seus intervalos de confiança de 90% como linhas pontilhadas.

Figura 5: Histograma da Capacidade Total de Ligação do Ferro em cães sadios após transformação Box Cox.



A linha cor-de-rosa (curva) representa a distribuição normal; barras verticais são limites de referência, com seus intervalos de confiança de 90% como linhas pontilhadas.

No presente estudo o valor do ferro sérico variou de 28,5 a 267,2 µg/dL. No estudo de PIRES *et al.* (2011), com 120 cães saudáveis, de ambos os sexos, jovens e adultos, os valores médios para ferro sérico foram de 136,6 µg/dL e 154,3 µg/dL para adultos, machos e fêmeas, respectivamente, utilizando método colorimétrico. Em 1994, LISTE *et al.* determinaram os valores de referência de 138 a 230 ng/dL em oito cães da raça Beagle, por meio do método colorimétrico com batofenantrolina. No presente estudo foi utilizada a mesma metodologia de PIRES *et al.* (2011), porém a marca comercial do reagente foi diferente dos dois estudos supracitados (reação baseada em fatores diferentes) e a quantidade de animais também foi distinta, sendo a possível explicação para a variação do intervalo e valores médios entres os trabalhos. Porém ao avaliarmos os valores dos outros autores baseado no intervalo de referência estabelecido no presente estudo, os resultados mostram-se dentro dos limites referenciais.

WEEKS *et al.* (1988), determinaram o intervalo de 33 a 147 µg/dL para o mesmo íon em 95 cães, por coulometria, sendo este valor adotado como referência pelo Laboratório de Diagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado do Kansas. O valor máximo referencial do presente estudo é aproximadamente 1,8 vezes maior do encontrado por WEEKS *et al.*, podendo-se atribuir esta diferença de resultados às metodologias diferentes.

O estudo desenvolvido por CHUNG *et al.* (2016) que objetivou estabelecer valores de referência para diversos parâmetros em 38 cães saudáveis demonstrou uma média do ferro sérico de 150 µg/dL, e intervalo de referência de 43 a 258 µg/dL. Tais pesquisadores utilizaram a mesma metodologia deste trabalho, inclusive a estatística realizada pelo mesmo *freeware*, e os resultados foram semelhantes.

No presente estudo o valor da ferritina variou de 19,4 a 93,5 ng/mL. A ferritina nos cães só conseguiu ser avaliada em estudos anteriores por pesquisadores que desenvolveram um kit específico para a espécie, visto que sua mensuração é baseada em métodos imunológicos. Em 1992, ANDREWS e WEEKS quantificaram a proteína canina em 61 animais saudáveis; a técnica por ELISA utilizou dois anticorpos monoclonais de ratos em um arranjo sanduíche: um anticorpo anti-ferritina canina capta a ferritina do soro, enquanto o outro é usado como indicador no ensaio cinético, obtendo valor médio de 252 ng/mL e intervalo de referência de 80 a 800 ng/mL. LISTE *et al.* (1994) determinou média de 155,7 ng/dL e intervalo de 80 a 280 ng/dL, utilizando método ELISA com anticorpos monoclonais 5D56F7 anti-ferritina canina.

Foi realizado um estudo por WATANABE *et al.* (2000) em 51 cães saudáveis semelhante aos supracitados, porém utilizando anticorpos de coelhos anti-ferritina de fígado de ratos, e obteve como média 479 ng/mL e intervalo de 298 a 959 ng/mL. CHIKAZAWA *et al.* (2013) publicou estudo em que dosou a ferritina em 163 cães saudáveis, por meio da técnica ELISA em sanduíche, mas utilizou anticorpo policlonal de coelho anti-ferritina cardíaca canina e como padrão a própria ferritina cardíaca canina; a média das concentrações proteicas foi 789 ng/mL.

O presente estudo quantificou a ferritina canina utilizando reagente comercial por imunoenensaio turbidimétrico com anticorpos de coelho anti-ferritina humana. Tal ensaio nunca foi testado em amostras séricas de cães, até o presente momento. A possível justificativa para a detecção de ferritina de cão com reagente humano é a alta homologia das cadeias de aminoácidos entre as espécies, conforme relatado por ORINO e WATANABE (2008), tornando esta técnica viável especificamente para o reagente testado. Os valores médios da concentração proteica e intervalo de referência foram inferiores aos estudos anteriores pela diferença de metodologia empregada nos mesmos.

O intervalo referencial estabelecido no presente estudo para transferrina foi 33,8 a 610,3 mg/dL. A dosagem de transferrina em cães foi relatada pelos mesmos autores que mensuraram o ferro sérico. O valor médio descrito por PIRES *et al.* (2011) foi 257,8 mg/dL. Em tal estudo, primeiro foi determinada a Capacidade Total de Ligação do Ferro a partir da fórmula: Ferro

sérico + Capacidade de Fixação do Ferro; com o valor da CTLF já estabelecido, aplicou-se outra fórmula para chegar ao valor da Transferrina: $CTLF \times 0,7$. O atual estudo utilizou método turbidimétrico com anticorpos policlonais de cabras anti-transferrina humana para detectar a proteína transportadora do ferro, sem a necessidade de calcular pelas fórmulas supracitadas. Tal metodologia imunológica confere uma maior acurácia aos resultados e demonstrou uma variação bastante significativa do intervalo referencial quando comparado aos demais autores.

A capacidade de fixação do ferro do presente estudo variou de 55,6 a 471,8 mg/dL. O mesmo parâmetro foi mensurado por PIRES *et al.* (2011) e LISTE *et al.* (1994) em cães sadios por método colorimétrico (com ferrozine) e cálculo (CTLF menos ferro sérico), respectivamente. As respectivas médias encontradas foram 223 µg/dL e 132,8 ng/dL; e o intervalo foi estabelecido de 80 a 204 ng/dL por LISTE *et al.* (1994). No presente estudo a metodologia utilizada foi fotométrica (com ferene) e o valor médio foi semelhante ao encontrado pelos pesquisadores brasileiros; já o intervalo de referência foi maior do que o estabelecido por meio de cálculos por pesquisadores espanhóis, possivelmente indicando maior sensibilidade na determinação dos valores por meio de reagentes.

O intervalo referencial estabelecido para a capacidade total da ligação do ferro no atual estudo foi 48,3 a 871,8 µg/dL. Este parâmetro foi relatado por WEEKS *et al.* (1988) e PIRES *et al.* (2011), sendo o intervalo de referência de 282 a 386 µg/dL e a média 368 µg/dL, respectivamente. A média encontrada neste trabalho foi muito próxima à descrita por PIRES *et al.*, apesar de ter sido estabelecida por fórmulas diferentes; porém o intervalo referencial foi mais amplo do que o observado pelos pesquisadores americanos.

2.4 CONCLUSÃO

A divergência entre os valores encontrados neste estudo quando comparados às publicações anteriores reforça a necessidade de estabelecimento de valores referenciais exclusivos de cada laboratório de acordo com amostras de pacientes saudáveis, assim como é indicado e realizado por laboratórios humanos.

O teste piloto da dosagem da ferritina canina pelo método turbidimétrico apresentou bons resultados, mesmo contendo anticorpos não-específicos para a espécie em sua

composição. A utilização de métodos colorimétricos e imunológicos foi eficaz para determinação dos parâmetros do ferro, tornando válida a utilização destes reagentes humanos nas análises laboratoriais de cães.

Portanto, em casos suspeitos de anemia ferropriva ou anemia da doença inflamatória recomenda-se a dosagem dos parâmetros do metabolismo do ferro associado ao hemograma e observação de alterações morfológicas das hemácias.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, G.A.; WEEKS, B.R. An Improved Ferritin Assay for Canine Sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, n.2, p. 57 – 60. 1992.
- 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. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- BOHN, A.A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Clin Lab Med**, v. 35, p. 579-590, 2015.
- CHIKAZAWA, S.; NAKAZAWA, T.; HORI, Y.; HOSHI F.; KANAI, K.; ITO, N.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. **J. Vet. Med. Sci**, v. 75, n. 11, p. 1419-1426, 2013.
- CHIKAZAWA, S.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; SATO, J.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Development of a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect and Measure Serum Levels of Canine Ferritin. **J. Vet. Med. Sci**, v. 75, n. 4, p. 515-517, 2013.
- CHUNG, S.H.; CHANG, L.W.; CHENG, T.L.; LIN, C.J.; CHEN, W.Y.; CHOU, C.C. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 42, n. 2, p.53-67, 2016.
- GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J.P.; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2011.
- HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6th ed. Missouri: Saunders, 2008. p. 259-285.
- LISTE, F.; GASCÓN, M.; PALACIO, J. Metabolismo del hierro en el perro: aplicaciones diagnósticas de la determinación de status férrico y valores de referencia em la raza Beagle. **Annals of Veterinary**, v. 9, n. 10, p. 75-81, 1994.
- MCCOWN, J.L; SPECHT, A.J. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 47, p. 151-160, 2011.
- MEDEIROS, N. C. **Resposta da medula óssea e o metabolismo do ferro em cães com anemias de diferentes etiologias**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013. 73p. Dissertação de Mestrado.
- ORINO, K.; WATANABE K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage ferritin. **The Veterinary Journal**, v. 178, p.191-201, 2008.
- ORINO, K.; MIURA, T.; MUTO, S.; WATANABE, K. Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. **DNA Sequence**, v. 16, n.1, p. 58-64, 2005.

PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S.K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, p. 5705-5724, 2012.

PIRES, L.S.A.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOUZA, A.C.; BERTOL, M.A.F.; PATRICIO, L.F.L. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, v. 41, n.2, p. 272-277, 2011.

THRALL, M.A. Anemia regenerativa. In: THRALL, M.A et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p 191-248.

WATANABE, K.; MURANISHI, N.; MURATA, Y.; ORINO, K.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S. Biochemical properties of canine serum ferritin: iron content and nonbinding to concanavalin A. **Biomaterials**, v. 13, n. 4, p. 319–324, 2000.

WATANABE, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. **Biomaterials**, v.13, p. 57-63, 2000.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; PHILIPS, R.M. Enzyme linked immunosorbent assay for canine serum ferritin using monoclonal anti-canine ferritin. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1193-1195, 1988.

3 Capítulo 2: DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS EM CÃES E CORRELAÇÃO COM O METABOLISMO DO FERRO

RESUMO

A anemia é frequentemente relatada em cães na rotina clínica e laboratorial, porém as causas desta manifestação clínica são diversas e envolvem diferentes processos patológicos, revelando a importância da realização de exames laboratoriais específicos para classificá-las. No presente estudo, foram avaliados 219 cães anêmicos provenientes da rotina clínica do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Curitiba - PR), da Universidade Federal de Santa Catarina (Curitibanos - SC), e do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária My Pets, localizado na região metropolitana de Curitiba - PR. O principal objetivo deste estudo foi classificar as anemias de acordo com a causa e avaliar o metabolismo do ferro nestes pacientes. Entre os 219 cães anêmicos selecionados, houve predominância de anemia discreta (53,9%), normocítica e normocrômica (54,8%), regeneração medular leve (37,9%), presença de poiquilocitose (66,2%), leucograma normal (31,1%) e valores normais dos parâmetros do ferro (variando de 79,8 a 86,8%); as doenças infecciosas foram as principais causas observadas no estudo (41,1%). Foram diagnosticados cinco cães com *Rangelia vitalli*, um cão com *Babesia canis vogeli* e um cão com *Ehrlichia canis*, por método molecular. Este foi o primeiro estudo a relatar a ocorrência de *Babesia canis vogeli* em Curitiba-PR, e o segundo estudo do Paraná a sequenciar *Ehrlichia canis*. As principais alterações do metabolismo do ferro foram: elevação da concentração sérica da ferritina constatada nas doenças infecciosas (hemoparasitoses e infecções bacterianas) e neoplásicas; diminuição da concentração plasmática de ferro em cães com cirrose em estágio terminal e hemorragia ativa.

Palavras-chave: metabolismo do ferro; anemia ferropriva; anemia da doença inflamatória; *Rangelia vitalli*; *Babesia canis vogeli*; *Ehrlichia canis*.

ABSTRACT

Anemia is frequently reported in dogs in clinical and laboratory routine, but the causes of this clinical manifestation are diverse and involve different pathological processes, revealing the importance of carrying out specific laboratory tests to classify them. In the present study, 219 anemic dogs from the clinical routine of the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Paraná (Curitiba - PR) and of the Federal University of Santa Catarina (Curitibanos - SC), and the Veterinary Clinical Pathology Laboratory, My Pets located in the metropolitan area of Curitiba - PR. The main objective of this study was to classify the anemias according to the cause and to evaluate the iron metabolism in these patients. Among the 219 anemic dogs selected, there was a predominance of discrete anemia (53.9%), normocytic and normochromic (54.8%), mild bone marrow regeneration (37.9%), presence of poikilocytosis (66.2%), normal leukogram (31.1%) and normal values of iron parameters (ranging from 79.8 to 86.8%); infectious diseases were the main causes observed in the study (41.1%). Five dogs were diagnosed with *Rangelia vitalli*, one dog with *Babesia canis vogeli* and one dog with *Ehrlichia canis*, by molecular methods. This was the first study to report the occurrence of *Babesia canis vogeli* in Curitiba-PR, and the second Paraná study to sequence *Ehrlichia canis*. The main alterations in iron metabolism were: elevation of serum ferritin concentration observed in infectious diseases (hemoparasitoses and bacterial infections) and neoplastic diseases; decrease in plasma iron concentration in dogs with end-stage cirrhosis and active hemorrhage.

Key words: metabolism of iron; iron deficiency anemia; anemia of inflammatory disease; *Rangelia vitalli*; *Babesia canis vogeli*; *Ehrlichia canis*.

3.1 INTRODUÇÃO

A anemia é um sinal clínico comum nos animais, com diversas causas, geralmente devido à hemorragia, hemólise e/ou hipoplasia/aplasia medular (CHIKAZAWA e DUNNING, 2016; CASTILHO *et al.*, 2016). Não há dados publicados sobre a prevalência da anemia no Brasil. Segundo um levantamento executado por PIRES (2009), 15,9% de todos os hemogramas realizados em pacientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná apresentavam anemia, evidenciando a frequência na rotina clínica veterinária em Curitiba.

A classificação da anemia quanto à resposta da medula óssea é importante para diagnóstico e definir o prognóstico do paciente. Nas anemias não regenerativas, há pouca ou nenhuma liberação de reticulócitos na circulação e conseqüentemente possuem um prognóstico mais reservado (MEDEIROS e LOCATELLI-DITTRICH, 2014).

As anemias mais graves ocorrem em distúrbios primários na medula óssea, como por exemplo na mielofibrose crônica. As anemias leves e moderadas são decorrentes da supressão secundária da medula óssea, como nos casos de anemia da doença inflamatória (ADI). Em animais com distúrbios inflamatórios graves ou portadores de neoplasias, é esperada anemia com gravidade leve a moderada, sendo considerada um problema secundário a tais patologias. Os animais com anemias intensas são intolerantes ao exercício e apresentam sinais clínicos como fraqueza, taquipneia marcante com sopro anêmico, podendo até ocorrer síncope (PIRES, 2009). Um estudo realizado na França por CHERVIER *et al.* (2012) relatou maior ocorrência de anemia em cães diagnosticados com neoplasias e doenças de origem infecciosa. Já um estudo feito na Nigéria pelos pesquisadores USEH *et al.* (2003), detectou maior ocorrência de infestações parasitárias (hemoparasitas e parasitas gastrointestinais).

O metabolismo do ferro é avaliado por meio de análises bioquímicas que mensuram quantitativamente o ferro sérico, sendo transportado ou estocado no organismo. A concentração plasmática do ferro sérico indica a quantidade deste na circulação ligado à transferrina; os valores estão aumentados na anemia hemolítica, sobrecarga de ferro ou administração de

glicocorticoides; e valores diminuídos na anemia ferropriva ou ADI (PIRES *et al.*, 2011; CHIKAZAWA *et al.*, 2013).

Há enfermidades com potencial de promover alteração do metabolismo do ferro, como por exemplo a doença inflamatória e o desvio portossistêmico. No caso da ADI, são diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da anemia: produção de mediadores inflamatórios que inibem a eritropoese, diminuição da meia-vida dos eritrócitos e da resposta da eritropoetina à anemia, além de promover diminuição do ferro sérico com o objetivo de tornar tal mineral indisponível para proliferação de vasos microbianos e células neoplásicas. Já nos desvios portossistêmicos, primário ou adquirido, cerca de metade dos animais apresentam diminuição do ferro sérico e ferritina normal ou aumentada (HARVEY, 2008).

A mensuração e correlação dos parâmetros do ferro também é importante para diferenciar a ADI da anemia ferropriva, como mostra o quadro a seguir, adaptado de CANÇADO e CHIATTONE (2002).

Quadro 1: Diferenciação de ADI e Anemia Ferropriva de acordo com os parâmetros do ferro, adaptado de CANÇADO e CHIATTONE (2002).

	ADI	Anemia Ferropriva
Ferro sérico	Diminuído ou normal	Diminuído
Transferrina	Diminuído ou normal	Aumentado
IST	Diminuído ou normal	Diminuído
Ferritina	Aumentado ou normal	Diminuído

ADI: Anemia da Doença Inflamatória; IST: Índice de Saturação da Transferrina.

Na Medicina Veterinária, há poucas publicações relacionando a causa da anemia com alterações da cinética do ferro e nenhuma publicação brasileira. Tal escassez de informações provavelmente se deve à dificuldade em se estabelecer metodologias e valores referenciais do ferro, conforme mencionado no Capítulo 1. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram diagnosticar as causas de anemias e avaliar o metabolismo do ferro utilizando como referência os parâmetros de ferro sérico, ferritina, transferrina, capacidade de fixação do ferro e capacidade total de ligação do ferro obtidos em cães saudáveis no Capítulo 1; analisar a ocorrência das

anemias e classificar conforme a gravidade, índices hematimétricos, regeneração medular, presença de alterações morfológicas eritrocitárias e resposta leucocitária.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), de acordo com o protocolo número 101/2017 (ANEXO).

3.2.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue de cães provenientes das rotinas clínicas dos Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, My Pets Laboratório Veterinário, localizado na região metropolitana de Curitiba – PR, e do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na cidade de Curitibanos.

Os pacientes foram submetidos à contenção física e as amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular e acondicionadas em frascos estéreis com anticoagulante (EDTA), para realização do hemograma, e frascos estéreis sem anticoagulante, para obtenção do soro. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados e os soros separados em eppendorfs e congelados a -20°C para realização dos parâmetros do ferro. O sangue total foi mantido em refrigeração até a análise, dentro de 12 horas. A extensão sanguínea foi realizada em menos de duas horas pós-coleta.

As amostras de soro com lipemia e hemólise foram descartadas a fim de anular erros pré-analíticos.

Os parâmetros do ferro não puderam ser realizados em todos os animais do estudo, por motivo de amostra insuficiente, lipemia ou hemólise.

3.2.3 Seleção de animais

Foram selecionados para o estudo 219 cães adultos a idosos, ambos os sexos e diferentes raças, e o critério de inclusão foi apresentar anemia (Hematócrito < 37%, segundo TVEDTEN, 2010) oriunda de diversas causas.

O grupo controle foi composto por 43 cães adultos saudáveis (Capítulo 1).

3.2.4 Análises Laboratoriais

3.2.4.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em analisador hematológico automático (Mindray BC 2800 Vet®), para determinação de número de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina e dos índices hematimétricos (VCM e CHCM). A extensão sanguínea foi realizada e corada com Panótico Rápido (Newprov®), e as leituras das lâminas foram realizadas em microscópio óptico em objetiva de 100. O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito e a proteína plasmática total foi determinada por refratometria.

Na extensão sanguínea foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos e contagem de plaquetas (estabelecendo média por campo).

Os índices hematimétricos foram classificados de acordo com os intervalos referenciais estabelecidos por RIZZI *et al.* (2010): Volume Corpuscular Médio (VCM) de 60-77 fl; e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) de 32-36%.

3.2.4.2 Análise do esfregaço sanguíneo e da extensão da capa leucocitária

Na análise dos eritrócitos foi realizada a leitura e avaliação, considerando-se cor, tamanho, forma, distribuição, células precursoras (nucleadas), inclusões nas hemácias, como corpúsculos de Heinz e Howell-Jolly, variações no tamanho (anisocitose, microcitose, macrocitose), cor (policromatofilia e hipocromia). Foi realizada leitura microscópica da lâmina em 10 campos e realizada a média dos valores encontrados; os resultados foram expressos em número por campo.

A análise da morfologia dos eritrócitos foi criteriosa, identificando a poiquilocitose: esquistócitos (fragmentos de hemácias); ceratócitos (fragmentos de hemácias com espículos); acantócitos (hemácias com espículos irregulares); esferócitos (hemácias sem palidez central); excentrócitos (hemácia com desvio de hemoglobina).

A análise da capa leucocitária foi realizada por meio do esfregaço da capa de leucócitos, obtida pela centrifugação do sangue em capilares de microhematócrito. A camada leucocitária foi retirada do capilar, para realizar o esfregaço. A coloração foi com kit Panótico Rápido (Newprov®) e a leitura das lâminas foi em microscópio óptico em objetiva de imersão (100x) avaliando a presença de hemoparasitas.

3.2.4.3 Contagem de reticulócitos e classificação da regeneração da medula óssea

Para contagem de reticulócitos foi utilizado o método de coloração supravital com azul de cresil brilhante: o sangue com EDTA foi misturado com o corante novo azul de metileno (proporção 1:1), incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos e o esfregaço sanguíneo foi realizado. Os reticulócitos são eritrócitos com precipitados em forma de cordões (agregados) ou esparsos (pontilhados). Foram contados os reticulócitos presentes em um total de 1000 hemácias, apresentando o resultado em porcentagem (TVEDTEN, 2010).

A partir do resultado obtido, o grau de resposta medular canina foi classificado segundo TVEDTEN (2010), descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação do grau de resposta medular baseada na porcentagem de reticulócitos em cães, desenvolvida por TVEDTEN (2010).

Grau de resposta medular	Reticulócitos (%)
Não regenerativa	Até 1%
Regenerativa leve	1 – 4%
Regenerativa moderada	5 – 20%
Regenerativa intensa	21 – 50%

Para os animais classificados com anemia não regenerativa foi avaliada a presença de policromatófilos nas lâminas coradas com Panótico Rápido no hemograma inicial e repetido três a cinco dias após, com o intuito de comparar os resultados e confirmar o grau de regeneração medular.

3.2.4.4 Gravidade da anemia

A anemia foi classificada em leve, moderada, grave e muito grave conforme o valor do hematócrito do paciente, segundo TVEDTEN (2010), descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação da gravidade da anemia baseado no valor do hematócrito em cães, desenvolvida por TVEDTEN (2010).

Gravidade da anemia	Hematócrito (%)
Leve	30 – 37%
Moderada	20 – 29%
Grave	13 - 19%
Muito Grave	< 13%

3.2.4.5 Avaliação da resposta leucocitária

A resposta leucocitária foi determinada avaliando o leucograma do paciente e classificada de acordo com REBAR e METZGER (2001) em: inflamações aguda, crônica e grave; e leucogramas de estresse e mediado por catecolaminas, descritos no Quadro 2. A presença de alterações tóxicas em neutrófilos (basofílica citoplasmática, granulação tóxica e corpúsculos de Döhle) foram avaliadas na extensão sanguínea dos pacientes.

Quadro 2: Classificação da resposta leucocitária em cães, adaptado de REBAR e METZGER, 2001.

Resposta leucocitária	Número de Leucócitos Totais (6000 a 17000)	Neutrófilos Segmentados (3000 a 11500)	Neutrófilos Bastonetes (0 a 300)	Linfócitos (1000 a 4800)	Monócitos (150 a 1350)	Eosinófilos (100 a 1250)	Neutrófilos tóxicos
Inflamação Aguda	Aumentado	Aumentado	Aumentado	Diminuído ou normal	Variável	Variável	Presente
Inflamação Crônica	Aumentado ou normal	Aumentado ou normal	Aumentado ou normal	Aumentado ou normal	Variável	Variável	Presente
Inflamação Grave	Diminuído	Diminuído ou normal	Aumentado	Diminuído ou normal	Variável	Variável	Presente
Leucocitose excitatória	Aumentado	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Normal	Ausente
Leucograma de estresse	Aumentado	Aumentado	Normal	Diminuído	Aumentado ou normal	Diminuído	Ausente

3.2.4.6 Análises dos parâmetros do ferro

As metodologias dos exames dos parâmetros do ferro e os respectivos valores referenciais utilizados estão descritos no Capítulo 1.

3.2.5 Sorologia e Biologia Molecular

Foi realizado o diagnóstico de hemoparasitoses em 37 cães no presente estudo. Esses cães foram diagnosticados baseados na presença do parasito intracelular em esfregaço sanguíneo, sorologia ou método molecular. Os cães apresentavam sinais clínicos como anemia e esplenomegalia, além de presença de carrapatos no exame físico ou relatado pelo tutor.

3.2.5.1 Sorologia para *Ehrlichia canis* por Imunofluorescência Indireta

A sorologia para detecção de anticorpos IgG para *Ehrlichia canis* pelo método de imunofluorescência indireta foi realizada em 35 cães anêmicos com suspeita de hemoparasitoses. Os critérios de inclusão para realização da sorologia foram: alterações clínicas, laboratoriais, e em alguns casos evidência dos parasitas no esfregaço sanguíneo ou capa leucocitária.

O antígeno utilizado na reação foi “Cuiabá#1” conforme AGUIAR *et al.* (2007); as amostras de soro dos cães foram diluídas em PBS (solução salina tamponada) partindo-se da diluição inicial de 1:40.

Os exames de anticorpos IgG contra *Ehrlichia canis* foram realizadas no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

3.2.5.2 Sorologia para *Babesia canis* por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

Amostras de soro de sete cães anêmicos com suspeita de hemoparasitas, com os mesmos critérios de inclusão supracitados, foram testadas pelo método de ELISA utilizando o kit comercial: IMUNOTESTE® - BABESIA (ELISA) - CANINO da Immunodot Diagnósticos®, seguindo as instruções do fabricante.

As detecções de anticorpos por ELISA anti-*Babesia canis* foram realizadas no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

3.2.5.3 Snap 4DX Plus

O teste rápido Snap 4DX Plus fabricado pela Idexx® foi o meio diagnóstico utilizado para detectar por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) hemoparasitas em dois cães no presente estudo. Este teste detecta quatro tipos de hemoparasitas: *Ehrlichia sp.*, *Anaplasma sp.*, Doença de Lyme e Dirofilariose.

3.2.5.4 Biologia Molecular

Foram selecionados 33 cães com suspeita de hemoparasitas para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os critérios de inclusão utilizados foram os mesmos para a realização da sorologia. As amostras de sangue com EDTA dos pacientes foram centrifugadas à 3000 rpm por 5 minutos, o plasma foi descartado e o concentrado de hemácias foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA. As análises de PCR para *Babesia sp.* e *Ehrlichia sp.* foram realizadas no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

PCR para *Babesia sp.*

Primeiramente, o DNA genômico foi extraído utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) conforme orientações do fabricante.

A PCR foi realizada utilizando os primers BAB143-167 (CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA) e BAB694-667 (GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG) conforme ALMEIDA (2011), obtendo-se um fragmento de 551 pares de bases do gene 18S rRNA de *Babesia sp.* A reação de amplificação foi realizada com 2,5 microlitros do DNA, 12,5 microlitros de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 microlitro de cada primer e 8 microlitros de água estéril, totalizando 25

microlitros. No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C, 1 minuto a 72 °C, seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os controles positivos e negativos (água Milli-Q®) foram inseridos na PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e examinados por transiluminação UV.

PCR para *Ehrlichia sp.*

O DNA genômico foi extraído conforme descrito acima. As amostras de DNA foram submetidas então, a um protocolo de PCR utilizando os primers dsb330 (GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT) e usb729 (CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT) de acordo com AGUIAR *et al.*, 2007, obtendo-se um fragmento de 409 pares de bases do gene dsb do gênero *Ehrlichia*. A reação de amplificação foi realizada com 2,5 microlitros do DNA, 12,5 microlitros de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 microlitro de cada primer e 8 microlitros de água estéril, totalizando 25 microlitros. No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72 °C, seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os controles positivos e negativos (água Milli-Q®) foram inseridos na PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e examinados por transiluminação UV.

3.2.5.5 Sequenciamento genético

Os produtos da PCR de amostras positivas foram sequenciados. Obteve-se uma amostra positiva para *Ehrlichia sp.*; e seis para *Babesia sp.* O sequenciamento genético da *Babesia sp.* foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT); já a *Ehrlichia sp.* foi sequenciada em laboratório comercial localizado em Botucatu-SP.

3.2.6 Classificação da causa da anemia

As causas da anemia foram determinadas correlacionando dados dos exames: clínico, laboratorial e ultrassonográfico.

O diagnóstico de hemoparasitas foi baseado na sua presença nas células (leucócitos e hemácias) no exame da capa leucocitária, detecção de anticorpos por sorologia pela técnica de imunofluorescência indireta e teste rápido Snap 4DX Plus (Idexx®) ou detecção de antígeno pelo método PCR. Os cães com cinomose foram diagnosticados pela presença de Corpúsculos

de Lentz em esfregaço sanguíneo, ou por detecção de antígeno pelo método de imunocromatografia (Alere®). Os animais com neosporose foram diagnosticados por Imunofluorescência Indireta realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

As doenças endócrinas foram diagnosticadas pela dosagem hormonal sérica por método radioimunoensaio em laboratório comercial. Para o diagnóstico de diabetes mellitus os animais deveriam apresentar concentrações elevadas da glicose e frutamina, além de glicosúria. O hipotireoidismo foi diagnosticado pela dosagem de T4 livre por diálise e o hiperadrenocorticismismo pelo teste de supressão com baixa dose de dexametasona.

As neoplasias foram diagnosticadas pela presença de tumor observado macroscopicamente ou por meio da ultrassonografia, com posterior análise do nódulo por citologia ou histopatologia.

Os cães com insuficiência renal crônica apresentaram níveis elevados de uréia, creatinina e fósforo, além de baixa densidade urinária e alterações morfológicas renais na ultrassonografia.

A hepatopatia foi comprovada por atividade sérica elevada de ALT, AST, fosfatase alcalina e GGT, concentrações baixas de proteínas séricas e alterações ultrassonográficas.

Os cães foram incluídos nos seguintes grupos, conforme o diagnóstico final:

(1) doenças infecciosas (bacteriana, hemoparasitose, cinomose, neosporose); (2) endocrinopatias (hipotireoidismo, hiperadrenocorticismismo, diabetes mellitus); (3) neoplasia; (4) doença renal; (5) doença hepática; (6) doença hemorrágica; (7) doença multifatorial; (8) fisiológica (prenhez); (9) diagnóstico inconclusivo. As anemias multifatoriais foram assim classificadas porque os cães apresentavam duas ou mais causas supracitadas, como por exemplo: neoplasia e doença renal, falência múltipla de órgãos, doença renal e hepática concomitantes, neoplasia e endocrinopatia, endocrinopatia e insuficiência hepática, entre outros.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos 219 cães anêmicos incluídos neste estudo revelou: predomínio de anemia discreta (53,9%); normocítica normocrômica (54,8%); regeneração medular leve (37,9%); presença de poiquilocitose (66,2%); leucograma normal (31,1%); parâmetros do ferro dentro dos limites de referência (80-86%); e diagnóstico de doenças infecciosas (41,1%).

Na análise microscópica do esfregaço sanguíneo foram constatadas alterações da morfologia dos eritrócitos em 66,2% dos animais, enquanto em 33,8% a morfologia eritrocitária estava normal. As principais alterações morfológicas observadas nos animais anêmicos foram: esferócitos, excentrócitos, acantócitos, codócitos, esquistócitos. Esferócitos foram observados em cães com doenças infecciosas, endocrinopatias e neoplasias. Codócitos foram observados no grupo com insuficiência hepática. Excentrócitos estavam presentes em cães com hemoparasitoses e neoplasias. As demais alterações morfológicas encontradas (acantócitos e esquistócitos) predominaram em cães com causa multifatorial.

As inflamações agudas e crônicas foram observadas com mais frequência nos animais pertencentes ao Grupo 1 (doenças infecciosas), Grupo 3 (neoplasias) e Grupo 7 (multifatorial). Houve predomínio do Grupo 1 nas respostas leucocitárias classificadas como graves e, também na leucopenia isolada. O leucograma de stress foi relacionado às causas como hemoparasitose, insuficiência renal, atropelamentos e traumas. A resposta fisiológica por catecolaminas foi observada em animais com insuficiência renal crônica, que foi relacionado com a difícil coleta de sangue nesses animais.

Os resultados detalhados estão descritos nas Tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11; e Quadros 3, 4, 5, 6 e 7, apresentados a seguir.

Tabela 4: Classificação da anemia em 219 cães, de acordo com TVEDTEN (2010).

Anemia discreta	Anemia moderada	Anemia grave	Anemia muito grave
118	75	22	4
53,9%	34,2%	10,1%	1,8%

Tabela 5: Classificação morfológica da anemia em 219 cães anêmicos, de acordo com RIZZI *et al.* (2010).

Normocítica normocrômica	Normocítica hipocrômica	Macroscítica hipocrômica	Microscítica normocrômica	Microscítica hipocrômica
120	57	26	13	3
54,8%	26%	11,9%	5,9%	1,4%

Tabela 6: Classificação da resposta da medula óssea em 219 cães anêmicos, de acordo com TVEDTEN (2010).

Não regenerativa	Regenerativa leve	Regenerativa moderada	Regenerativa intensa
74	83	54	8
33,8%	37,9%	24,7%	3,6%

Tabela 7: Avaliação da presença ou ausência de alterações morfológicas eritrocitárias em 219 cães anêmicos.

Poiquilocitose presente (≥ 5 a 10 por campo/objetiva 1000x)	Poiquilocitose ausente
145	74
66,2%	33,8%

Tabela 8: Classificação da resposta leucocitária em 219 cães anêmicos.

Leucograma normal	Inflamação Aguda	Inflamação Crônica	Inflamação Grave	Leucocitose excitatória Fisiológica	Leucograma de estresse	Leucopenia
68	58	62	6	2	16	7
31,1%	26,5%	28,3%	2,7%	0,9%	7,3%	3,2%

Tabela 9: Avaliação do metabolismo do ferro em 219 cães anêmicos.

	Ferro sérico (N=203)	UIBC (N=197)	Ferritina (N=194)	Transferrina (N=198)	CTLF (N=198)
Normal	162 79,8%	171 86,8%	165 85,1%	166 83,8%	166 83,8%
Alto	31 15,3%	4 2%	26 13,4%	30 15,2%	30 15,2%
Baixo	10 4,9%	22 11,2%	3 1,5%	2 1%	2 1%

UIBC = Capacidade de Fixação do Ferro; CTLF = Capacidade Total de Ligação do Ferro.

Intervalos de Referência: Ferro sérico 28,5 - 267,2 µg/dL; Ferritina 19,4 - 93,5 ng/mL; Transferrina 33,8 - 610,3 mg/dL; UIBC 55,6- 471,8 mg/dL; CTLF 48,3 - 871,8 µg/dL.

Quadro 3: Causas dos achados anormais nos valores do ferro sérico em 219 cães.

↑ Ferro sérico	↓ Ferro sérico
Neosporose	Hemoparasitas
Leptospirose	Peritonite
Piometra	Ruptura esplênica
Pancreatite	Hemorragias (atropelamento; mordedura)
Piodermite	Neoplasia cardíaca
Cinomose	Cirroze
Hiperadrenocorticismo	
Hipotireoidismo	
Diabetes Mellitus	
Neoplasias (testicular; mamária; linfoma)	
Insuficiência renal crônica	
Hepatopatia esteroideal	
Colangiohepatite	

Intervalo de Referência: Ferro sérico 28,5 - 267,2 µg/dL.

Quadro 4: Causas dos achados anormais nos valores da ferritina em 219 cães.

↑ Ferritina	↓ Ferritina
Hemoparasitas	Hepatopatia
Necrose esplênica	
Piodermite	
Piometra	
Hiperadrenocorticismo	
Neoplasias (esplênica; mastocitoma)	
Insuficiência renal crônica	
Colangiohepatite	
Hemorragia (atropelamento)	

Intervalo de Referência: Ferritina 19,4 - 93,5 ng/mL.

Quadro 5: Causas dos achados anormais nos valores da transferrina em 219 cães.

↑ Transferrina	↓ Transferrina
Hemoparasitas	Neoplasia peritoneal
Piometra	Hemorragia (atropelamento)
Peritonite	
Leptospirose	
Pancreatite	
Sialadenite	
Colite	
Piodermite	
Hiperadrenocorticismo	
Neoplasias (carcinoma; hemangiossarcoma; mastocitoma)	
Insuficiência renal crônica	
Hepatopatia	

Intervalo de Referência: Transferrina 33,8 - 610,3 mg/dL.

Quadro 6: Causas dos achados anormais nos valores da capacidade de fixação do ferro em 219 cães.

↑ UIBC	↓ UIBC
Hepatopatia	Piometra
	Leptospirose
	Peritonite
	Insuficiência renal crônica
	Hemorragia (atropelamento)

UIBC = Capacidade de Fixação do Ferro; Intervalo de Referência: UIBC 55,6- 471,8 mg/dL.

Quadro 7: Causas dos achados anormais nos valores da capacidade total de ligação do ferro em 219 cães.

↑ CTLF	↓ CTLF
Hemoparasitas	Neoplasia peritoneal
Piometra	Hemorragia (atropelamento)
Peritonite	
Leptospirose	
Pancreatite	
Sialadenite	
Colite	
Piodermite	
Hiperadrenocorticismo	
Neoplasias (carcinoma; hemangiossarcoma; mastocitoma)	
Insuficiência renal crônica	
Hepatopatia	
Hemorragia (arma de fogo)	

CTLF = Capacidade Total de Ligação do Ferro; Intervalo de Referência: CTLF 48,3 - 871,8 µg/dL.

Tabela 10: Causas de anemia em 219 cães.

DIAGNÓSTICO	N (%)
DOENÇAS INFECCIOSAS	90 (41,1%)
ENDOCRINOPATIAS	7 (3,2%)
NEOPLASIAS	37 (16,9%)
DOENÇA RENAL	22 (10%)
DOENÇA HEPÁTICA	11 (5%)
HEMORRAGIA	11 (5%)
MULTIFATORIAL	30 (13,7%)
FISIOLÓGICO (PRENHEZ)	2 (0,9%)
INDEFINIDO	9 (4,2%)

Tabela 11: Resultado do sequenciamento genético de amostras PCR positivas para hemoparasitas de 7 cães anêmicos.

Hemoparasita	N (%)
<i>Rangelia vitalli</i>	5 (71,4%)
<i>Babesia canis vogeli</i>	1 (14,3%)
<i>Ehrlichia canis</i>	1 (14,3%)

Ao correlacionar os parâmetros do ferro com o diagnóstico da causa da anemia, observamos que em todos os grupos pré-estabelecidos há predomínio de parâmetros dentro do intervalo de referência; quando o ferro sérico está aumentado, consequentemente a transferrina e CTLF possuem valores acima da referência.

Em um estudo realizado na França por CHERVIER *et al.* (2012), com 456 cães anêmicos: 57,9% dos animais desenvolveram anemia leve; 31,1% moderada; 7,5% intensa e 3,5% muito intensa; resultados semelhantes ao presente estudo. CHERVIER *et al.* (2012) observaram anemia leve na maioria dos cães com doenças inflamatórias e portadores de neoplasias, além de associação significativa entre gravidade da anemia e presença de fraqueza. Apesar dos estudos terem sido realizados em locais diferentes, os resultados foram semelhantes pois em ambos os estudos os altos índices de anemia leve e moderada estão diretamente relacionados ao diagnóstico final: origem infecciosa e neoplásica.

Como os sinais clínicos nas anemias leves e moderadas não são tão evidentes como nas anemias mais graves, é necessária a realização do hemograma para identificar tal condição patológica.

Quanto à regeneração da medula óssea frente ao quadro de anemia, pouca ou nenhuma regeneração medular foi observada na maioria (71,7%) dos cães deste estudo. No estudo de CHERVIER *et al.* (2012), houve predomínio de padrão não regenerativo; a anemia regenerativa predominou apenas no grupo de cães diagnosticados com anemia hemolítica. Tais resultados foram evidentes pois os pacientes com ADI apresentam resposta medular inadequada: eritropoese normal ou pouco aumentada e consequentemente liberação de reticulócitos normal ou pouco aumentada. Tal resposta inadequada deve-se principalmente à baixa secreção de eritropoietina, resultando em baixa resposta da medula óssea à eritropoietina e diminuição da eritropoiese, consequente da baixa oferta de ferro. Tais mecanismos são resultantes da liberação de citocinas inflamatórias e ativação de macrófagos (CANÇADO e CHIATTONE, 2002; FRY, 2010; PRICE e SCHRIER, 2010). Pesquisadores italianos realizaram um estudo em 40 cães anêmicos por diferentes causas e constataram que as anemias não regenerativas estavam relacionadas às doenças crônicas e à hemólise que acompanha a fase inicial da babesiose canina; já as anemias regenerativas relacionavam-se principalmente à hemólise, em alguns casos sendo imunomediada (PALTRINIERI *et al.*, 2000).

No presente estudo foi constatada prevalência de 37,8% de anemia com resposta medular leve em cães portadores de neoplasias. Pacientes com neoplasias podem apresentar anemia devido à diversos fatores relacionados à doença e ao tratamento, sendo os principais: hemorragia aguda ou crônica, função renal prejudicada resultando em diminuição da produção de eritropoietina, deficiências nutricionais, hemólise imunomediada secundária, infiltração neoplásica na medula óssea, ADI e quimioterapia mielossupressora (FRY, 2010). Em um trabalho publicado por SILVA *et al.* (2014), avaliando características do hemograma em cadelas com neoplasia mamária, os autores constataram prevalência de anemia não regenerativa, que está correlacionada positivamente com a progressão da doença. Porém o método utilizado foi contagem de policromatófilos, diferente do método utilizado no presente estudo, o que explica a divergência dos resultados.

Para avaliação da resposta da medula óssea, recomenda-se a contagem de reticulócitos e não apenas a avaliação de presença de policromatófilos; neste estudo a policromatofilia foi avaliada apenas nos casos de ausência de regeneração na contagem de reticulócitos, cerca de 3 a 5 dias após, com a finalidade de confirmar a resposta medular. Um estudo realizado por MEDEIROS e LOCATELLI-DITTRICH (2014) constatou que a contagem de policromatófilos tem grande valor diagnóstico na diferenciação das anemias não regenerativas de regenerativas,

contudo, não é possível classificar de acordo com a intensidade de regeneração e associar ao número de reticulócitos.

A alteração da morfologia dos eritrócitos foi observada em 66,2% dos animais incluídos neste estudo (esferócitos, acantócitos, excentrócitos, esquistócitos e ceratócitos). CALDIN *et al.* (2005) realizaram um estudo retrospectivo na Itália, avaliando a presença de excentrócitos em cães; tal alteração morfológica foi encontrada em 1,4% dos animais e em 66,6% dos casos estava associada à anemia leve a moderada; a principal causa observada foi administração de medicamentos, mas também foi observado em casos de cetoacidose diabética, linfoma e infecções graves. SARANIYA *et al.* (2015) pesquisaram as alterações morfológicas e celulares que ocorrem na anemia desencadeada pela doença renal em cães: 25,58% dos animais apresentaram esferócitos, 13,95% equinócitos, 9,3% acantócitos, 9,3 % esquizócitos. Tais alterações foram similares às encontradas no presente estudo.

A alteração morfológica dos eritrócitos mais comumente encontrada no grupo de doenças infecciosas foram esferócitos e excentrócitos. Na análise da morfologia eritrocitária em pacientes com ADI, observa-se discreta poiquilocitose, podendo apresentar também discreta microcitose (CANÇADO e CHIATTONE, 2002). Um exemplo de alteração morfológica eritrocitária que podemos observar em casos de infecções graves são os excentrócitos (BARGER, 2010). Segundo CHIKAZAWA e DUNNING (2016), no esfregaço sanguíneo de cães com ADI, as alterações morfológicas dos eritrócitos mais comumente observada são: ceratócitos e esquizócitos. Já um estudo realizado por HARRINGTON *et al.* (2008) observou número elevado de alteração eritrocitária considerada incomum, denominada prequeratócito na anemia ferropriva em humanos; prequeratócitos são hemácias que apresentam palidez central e possuem um ou mais vacúolos bem definidos abaixo da membrana. Tal alteração não foi documentada em cães.

Avaliar e identificar as alterações morfológicas eritrocitárias é importante para sugerir determinados diagnósticos.

Neste estudo, as causas que se destacaram foram as de origem infecciosa e neoplásica. Em um estudo retrospectivo realizado na Nigéria, USEH *et al.* (2003) observaram que a maioria dos animais anêmicos apresentavam infestações parasitárias (parasitas gastrointestinais e hemoparasitas). No presente estudo houve alta incidência de cães com hemoparasitas, porém não foi relatada anemia causada por parasitas gastrointestinais. Esta divergência de resultados

pode estar relacionada com a falta de programas de conscientização e controle parasitário na Nigéria, o que torna os animais mais susceptíveis.

No grupo 1 (Doenças Infecciosas) 3,9% dos cães apresentaram ferro sérico abaixo do limite referencial, sendo causados pela presença de hemoparasitas (*Ehrlichia sp.* e *Anaplasma platys*) e peritonite. O valor da ferritina estava aumentado em 18,9% dos cães, sendo 71,4% decorrentes de hemoparasitas (*Ehrlichia sp.*, *Babesia sp.* e *Anaplasma platys*) e 28,6% de infecções bacterianas (piodermite, piometra e necrose esplênica); os maiores valores encontrados foram 726,8 ng/mL e 635,5 ng/mL em pacientes diagnosticados com *Babesia sp.* e piometra, respectivamente.

Nos cães diagnosticados com hemoparasitas, 44,4% dos pacientes foram positivos para *Babesia sp.*, 38,9% foram positivos para *Ehrlichia sp.*, 16,7% foram positivos para *Anaplasma platys* e 5,6% positivos para *Dirofilaria immitis*. Entre estes animais, observou-se infecções concomitantes em três pacientes: dois cães estavam infectados por *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.*; um cão estava infectado por *Ehrlichia sp.* e *Dirofilaria immitis*. Todos os cães positivos na sorologia foram positivos no PCR, entretanto alguns animais positivos no PCR não apresentaram títulos de anticorpos IgG na sorologia, indicando que a detecção do antígeno na amostra é soberana a avaliação de anticorpos IgG, uma vez que são anticorpos que indicam infecção crônica, portanto podem não terem sido produzidos pelo organismo do paciente até então.

No sequenciamento genético realizado em 6 cães com PCR positivo para *Babesia sp.*, 5 cães obtiveram sequenciamento 100% compatível com *Rangelia vitalli* (GGCGTTTATTAGTTTTAAACCTCCATTTGGTTTGGTGATTTCATAATAACATGCG AATCGCTTTGGCGATGTTCCATTCAAGTTTCTGCCCATCAGCTTGACGGTAGGGT ATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAG AGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATT ACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCAATAG TCTTGTAATTGGAATGATGCCGATTTAAAATTCCGGCAGAGTACCAATTGGAGGG CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTAGCGATTCTGTCATTATAACCATGT G) e em um cão obteve-se sequenciamento 100% compatível com *Babesia canis vogeli* (AAACCCGCCTTGGCTTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGCGAATCGCATTTAGCGA TGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGA GGCAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGA

GACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC
 ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTAATGTCTTGTAATTGGA
 ATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTGCAGTTAA
 AAAGCTCGTAGTTGAATTTTAGCGTGTTTCGAGTTTGCCATTCGTTTGGCTTTTTTCG
 AGTTCGCTTTTTGGGTTTTCCCTT). O único produto da PCR sequenciado positivo para
Ehrlichia sp. apresentou compatibilidade de 100% com *Ehrlichia canis*
 (AAAGTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATA
 GACTTCTATTATGCAGCACTACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATAT
 TAAGTATCATAAAATCAATAGGTATAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGC
 AAAAAATGCTGATGCTATAGACAAAATGATACAATCTACCAGAGAACTAGCACA
 GAACATTAATATAAGGGGCACTCCTGCTATC).

Estudos prévios realizados no Paraná utilizando a técnica de PCR detectaram *Ehrlichia sp.* na região norte do estado (DAGNONE *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012) e apenas um estudo realizou o sequenciamento genético do patógeno, obtendo 100% de compatibilidade com *Ehrlichia canis* (SILVA, 2017). Este foi o segundo estudo no Paraná a sequenciar *Ehrlichia canis* na região de Curitiba.

No presente estudo, dos seis cães em que foi realizado o sequenciamento genético de amostras positivas para *Babesia sp.*, obteve-se em cinco amostras 100% de identidade para *Rangelia vitalli* e uma amostra apresentou 100% de compatibilidade com *Babesia canis vogeli*. Tais hemoparasitas não possuem características morfológicas que os difiram entre si, portanto o PCR seguido do sequenciamento genético é a única forma de diferenciarmos as espécies (LEMOS *et al.*, 2012).

No estado do Paraná, a rangelirose foi relatada em um cão proveniente de Campo Largo e outro cão de Curitiba por diagnóstico molecular (MONGRUEL *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018); um cão de Tijucas do Sul por diagnóstico histopatológico (SOUSA e LEITE, 2011). Estes resultados comprovam a alta incidência do parasita em cães no Paraná.

A *Babesia canis vogeli* foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2005 no estado de Minas Gerais (PASSOS *et al.*, 2014). No Paraná há publicações de cães infectados nas cidades de Pato Branco (RIBEIRO *et al.*, 2017) e Guarapuava (MONGRUEL *et al.*, 2017). É importante ressaltar que o presente estudo foi o primeiro a relatar a ocorrência do hemoparasita em Curitiba.

Neste estudo observamos co-infecção por múltiplos agentes em dois cães. O diagnóstico de co-infecções é difícil de se realizar sem utilização de testes altamente sensíveis como a PCR (IRWIN, 2005). Co-infecções entre *E. canis* e outros hemoparasitas, como *Babesia sp.*, *Hepatozoon sp.* e *Mycoplasma haemocanis* em cães já foram previamente descritas (BORING *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014).

Alguns parasitas intracelulares podem ser observados na análise do esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido, como mostram as figuras 6 a 11.

Figura 6: Presença de *Rangelia vitalli* (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.

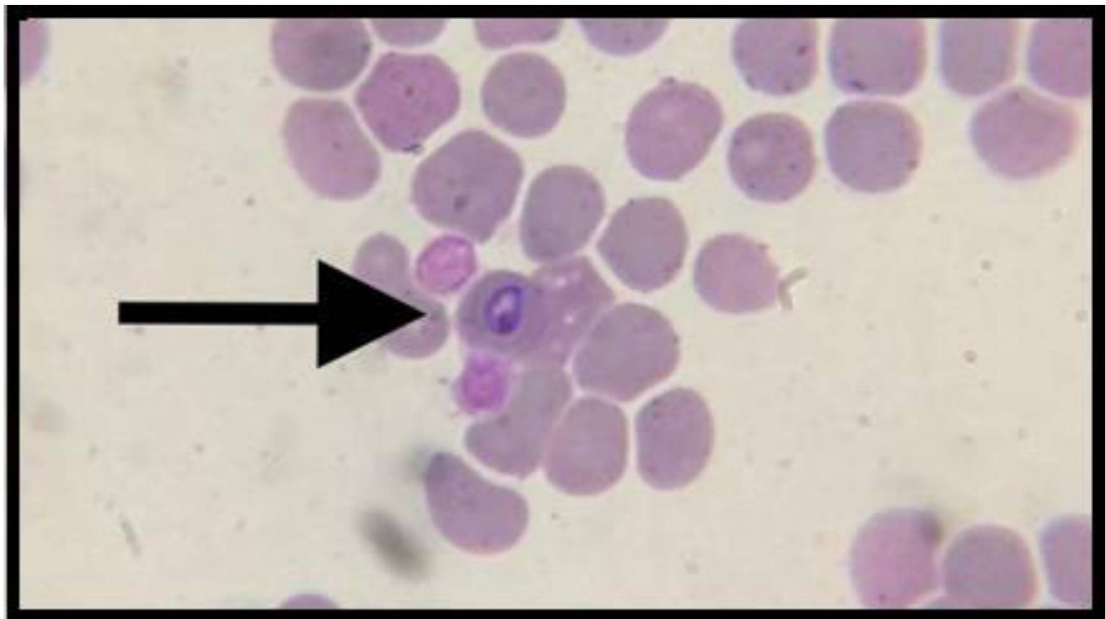


Figura 7: Presença de *Rangelia vitalli* (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.

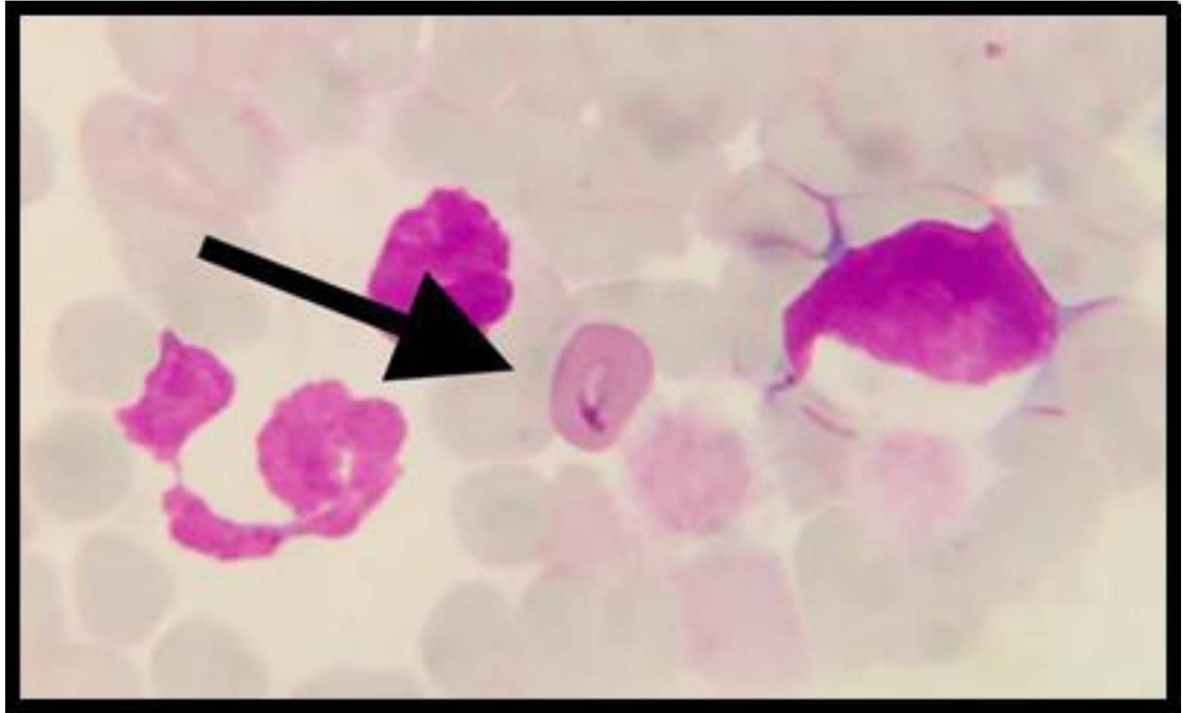


Figura 8: Presença de *Rangelia vitalli* (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.

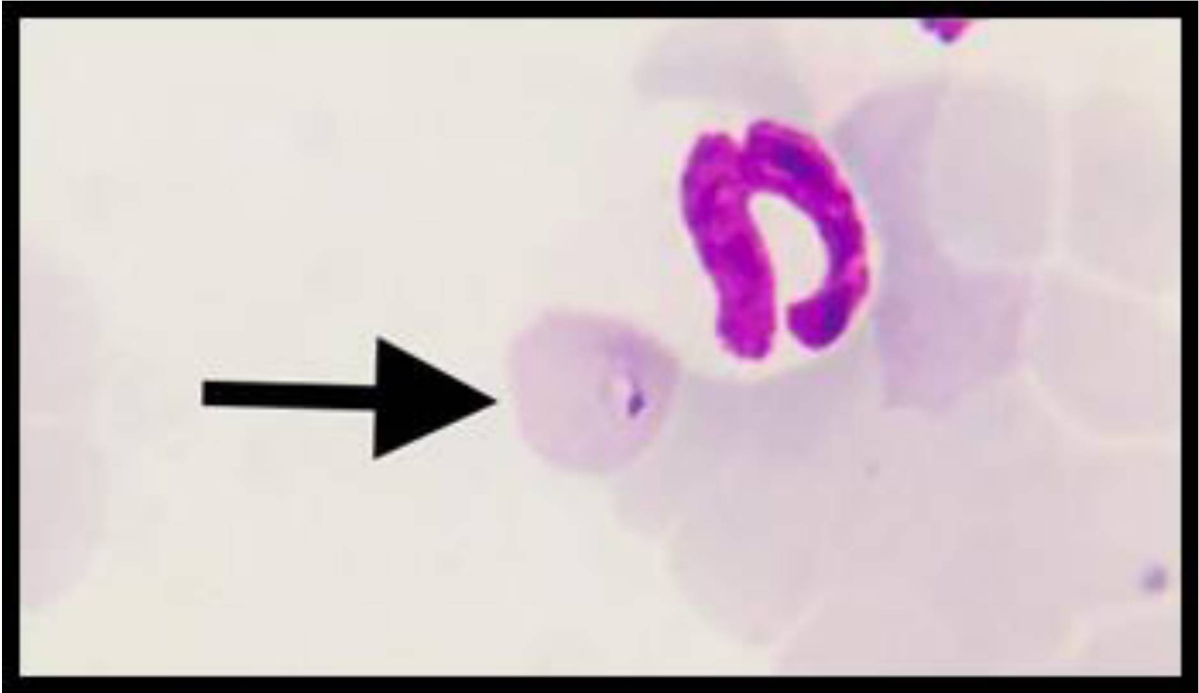


Figura 9: Presença de *Rangelia vitalli* (seta) no interior de hemácia em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.

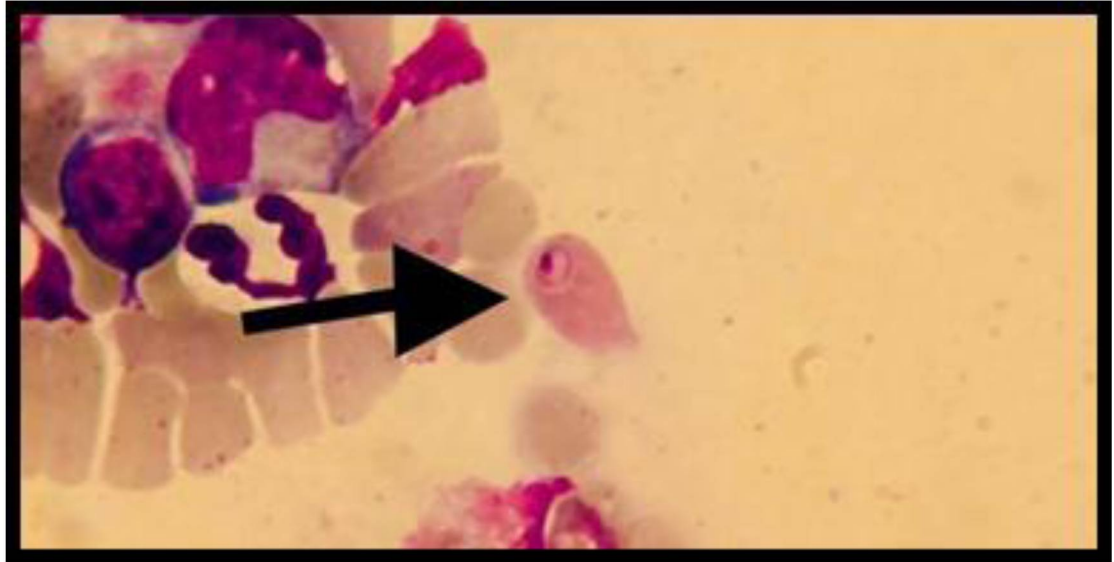
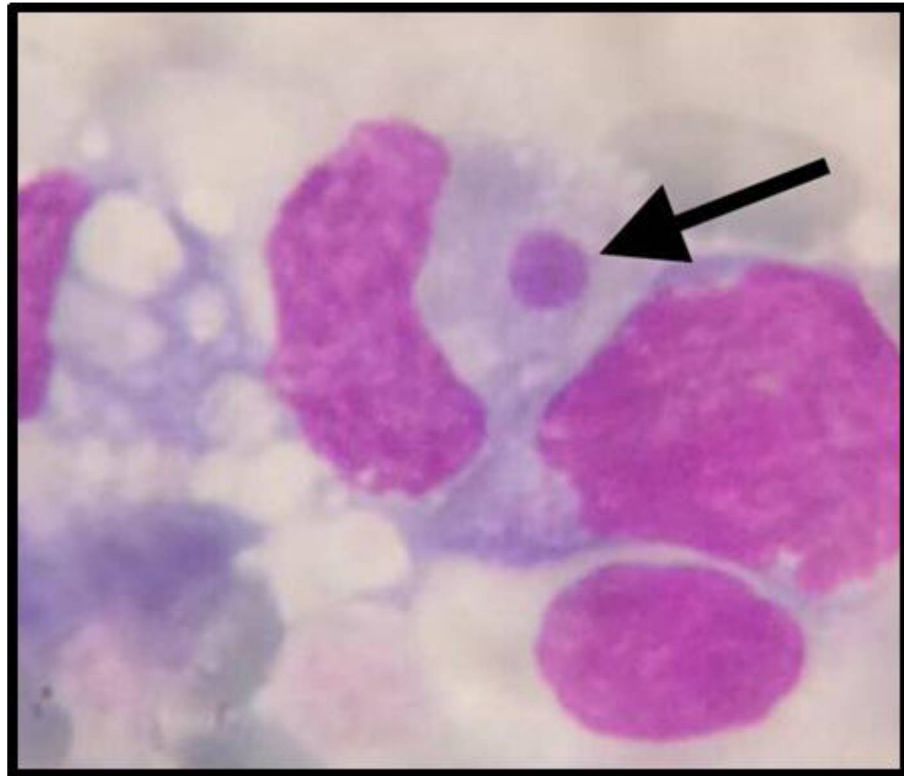


Figura 10: Presença de *Dirofilaria sp.* em esfregaço sanguíneo em cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.



Figura 11: Presença de *Ehrlichia canis* (seta) em monócito em esfregaço sanguíneo de cão. Microscopia de imersão (1000x). Coloração de Romanowsky.



O grupo 2, representado pelas doenças endócrinas, evidenciou aumento da ferritina em apenas um cão com hiperadrenocorticismo (526 ng/mL), este paciente também apresentava ferro pouco acima do limite superior (279,4 µg/dL) acompanhado de aumento expressivo da transferrina e CTLF (4007,37 mg/dL e 5724,08 µg/dL, respectivamente). Nos cães diagnosticados com hipotireoidismo e diabetes mellitus, os parâmetros do ferro apresentaram-se normais, ocasionalmente com ferro sérico, transferrina e CTLF pouco acima do limite superior.

No grupo 3, representado por cães diagnosticados com neoplasias de diversas origens, 8,8% apresentaram aumento discreto da ferritina (97,2 a 164,0 ng/mL) em casos de neoplasias hepáticas, esplênicas e mastocitoma cutâneo. O ferro sérico apresentou-se aumentado (297,4 a 352,8 µg/dL) em 8,1% dos cães e os diagnósticos relacionados foram neoplasias testicular e mamária, além de linfoma. Os valores da transferrina e CTLF estavam acima do limite superior

em 8,3% dos pacientes, que foram diagnosticados com carcinoma indiferenciado, hemangioossarcoma esplênico e cutâneo, e mastocitoma cutâneo.

No grupo 4 (cães com insuficiência renal crônica), 13,6 % dos animais apresentaram ferro sérico acima do limite superior, sendo 10% acompanhado de aumento de transferrina e CTLF. Apenas um cão apresentou valor de ferritina pouco elevado (158,8 ng/mL).

No grupo 5 representado por cães com doença hepática, o ferro sérico estava elevado em 36,4% e diminuído em 18,2%; os animais com cirrose em estágio terminal apresentaram baixas concentrações séricas de ferro, variando de 12,9 a 17,5 µg/dL. A ferritina estava elevada (243,5 ng/mL) apenas em um caso de colangiohepatite, tal aumento possivelmente fosse devido à causa inflamatória e não à hepatopatia. A transferrina e CTLF acompanharam a elevação do ferro sérico em todos os casos, sendo a maior concentração obtida de transferrina 1264,94 mg/dL e da CTLF 1807,0 µg/dL.

O grupo 6 (anemias hemorrágicas) evidenciou 27,3% dos cães com ferro sérico abaixo do limite referencial (7,6 a 22,9 µg/dL), sendo as causas relacionadas à ruptura esplênica, brigas com outros cães e atropelamento recentes; estes mesmos animais consequentemente também tiveram seus níveis séricos de transferrina e CTLF abaixo do valor de referência. Apenas um paciente atropelado recentemente apresentou ferritina levemente aumentada (99,1 ng/mL). Um cão com hemorragia devido à arma de fogo revelou níveis elevados de transferrina e CTLF (775,07 mg/dL e 1107,2 µg/dL, respectivamente).

No grupo 7 foram incluídos os cães com causas multifatoriais, os quais 6,7% apresentaram níveis séricos elevados de ferro, e apenas um animal revelou concentração muito baixa de ferro sérico (3,2 µg/dL). Este cão foi diagnosticado com cirrose em estágio terminal e neoplasia mamária. A concentração sérica de ferritina estava aumentada em 6,9% dos animais, variando de 129,9 a 480,9 µg/dL; o cão que apresentou ferritina 129,9 ng/mL era portador de hemangioossarcoma esplênico associado ao hipotireoidismo, já a concentração de ferritina de 480,9 ng/mL foi encontrada em cão com diabetes mellitus associada à insuficiência hepática. Os valores de transferrina e CTLF mostraram-se aumentados em 13,3% dos casos; um cão com neoplasias (carcinoma intestinal e mastocitoma cutâneo) associado à pancreatite apresentou 1293,55 mg/dL de transferrina e 1847,9 µg/dL de CTLF; um paciente com insuficiência renal crônica, insuficiência hepática e hemocultura positiva para *Pseudomonas aeruginosa* evidenciou 3042,14 mg/dL de transferrina e 4345,9 µg/dL de CTLF.

O grupo 8 representado por apenas duas cadelas com anemia de origem fisiológica relacionada à prenhez, apresentou níveis normais do metabolismo do ferro, exceto pela ferritina pouco elevada (103 ng/mL) em uma das pacientes.

No grupo 9 (anêmicos com causas indefinidas) observou-se ferro sérico abaixo do limite inferior (17,1 µg/dL) em apenas um dos cães. A ferritina sérica estava aumentada em 33,3% dos cães (106,2 a 133,3 ng/mL), os quais suspeitava-se de presença de hemoparasitas, que não foram comprovadas por exames específicos como sorologia ou PCR.

No presente estudo 5 cães foram diagnosticados com hemangiossarcoma esplênico e apenas 2 animais apresentaram aumento discreto na ferritina sérica, pelo método turbidimétrico. CHIKAZAWA *et al.* (2013) constataram concentrações séricas de ferritina elevadas em cães com massas esplênicas, por método ELISA sanduíche. Todos os pacientes (11 cães) com hemangiossarcoma em estágios avançados apresentaram hiperferritinemia, provavelmente causada por inflamação ou liberação de ferritina a partir do tecido tumoral friável. Tal divergência de resultados pode ser explicada pela diferença de metodologia utilizada na mensuração da ferritina e também pelo estadiamento neoplásico.

Neste estudo apenas dois cães apresentaram anemia devido à enteropatia inflamatória e o valor do ferro sérico apresentou-se dentro dos parâmetros referenciais. MARCHETTI *et al.* (2010) avaliaram o ferro sérico de 22 cães com enteropatia crônica. Houve correlação estatisticamente significativa entre o aumento da concentração sérica de ferro pós tratamento da patologia, entretanto o ferro apresentou média dentro dos valores referenciais pré e pós tratamento. Tais resultados nos faz supor que a diminuição dos índices séricos do ferro associada à enteropatia está relacionada com a presença de episódios hemorrágicos crônicos.

TORRENTE *et al.* (2015) analisaram o ferro sérico em 96 cães em sepse ou reação inflamatória focal e concluíram que os animais em sepse tinham concentrações significativamente mais baixas do íon quando comparados aos pacientes com inflamação focal. No presente estudo, tal diferença não foi constatada.

3.4 CONCLUSÃO

Nos cães anêmicos houve predomínio de anemia discreta, normocítica e normocrômica, regeneração medular leve, presença de poiquilocitose, leucograma normal e valores normais dos parâmetros do ferro.

As causas prevalentes foram doenças infecciosas e neoplásicas, e foi observado aumento de ferritina sérica em alguns cães pertencentes a estes grupos.

O ferro apresentou concentrações plasmáticas abaixo do valor referencial em animais com hemorragia ativa e cirrose em estágio terminal.

Entre os cães com anemia com origem infecciosa, foram diagnosticados os hemoparasitas *Rangelia vitalli*, *Babesia canis vogeli* e *Ehrlichia canis*. Este foi o primeiro estudo a relatar *Babesia canis vogeli* em Curitiba e o segundo estudo a relatar *Ehrlichia canis* no estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ALMEIDA, A.P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 80 p. Dissertação de Mestrado.
- BARGER, A.M. Erythrocyte morphology. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- BORING, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- CALDIN, M.; CARLI, E.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGU, L.; TASCIA, S.; PATRON, C.; LUBAS, G. 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 doença crônica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.
- CASTILHO, R.C.; LIMA, M.O.; CRUZ, M.F.R.; MARQUEZ, E.S.; CALDERÓN, C. Anemia hemolítica imunomediada em cães. **Sci. Elec. Arch.** v. 9, n.5, 2016.
- CHERVIER, C.; CADERÉ, J.L.; RODRIGUEZ-PIÑEIRO, M.I.; DEPUTTE, B.L.; CHABANNE, L. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. **J Small Anim Pract**, v. 53, p. 223-227, 2012.
- CHIKAZAWA, S.; NAKAZAWA, T.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. **J. Vet. Med. Sci**, v. 75, n. 11, p. 1419-1426, 2013.
- CHIKAZAWA, S.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; HIGUCHI, S. Hyperferritinemia in Dogs with Splenic Hemangiosarcoma. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 75, n. 11, p. 1515-1518, 2013.
- CHIKAZAWA, S.; DUNNING, M. D. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. **J Small Anim Pract**, v. 57, p. 348-353, 2016.
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet Parasitol**, v. 117, p. 285-290, 2003.
- FRY, M.M. Anemia of inflammatory, neoplastic, renal and endocrine diseases. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 246-250 p.

- GONÇALVES, L. R.; FILGUEIRA, K. D.; AHID, S. M. M.; PEREIRA, J. S.; VALE, A. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Study on coinfecting vectorborne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.
- HARRINGTON, A.M.; WARD, P.C.J.; KROFT, S.H. Iron deficiency anemia, β -thalassemia minor, and anemia of chronic disease. **American Society for Clinical Pathology**, v.129, p. 466-471, 2008.
- IRWIN, P. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: SHAW, S. E.; DAY, M. J. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Manson Publishing**, Barcelona, p. 63-77, 2005.
- LEMO, T. D.; CERQUEIRA, A. M.; TOMA, H. K.; SILVA, A. V.; CORREA, R. G.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, p. 137-142, 2012.
- MARCHETTI, V.; LUBAS, G.; LOMBARDO, A.; CORAZZA, M.; GUIDI, G.; CARDINI, G. Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p.1-5, 2010.
- MOREIRA, M. V. L.; GUIMARÃES, L. B.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; ECCO, R. Infecção por *Rangelia vitalli* em um cão em Minas Gerais. **Arch Vet Sci**, v. 18, n. 2, p. 637-639, 2013.
- HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6th ed. Missouri: Saunders, 2008. p. 259-285.
- MEDEIROS, N.C; DITTRICH, R.L. Número de policromatófilos na diferenciação das anemias não regenerativas de regenerativas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2501-2506, 2014.
- MONGRUEL, A. C. B.; SOUSA, M. G.; VALENTE, J. D. M.; BARBOSA, I. C.; SPANHOL, V. C.; SEZYSHTA, A.; WEBER, L. F. S.; STEDILE, S. T. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First report of *Rangelia vitalli* in a dog from Parana State, **Southern Brazil**. **Arch Vet Sci**, v. 22, n. 4, p. 139-144, 2017.
- MONGRUEL, A.C.B.; IKEDA, P.; SOUSA, K.C.M.; BENEVENUTE, J.L.; FALBO, M.K.; MACHADO, R.Z.; CARRASCO, A.O.T.; ANDRÉ, M.R.; SEKI, M.C. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 505-513, 2018.
- PALTRINIERI, S.; COMAZZI, S.; AGNES, F. Haematological Parameters and Altered Erythrocyte Metabolism in Anaemic Dogs. **J. Comp. Path.**, v. 122, p. 25-34, 2000.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.
- PIRES, L.S.A. **Determinação dos parâmetros do ferro em cães sadios e anêmicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 102p. Dissertação de Mestrado.

PIRES, L.S.A.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOUZA, A.C.; BERTOL, M.A.F.; PATRICIO, L.F.L. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, v. 41, n.2, p. 272-277, 2011.

PRICE, E.A.; SCHRIER, S.L. Unexplained Aspects of Anemia of Inflammation. **Advances in Hematology**, v. 2010, p.1-5, 2010.

RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C.; AZZOLLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 2, p.129-136, 2017.

SARANIYA, H.; CHHABRA, S.; SANDHU, B.S.; BANSAL, B.K. Morphological and cellular changes occurring in anemia associated with chronic renal failure in dogs. **J Vet Sci Med Diagn**, v. 4, n. 5, p. 1 – 3, 2015.

SILVA, G. C. F; BENITEZ, A. N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal**, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, A.H.C.; DA SILVA, D.M.; RIBAS, C.R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; DORNBUSCH, P. T.; GUÉRIOS, S.D. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 87-92, 2014.

SILVA, B.R. **Agentes transmitidos por carrapatos e fauna ixodídica em cães do estado do Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2017. 104p. Dissertação de Mestrado.

SILVA, B.R.; FERREIRA, M.F.K.; MAFFEZZOLLI, G.; KOCH, M.O.; BELTRAME, O.C.; TAQUES, I.I.G.G.; CAMPOS, A.N.S.; AGUIAR, D.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Detection molecular of *Rangelia vitalli* in dogs from Parana State, Southern Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, (ahead of print), p. 1-5, 2018.

SOUSA, R. S.; LEITE, N. C. *Rangelia vitalli* em um cão no estado do Paraná- Brasil: relato de caso. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 15., Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 1., 2011. Goiânia, **Anais Goiânia: ENAPAVE**, 2011.

TORRENTE, C.; MANZANILLA, E.G.; BOSCH, L.; FRESNO, L.; DEL ALAMO, M.R.; ANDALUZ, A.; SACO, Y. GOPEGUI, R.R. Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 25, n. 5, p. 611-619, 2015.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 152-161 p.

USEH, N.M.; OLADELE, S.B.; ADAMU, S.; IBRAHIM, N.D.G.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N. Aetiology and prevalence of canine anaemia in Zaria: a review of 2139 cases observed at the Veterinary Teaching Hospital of the Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria (1990-2003). **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 150 – 154, 2003.

5 Capítulo 3: DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM CÃES

RESUMO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é considerada a principal causa de anemia hemolítica em cães americanos. No Brasil, as causas de anemia hemolítica são pouco estudadas na Medicina Veterinária; os poucos artigos publicados focam em casos individuais, demonstrando a necessidade de estudos clínicos controlados. O Teste de Coombs é o método mais utilizado para diagnosticar a enfermidade, porém, nos laboratórios brasileiros não é realizado rotineiramente por necessitar da importação do reagente espécie-específico, tornando o custo inviável. Esta técnica consiste na detecção de imunoglobulinas presentes na superfície eritrocitária, resultando em aglutinação nas reações positivas. Possui alta especificidade (90-100%) e sensibilidade em torno de 60%. Os objetivos desse estudo foram diagnosticar a AHIM pelo Teste de Coombs, por microtitulação em microplacas, com soro polivalente (MP Biomedicals®) e determinar a taxa de mortalidade dos animais positivos. Foram incluídos no estudo 17 cães com anemia, icterícia e esferocitose e estes fatores foram avaliados quanto ao prognóstico do animal. Os cães com resultado positivo no Teste de Coombs apresentaram predominantemente anemia moderada (Ht 20-29%); regeneração medular leve (1 a 4% de reticulócitos) e resposta leucocitária aguda. A taxa de mortalidade detectada foi 62,5%, demonstrando um prognóstico ruim.

Palavras-chave: teste de antiglobulina; microtitulação; esferocitose, reagente polivalente.

ABSTRACT

Immune-mediated hemolytic anemia (AHIM) is considered the most common cause of hemolytic anemia in American dogs. In Brazil, the causes of hemolytic anemia are little studied in Veterinary Medicine; the few articles published focus on individual cases, demonstrating the need for controlled clinical trials. Coombs test is the most used method to diagnose the disease, but in Brazilian laboratories it is not performed routinely because it requires the importation of the species-specific reagent, making the cost unfeasible. This technique consists the detection of immunoglobulins present on the erythrocyte surface, resulting in agglutination in the positive reactions. It has high specificity (90-100%) and sensitivity around 60%. The objectives of this study were to diagnose AHIM through Coombs test, by microtiter on microplates, with polyvalent serum (MP Biomedicals®) and to determine the mortality rate of positive animals. The study included 17 dogs with anemia, jaundice and spherocytosis and these factors were evaluated for the prognosis of the animal. Dogs with positive results in the Coombs test presented predominantly moderate anemia (Ht 20-29%); mild spinal regeneration (1 to 4% of reticulocytes) and acute leukocyte response. The mortality rate detected was 62,5%, demonstrating a poor prognosis.

Key words: antiglobulin test; microtiter; spherocytosis, polyvalent reagent.

4.1 INTRODUÇÃO

As hemácias, também denominadas glóbulos vermelhos ou eritrócitos, possuem uma membrana flexível e permeável, composta por proteínas, lipídeos e carboidratos. Anormalidades na membrana principalmente envolvendo os lipídeos (colesterol e fosfolipídeos), podem resultar em alterações no formato celular. As proteínas da membrana formam o citoesqueleto e são responsáveis pela forma e integridade da célula. A função dos glóbulos vermelhos é carrear a hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e transporte de CO₂ dos tecidos para os pulmões (KERR, 2003; THRALL, 2015).

A hemólise é um processo fisiológico de destruição dos eritrócitos pelas células do Sistema Monocítico-Fagocitário. Certas enfermidades resultam no aumento da taxa de destruição dos eritrócitos, ocasionando queda de sua meia vida na circulação sanguínea. A destruição acelerada das hemácias pode ser causada por hemólise intravascular ou extravascular. Na hemólise intravascular, as hemácias são destruídas no interior dos vasos sanguíneos, com liberação de hemoglobina livre no plasma. Na hemólise extravascular, os eritrócitos apresentam anormalidades em sua superfície e são retirados da circulação pelas células do Sistema Monocítico-Fagocitário. (FIGHERA, 2007; THRALL, 2015).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é o resultado da diminuição da meia vida eritrocitária, mediada por ativação do sistema complemento e/ou imunoglobulinas; tal processo resulta de uma reação de hipersensibilidade do tipo II, causando citotoxicidade mediada por anticorpos. A hemólise autoimune é a causa mais comum de anemia hemolítica em cães e geralmente caracteriza-se por uma anemia regenerativa intensa, contudo em alguns casos a anemia tem características não regenerativas, pela formação de anticorpos contra os precursores eritróides. A causa geralmente não é identificada, podendo estar relacionada com doenças, como neoplasias, infecções, distúrbios imunomediados e vacinas com vírus vivo modificado. Nos achados laboratoriais, observa-se evidência de hemoglobinúria e hemoglobinemia, autoaglutinação, esferocitose, hemácias “fantasmas”, corpúsculos de Heinz, pontilhado basofílico, teste de Coombs positivo, e raramente macrófagos com hemossiderina ou eritrofagocitose (FIGHERA, 2007; THRALL, 2015; CASTILHO *et al.*, 2016).

A AHIM pode ser classificada conforme a classe de imunoglobulinas envolvidas em: I, II, III, IV e V. A classe I envolve auto-anticorpos que aglutinam as hemácias à temperatura

corpórea, as principais imunoglobulinas envolvidas são IgM e IgG e a fagocitose eritrocitária ocorre principalmente no baço. Na classe II, os anticorpos IgM ativam o complemento, causando a hemólise intravascular. A classe III é mediada por anticorpos IgG1 e IgG4 que se ligam às hemácias à 37°C, porém sem causar aglutinação ou ativar o sistema complemento; tais hemácias serão opsonizadas e removidas por macrófagos derivados do baço, sendo a esplenomegalia um achado muito comum desta classe. Os anticorpos da classe IV são chamados de aglutininas frias, pois não conseguem aglutinar os eritrócitos em temperatura corpórea, apenas quando o sangue é resfriado entre 10°C e 4°C; tal fenômeno pode provocar estase vascular nas extremidades e conseqüentemente isquemia tecidual e necrose. A classe V envolve imunoglobulinas IgM que se ligam às hemácias na temperatura de 4°C, entretanto não causam aglutinação ou necrose nas extremidades, mas podem ativar o sistema complemento e resultar em hemólise intravascular (CASTILHO *et al.*, 2016).

O teste de Coombs, também chamado de teste antiglobulina, foi introduzido pelo médico Robin Coombs em 1945, com o intuito de identificar auto-anticorpos eritrocitários presentes na AHIM, reações hemolíticas transfusionais e isoeritrólise neonatal. O teste de antiglobulina direta, dependendo do soro antiglobulina utilizado (polivalente ou monovalente), detecta imunoglobulina, complemento ou ambos, ligados à membrana dos eritrócitos (WARDROP, 2005; WARDROP, 2012; CAVIEZEL *et al.*, 2014).

Há diversas metodologias disponíveis para o teste da antiglobulina, sendo o método de microtitulação o mais utilizado. É um teste com alta especificidade, mas com sensibilidade em torno de 60%, portanto podem ocorrer resultados falso negativos, devido à pouca quantidade detectável de anticorpos ou do efeito pró-zona, que é o excesso relativo de antiglobulina em relação ao antígeno proveniente de erros de pipetagem. Falsos positivos ocorrem com menos frequência por ligações não-específicas dos anticorpos, devido a altas concentrações plasmáticas de globulinas (MORAES *et al.*, 2017). A técnica consiste em lavagens repetidas das hemácias em solução fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS), para eliminar as proteínas livres e garantir que os eritrócitos permaneçam separados uns dos outros; após o término das lavagens, adiciona-se a antiglobulina espécie-específica (em diferentes diluições) à solução; a amostra é incubada e posteriormente avaliada conforme o grau de aglutinação. Há também a técnica enzimática, que é semelhante à microtitulação, porém, ao final, o sobrenadante é avaliado por espectrofotometria. A técnica por citometria de fluxo, utilizando imunofluorescência, é rápida e possui alta sensibilidade, entretanto envolve um alto custo, equipamentos e profissionais qualificados. Os testes envolvendo gel são uma forma de

aglutinação em coluna, embora não precisem de repetidas lavagens das hemácias (WARDROP, 2005; CASTILHO *et al.*, 2016). Há autores que também relatam o teste da fragilidade osmótica da membrana eritrocitária; os pacientes com AHIM apresentam fragilidade alta, porém não é uma característica exclusiva desta enfermidade (PAES *et al.*, 2013).

A tabela abaixo desenvolvida por MORAES *et al.* (2017) informa, em porcentagem, a sensibilidade e especificidade das técnicas de citometria de fluxo e teste de Coombs, segundo diversos autores.

Tabela 12: Comparação da sensibilidade e especificidade entre as técnicas de citometria de fluxo e teste de Coombs, desenvolvida por MORAES *et al.* (2017).

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

CF = citometria de fluxo

A AHIM necessita de mais estudos na Medicina Veterinária, com intuito de estabelecer fatores prognósticos e tratamentos mais eficientes, visto que o índice de mortalidade é considerado alto nos Estados Unidos. A principal dificuldade está em estabelecer o diagnóstico definitivo da doença. O tratamento realizado, muitas vezes, é paliativo, com medicamentos corticosteróides; sendo assim, a causa de base não é tratada e o paciente apresenta melhoras apenas durante a utilização de imunossuppressores.

O presente estudo objetivou avaliar cães adultos com suspeita de AHIM, realizar o diagnóstico pelo teste de Coombs e estabelecer a taxa de mortalidade nos animais positivos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), de acordo com o protocolo número 101/2017 (ANEXO).

4.2.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de sangue de cães provenientes da rotina clínica do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, e do My Pets Laboratório Veterinário, localizado na região metropolitana de Curitiba – PR.

Os pacientes foram submetidos à contenção física e as amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular e acondicionadas em frascos estéreis com anticoagulante (EDTA) para realização do hemograma, contagem de reticulócitos e teste de Coombs direto. As amostras foram mantidas sob refrigeração.

4.2.3 Seleção de animais

Foram selecionados 17 cães adultos, de diferentes raças, machos e fêmeas, para o presente estudo e os critérios de inclusão necessários foram: anemia (Hematócrito < 37%, segundo TVEDTEN, 2010), icterícia e poiquilocitose marcantes (com presença de 10 a 20 esferócitos por campo/1000x) na leitura do esfregaço sanguíneo corado. Foram excluídos do estudo animais com terapia imunossupressora prévia e transfusão sanguínea recente.

O grupo controle foi composto por 12 cães adultos não-anêmicos e saudáveis, que participaram do estudo com o intuito de validar o teste de Coombs e comparar com os resultados dos animais doentes. Estes animais eram provenientes da rotina laboratorial e não apresentavam sinais clínicos (exames clínicos e físicos normais); os exames laboratoriais (hemograma, função renal e hepática) estavam normais.

O histórico e prognóstico dos cães foram relatados pelos clínicos veterinários responsáveis.

4.2.4 Análises Laboratoriais

4.2.4.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em analisador hematológico automático (Mindray BC 2800 Vet®), para determinação de número de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina e os índices hematimétricos (VCM e CHCM). A extensão sanguínea foi realizada em menos de duas horas após a coleta de sangue. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Newprov®), e as leituras das lâminas foram realizadas em microscópio óptico em objetiva de 100x. O hematócrito foi determinado pela técnica de microhematócrito e a proteína plasmática total foi determinada por refratometria.

Na extensão sanguínea, foi realizada a estimativa de plaquetas, contagem diferencial dos leucócitos, e análise dos eritrócitos, descrita a seguir.

Os índices hematimétricos foram classificados de acordo com os intervalos referenciais estabelecidos por RIZZI *et al.* (2010): Volume Corpuscular Médio (VCM) 60-77 fl; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) 32-36%.

4.2.4.2 Análise do esfregaço sanguíneo

Na análise dos eritrócitos foi realizada a leitura e avaliação em 10 campos, considerando-se cor, tamanho, forma, distribuição e células precursoras (nucleadas). Foram detectadas inclusões nas hemácias, como corpúsculos de Heinz e Howell-Jolly; variações no tamanho (anisocitose, microcitose, macrocitose), cor (policromatofilia e hipocromia).

A análise da morfologia dos eritrócitos foi criteriosa, identificando a poiquilocitose de uma forma geral, atentando especialmente para presença de esferócitos: hemácias sem palidez central. O resultado foi expresso em número de esferócitos por campo.

4.2.4.3 Contagem de reticulócitos e classificação da resposta da medula óssea

Para contagem de reticulócitos foi utilizado o método de coloração supravital azul de cresil brilhante. A amostra de sangue com EDTA foi misturado com o corante azul de cresil brilhante (proporção 1:1), incubado em banho-maria à 37°C por 15 minutos e foi realizado o esfregaço sanguíneo. Os reticulócitos são eritrócitos imaturos, com precipitados em formas de cordões (agregados) ou esparsos (pontilhados). Foram contados os reticulócitos presentes em um total de 1000 hemácias, apresentando o resultado em porcentagem.

A partir do resultado obtido, o grau de resposta medular canina foi classificado segundo TVEDTEN (2010), conforme descrito no Capítulo 2.

4.2.4.4 Gravidade da anemia

A anemia foi classificada em leve, moderada, grave e muito grave conforme o valor do hematócrito do paciente, segundo TVEDTEN (2010), descrito no Capítulo 2.

4.2.4.5 Avaliação da resposta leucocitária

A resposta leucocitária foi determinada conforme descrito no Capítulo 2.

4.2.4.6 Teste de Coombs direto

O teste de Coombs foi realizado no máximo após 24 horas da coleta do sangue acondicionado em frasco com EDTA. Foi utilizado reagente antiglobulina canina da marca MP Biomedicals® (liofilizado, para ser reconstituído em 1 mL de água deionizada ou PBS), que permaneceu sob refrigeração. Segundo o fabricante, o soro antiglobulina foi preparado imunizando coelhos com IgM, IgG e C3 caninos purificados de soro de animais saudáveis. O complemento tornou-se inativo por tratamento térmico e aglutininas não-específicas foram removidas. Importante destacar que após a reconstituição da liofilização, o reagente deve ser diluído em alíquotas 1:2, 1:4 e 1:8, com o objetivo de titular as antiglobulinas.

O método utilizado foi microtitulação em microplacas estéreis com 96 poços em formato U. Primeiramente foram efetuadas quatro lavagens das hemácias em solução fisiológica 0,9%, iniciando as lavagens com 4,9 mL de solução salina e 100 microlitros do concentrado de hemácias, derivado da centrifugação do sangue total com EDTA, obtendo, ao final, uma solução de 5 mL 2% de eritrócitos. Tal processo foi executado com as amostras dos pacientes anêmicos e controles (sadios).

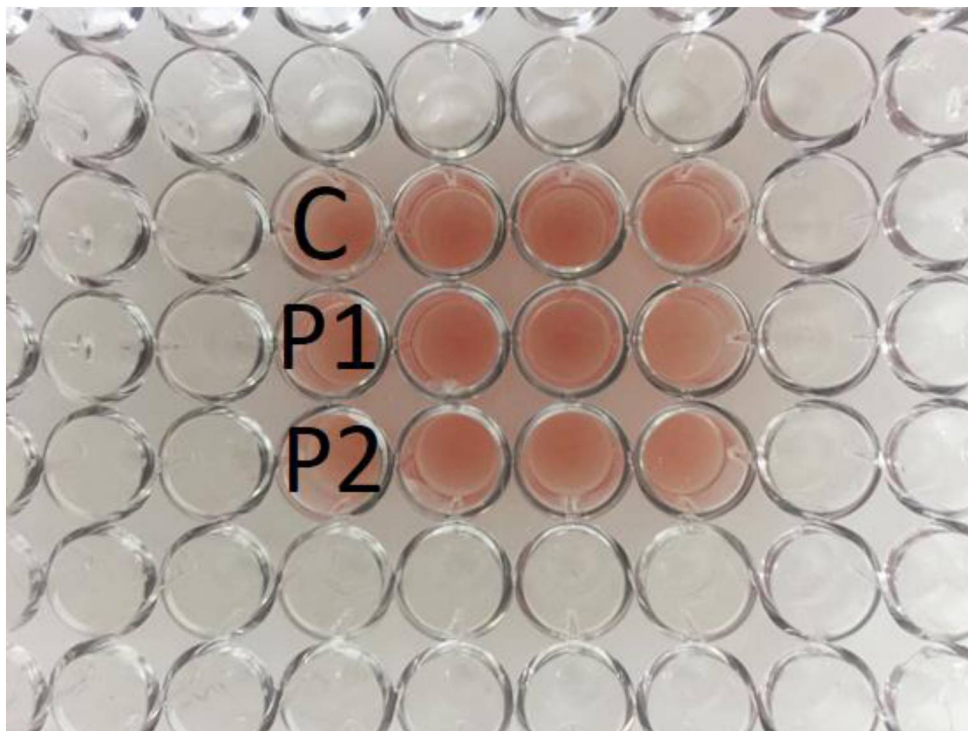
O teste de Coombs direto consistiu em incubar 25 microlitros das alíquotas das células lavadas (animais controles e anêmicos) com 25 microlitros soro nas diluições supracitadas, em banho maria à 37°C por 30 minutos. As hemácias lavadas de todos os cães também foram incubadas com solução fisiológica (teste de autoaglutinação).

Após este período, foi observada a presença ou ausência de aglutinação microscópica eritrocitária, considerando-se positividade em casos de aglutinação e negatividade em sua ausência. Para validação do teste, os animais controles não apresentaram aglutinação, quando comparados às amostras aglutinadas, microscopicamente.

Figura 12: Microplaca estéril para microtitulação com fundo em U, utilizada no experimento para teste de Coombs, fabricante Olen, para cão.



Figura 13: Observar os poços vermelhos com amostra do controle (C) e pacientes (P1 e P2): hemácias lavadas homogeneizadas com solução salina e diluições do reagente de Coombs 1:2, 1:4 e 1:8. Amostras antes de serem incubadas em banho maria à 37°C por 30 minutos.



4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cães pertencentes ao Grupo Controle obtiveram resultado negativo ao método de Coombs direto por microtitulação em microplacas. O Grupo dos cães anêmicos (N=17) foi dividido em dois subgrupos: positivos (N=8) e negativos (N=9) ao teste da antiglobulina direta, os resultados estão apresentados nas tabelas 13 a 16. Os animais diagnosticados com AHIM representaram 47,1%, considerada uma alta prevalência. Destes cães com AHIM, 37,5% não tiveram a causa diagnosticada; 50% tinha suspeita (clínica e laboratorial) de hemoparasitose e 12,5% foram positivos para leptospirose.

Relacionado à titulação dos animais positivos, todos os cães apresentaram a titulação mínima 1:2; a titulação 1:4 foi detectada em sete pacientes (87,5%); e apenas dois cães (25%) foram positivos para titulação 1:8. Além da aglutinação microscópica, nos cães que apresentaram maior titulação para anticorpos, foi evidenciada aglutinação à análise macroscópica e ambos evoluíram para óbito.

O teste de autoaglutinação foi pareado com o teste de Coombs. Dos animais positivos para AHIM, 25% foram também positivos no teste de autoaglutinação; tal resultado revela que testes positivos na autoaglutinação, realizado com hemácias lavadas em solução fisiológica, pode auxiliar no diagnóstico da AHIM. A importância da lavagem dos eritrócitos é devido ao fato de as hemácias em suspensão permanecerem separadas umas das outras em meio salino; os eletrólitos contidos no meio envolvem cada glóbulo vermelho com íons positivos, fazendo com que permaneçam separados pelo fato de possuírem cargas elétricas iguais.

Tabela 13: Variação do hematócrito (Ht) e gravidade da anemia em cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.

Grupo Cães Anêmicos (N=17)	Variação do Ht (%)	Anemia moderada (N)	Anemia grave (N)	Anemia muito grave (N)
Positivos (N=8)	10 – 27%	4	2	2
Negativos (N=9)	10 – 26%	3	3	3

Tabela 14: Grau de resposta da medula óssea de cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.

Grupo Cães Anêmicos (N=17)	Não regenerativa (N)	Regeneração leve (N)	Regeneração moderada (N)	Regeneração intensa (N)
Positivos (N=8)	1	5	1	1
Negativos (N=9)	1	2	3	3

Tabela 15: Classificação morfológica da anemia (VCM e CHCM) de cães positivos e negativos ao teste de Coombs direto.

Grupo Cães Anêmicos (N=17)	Normocítica normocrômica (N)	Macroscítica normocrômica (N)	Macroscítica hipocrômica (N)	Normocítica hipocrômica (N)
Positivos (N=8)	3	2	2	1
Negativos (N=9)	3	0	4	2

VCM = Volume Corpuscular Médio; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 16: Resposta leucocitária de cães anêmicos positivos e negativos ao teste de Coombs direto.

Grupo Cães Anêmicos (N=17)	Inflamação Aguda (N)	Inflamação Crônica (N)	Leucopenia (N)
Positivos (N=8)	6	1	1
Negativos (N=9)	3	5	1

A presença de anticorpos na superfície dos eritrócitos causa a aglutinação eritrocitária (figuras 14, 15 e 16); amostras controles não apresentam aglutinação, o que indica ausência de antiglobulinas (Figura 17).

Figura 14: Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em cão, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.

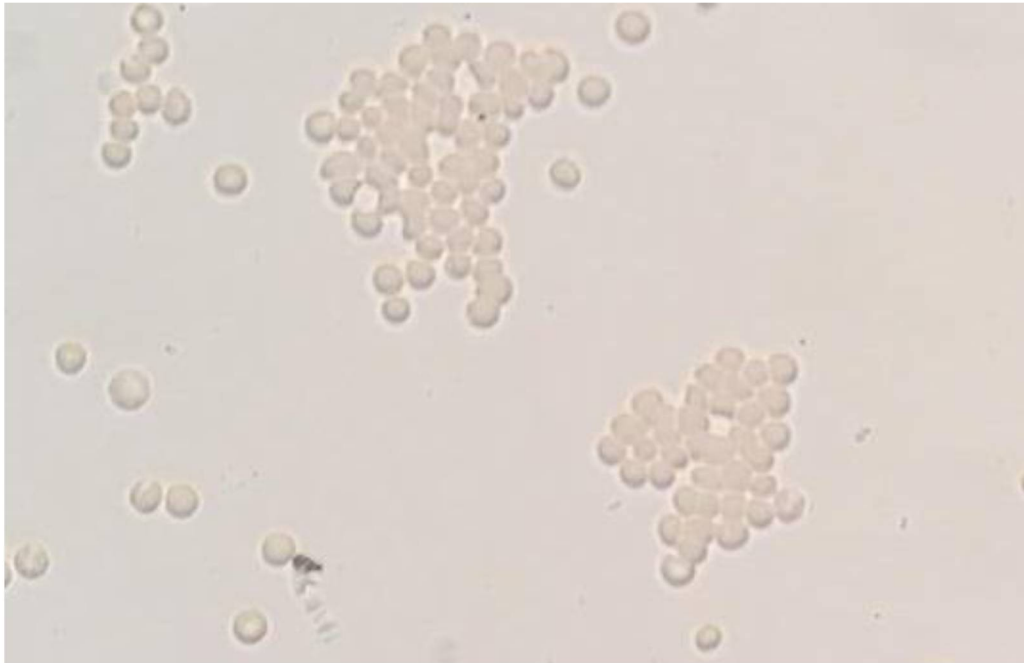


Figura 15: Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em cão, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.

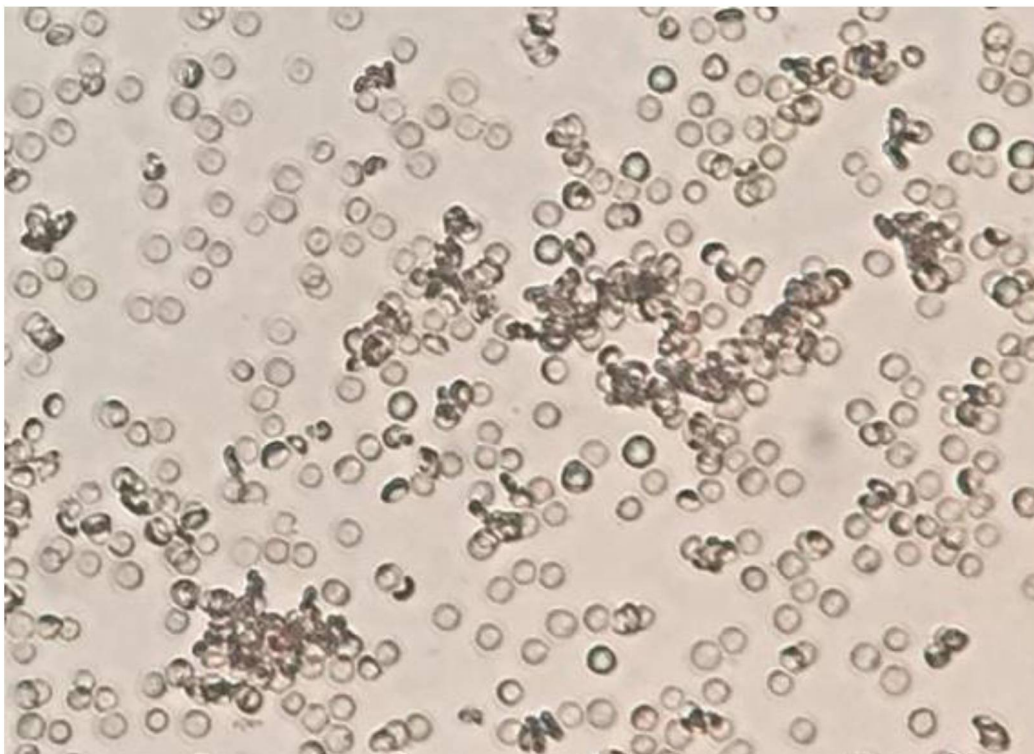


Figura 16: Presença de aglutinação eritrocitária no teste de Coombs em cão, indicando presença de anticorpos na superfície das hemácias.

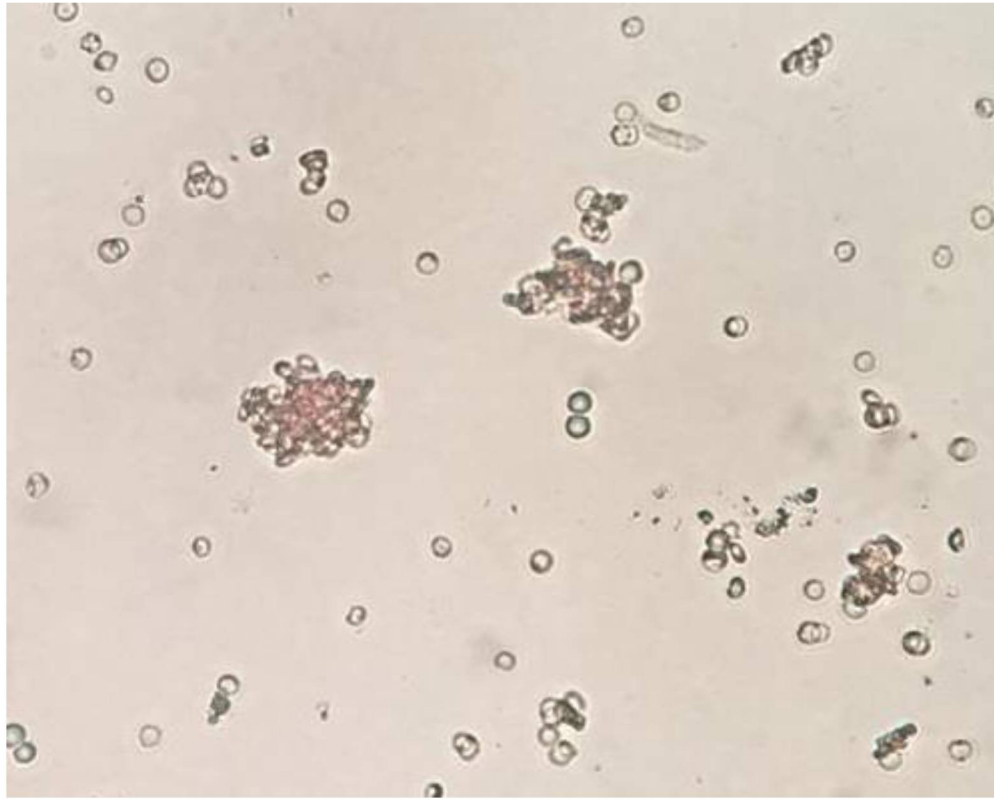
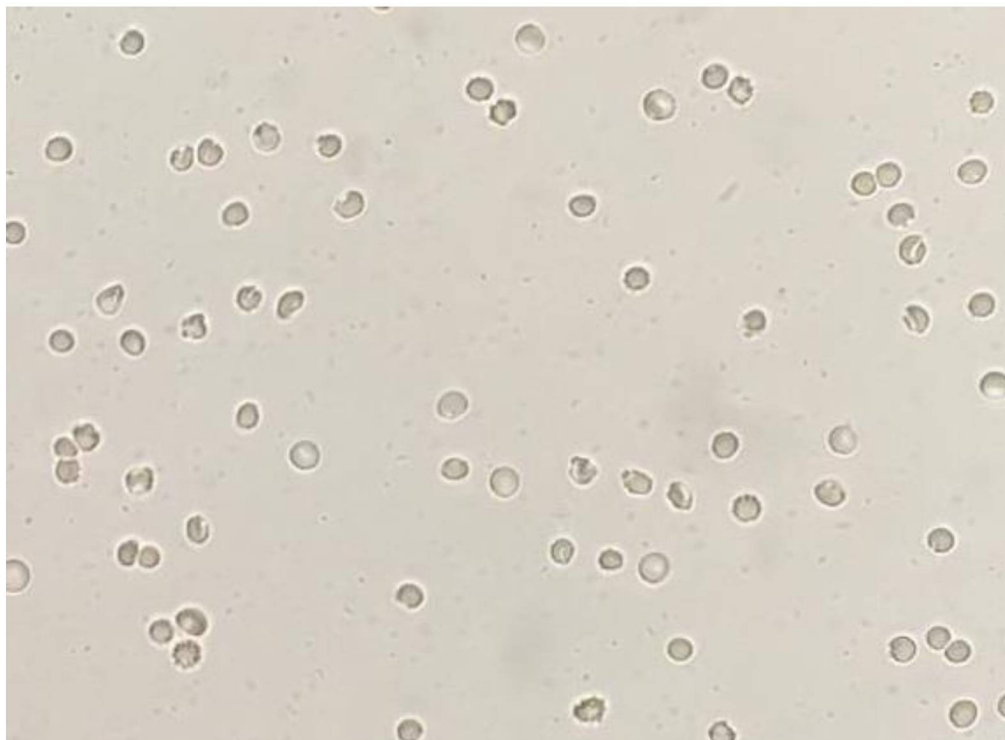


Figura 17: Ausência de aglutinação eritrocitária no Teste de Coombs em cão, indicando ausência de anticorpos na superfície das hemácias.



Dos 17 cães selecionados para o estudo, com anemia, icterícia e poiquilocitose (com esferocitose de 10 a 20 por campo): 47% foram positivos (com titulações variadas) e 53% foram negativos no teste de Coombs; ressaltando que estes sinais clínicos não podem ser utilizados isoladamente para diagnóstico da AHIM.

Avaliando todos os animais anêmicos, positivos e negativos, o índice de mortalidade (morte natural ou eutanásia) foi de 64,7%, revelando prognóstico reservado para cães com os sinais clínicos citados anteriormente.

O índice de mortalidade observado nos cães com AHIM, no presente estudo, foi elevado, de 62,5%, superior ao de ISHIHARA *et al.* (2010), que observaram índice de mortalidade de apenas 39% em cães com AHIM, porém os próprios autores o consideraram baixo (citando demais autores que obtiveram índices de até 70%) e correlacionaram com a adequada terapia de suporte utilizada. Em tal estudo também foram determinados fatores complicadores e estabelecido escores que definem o prognóstico dos cães com AHIM primária. Fatores como sexo (maior incidência em fêmeas), hematócrito < 20%, trombocitopenia e alterações nos tempos de coagulação influenciaram significativamente o tempo de vida do paciente. Há protocolos de tratamentos de suporte bem-sucedidos já relatados por pesquisadores. Como exemplo, WEINKLE *et al.* (2005) realizaram estudo retrospectivo de 151 cães com AHIM confirmada e concluíram que o tratamento com associação de glicocorticoide, azatioprina e dose muito baixa de ácido acetilsalicílico prolongaram o tempo de vida dos animais, a longo prazo. A taxa de mortalidade do presente estudo é considerada alta, mas está de acordo com os relatos anteriores em que o tratamento de suporte não teve sucesso.

Neste estudo houve predominância de anemia moderada (Ht 20-29%), normocítica normocrômica, com regeneração medular leve (1 a 4% de reticulócitos) e resposta inflamatória aguda. Em 2017, MORAES *et al.* analisaram os parâmetros hematológicos de 60 cães com AHIM e relataram maior prevalência de anemia regenerativa, macrocítica e hipocrômica; e presença esferocitose em apenas 9,8% dos animais; 30% e 38,7 % apresentavam leucocitose e neutrofilia, respectivamente. Em 2001, MCMANUS *et al.*, publicaram que leucocitose e neutrofilia com desvio à esquerda são fatores complicadores da AHIM, que podem piorar o prognóstico. Portanto a alta prevalência de resposta inflamatória aguda observada no presente estudo pode ser considerada um fator complicador.

No presente estudo, a presença de 10 a 20 esferócitos por campo foi considerada como fator de inclusão. A presença de esferocitose é muitas vezes subjetiva, porque depende da

análise de profissional capacitado e experiente, devendo ser minuciosamente avaliada, pois é a alteração morfológica mais observada desta doença.

Esta pesquisa realizou o teste da antiglobulina canina em banho-maria à 37°C, o que significa que apenas imunoglobulinas da classe III (aglutininas quentes) foram detectadas; embora sejam as maiores causadoras da AHIM em cães, há possibilidade de resultados falso-negativos, revelando uma limitação deste trabalho. Em uma pesquisa realizada por WARMAN *et al.* (2008) para avaliar o desempenho de anticorpos polivalentes e monovalentes nas temperaturas de 4°C e 37°C, os pesquisadores concluíram que o teste deve ser realizado em ambas as temperaturas, pois muitos animais foram positivos à 4°C e negativos à 37°C, ou seja, aglutininas frias também têm sua importância no processo hemolítico imunomediado; concluíram também que altas titulações de anticorpos estão relacionadas à AHIM primária, enquanto titulações mais baixas são encontradas em caso de doenças concomitantes.

Para a rotina laboratorial veterinária no Brasil, o teste de Coombs ainda é considerado um procedimento pouco viável, devido ao alto custo de importação do reagente espécie-específico.

A sensibilidade do método de microtitulação (técnica utilizada neste estudo) é questionada por alguns autores e resultados negativos não podem excluir o diagnóstico de AHIM, porém a especificidade é alta. Na publicação de ASHWINI e PILLAI (2017), os autores compararam dois métodos diferentes de microtitulação em 47 cães (tubo padrão ou microplaca): o teste realizado em microplaca demonstrou maior sensibilidade que em tubo padrão, pois os resultados de oito animais foram positivos na microplaca e negativos no tubo, indicando que o efeito pró-zona pode ocorrer no método menos preciso; sendo assim, este erro é minimizado ao se utilizar pouca quantidade de amostra no caso nas microplacas, como no presente estudo. O trabalho de OVERMANN *et al.* (2007) teve como principal objetivo avaliar a sensibilidade do método de microtitulação em microplacas baseado na empregabilidade de antiglobulinas monovalentes e polivalentes, e o resultado demonstrou que não houve alteração estatisticamente significativa na sensibilidade entre elas, porém a diluição seriada do soro influenciou na detecção de positividade das amostras contendo pouca quantidade de anticorpo.

CAVIEZEL *et al.* (2014) testaram quatro métodos diferentes de teste de Coombs direto: microtitulação, microcoluna de gel, técnicas capilares e tira imunocromatográfica; os testes apresentaram grande correlação nos resultados e a técnica da tira imunocromatográfica

mostrou-se como uma abordagem inovadora, pois não é baseada em aglutinação, e sim na coloração quando os glóbulos vermelhos se ligam ao reagente antiglobulina.

Com o intuito de avaliar e comparar o desempenho dos testes de microcoluna de gel e microtitulação para o diagnóstico de AHIM, PIEK *et al.* (2012) selecionaram 247 cães suspeitos e concluíram que houve boa concordância entre os testes, e o método em gel mostrou bom desempenho na identificação de AHIM idiopática; porém, amostras de sangue de pacientes com AHIM secundária foram negativas. Mais estudos, com novas técnicas com maior sensibilidade e especificidade são de grande importância para o diagnóstico.

No presente trabalho as causas da AHIM que não puderam ser estabelecidas, foram de casos agudos e o cão foi a óbito rapidamente. Como as amostras eram provenientes da rotina laboratorial, ao constatar o óbito do paciente, os respectivos proprietários suspendiam a investigação.

4.4 CONCLUSÃO

O teste de Coombs pelo método de microtitulação em microplacas com soro polivalente foi realizado com êxito para diagnóstico de AHIM em cães.

O prognóstico dos cães com diagnóstico de AHIM e sinais como icterícia e esferocitose de 10 a 20 por campo foi ruim, considerando a taxa elevada de mortalidade (62,5%). Esses cães apresentaram maior incidência de anemia moderada, normocítica normocrômica, resposta da medula óssea leve e inflamação aguda.

REFERÊNCIAS

- ASHWINI, M.; PILLAI, U.N. Efficacy of Microtiter Method of Direct Antiglobulin Test in diagnosis of Immune Mediated Haemolytic Anaemia in Dogs. **Journal of Animal Research**, v.7, n.3, p. 597-599, 2017.
- CASTILHO, R.C.; LIMA, M.O.; CRUZ, M.F.R.; MARQUEZ, E.S.; CALDERÓN, C. Anemia hemolítica imunomediada em cães. **Scientific Eletronic Archives**, v. 9, n. 5, p.72-84. 2016.
- CAVIEZEL, L.L.; RAJ, K.; GIGER, U. Comparison of 4 Direct Coombs' Test Methods with Polyclonal Antiglobulins in Anemic and Nonanemic Dogs for In-Clinic or Laboratory Use. **J Vet Intern Med**, v. 28, p. 583-591, 2014.
- FIGHERA, R.A. Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 264-266, 2007.
- ISHIHARA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUSHI, A.; TAKAHASHI, M.; NAKASHIMA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Evaluation of Prognostic Factors and Establishment of a Prognostic Scoring System for Canine Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 72, n. 4, p. 465-470, 2010.
- KERR, G. M. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**: Hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. 1-43 p.
- MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K.; GOLIM, M.A. Avaliação hematológica e da função renal em cães com AHIM. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-12, 2017.
- OVERMANN, J.A.; SHARKEY, L.C.; WEISS, D.J.; BORJESSON, D.L. Performance of 2 microtiter canine Coombs' tests. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 179-183, 2007.
- PAES, G.; PAEPE, D.; MEYER, E.; KRISTENSEN, A.T.; DUCHATEAU, L.; CAMPOS, M.; DAMINET, S. The use of the rapid osmotic fragility test as an additional test to diagnose canine immune-mediated haemolytic anaemia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 74, p. 1-12, 2013.
- PIEK, C.J.; TESKE, E.; VAN LEEUWEN, M.W.; DAY, M.J. Good agreement of conventional and gel-based direct agglutination test in immune-mediated haemolytic anaemia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 10, p. 1-8, 2012.
- 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. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- THRALL, M.A. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**: Hematologia das espécies domésticas comuns. 2 ed. São Paulo: Roca, 2015. 139-477 p.
- TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 152-161 p.
- WARDROP, K.J. The Coomb's test in veterinary medicine: past, present and future. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 4, p. 325-334, 2005.

WARDROP, K.J. Coomb's Testing and Its Diagnostic Significance in Dogs and Cats. **Vet Clin Small Anim**, v. 42, p. 43-51, 2012.

WARMAN, S.M.; MURRAY, J.K.; RIDYARD, A.; EASTWOOD, J.; SILVA, S.; DAY, M.J. Pattern of Coombs' test reactivity has diagnostic significance in dogs with immune-mediated haemolytic anaemia. **Jornal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 525-530, 2008.

WEINKLE, T.K.; CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F.; WARNER, K.L.; BARR, S.C.; ERB, H.N. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). **J Am Vet Med Assoc**, v. 226, n. 11, p. 1869-1880, 2005.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ALMEIDA, A.P. **Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 80 p. Dissertação de Mestrado.
- ANDREWS, G.A.; WEEKS, B.R. An Improved Ferritin Assay for Canine Sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 21, n.2, p. 57 – 60. 1992.
- 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. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- ASHWINI, M.; PILLAI, U.N. Efficacy of Microtiter Method of Direct Antiglobulin Test in diagnosis of Immune Mediated Haemolytic Anaemia in Dogs. **Journal of Animal Research**, v.7, n.3, p. 597-599, 2017.
- BOHN, A.A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Clin Lab Med**, v. 35, p. 579-590, 2015.
- BARGER, A.M. Erythrocyte morphology. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- BORING, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.
- CALDIN, M.; CARLI, E.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L.; TASCA, S.; PATRON, C.; LUBAS, G. 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 doença crônica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.
- CASTILHO, R.C.; LIMA, M.O.; CRUZ, M.F.R.; MARQUEZ, E.S.; CALDERÓN, C. Anemia hemolítica imunomediada em cães. **Sci. Elec. Arch**. v. 9, n.5, 2016.
- CAVIEZEL, L.L.; RAJ, K.; GIGER, U. Comparison of 4 Direct Coombs' Test Methods with Polyclonal Antiglobulins in Anemic and Nonanemic Dogs for In-Clinic or Laboratory Use. **J Vet Intern Med**, v. 28, p. 583-591, 2014.
- CHERVIER, C.; CADERÉ, J.L.; RODRIGUEZ-PIÑEIRO, M.I.; DEPUTTE, B.L.; CHABANNE, L. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. **J Small Anim Pract**, v. 53, p. 223-227, 2012.

CHIKAZAWA, S.; NAKAZAWA, T.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. **J. Vet.Med.Sci.**, v.75, n.11, p.1419-1426, 2013.

CHIKAZAWA, S.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, N.; SATO, J.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Development of a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect and Measure Serum Levels of Canine Ferritin. **J. Vet. Med. Sci**, v. 75, n. 4, p. 515-517, 2013.

CHIKAZAWA, S.; DUNNING, M.D. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, p. 348-353, 2016.

CHUNG, S.H.; CHANG, L.W.; CHENG, T.L.; LIN, C.J.; CHEN, W.Y.; CHOU, C.C. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 42, n. 2, p.53-67, 2016.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet Parasitol**, v. 117, p. 285-290, 2003.

FRY, M.M. Anemia of inflammatory, neoplastic, renal and endocrine diseases. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 246-250 p.

FIGHERA, R.A. Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 264-266, 2007.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, p. 783-788, 2003.

GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J.P.; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2011.

GONÇALVES, L. R.; FILGUEIRA, K. D.; AHID, S. M. M.; PEREIRA, J. S.; VALE, A. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Study on coinfecting vectorborne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 407-412, 2014.

HARRINGTON, A.M.; WARD, P.C.J.; KROFT, S.H. Iron deficiency anemia, β -thalassemia minor, and anemia of chronic disease. **American Society for Clinical Pathology**, v.129, p. 466-471, 2008.

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

IRWIN, P. Babesiosis and cytauxzoonosis. In: SHAW, S. E.; DAY, M. J. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Manson Publishing**, Barcelona, p. 63-77, 2005.

ISHIHARA, M.; FUJINO, Y.; SETOGUSHI, A.; TAKAHASHI, M.; NAKASHIMA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Evaluation of Prognostic Factors and Establishment of a

Prognostic Scoring System for Canine Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 72, n. 4, p. 465-470, 2010.

JACOBS, A.; WORWOOD, M. Ferritin in serum: Clinical and biochemical implications. **N Engl J Med**, v. 292, p. 951-956, 1975.

KERR, G. M. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**: Hematologia. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. 1-43 p.

LEMOES, T. D.; CERQUEIRA, A. M.; TOMA, H. K.; SILVA, A. V.; CORREA, R. G.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, p. 137-142, 2012.

LISTE, F.; GASCÓN, M.; PALACIO, J. Metabolismo del hierro en el perro: aplicaciones diagnósticas de la determinación de status férrico y valores de referencia em la raza Beagle. **Annals of Veterinary**, v. 9, n. 10, p. 75-81, 1994.

MARCHETTI, V.; LUBAS, G.; LOMBARDO, A.; CORAZZA, M.; GUIDI, G.; CARDINI, G. Evaluation of Erythrocytes, Platelets, and Serum Iron Profile in Dogs with Chronic Enteropathy. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, p.1-5, 2010.

MOREIRA, M. V. L.; GUIMARÃES, L. B.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; ECCO, R. Infecção por *Rangelia vitalli* em um cão em Minas Gerais. **Arch Vet Sci**, v. 18, n. 2, p. 637-639, 2013.

MCCOWN, J.L.; SPECHT, A.J. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 47, p. 151-160, 2011.

MEDEIROS, N. C. **Resposta da medula óssea e o metabolismo do ferro em cães com anemias de diferentes etiologias**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013. 73p. Dissertação de Mestrado.

MEDEIROS, N.C.; DITTRICH, R.L. Número de policromatófilos na diferenciação das anemias não regenerativas de regenerativas em cães. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2501-2506, 2014.

MONGRUEL, A. C. B.; SOUSA, M. G.; VALENTE, J. D. M.; BARBOSA, I. C.; SPANHOL, V. C.; SEZYSHTA, A.; WEBER, L. F. S.; STEDILE, S. T. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First report of *Rangelia vitalli* in a dog from Parana State, **Southern Brazil**. **Arch Vet Sci**, v. 22, n. 4, p. 139-144, 2017.

MONGRUEL, A.C.B.; IKEDA, P.; SOUSA, K.C.M.; BENEVENUTE, J.L.; FALBO, M.K.; MACHADO, R.Z.; CARRASCO, A.O.T.; ANDRÉ, M.R.; SEKI, M.C. Molecular detection of vector borne pathogens in anemic and thrombocytopenic dogs in southern Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 505-513, 2018.

MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K.; GOLIM, M.A. Avaliação hematológica e da função renal em cães com AHIM. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-12, 2017.

- OLVER, C. S.; ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E.; KANEKO, J. J. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology: Erythrocyte Structure and Function**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 123-130 p.
- ORINO, K.; WATANABE K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage ferritin. **The Veterinary Journal**, v. 178, p.191-201, 2008.
- ORINO, K.; MIURA, T.; MUTO, S.; WATANABE, K. Sequence analysis of canine and equine ferritin H and L subunit cDNAs. **DNA Sequence**, v. 16, n.1, p. 58-64, 2005.
- OVERMANN, J.A.; SHARKEY, L.C.; WEISS, D.J.; BORJESSON, D.L. Performance of 2 microtiter canine Coombs' tests. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 179-183, 2007.
- PAES, G.; PAEPE, D.; MEYER, E.; KRISTENSEN, A.T.; DUCHATEAU, L.; CAMPOS, M.; DAMINET, S. The use of the rapid osmotic fragility test as an additional test to diagnose canine immune-mediated haemolytic anaemia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 74, p. 1-12, 2013.
- PALTRINIERI, S.; COMAZZI, S.; AGNES, F. Haematological Parameters and Altered Erythrocyte Metabolism in Anaemic Dogs. **J. Comp. Path.**, v. 122, p. 25-34, 2000.
- PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S.K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, p. 5705-5724, 2012.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 81-85, 2005.
- PIEK, C.J.; TESKE, E.; VAN LEEUWEN, M.W.; DAY, M.J. Good agreement of conventional and gel-based direct agglutination test in immune-mediated haemolytic anaemia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 10, p. 1-8, 2012.
- PIRES, L.S.A. **Determinação dos parâmetros do ferro em cães sadios e anêmicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 102p. Dissertação de Mestrado.
- PIRES, L.S.A.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOUZA, A.C.; BERTOL, M.A.F.; PATRICIO, L.F.L. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, v. 41, n.2, p. 272-277, 2011.
- PRICE, E.A.; SCHRIER, S.L. Unexplained Aspects of Anemia of Inflammation. **Advances in Hematology**, v. 2010, p.1-5, 2010.
- RIBEIRO, C.M.; MATOS, A.C.; AZZOLLINI, T.; BONES, E.R.; WASNIESKI, E.A.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LUCHEIS, S.B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 2, p.129-136, 2017.
- 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. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010.
- SARANIYA, H.; CHHABRA, S.; SANDHU, B.S.; BANSAL, B.K. Morphological and cellular changes occurring in anemia associated with chronic renal failure in dogs. **J Vet Sci Med Diagn**, v. 4, n. 5, p. 1 - 3, 2015.

SILVA, G. C. F.; BENITEZ, A. N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal**, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, A.H.C.; DA SILVA, D.M.; RIBAS, C.R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; DORNBUSCH, P. T.; GUÉRIOS, S.D. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 87-92, 2014.

SILVA, B.R. **Agentes transmitidos por carrapatos e fauna ixodídica em cães do estado do Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2017. 104p. Dissertação de Mestrado.

SILVA, B.R.; FERREIRA, M.F.K.; MAFFEZZOLLI, G.; KOCH, M.O.; BELTRAME, O.C.; TAQUES, I.I.G.G.; CAMPOS, A.N.S.; AGUIAR, D.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R. Detection molecular of *Rangelia vitalli* in dogs from Parana State, Southern Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, (ahead of print), p. 1-5, 2018.

SOUSA, R. S.; LEITE, N. C. *Rangelia vitalli* em um cão no estado do Paraná- Brasil: relato de caso. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 15., Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 1., 2011. Goiânia, **Anais Goiânia: ENAPAVE**, 2011.

THRALL, M.A. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária: Hematologia das espécies domésticas comuns**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2015. 139-477 p.

THRALL, M.A. Anemia regenerativa. In: THRALL, M.A et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p 191-248.

TORRENTE, C.; MANZANILLA, E.G.; BOSCH, L.; FRESNO, L.; DEL ALAMO, M.R.; ANDALUZ, A.; SACO, Y. GOPEGUI, R.R. Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 25, n. 5, p. 611-619, 2015.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Wiley-Blackwell, USA. 2010. 152-161 p.

USEH, N.M.; OLADELE, S.B.; ADAMU, S.; IBRAHIM, N.D.G.; NOK, A.J.; ESIEVO, K.A.N. Aetiology and prevalence of canine anaemia in Zaria: a review of 2139 cases observed at the Veterinary Teaching Hospital of the Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria (1990-2003). **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 150 – 154, 2003.

WARDROP, K.J. The Coomb's test in veterinary medicine: past, present and future. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 4, p. 325-334, 2005.

WARDROP, K.J. Coomb's Testing and Its Diagnostic Significance in Dogs and Cats. **Vet Clin Small Anim**, v. 42, p. 43-51, 2012.

WARMAN, S.M.; MURRAY, J.K.; RIDYARD, A.; EASTWOOD, J.; SILVA, S.; DAY, M.J. Pattern of Coombs' test reactivity has diagnostic significance in dogs with immune-mediated haemolytic anaemia. **Jornal of Small Animal Practice**, v. 49, p. 525-530, 2008.

WATANABE, K.; MURANISHI, N.; MURATA, Y.; ORINO, K.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S. Biochemical properties of canine serum ferritin: iron content and nonbinding to concanavalin A. **Biomaterials**, v. 13, n. 4, p. 319–324, 2000.

WATANABE, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, M.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S. Characterization of ferritin and ferritin-binding proteins in canine serum. **Biomaterials**, v.13, p. 57-63, 2000.

WEEKS, B.R.; SMITH, J.E.; PHILIPS, R.M. Enzyme linked immunosorbent assay for canine serum ferritin using monoclonal anti-canine ferritin. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1193-1195, 1988.

WEINKLE, T.K.; CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F.; WARNER, K.L.; BARR, S.C.; ERB, H.N. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). **J Am Vet Med Assoc**, v. 226, n. 11, p. 1869-1880, 2005.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 101/2017, referente ao projeto “Diagnóstico das anemias em cães e gatos e a correlação com os valores de ferro, transferrina, capacidade total de ligação do ferro e ferritina séricos”, sob a responsabilidade de Rosângela Locatelli Dittrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 04/12/2017.

Vigência do projeto	Dezembro/2017 até Outubro/2018
Espécie/Linhagem	<i>Canis familiaris</i> (cão) e <i>Felis catus</i> (gato)
Número de animais	200 (100 cães e 100 gatos)
Peso/Idade	Não verificado
Sexo	Ambos
Origem	Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 101/2017, regarding the project “Diagnosis of anemia in dogs and cats and correlation with serum iron, transferrin, total iron binding capacity and ferritin” under Rosângela Locatelli Dittrich supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it 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, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 12/04/2017.

Duration of the project	December/2017 until October/2018
Specie/Line	<i>Canis familiaris</i> (dog) and <i>Felis catus</i> (cat)
Number of animals	200 (100 dogs and 100 cats)
Weight/Age	Not verified
Sex	Both
Origin	Veterinary Hospital of the Federal University of Paraná

Curitiba, 4 de dezembro de 2017.

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA