

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA VOGEL SEIXAS

ANEMIA POR DOENÇA INFLAMATÓRIA EM GATOS

CURITIBA

2021

SANDRA VOGEL SEIXAS

ANEMIA POR DOENÇA INFLAMATÓRIA EM GATOS

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: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich  
Coorientadora: Profa. Dra. Cybelle de Souza

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Seixas, Sandra Vogel

Anemia por doença inflamatória em gatos. / Sandra Vogel  
Seixas. – Curitiba, 2021.  
1 recurso online : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich.  
Coorientadora: Profa. Dra. Cybelle de Souza.

1. Gatos - Doenças. 2. Ferro. 3. Transferrina. I. Dittrich,  
Rosangela Locatelli. II. Souza, Cybelle de. III. Universidade  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação Ciências  
Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
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 CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SANDRA VOGEL SEIXAS** intitulada: **ANEMIA POR DOENÇA INFLAMATÓRIA EM GATOS**, sob orientação da Profa. Dra. ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 08 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica

21/12/2021 11:42:27.0

ROSANGELA LOCATELLI DITTRICH

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/02/2022 19:14:52.0

ANGELA PATRICIA MEDEIROS VEIGA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

09/11/2021 14:55:48.0

SIMONE TOSTES DE OLIVEIRA STEDILE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80035060 - Tel: (41) 3360-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.  
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 126130

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prgpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 126130**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por guiar, iluminar e abençoar meus passos.

A minha orientadora Rosangela Locatelli Dittrich, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, aconselhando, ensinando e incentivando, sempre acreditando em meu potencial.

A minha coorientadora Cybelle de Souza pelos conselhos e ensinamentos.

A minha família pela compreensão, paciência e carinho: minha mãe Elisa pelas palavras de carinho, minha filha Gabrielle pela compreensão e apoio e minha irmã Elizabeth pelas risadas mesmo em momentos difíceis.

Aos meus amigos: Maria Aparecida, Claudia, Thierry, Morgana, Daniele que mesmo distantes ao longo dessa pandemia, se mostraram presentes em conversas de apoio, conselhos e risadas.

A toda equipe do laboratório de Patologia Clínica Veterinária UFPR: Aos técnicos Olair, Louise; aos residentes: Giovanna, Gabriela, Wesley, Daiane, Mayara e Penélope por toda ajuda nesta jornada com coletas e processamento de amostras, conversas e risadas, enfim pelo companheirismo. Vocês tornaram tudo isso mais suave.

A toda equipe da Clínica Veterinária Mania de Gato: Marúcia, madrinha, Gabrieli, Lezirre pelo companheirismo e por me ajudarem com os pacientes para meu projeto! Vocês são show!

## EPÍGRAFE

“Mais bonito que o canto dos pássaros,  
são os seus voos. Nem todo canto é de  
alegria, mas todo o voo é de  
LIBERDADE”

Mário Quintana

## RESUMO

A anemia é diagnosticada frequentemente na rotina laboratorial veterinária e a manifestação varia com a gravidade dos sinais clínicos, sendo originada por diversas doenças. O ferro é essencial para o funcionamento do organismo, participa da eritropoiese. O hemograma é utilizado no diagnóstico, mas os parâmetros do ferro também são importantes na avaliação das anemias, entretanto, não é uma realidade na rotina laboratorial veterinária. Os kits não são específicos para as diferentes espécies e os valores de referência são escassos. Os valores de referência do metabolismo do ferro, para gatos saudáveis e anêmicos, são limitados. Os objetivos do presente estudo foram estabelecer os valores de referência para os parâmetros do ferro em gatos saudáveis e avaliar o metabolismo do ferro em gatos com anemia por doença inflamatória; adicionalmente, foram avaliados os neutrófilos tóxicos em gatos e a correlação com as doenças sistêmicas. O presente trabalho foi dividido em três capítulos: o primeiro capítulo é “Revisão sobre o metabolismo do ferro em mamíferos”. O segundo capítulo é a análise dos parâmetros do ferro em gatos saudáveis e anêmicos por doença inflamatória, com o objetivo de verificar o comportamento do ferro nesses pacientes e seu auxílio na rotina médica veterinária, sendo intitulado: “Anemias por doenças inflamatórias em gatos e o metabolismo do ferro”. O terceiro capítulo aborda as alterações morfológicas citoplasmáticas e nucleares em neutrófilos de gatos com doenças inflamatórias sistêmicas, com o objetivo de correlacionar o grau e a quantidade de neutrófilos tóxicos e o diagnóstico clínico dos pacientes e é intitulado “Neutrófilos tóxicos em gatos com doenças sistêmicas e seu prognóstico”.

Palavras-chave: gatos anêmicos, ferro, ferritina, transferrina.

## ABSTRACT

Anemia is frequently diagnosed in the veterinary laboratory routine and its manifestation varies with the severity of clinical signs, originating from several diseases. Iron is essential for the body's functioning; it participates in erythropoiesis. The measurement of iron and complete blood count is important in the assessment of anemia. The evaluation of iron, ferritin and transferrin parameters in the veterinary routine is not a reality because commercial kits are not specific for different species. Reference values are scarce for healthy and anemic cats. The objectives of this study were to establish reference ranges for iron parameters in healthy cats and to evaluate iron metabolism in cats with anemia due to inflammatory disease; additionally, toxic neutrophils in cats and their correlation with systemic diseases were evaluated. This work was developed and divided into three chapters. The first chapter is a literature review, entitled: "Review on iron metabolism in mammals". The second chapter deals with the analysis of iron parameters in healthy and anemic cats due to inflammatory disease, to verify the behavior of iron in these patients and how it helps in the veterinary medical routine, entitled: "Anemias due to inflammatory diseases in cats and metabolism of iron". The third chapter addresses the cytoplasmic and nuclear morphological changes in neutrophils from cats with systemic inflammatory diseases, with the objective of correlating the degree and number of toxic neutrophils and the clinical diagnosis of patients and is entitled "Toxic neutrophils in cats with systemic and your prognosis".

Keywords: anemic cats, iron, ferritin, transferrin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esquema sobre a regulação sistêmica do ferro no organismo.....	24
FIGURA 2 - Histograma representando o ferro sérico do grupo (G1) .....	35
FIGURA 3 - Histograma representando a ferritina sérica do grupo (G1) .....	35
FIGURA 4 - Histograma representando a transferrina sérica do grupo (G1) após transformação Box Cox.....	35
FIGURA 5 - Histograma representando a capacidade de Ligação do Ferro (UIBC) do grupo (G1) .....	35
FIGURA 6 - Porcentagem de gatos anêmicos (G2) de acordo com o grupo de doenças.....	37
FIGURA 7 - Avaliação dos parâmetros hematológicos - hemácias (milhões/ $\mu$ L), hematócrito (%) e concentração de hemoglobina (g/dL) correlacionado com a cinética do ferro sérico nos gatos .....	38
FIGURA 8 - Número de neutrófilos tóxicos totais (%) nos grupos G1 (saudáveis) e G2 (subgrupo de doenças) .....	56
FIGURA 9 - Quantificação de neutrófilos tóxicos com Basofilia Citoplasmática (%) nos grupos G1 (saudáveis) e G2 de acordo com o subgrupo de doenças.....	57
FIGURA 10 - Quantificação de neutrófilos tóxicos com Corpúsculo de Döhle nos grupos G1 (saudáveis) e G2 de acordo com o subgrupo de doenças.....	57
FIGURA 11 - Neutrófilo segmentado com alterações tóxicas: basofilia citoplasmática e Corpúsculo de Döhle em extensões sanguíneas de gatos do grupo G1 (gatos saudáveis) .....	62
FIGURA 12 - Neutrófilos tóxicos: basofilia citoplasmática, corpúsculo de Döhle, vacuolização citoplasmática e em forma de “Donut” na extensão sanguínea de gato do grupo G2 (doentes) com doença infecciosa (perfuração intestinal – sepsé) .....	63
FIGURA 13 - Neutrófilos tóxicos: (g) corpúsculo de Döhle (h) forma de “Donut” em extensão sanguínea de gato do grupo G2 - doença infecciosa - FeLV.....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grau de resposta medular de acordo com a porcentagem de reticulócitos, segundo - TVEDTEN (2010) .....	32
TABELA 2 - Valores dos parâmetros do ferro em gatos saudáveis - grupo G1.....	34
TABELA 3 - Grau de resposta medular de acordo com a porcentagem de reticulócitos nos 48 gatos anêmicos.....	39
TABELA 4 - Classificação da gravidade da anemia de acordo com hematócrito (%) para gatos, segundo - TVEDTEN (2010) .....	39
TABELA 5 - Classificação morfológica da anemia e alterações eritrocitárias em 48 gatos anêmicos, segundo critérios de HARVEY (2012) .....	39
TABELA 6 - Média e desvio padrão dos parâmetros leucocitários dos gatos saudáveis (grupo G1) e doentes (G2) .....	40
TABELA 7 - Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos gatos saudáveis (grupo G1) e doentes (G2) .....	38
TABELA 8 - Avaliação da cinética do ferro nos 48 gatos anêmicos – grupo G2.....	41
TABELA 9 - Grupo das Doenças Infecciosas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.....	42
TABELA 10 - Grupo das Doenças Metabólicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.....	42
TABELA11 - Grupo das Doenças Traumáticas/Anatômicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.....	42
TABELA12 - Grupo das Doenças Neoplásicas e Infecciosas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo.....	42
TABELA 13 - Grupo das Doenças Neoplásicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.....	42
TABELA 14 - Avaliação semiquantitativa de alterações tóxicas em neutrófilos .....	52
TABELA 15 - Avaliação semiquantitativa da gravidade das alterações tóxicas em neutrófilos.....	52

TABELA 16 - Doenças em gatos associadas à classificação de neutrófilos tóxicos (%) e sobrevida do paciente.....	55
TABELA 17 - Média e desvio padrão dos parâmetros dos leucócitos em gatos dos grupos G1 e G2.....	56
TABELA 18 - Locais e isolamento de bactérias do G2 com doenças infecciosas localizadas, alteração leucocitária, quantificação (%) e grau de alterações tóxicas em neutrófilos e prognóstico.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT -Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

ASVCP - Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

DNNE - Desvio nuclear de neutrófilos a esquerda

FA- Fosfatase Alcalina

FeLV- Leucemia viral felina

FIV- Vírus da imunodeficiência felina

GGT - Gama-glutamil transferase

IFCC - Federação Internacional de Química Clínica

MGG - May-Grunwald-Giemsa

RPM - Rotação por minuto

TIBC - Capacidade de fixação do ferro total

ONG - Organização não governamental

QALS - Comitê de Garantia de Qualidade e Padrões de Laboratório

UIBC - Capacidade de Ligação do Ferro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 HIPOTHESES.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 Objetivo Geral.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
<b>2 CAPÍTULO 1: TÓPICOS SOBRE O METABOLISMO DO FERRO EM MAMÍFEROS.....</b>	<b>19</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	21
2.1.1 Ferroportina.....	22
2.1.2 Hepcidina.....	22
2.1.3 Concentração sérica do ferro.....	22
2.1.4 Ferritina sérica.....	23
2.1.5 Transferrina sérica.....	23
2.1.6 Capacidade de Ligação do Ferro.....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>3 CAPÍTULO 2: ANEMIAS POR DOENÇAS INFLAMATÓRIAS EM GATOS E O METABOLISMO DO FERRO.....</b>	<b>27</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1 Comitê de ética.....	30
3.2.2 Seleção de animais.....	30
3.2.3 Coleta de dados.....	31
3.2.4 Amostras.....	31

3.2.5 Análises Laboratoriais.....	32
3.2.5.1 Hemograma e análise do esfregaço sanguíneo.....	32
3.2.5.2 Contagem de Reticulócitos - Gatos anêmicos.....	32
3.2.5.3 Análises Bioquímicas.....	33
3.2.6 Análises Estatísticas.....	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3. 4 Conclusão.....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>4 CAPÍTULO 3: NEUTRÓFILOS TÓXICOS EM GATOS COM DOENÇAS SISTÊMICAS E VALOR PROGNÓSTICO DA AVALIAÇÃO</b> .....	47
4.1 INTRODUÇÃO.....	49
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.1 Comitê de ética.....	50
4.2.2 Seleção de animais.....	50
4.2.3 Coleta de dados.....	51
4.2.4 Amostras e análise laboratorial do hemograma.....	51
4.2.5 Análise dos Neutrófilos Tóxicos.....	52
4.2.6 Análises bioquímicas.....	53
4.2.7 Exame Microbiológicos.....	53
4.2.8 Análises Estatísticas .....	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.4 Conclusão.....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	67

**ANEXO 1**.....72  
**ANEXO 2** .....73

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O ferro é um elemento essencial para todas as células do organismo e tem funções importantes no metabolismo celular. Estas funções são o transporte de oxigênio e eritropoiese, no metabolismo energético, na síntese do DNA e nas respostas imunes. Nos mamíferos 75% do ferro encontram-se nas células eritróides, na molécula da hemoglobina, por isso alterações na concentração deste mineral podem ocasionar alterações hematológicas importantes (BOHN, 2013).

A anemia devido a doença inflamatória é secundária a inflamação. É considerada moderada, normocítica e normocrômica e não regenerativa. Normalmente está associada a vários distúrbios crônicos, incluindo doenças infecciosas, inflamatórias, imunomediadas e neoplásicas. Este tipo de anemia também tem sido chamado de anemia de doença crônica (CHIKAZAWA & DUNNING, 2016).

As causas de anemias em gatos são variadas, como as causadas pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV), por hemoparasitas, doença renal crônica, doença intestinal inflamatória, peritonite infecciosa felina (PIF), pancreatite, entre outras (CHIKAZAWA & DUNNING, 2016).

Os três principais mecanismos patológicos envolvidos na anemia por doença inflamatória são: diminuição da sobrevivência das hemácias, falha da medula óssea em aumentar a produção das hemácias para compensar o aumento de sua demanda e distúrbio da mobilização do ferro de depósito do sistema mononuclear fagocitário (CANÇADO & CHIATTONE, 2002; GRIMES & FRY, 2015).

Doenças envolvendo alterações na concentração sérica do ferro podem estar associadas ao excesso ou diminuição da sua biodisponibilidade no organismo, causando alterações no conteúdo corporal total do ferro. A falta de ferro disponível, mesmo com reservas corporais adequadas, está associada a processos inflamatórios. Esse mecanismo funciona como “protetor” diminuindo nutrientes essenciais para agentes infecciosos, resultando em má absorção de ferro sérico e sequestro do ferro, armazenado nos macrófagos, como consequência a baixas concentrações de ferro circulantes, gerando a deficiência funcional do ferro que contribui para o desenvolvimento de anemia (BOHN, 2013).

A inflamação sistêmica também altera os leucócitos, podendo ocasionar o aumento da demanda de neutrófilos e alterações tóxicas, gerando uma maturação e liberação rápida na circulação. A consequência desta resposta é a persistência de características imaturas no citoplasma de neutrófilos como: basofilia, corpúsculo de

Döhle, granulação tóxica, vacuolização, e alterações morfológicas como: neutrófilos gigantes (SCHNELLE & BARGER, 2012).

A quantidade e o tipo de toxicidade dos neutrófilos parecem estar associados com a severidade da doença e dos sinais clínicos em cães e gatos, ou seja, quantidade leve a moderada de neutrófilos tóxicos sugere prognóstico melhor (AROCH et al., 2005).

Estudos sobre o metabolismo do ferro são limitados na literatura veterinária; faltam informações sobre os parâmetros do ferro em gatos saudáveis e com anemia; isso ocorre pela indisponibilidade de reagentes específicos veterinários para análise desses parâmetros.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o comportamento do metabolismo do ferro nos gatos com anemia por inflamação devido a diferentes causas, como doença renal crônica, neoplasias, doenças infecciosas e hormonais e estabelecer valores de referência dos parâmetros do ferro em gatos saudáveis.

O presente trabalho foi desenvolvido e dividido em três capítulos. O primeiro capítulo é intitulado: “Revisão sobre o metabolismo do ferro em mamíferos”. O segundo capítulo, com o título “Anemias por doenças inflamatórias em gatos e o metabolismo do ferro” compreende a análise dos parâmetros do ferro em gatos saudáveis e em gatos com anemia por doença inflamatória. O terceiro capítulo “Neutrófilos tóxicos em gatos com doenças sistêmicas e seu prognóstico”, descreve as alterações em neutrófilos de gatos com doenças inflamatórias sistêmicas, e correlaciona o grau e a quantidade de neutrófilos tóxicos com o diagnóstico clínico.

## **1.1 HIPÓTESES**

Há melhora da anemia e das alterações hematológicas na resolução da inflamação.

O conhecimento sobre a cinética do ferro auxilia na avaliação e monitoramento de gatos com anemia por doença inflamatória.

O aumento do número de neutrófilos tóxicos em gatos indica pior prognóstico.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações hematológicas e a cinética do ferro em pacientes com anemia por doença inflamatória.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1 - Estabelecer a cinética do ferro em gatos com anemia de diferentes etiologias e em gatos saudáveis.
- 2 - Avaliar a resposta da medula óssea em gatos com anemia por doença inflamatória, por contagem de reticulócitos.
- 3 - Estabelecer as alterações no eritrograma, leucograma e bioquímica sérica de gatos com doenças inflamatórias.
- 4 - Correlacionar o grau e a quantidade de neutrófilos tóxicos com o diagnóstico clínico dos pacientes e prognóstico.
- 5 - Estabelecer os tipos de alterações tóxicas presentes nos neutrófilos nas doenças inflamatórias.

## REFERÊNCIAS

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

BOHN, A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 43, Nov 2013.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 24, n 2, p. 127-136, 2002.

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

GRIMES, C. N; FRY.M.M. Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. **Veterinary Pathology**. p. 298-311, vol. 52(2), 2015.

SCHNELLE, A. N.; BARGER, A. M. Neutropenia in Dogs and Cats: Causes and Consequences. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 42, p. 111-122, 2012.

## **2 CAPÍTULO 1: TÓPICOS SOBRE O METABOLISMO DO FERRO EM MAMÍFEROS.**

### **RESUMO**

O ferro é um elemento mineral essencial para as células do organismo com importantes funções no metabolismo dos mamíferos como no transporte de oxigênio, metabolismo energético, síntese de DNA e na eritropoiese. O fornecimento do ferro é determinado a partir de três fontes: absorção intestinal, reciclagem das hemácias senescentes e do ferro armazenado no fígado. No organismo pode ser dividido em três grupos: transporte, funcional e armazenamento. A fração do ferro transportada é ligada a proteína plasmática transferrina, o estoque corpóreo total de ferro é refletido pela ferritina. A sobrecarga de ferro é tóxica para as células causando lesão oxidativa no DNA, resultando em lesões e morte celular. Alguns distúrbios relacionados à regulação do ferro podem gerar alterações clínicas importantes, sendo a anemia a principal manifestação. Neste capítulo foi realizada uma revisão sobre o metabolismo do ferro em mamíferos, abordando os tópicos sobre sua formação e regulação corporal, cinética (transporte, funcional e armazenamento), sobrecarga e avaliação do metabolismo (ferro sérico, ferritina, transferrina e capacidade de ligação do ferro).

Palavras-chave: anemia, eritropoiese, ferritina e transferrina.

### ABSTRACT

Iron is an essential mineral for the body's cells with important functions in mammalian metabolisms, such as oxygen transport, energy metabolism, DNA synthesis and erythropoiesis. Iron supply is obtained from three sources: intestinal absorption, recycling of senescent erythrocytes, and iron stored in the liver. In the organism, iron can be divided into three groups: transport, functional and storage. The fraction of transported iron is bound to the plasma protein transferrin and the total body iron store is reflected by ferritin. Iron overload is toxic to cells, causing oxidative damage to DNA and resulting in cell injury and death. Some disorders related to iron regulation may lead to variety of clinical changes, anemia being the most important. In this chapter, a review of iron metabolism in mammals was carried out. Topics on body formation and regulation, iron kinetics (transport, functional and storage), overload and assessment of ferric metabolism (serum iron, ferritin, transferrin and binding capacity) were discussed.

Keywords: anemia, erythropoiesis, ferritin, transferrin.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial usado por todas as células do organismo, possuindo importantes funções no metabolismo dos mamíferos; estas funções estão envolvidas no transporte de oxigênio e eritropoiese, metabolismo energético, síntese do DNA; e respostas imunes. As células do organismo necessitam de uma quantidade suficiente de ferro para satisfazer suas necessidades e sua regulação é estritamente controlada (BOHN, 2013). O fornecimento de ferro às células do organismo provém de três principais fontes: absorção intestinal, reciclagem das hemácias senescentes e do ferro armazenado no fígado (OLVER et al., 2010).

A regulação do ferro corporal pela dieta ocorre através da absorção pelos enterócitos na porção proximal no duodeno, controlada pelo hormônio regulador de ferro hepcidina (BOHN, 2013). O ferro é estabilizado sob a forma férrica pela acidez do conteúdo gástrico e a ação do Citocromo B duodenal apical reduz o ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) em ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) (OLVER et al., 2010, PANTOPOULOS, 2012).

Os mamíferos não possuem uma via fisiológica para excreção de ferro, a homeostase do ferro corpóreo é regulada pelo nível de absorção (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004). A sobrecarga de ferro é tóxica para as células causando lesão oxidativa no DNA, por meio da reação de Fenton, produzindo radicais hidroxilas, resultando em lesões e morte celular (PANTOPOULOS, 2012). Distúrbios correlacionados a ingestão, perda ou regulação do ferro podem gerar alterações clínicas, algumas graves ou até mesmo fatais, sendo a anemia a manifestação mais importante (GROTTO, 2008; MCCOWN e SPECHT, 2011). Determinadas doenças alteram o metabolismo do ferro no organismo, como por exemplo a doença inflamatória, neoplasia, infecções entre outras (CHIKAZAWA et al., 2013).

A fração do ferro transportada se liga a proteína plasmática transferrina e corresponde a 1% do ferro total, a maior parte total de ferro corpóreo é encontrada no grupo heme, como hemoglobina dentro das hemácias, mioglobina dos músculos e em quantidades menores em enzimas e corresponde a fração funcional do ferro e uma quantidade significativa de ferro corpóreo também poder armazenada dentro de hepatócitos e macrófagos do sistema de fagocitário mononuclear na forma de ferritina e hemossiderina (HARVEY, 2008; MCCOWN e SPECHT, 2011; BOHN, 2013).

### 2.1.1 Ferroportina

A ferroportina exporta o ferro celular, localizando-se principalmente na superfície de diversas células como enterócitos intestinais, macrófagos, hepatócitos e células da placenta (GROTTO,2008; CHIKAZAWA & DUNNING, 2016). O ferro externalizado pela ferroportina está na forma ferrosa (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004).

### 2.1.2 Hepcidina

A hepcidina é um peptídeo produzido no fígado que circula pelo plasma e regula a concentração do ferro extracelular (absorção do ferro da dieta, na reciclagem das hemácias, e no movimento de ferro armazenado dos hepatócitos (NEMETH et al., 2004). Em processos inflamatórios a produção da citocina inflamatória interleucina-6 (IL-6), induz o aumento da produção de hepcidina, que resulta na internalização e degradação da ferroportina em macrófagos, enterócitos duodenais e hepatócitos, retendo o ferro nas células tornando-o indisponível no plasma (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004; GANZ & NEMETH,2006).

### 2.1.3 Concentração sérica do ferro

A avaliação do metabolismo do ferro é realizada pela análise bioquímica quantitativa do soro, mensurando-se o ferro transportado e estocado no organismo. O método utilizado para a determinação da concentração sérica do ferro é o colorimétrico, as amostras devem ser cuidadosamente manipuladas para evitar a contaminação pelo ferro presente no ambiente e deve-se evitar amostras com moderada a acentuada hemólise, pela presença da hemoglobina que interfere no teste colorimétrico. (WEISS, 2010; ANDREWS, 2010). A concentração sérica do ferro não é um reflexo preciso dos estoques de ferro corporal, ou seja, pode-se ter uma diminuição do ferro sérico em doenças inflamatórias, nas deficiências por ferro e na aceleração da eritropoiese (WEISS, 2010; BOHN, 2013). O aumento sérico do ferro pode ser observado nas anemias hemolíticas, diseritropoiese, anemia hipoplásica, anemia aplástica e na sobrecarga de ferro (ANDREWS, 2010).

#### 2.1.4 Ferritina sérica

A ferritina é uma proteína produzida pelo fígado. Em humanos, reflete o estoque corpóreo total de ferro (ALENCAR et al., 2002). A apoferrina é uma fração protéica, que ligada ao complexo forma a apoferrina-ferro constituindo a ferritina que é forma solúvel de armazenamento do ferro. A hemossiderina corresponde à forma degradada da ferritina, permitindo a formação de agregados de ferro (GROTTO,2008).

A ferritina é considerada uma proteína de fase aguda positiva, portanto, sua concentração sérica aumenta nos processos inflamatórios. Concentração de ferritina sérica abaixo do intervalo de referência indica deficiência de ferro; nas concentrações séricas acima do intervalo de referência pode estar associado a sobrecarga de ferro ou inflamação (BOHN, 2013). Para a determinação da ferritina sérica em humanos podem ser utilizadas algumas técnicas com reações por anticorpos, incluindo, imunoturbidimetria, radioimunoensaio, ELISA e quimioluminescência. (PIRES et al., 2011).

#### 2.1.5 Transferrina sérica

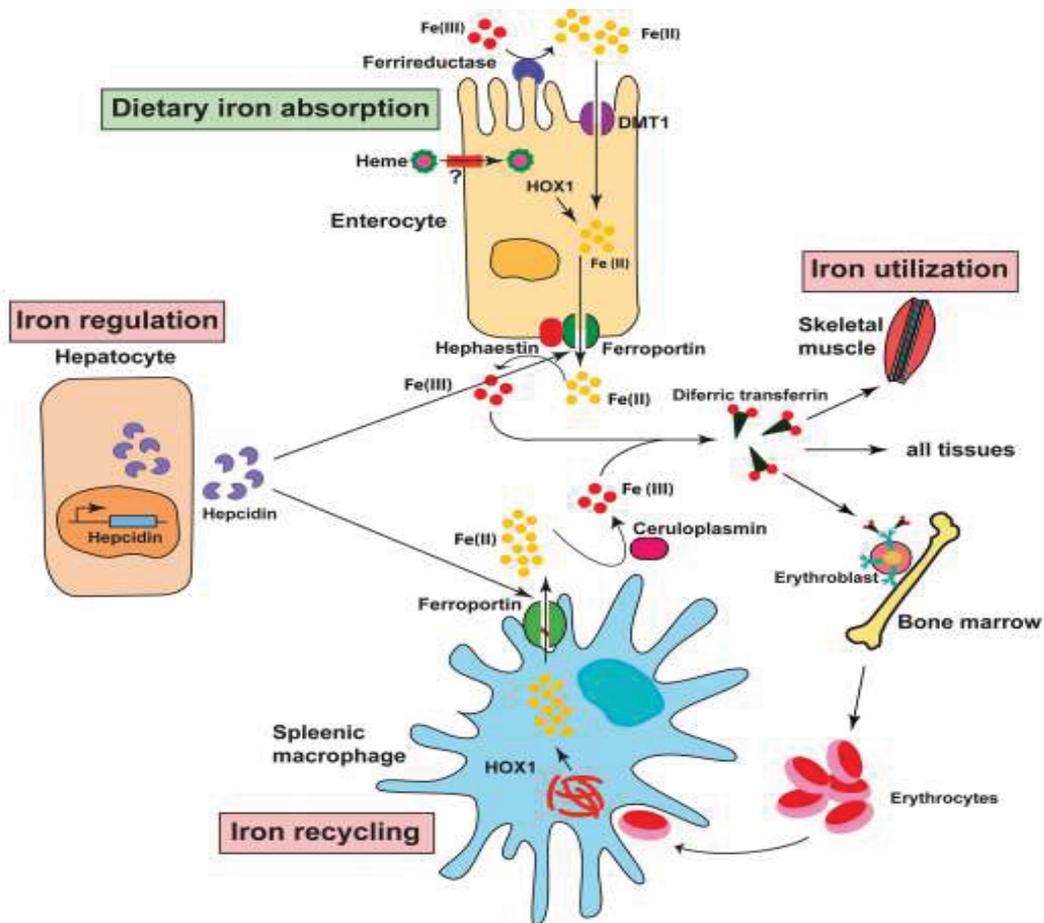
No plasma o ferro é liberado principalmente a partir dos enterócitos ou macrófagos reticuloendoteliais, sendo capturado e transportado até os tecidos através da transferrina (WANG & PANTOPOULOS, 2011). O ferro liga-se ao receptor específico da transferrina 1(TfR1) (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2004). A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, diminui com processos inflamatórios. Nas concentrações séricas acima do intervalo de referência pode estar associada à deficiência de ferro ou doença hepática crônica. (BOHN, 2013).

#### 2.1.6 – Capacidade de Ligação do Ferro

A capacidade de ligação de ferro (UIBC) em combinação com o ferro sérico é uma ferramenta de diagnóstico eficaz para detecção das várias doenças envolvendo ferro. A soma do UIBC e do ferro sérico fornecem o valor da capacidade de fixação do ferro total (TIBC). TIBC representa a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas são capazes de ligar (ANDREWS, 2010).

A seguir está ilustrada a regulação sistêmica do ferro no organismo (Figura 1).

Figura 1: Esquema sobre a regulação sistêmica do ferro no organismo.



Fonte: PANTOPOULOS, 2012.

Na literatura veterinária brasileira há poucos estudos relacionados aos parâmetros do ferro, com foco principal em cães, já em gatos o tema citado é ainda mais escasso. Os objetivos do presente estudo foram revisar a cinética do ferro em mamíferos; estabelecer valores de referência para os parâmetros do ferro em gatos saudáveis; avaliar os parâmetros do ferro (ferritina, transferrina, ferro sérico e capacidade de ligação do ferro) em gatos anêmicos.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Rev. educ. contin. CRMV-SP I Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo, fascículo 5, v. 2, p. 196 - 205. 2002.
- ANDREWS, G.A. Measurement of Serum Iron Concentration, TIBC, and Serum Ferritin Concentration. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. p. 1162 - 1164. 2010.
- BOHN, A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 43, Nov 2013.
- CHIKAZAWA, S., DUNNING, M.D. A review of anemia of inflammatory disease in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**. v. 57, p. 348–353, 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.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Review - Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. vol. 1763, p.690-699, 2006.
- GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. p. 390-397, 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.

OLVER, C.S; ANDREWS, G.A, SMITH, J.E; KANEK, J.J. Erythrocyte Structure and Function. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. p. 123-129.2010.

NEMETH, E., TUTTLE, M. S., POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; MCVEY WARD, D.; GANZ, T.; KAPLAN, J. **Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization**. *Science* 306, p. 2090 -2093, 2004.

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.

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

PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S. K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. **Biochemistry (including biophysical chemistry & molecular biology)**. v. 51, p. 5705–5724, 2012.

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

WANG, J., PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**. v. 434, p.365–381, 2011.

WEISS, D. J. Iron and Copper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. p. 167 - 171. 2010.

### **3 CAPÍTULO 2: ANEMIAS POR DOENÇAS INFLAMATÓRIAS EM GATOS E O METABOLISMO DO FERRO**

#### **RESUMO:**

A anemia secundária à inflamação é considerada moderada, normocítica e normocrômica e não regenerativa. Normalmente está associada a vários distúrbios crônicos, incluindo doenças infecciosas, inflamatórias, imunomediadas e neoplásicas. Os objetivos do estudo foram determinar os valores de referência para ferro sérico, ferritina, transferrina e capacidade de ligação do ferro em gatos saudáveis; avaliar o metabolismo do ferro em gatos com anemia por doenças inflamatórias, como na doença renal crônica, insuficiência renal aguda, neoplasias, doenças infecciosas e hormonais. Os gatos foram classificados em grupos: G1 = controle, gatos clinicamente saudáveis (60) e G2 = gatos anêmicos (48). No G2 os gatos foram separados em subgrupos: doenças infecciosas, metabólica, traumática/anatômica, neoplásica e neoplásica associada a doença infecciosa. Foram realizadas análises hematológicas e exames bioquímicos para estabelecer os valores de referência do metabolismo do ferro em gatos saudáveis e avaliar o seu comportamento em gatos anêmicos. A metodologia realizada para estabelecer e avaliar o metabolismo do ferro em ambos os grupos foi o colorimétrico e imunoensaio turbidimétrico com reagentes da linha humana. No G1 os resultados obtidos para os intervalos de referência foram: ferro = 61,8 a 217,8 µg/dL, ferritina = 17,7 a 109,4 ng/mL, transferrina = 77,9 a 368,2 mg/dL e capacidade de ligação do ferro = 174,8 a 423,9 mg/dL. No grupo (G2) verificou-se variação nos valores do ferro sérico, sendo elevados de 218,6 a 366,8 µg/dL nas doenças infecciosas. Na transferrina sérica observou-se valores elevados de 376,3 a 614,6 mg/dL nas doenças infecciosas, metabólicas e traumáticas/anatômicas. Na ferritina verificou-se o aumento sérico 153,5 ng/mL em um paciente com doença renal crônica. As principais causas da anemia nos gatos foram as doenças infecciosas, seguida pelas doenças metabólicas. Os resultados obtidos na avaliação do metabolismo do ferro nos pacientes anêmicos evidenciam a necessidade da avaliação desses parâmetros no auxílio para o tratamento e suplementação com o mineral.

Palavras-chave: capacidade de ligação do ferro, ferritina, gatos, transferrina.

## ABSTRACT

Anemia of inflammation is considered moderate, normocytic and normochromic and non-regenerative. It is usually associated with a variety of chronic disorders, including infectious, inflammatory, immune-mediated, and neoplastic diseases. This study aimed to determine reference parameters for serum iron, ferritin, transferrin, iron-binding capacity in healthy cats; evaluate iron metabolism in cats with anemia caused by inflammatory diseases, such as chronic kidney disease, acute kidney failure, neoplasms, infectious and hormonal diseases. Cats were divided into groups: G1= healthy (60) and G2= anemic (48). In G2, cats were separated into groups: infectious, metabolic, traumatic/anatomical, neoplastic, and neoplastic associated with infectious disease. Hematological analyzes and biochemical tests were performed to determine reference values for iron metabolism in healthy cats and to evaluate their behavior in anemic cats. The methodology used to determine and evaluate iron metabolism in both groups was the colorimetric and turbidimetric immunoassay with human line reagents. In G1, the results obtained for the reference intervals were: iron = 61.8 to 217.8  $\mu\text{g/dL}$ , ferritin = 17.7 to 109.4  $\text{ng/mL}$ , transferrin = 77.9 to 368.2  $\text{mg/dL}$  and iron binding capacity = 174.8 to 423.9  $\text{mg/dL}$ . In the group (G2) there was variation in serum iron values, which ranged from 218.6 to 366.8  $\mu\text{g/dL}$  in infectious diseases. In serum transferrin, high values from 376.3 to 614.6  $\text{mg/dL}$  were observed in infectious, metabolic and traumatic/anatomical diseases. In ferritin, there was a serum increase of 153.5  $\text{ng/mL}$  in a patient with chronic kidney disease. The main causes of anemia in cats were infectious diseases, followed by metabolic diseases. The results obtained in the evaluation of iron metabolism in anemic patients show the necessity of evaluating these parameters to assist in the treatment and supplementation of the mineral.

Keywords: iron binding capacity, ferritin, cats, transferrin.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As anemias são comuns na rotina veterinária. Em gatos as causas de anemia podem ser hemorrágicas, por hemólise ou diminuição da produção de hemácias (KORMAN et al., 2013). O ferro é um elemento essencial utilizado por todas as células do organismo, com importantes funções no metabolismo dos mamíferos, entre elas o transporte de oxigênio, eritropoiese, metabolismo energético, síntese do DNA, e resposta imune (GROTTO, 2008; BOHN, 2013).

A anemia secundária à inflamação em gatos normalmente está associada a vários distúrbios crônicos, incluindo doenças infecciosas, inflamatórias, imunomediadas e neoplásicas. Este tipo de anemia é também denominado de anemia de doença crônica (CHIKAZAWA & DUNNING, 2016). Essa anemia envolve a hepcidina produzida principalmente no fígado e seu receptor ferroportina. A hepcidina é uma proteína de fase aguda do tipo II, e aumenta devido a resposta inflamatória e ação das citocinas principalmente a interleucina (IL-6) (GRIMES & FRY, 2015).

Os principais mecanismos patológicos envolvidos na anemia por doença inflamatória em gatos são: diminuição da sobrevivência das hemácias, falha da medula óssea em aumentar a produção das hemácias para compensar o aumento de sua demanda e distúrbio da mobilização do ferro de depósito do sistema mononuclear fagocitário (GRIMES & FRY, 2015).

A inflamação altera o metabolismo do ferro e diminui sua concentração plasmática (hipoferremia); em processos inflamatórios graves ou crônicos e desenvolve uma anemia normocítica normocrômica (GANZ & NEMETH, 2006).

Em humanos os estudos sobre o metabolismo do ferro são mais abrangentes. A falta de ferro disponível, mesmo com reservas corporais adequadas, está associada a processos inflamatórios. Esse mecanismo funciona como “protetor”, diminuindo nutrientes essenciais para agentes infecciosos, resultando em má absorção de ferro sérico e sequestro do ferro armazenado nos macrófagos, baixas concentrações de ferro circulantes, gerando a deficiência funcional do ferro que contribui para o desenvolvimento de anemia. (BOHN, 2013).

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, que diminui com processos inflamatórios. A ferritina é considerada uma proteína de fase aguda positiva, portanto, sua concentração sérica aumenta com processos inflamatórios, ambas são sintetizadas pelo fígado (BOHN, 2013). Os valores dos parâmetros do ferro para gatos encontrados

na literatura citada por KANEKO et al (1997) foram: ferro sérico (68,0 a 215,0 µg/dL), ferritina: (32 a 123 ng/mL), transferrina: (169 a 325 mg/mL). A metodologia utilizada para a análise do ferro e transferrina foi colorimétrica. Os kits comerciais de ferritina não estão disponíveis para animais. A avaliação da ferritina sérica pode ser realizada pelo Laboratório de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Kansas e a metodologia é espécie - específica.

As informações são limitadas na literatura veterinária sobre dados que correlacionam e identificam o comportamento do metabolismo do ferro em gatos saudáveis e em gatos anêmicos com doenças inflamatórias, associando a resposta medular, avaliação eritrocitária e leucocitária. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram: (1) determinar os parâmetros de referência para ferro sérico, ferritina, transferrina, capacidade de ligação do ferro em gatos saudáveis; (2) avaliar o metabolismo do ferro em gatos com anemia por doença inflamatória em diferentes enfermidades, incluindo doença renal crônica, falha renal aguda, neoplasias, doenças infecciosas e doenças hormonais.

## 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 037/2019 (ANEXO).

### 3.2.2 Seleção de animais

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com gatos atendidos na rotina clínico-cirúrgica e de especialidades do Hospital Veterinário (HV) da UFPR, na Clínica Mania de Gato, especialista no atendimento de felinos, em uma organização não governamental (Beco da Esperança).

Foram selecionados para o estudo 108 gatos de ambos os sexos, com diferentes raças e faixas etárias (de 9 meses a 13 anos). Os gatos foram subdivididos em dois grupos: (G1) controle, com 60 gatos clinicamente saudáveis nos exames clínicos e laboratoriais (hemograma e perfil bioquímico). Grupo (G2): 48 gatos anêmicos, clinicamente doentes, machos e fêmeas, com raças diferentes e faixa etária entre 7 meses e 18 anos.

Os critérios de inclusão dos animais do grupo G1 consistiu em exames clínicos (escore corporal, frequência cardíaca e respiratória, temperatura corpórea e anamnese), laboratoriais (hemograma, bioquímica hepática e renal) com resultados normais e testes rápidos de ELISA para detecção dos Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) não reagentes. No hemograma, foi considerado normal valores do hematócrito:  $> 27\%$  e hemoglobina  $> 8,0$  g/dl. Os critérios de exclusão foram gatos em tratamento medicamentoso ou suplementado com ferro, gestação.

Para os critérios de inclusão no grupo G2 foram realizados os mesmos exames descritos para o grupo de gatos saudáveis, além de outros exames complementares, de acordo com a suspeita clínica, como ultrassonografia, radiografia, exames citológicos, histológicos e contagem de reticulócitos. No hemograma, foram considerados anêmicos gatos com hematócrito  $\leq 24\%$  ou hemoglobina  $\leq 8,0$  g/dl. Os critérios de exclusão foram gatos em tratamento com suplementação de ferro e gestação.

### 3.2.3 Coleta de dados

Foram analisadas as fichas clínicas dos pacientes para obtenção de dados sobre: raça, sexo, idade, castração, acesso à rua, contactantes, vacinação, vermífugo, exames realizados, diagnóstico e evolução do paciente. A evolução foi realizada com o acompanhamento dos pacientes em que houve retorno ao hospital veterinário e alta clínica.

### 3.2.4 Amostras

As amostras foram coletadas de pacientes após a contenção física, por venopunção jugular, cefálica ou femoral e acondicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA) para a realização do hemograma e sem anticoagulante para separação e obtenção do soro e realização das análises bioquímicas. O sangue total foi mantido refrigerado e a análise ocorreu dentro de 12 horas. O esfregaço sanguíneo foi confeccionado dentro de 2 horas após a coleta e a coloração realizada foi MGG. Os tubos sem anticoagulantes foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm, os soros foram separados em microtubos e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização dos parâmetros do ferro e avaliação hepática e renal. Os parâmetros do ferro não foram realizados em 14 amostras devido ao volume insuficiente de amostra ou presença de lipemia/ hemólise.

### 3.2.5 Análises Laboratoriais

#### 3.2.5.1 Hemograma

Os parâmetros hematológicos: número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos totais e plaquetas foram realizados pelo analisador automático (BC-2800 Vet, Mindray®). A confirmação do hematócrito foi feita pela técnica de microhematócrito e a análise das proteínas plasmáticas foi realizada por refratometria.

Nos esfregaços sanguíneos foram realizadas a contagem diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e análise de alterações morfológicas eritrocitárias e leucocitárias, em microscopia com a objetiva de 100X.

#### 3.2.5.2 Contagem de Reticulócitos – Gatos anêmicos

Para a realização da contagem de reticulócitos foram utilizadas as mesmas amostras de sangue total em EDTA para o hemograma e a análise ocorreu dentro de duas horas. Utilizou-se o reagente azul de cresil brilhante misturado ao sangue com EDTA na proporção 1:1, incubado em banho-maria por 15 minutos na temperatura de 37°C. Após, realizou-se a confecção da lâmina e a leitura microscópica. Para a leitura foram contados os reticulócitos agregados e pontilhados presentes no total de 1.000 hemácias com o resultado em porcentagem. Após a análise do resultado obtido classificou-se o grau de resposta medular (TVEDTEN, 2010).

**Tabela 1 - Grau de resposta medular de acordo com a porcentagem de reticulócitos, segundo - TVEDTEN (2010).**

<b>Resposta Medular</b>	<b>Reticulócitos Agregados (%)</b>	<b>Reticulócitos Pontilhados (%)</b>
Não regenerativa	0-0,4	1-10
Regeneração - leve	0,5-2	10-20
Regeneração - moderada	3-4	20-50
Regeneração - acentuada	>5	>50

### 3.2.5.3 Análises bioquímicas

Para realização dos exames bioquímicos parâmetros do ferro, avaliação hepática e renal, as amostras de sangue foram coletadas em tubo sem anticoagulante, centrifugadas por 5 minutos a 3.000 rpm, para a separação do soro, armazenadas em microtubos e congeladas a -20°C.

Os exames bioquímicos foram realizados por espectrofotometria, em Analisador Bioquímico Automático (BS-200, Mindray®) com os reagentes específicos para cada teste, sendo mensurados os seguintes parâmetros: Albumina - método verde Bromocresol, Alanina aminotransferase (ALT) - método cinético, fosfatase alcalina (FA) - método cinético, gama-glutamil transferase (GGT) - método cinético, ureia - método cinética UV, creatinina - método Cinético de Tempo Fixo (Colorimétrico), proteína total - método de Biureto, globulina (proteína total - albumina), ferro sérico - método colorimétrico utilizando Ferene, Transferrina - método de imunoturbidimetria, Capacidade de ligação de ferro (UIBC) - método de fotométrico - com ferene, Ferritina - método de imunoturbidimetria. Ao todo 31 análises bioquímicas foram excluídas para anular erros pré-analíticos como também amostras insuficientes para as análises dos exames bioquímicos.

### 3.2.6 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente através dos programas *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows®. As comparações entre dois grupos foram feitas, através da Correlação e Regressão Linear para os gráficos e o programa Freeware Reference Value Advisor 2.1 para estatística descritiva e para os histogramas, que segue os conceitos estabelecidos pelo Comitê de Garantia de Qualidade e Padrões de Laboratório (QALS) da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP), as recomendações internacionais foram atualizadas recentemente pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (GEFFRÉ et al, 2011).

Para a estatística descritiva foram utilizados métodos paramétricos dos dados da média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo. Os intervalos de referência para cada teste foram determinados usando teste não paramétrico com intervalo de confiança de 90% por método de Bootstrap. Para o teste de normalidade foi usada a estatística de

Anderson-Darling para verificação da distribuição normal do valor de p. Os métodos de Tukey e Dixon-Reed foram usados para identificar e confirmar possíveis outliers (GEFFRÉ et al, 2011).

Para a metodologia utilizada neste estudo foram seguidos os modelos de avaliação do metabolismo do ferro estabelecidos no estudo realizado por BAGGIO (2019), em cães.

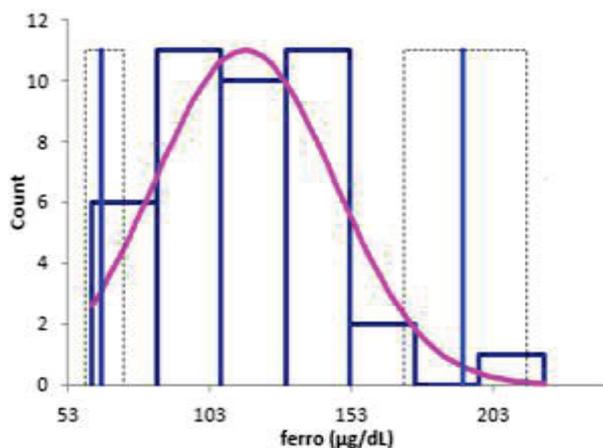
### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão apresentados os valores dos parâmetros do ferro para os gatos saudáveis - (G1) (Tabela 1).

**Tabela 2 - Valores dos parâmetros do ferro em gatos saudáveis - grupo G1.**

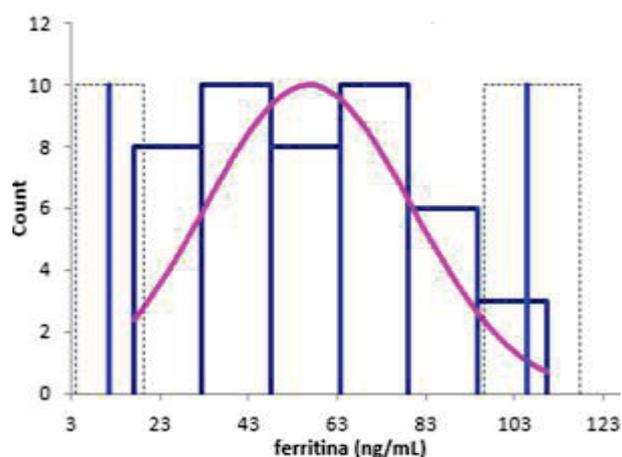
	Ferro Sérico ( $\mu\text{g/dL}$ )	Ferritina ( $\text{ng/mL}$ )	Transferrina ( $\text{mg/dL}$ )	UIBC ( $\text{mg//dL}$ )
Nº de amostras	(41)	(45)	(40)	(46)
Média	115,4	56,5	172,0	297,0
Mediana	112,7	56,2	154,0	293,5
Desvio padrão	31,8	23,3	78,9	62,5
Mínimo	61,4	17,0	77,81	172,9
Máximo	221,0	110,3	368,72	430,9
Intervalo de referência	61,8-217,8	17,7 - 109,4	77,9 - 368,2	174,8 – 423,9

A seguir estão os histogramas com os valores do metabolismo do ferro em gatos saudáveis (G1) (Figuras 2,3,4 e 5).



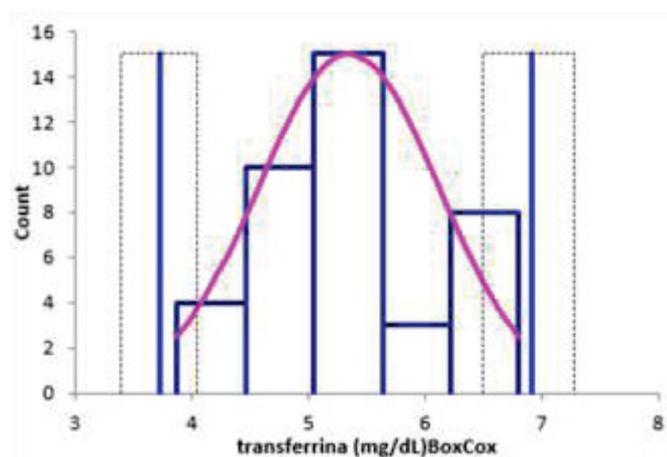
**Figura 2. Histograma representando o ferro sérico do grupo (G1).**

A curva na cor rosa representa a distribuição normal, barras verticais na cor azul são os limites de referência, e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 90%.



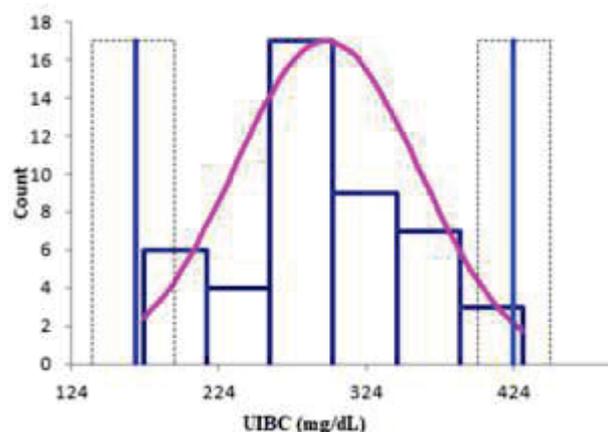
**Figura 3. Histograma representando a ferritina sérica do grupo (G1).**

A curva na cor rosa representa a distribuição normal, barras verticais na cor azul são os limites de referência, e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 90%.



**Figura 4. Histograma da transferrina sérica do grupo (G1) após transformação Box Cox.**

A curva na cor rosa representa a distribuição normal, barras verticais na cor azul são os limites de referência, e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 90%.



**Figura 5. Histograma representando a capacidade de Ligação do Ferro (UIBC) do grupo (G1).**

A curva na cor rosa representa a distribuição normal, barras verticais na cor azul são os limites de referência, e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 90%.

Nos gatos saudáveis (G1) o ferro sérico variou de 61,8 a 217,8 µg/dL, semelhantes aos valores de referência citados por KANEKO et al. (1997), de 68,0 a 215,0 µg/dL. A metodologia utilizada foi a colorimétrica utilizando Ferene. Em estudos recentes realizados por NUNES (2019), que avaliou o estoque de ferro na medula óssea de gatos jovens, clinicamente saudáveis, e determinou os valores de referência do ferro sérico, a média do ferro sérico foi 79,6 µg/dL, variando de 36,9 a 147,0 µg/dL. Houve variação

dos resultados do presente estudo e o realizado por NUNES (2019). Uma das hipóteses poderia ser devido aos reagentes utilizados, de marcas diferentes com metodologias diferentes.

No grupo G1 o intervalo de referência da ferritina sérica variou de 17,7 a 109,4 ng/mL e o utilizado foi da marca Kovalent® de uso humano, que possui partículas de látex de poliestireno de tamanho uniforme revestidas com imunoglobulinas G de coelho anti-ferritina humana. Quando a amostra contendo ferritina é misturada com o reagente, ocorre uma nítida reação de aglutinação, sendo mensurada pela técnica de turbidimetria. ANDREWS et al. (1994) em estudo quantitativo, para medir ferritina sérica felina, em 40 gatos aparentemente saudáveis, utilizaram a técnica do ensaio de imunoabsorção enzimática com dois anticorpos monoclonais, e a média foi 76,0 ng/mL e o desvio padrão 24,0 ng/mL). O estudo correlacionou a ferritina sérica com os níveis de ferro em tecidos (baço e fígado). BAGGIO (2019) em cães saudáveis, utilizou a mesma metodologia deste trabalho, para determinar o intervalo de referência da ferritina sérica que variou de 19,4 a 93,5 ng/mL.

A metodologia utilizada de imunoensaio turbidimétrico, não havia sido utilizada para gatos até o presente estudo. Essa técnica utiliza imunoprecipitação (antígenos e anticorpos) e a dispersão da luz para quantificar as substâncias ou componentes químicos na amostra. Os resultados obtidos apresentam-se próximos dos resultados realizados por ANDREWS et al., 1994, porém as metodologias são diferentes.

O intervalo de referência estabelecido no presente estudo para transferrina no grupo G1 foi 77,9 a 368,2 mg/dL através da metodologia por imunoensaio turbidimétrico. Em estudos realizados por PIRES et al. (2011) em cães, obteve-se o valor médio foi 254,6 mg/dL. NUNES (2019) também estabeleceu o valor médio e desvio padrão da transferrina para gatos saudáveis ( $217,9 \pm 41,7$  mg/dL).

BAGGIO (2019) estabeleceu o valor de referência para transferrina em cães saudáveis de 33,8 a 610,3 mg/dL utilizando a metodologia do imunoensaio turbidimétrico. No estudo atual a metodologia utilizada para a dosagem foi imunoensaio turbidimétrico, que ocorre pela reação antígeno-anticorpo, a marca do reagente foi Kovalent® de uso humano. Os resultados da transferrina são diferentes quando comparados ao estudo realizado por NUNES (2019), a justificativa poderia ser a metodologia e reagentes diferentes.

No grupo G1 o intervalo de referência estabelecido no presente estudo para a capacidade de ligação do ferro foi 174,8 a 423,8 mg/dL. A metodologia utilizada foi

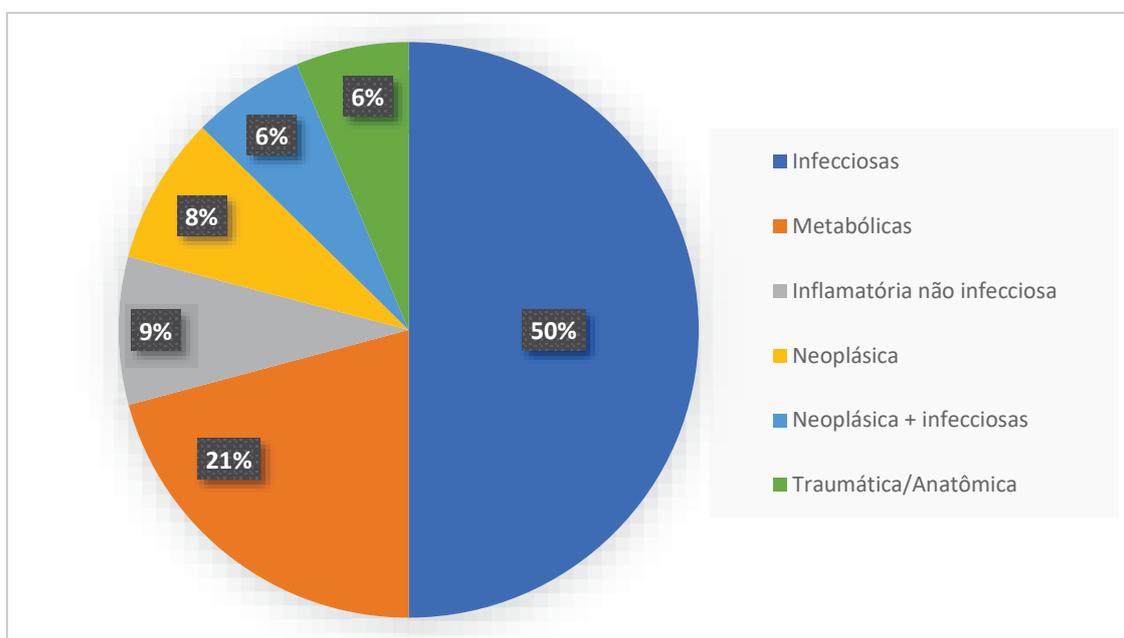
fotométrica utilizando Ferene, e o reagente foi de marca Kovalent® de uso humano. NUNES (2019) relatou o valor médio 331,0 mg/dL e desvio padrão 59,2 mg/dL. Os resultados do atual estudo foram semelhantes ao estudo citado, porém as metodologias foram diferentes.

A metodologia e os reagentes utilizados para o estudo da cinética do ferro estabeleceram resultados de referência para gatos saudáveis, a ferritina pode ser quantificada, mesmo com reagente não específico para a espécie. A possível justificativa está relacionada com a alta semelhança nas cadeias de aminoácidos entre as espécies. As metodologias, colorimétrica e imunoenensaio tubidimétrico (antígeno-anticorpo) da marca Kovalente de uso humano podem ser utilizados na rotina laboratorial da análise do metabolismo do ferro em gatos.

No grupo (G2) os gatos anêmicos foram separados de acordo com as doenças, analisados os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

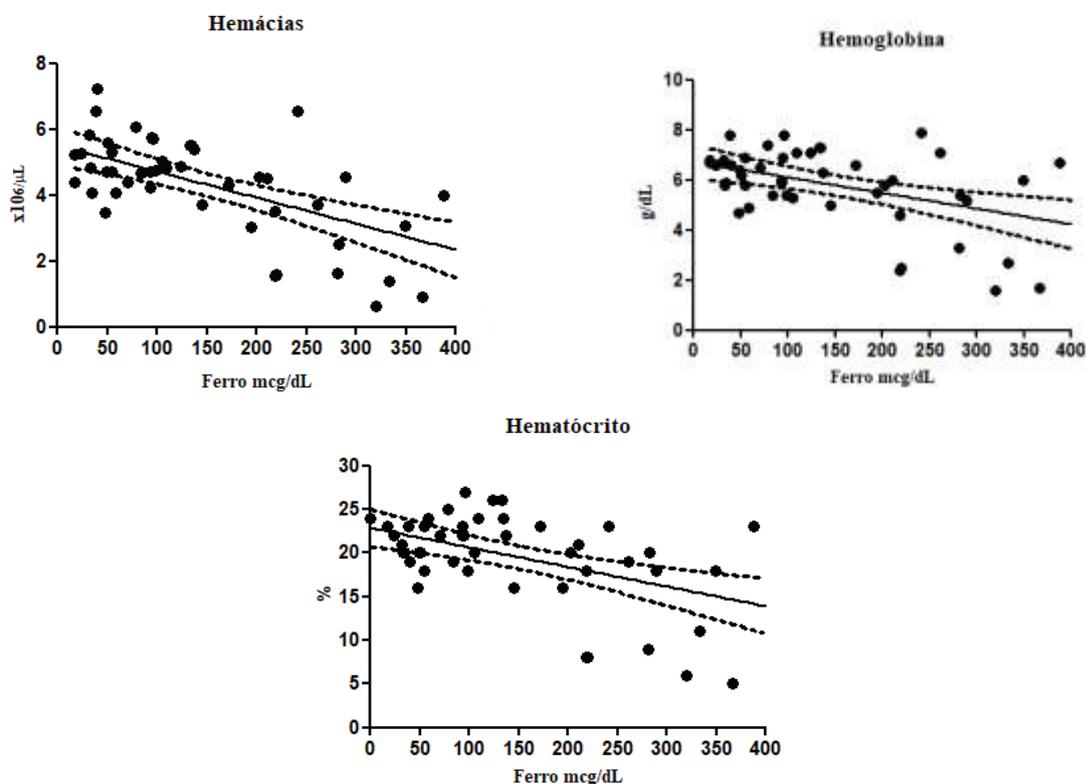
Na figura 6 estão apresentados os grupos de doenças dos 48 gatos anêmicos do grupo G2.

**Figura 6 - Porcentagem de gatos anêmicos (G2) de acordo com o grupo de doenças.**



A seguir estão representados os parâmetros hematológicos correlacionando com o ferro dos gatos doentes G2 (Figura 7).

**Figura 7 - Avaliação dos parâmetros hematológicos - hemácias (milhões/ $\mu$ L), hematócrito (%) e concentração de hemoglobina (g/dL) correlacionado com a cinética do ferro sérico nos gatos anêmicos - G2.**



No grupo G2 verificou-se que os parâmetros hematológicos: hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina estavam diminuídos. Os valores das hemácias (\*\* $p < 0,0001$ ), hemoglobina (\*\* $p < 0,0010$ ) e hematócrito (\*\* $p < 0,0034$ ), variaram com a quantidade de ferro. A concentração de ferro sérico variou (41,6% normal, 29,2% aumentado e 29,2% diminuído) nos gatos anêmicos com doenças inflamatórias.

No atual estudo 41,6% dos gatos apresentaram o ferro sérico dentro do intervalo de referência; 29,2% apresentaram aumento do ferro sérico, demonstrando a importância da avaliação do metabolismo do ferro antes de realizar suplementações com o mineral. Somente 29,2% dos gatos apresentaram o ferro sérico diminuído, isso pode ser justificado pela resposta nos processos inflamatórios associados às infecções e neoplasias que diminuem a concentração de ferro sérico e reduzem a eritropoiese, levando a uma anemia por doença crônica ou inflamação (BOHN, 2013; CHIKAZAWA et al., 2013; CHIKAZAWA & DUNNING, 2016).

A seguir está apresentada a classificação das anemias quanto à resposta da medula óssea (regenerativa ou não regenerativa), morfologia eritrocitária e gravidade da anemia

dos gatos anêmicos (G2) (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Para a classificação das anemias utilizou-se os valores estabelecidos por TVEDTEN (2010) no estudo.

**Tabela 3 - Grau de resposta medular de acordo com a porcentagem de reticulócitos nos 48 gatos anêmicos.**

	Não regenerativa	Regenerativa leve	Regenerativa moderada
Nº gatos	42	4	2
(%)	87,5%	8,3%	4,2%

**Tabela 4 – Classificação da gravidade da anemia de acordo com hematócrito (%) para gatos, segundo - TVEDTEN (2010).**

	Anemia Leve (20-26%)	Anemia Moderada (14-19%)	Anemia Grave (10-13%)	Anemia Severamente Grave (<10%)
Nº gatos	30	12	1	5
(%)	62,5%	25%	2,1%	10,4%

**Tabela 5- Classificação morfológica da anemia e alterações eritrocitárias em 48 gatos anêmicos, segundo critérios de HARVEY (2012).**

	Normocítica Hipocrômica	Microcítica normocrômica	Normocítica Normocrômica	Macroscítica Hipocrômica	Microcítica hipocrômica
Nº gatos	17	12	12	5	2
(%)	35,4%	25%	25%	10,4%	4,2%
	A (R) P (R) C. H.J (R) MTR(-)	A (R) P (R) C. H.J (R) MTR(R)	A (R) P (R) C.H.J (R) MTR (-)	A (M) P (M) C. H. J (-) MTR (M)	A (R) P (R) C. H. J (R) MTR (R)

Anisocitose (A), Policromatófilos(P), Corpúsculo Howell-Jolly (CHJ), Metarrubrócitos (MTR).  
Resposta medular: (R)raros, (M) moderado, (A) acentuado. (-) não observado.

No presente estudo 87,5% dos gatos apresentaram anemia não regenerativa, através da contagem de reticulócitos, e a gravidade da anemia predominante foi leve, seguida pela anemia moderada, severa e grave, segundo ALENCAR et al. (2002) doenças inflamatórias podem apresentar anemia leve a moderada não regenerativa. No estudo retrospectivo realizado por KORMAN et al. (2013) com 180 gatos anêmicos, a gravidade da anemia predominante foi leve (35,6%), seguida pela moderada (32,2%), severa (19,4%) e grave (12,8%) corroborando com o presente estudo. Sobre a classificação da resposta medular nos gatos anêmicos pela avaliação da contagem de reticulócitos, no atual estudo houve predomínio de anemia não regenerativa, nas seguintes doenças: doença

renal crônica, neoplasias, processos inflamatórios, doenças infecciosas (virais, bacterianas e fúngicas). Tais doenças também foram relatadas no estudo de OLSON & HOHENHAUS (2019) sobre anemia não regenerativa em gatos.

Na classificação morfológica realizada através dos parâmetros hematimétricos houve predomínio da anemia normocítica hipocrômica, no qual as hemácias possuem tamanho normal, porém há uma diminuição da concentração de hemoglobina, os resultados divergem dados literários citados por ALENCAR et al. (2002), CHIKAZAWA & DUNNING (2016), que classificam a anemia por doença inflamatória em normocítica normocrômica.

Os resultados dos parâmetros leucocitários dos gatos do grupo G1 e G2 estão representados pela média, e o desvio padrão (Tabelas 6). Verificou-se nos gatos com anemia um aumento do número de neutrófilos bastonetes no sangue, indicando desvio nuclear de neutrófilos a esquerda (DNNE) e processo inflamatório.

**Tabela 6 - Média e desvio padrão dos parâmetros leucocitários dos gatos saudáveis (grupo G1) e doentes (G2).**

	Grupo G1	Grupo G2	Valor de Referência
Nº de Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}$ )	11.265 $\pm$ 3.941	14.927 $\pm$ 9.349	5.500 a 19.500
Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ )	6.835 $\pm$ 3.574	11.451 $\pm$ 8.338	2.500 a 12.500
Bastonetes ( $\mu\text{L}$ )	-	466 $\pm$ 960,9	0 a 300
Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	3.211 $\pm$ 1.400	2.134 $\pm$ 2.621	1.500 a 7.000
Eosinófilos( $\mu\text{L}$ )	745 $\pm$ 480,0	281 $\pm$ 436,8	0 a 1.500
Monócitos ( $\mu\text{L}$ )	170 $\pm$ 214,0	170 $\pm$ 287,7	0 a 850

**Valor de P <0.05: Leucócitos totais:** P<0.0001; **Neutrófilos:** P<0.0001; **Bastonetes:** P<0.0003; **Linfócitos:** P<0.0073; **Eosinófilos:** P<0.0001.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos dos gatos dos grupos G1 e G2 estão representados pela média, e o desvio padrão (Tabela 7).

**Tabela 7 - Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos gatos saudáveis (grupo G1) e doentes (G2).**

	Grupo G1	Grupo G2	Intervalo de referência
ALT (UI/L)	59,2 $\pm$ 33,8	95,0 $\pm$ 157,2	26,0 – 83,0 UI/L
FA (UI/L)	44,5 $\pm$ 28,6	68,0 $\pm$ 111,4	25,0 – 93,0 UI/L
GGT (UI/L)	7,4 $\pm$ 3,28	10,0 $\pm$ 3,29	1,3 – 5,1 UI/L
Creatinina (mg/dL)	1,1 $\pm$ 0,25	1,87 $\pm$ 2,2	0,8 – 1,8 mg/dL
Ureia (mg/dL)	60,4 $\pm$ 10,1	101 $\pm$ 123,5	42,0 – 64,0 mg/dL
ProteínaTotal (g/dL)	6,8 $\pm$ 0,97	6,5 $\pm$ 1,53	6,0 – 7,4 g/dL
Albumina (g/dL)	2,71 $\pm$ 0,35	2,1 $\pm$ 0,55	2,1-3,3 g/dL
Globulina (g/dL)	4,10 $\pm$ 0,86	4,3 $\pm$ 1,6	2,3 – 5,1 g/dL

**Valor de P <0.05: GGT:** P<\*\*\*0.0022; **creatinina:** P<\*0.0111; **Ureia:** P<\*0.0146; **Albumina:** P<\*\*\*0.0001.

Houve diferença estatística nos parâmetros bioquímicos dos gatos anêmicos - G2 nos testes que avaliam função renal (creatinina e ureia), GGT (colestase) e albumina no presente estudo.

Na Tabela 8 estão os dados referentes ao metabolismo do ferro nos gatos anêmicos e nas Tabelas 9, 10,11,12 e 13 estão as alterações no metabolismo do ferro correlacionados aos grupos de doenças.

**Tabela 8 – Avaliação da cinética do ferro nos 48 gatos anêmicos – grupo G2.**

	<b>Ferro sérico (n=48)</b>	<b>Ferritina (n=47)</b>	<b>Transferrina (n=48)</b>	<b>UIBC (n=48)</b>
Normal	19 39,6%	40 85,1%	32 66,6%	10 20,8%
Aumentado	14 29,2%	1 2,2%	16 33,3%	35 72,9%
Diminuído	15 31,2%	6 12,7%	-	3 6,3%

\***Normal:** Valor dentro do intervalo de referência estabelecido a partir do grupo G1.

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL, Capacidade de Ligação do Ferro: 174,8 a 423,8 mg/dL.

Na avaliação do metabolismo do ferro nos gatos anêmicos observou-se que a maioria dos resultados do ferro, ferritina e transferrina estavam dentro do intervalo de referência nos grupos de doenças metabólicas, traumáticas/anatômicas, infecciosas. Segundo estudos realizados por ROEDERN et al (2017) gatos anêmicos apresentaram critérios amplos com relação ao metabolismo do ferro na anemia por inflamação com combinações do ferro sérico diminuído, ferritina sérica normal ou elevada e TIBC normal ou diminuída. Essa deficiência do ferro se torna funcional pois sua disponibilidade para atua na eritropoiese encontra-se diminuída, pelo sequestro do ferro para tecidos mediada principalmente pela IL-6.

A seguir estão apresentados os valores dos parâmetros do ferro de acordo com as doenças: infecciosas, metabólicas, traumática/anatômica, neoplásica associada a infecciosa e neoplásica.

**Tabela 9 - Grupo das Doenças Infecciosas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.**

	Nº gatos	Ferro sérico	Ferritina	Transferrina	UIBC
Cistite	2	↑ -	- -	↑ -	- ↓
Coronavírus	1	↑ -	- -	- -	↑ -
FeLV	5	↑ -	- -	- -	- ↓
Micoplasmose	2	↑ -	- -	↑ -	- -
Peritonite	1	- ↓	- -	- -	- ↓

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL, Capacidade de Ligação do Ferro - Intervalo de referência: 174,8 a 423,8 mg/dL.

**Tabela 10 - Grupo das Doenças Metabólicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.**

	Nº gatos	Ferro sérico	Ferritina	Transferrina
Doença Renal Crônica	2	- ↓	↑ -	↑ -
Hipertireoidismo	1	- ↓	- -	↑ -
Lipidose hepática	2	↑ ↓	- -	↑ -

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL.

**Tabela 11 - Grupo das Doenças Traumáticas/Anatômicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.**

	Nº gatos	Ferro sérico	Ferritina	Transferrina	UIBC
Hidrocefalia	1	↑ -	- ↓	- -	- ↓
Fratura de fêmur	1	- -	- -	↑ -	- -

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL, Capacidade de Ligação do Ferro - Intervalo de referência: 174,8 a 423,8 mg/dL.

**Tabela 12 - Grupo das Doenças Neoplásicas e Infecciosas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.**

	Nº gatos	Ferro sérico	Ferritina	Transferrina
Linfoma / FeLV	1	↑ -	↓ -	- -
Linfoma / FIV	1	- ↓	- -	↑ -

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL.

**Tabela 13 - Grupo das Doenças Neoplásicas (G2) correlacionadas a valores alterados do metabolismo ferro.**

	Nº gatos	Ferro sérico	Ferritina	Transferrina
Linfoma	1	- ↓	- ↓	↑ -

**Intervalo de referência:** Ferro sérico: 61,8 a 217,8 µg/dL, Ferritina sérica: 17,7 a 109,4 ng/mL, Transferrina sérica: 77,9 a 368,2 mg/dL.

No atual estudo verificou-se o aumento sérico do ferro em gatos com cistite, micoplasmose, fratura de fêmur, linfoma, doença renal crônica, hipertireoidismo e

lipidose hepática, isso demonstra a necessidade da avaliação e diagnóstico, evitando tratamentos com a suplementação de ferro e riscos de intoxicação pelo mineral.

GEST et al. (2015) citaram que as concentrações do ferro sérico em gatos diminuem quando as demandas eritrocitárias excedem o metabolismo de ferro na dieta e em seu pool de armazenamento, isso faz com que seus níveis sejam considerados inespecíficos para dosar o ferro total. No presente estudo verificou-se que o ferro sérico isolado não deve ser indicado para confirmar uma deficiência ou inflamação, e que seus valores alteraram acima e abaixo do valor de referência nos grupos de doenças.

O aumento sérico da ferritina foi evidenciado em um paciente com doença renal crônica no presente estudo, tal justificativa se deve a resposta a inflamação, GEST et al. (2015), não encontraram diferenças da ferritina sérica em gatos com doenças renais. ALENCAR et al. (2002) citam que há elevação do valor da ferritina em casos de linfoma, no presente estudo a ferritina sérica estava diminuída nas neoplasias.

Foi observado a transferrina sérica aumentada nas doenças metabólicas (doença renal crônica, lipidose hepática e no hipertireoidismo), doenças traumáticas/anatômicas (fratura de fêmur), doenças neoplásicas (linfoma) e neoplásicas associadas a doenças infecciosas (linfoma e FIV). Segundo BOHN (2013) a transferrina pode aumentar devido a deficiência de ferro.

### 3.4 CONCLUSÃO

A metodologia e os reagentes utilizados para o estudo dos parâmetros do metabolismo do ferro estabeleceram resultados de referência para gatos saudáveis e podem ser instituídos na rotina laboratorial para avaliação em gatos.

Nos 48 gatos anêmicos houve predomínio de anemia leve, não regenerativa, normocítica hipocrômica. As principais causas da anemia nos gatos foram as doenças infecciosas, seguida pelas doenças metabólicas.

Nos gatos anêmicos e com doenças infecciosas (inflamatórias) verificou-se valores elevados de ferro sérico, isso demonstra a necessidade da avaliação e diagnóstico, evitando tratamentos com a suplementação de ferro e riscos de intoxicação pelo mineral.

A avaliação do metabolismo do ferro em gatos anêmicos na rotina clínica é necessária para diferenciar a anemia por deficiência de ferro e doença inflamatória.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Rev. educ. contin. CRMV-SP I Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo, fascículo 5, v. 2, p. 196 - 205. 2002.
- ANDREWS, G. A.; CHAVEY, P. S.; SMITH, J.E. Enzyme-linked Immunosorbent Assay to Measure Serum Ferritin and the Relationship between Serum Ferritin and Nonheme Iron Stores in Cats. **Veterinary Pathology**, vol. 31, p. 674-678, 1994.
- BAGGIO, P.G.S. **Diagnóstico das anemias e avaliação dos parâmetros do ferro em cães saudáveis e anêmicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2019. 20-36p. Dissertação de Mestrado.
- BOHN, A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 43, Nov 2013.
- CHIKAZAWA, S.; NAKAZAWA, T.; HORI, Y.; HOSHI, F.; KANAI, K.; ITO, I.; ORINO, K.; WATANABE, K.; HIGUCHI, S. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. **Department of Small Animal Internal Medicine**. v. 75(11), p. 1419–1426, 2013.
- CHIKAZAWA, S., DUNNING, M.D. A review of anemia of inflammatory disease in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**. v. 57, p. 348–353, 2016.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Review - Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. vol. 1763, p.690-699, 2006.
- GEST, J.; LANGSTON, C.; E, A. Iron Status of Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**, vol.25, p. 1488-1493, 2015.
- GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J P.; TRUME, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**. Vol. 40/1, p. 107-112, 2011.
- GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. p. 390-397, 2008.

GRIMES, C. N; FRY.M.M. Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. **Veterinary Pathology**. p. 298-311, vol. 52(2), 2015.

HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. 6th ed. Missouri: Saunders, 2012. p. 259-285.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

KORMAN, R.M.; HETZEL, N.; KNOWLES, T.G.; HARVEY, A. M.; TASKER, S. A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15 (2), p. 81-90, 2012.

NUNES, N. J.D.S. Avaliação citológica e de estoques de ferro na medula óssea de gatos jovens clinicamente saudáveis: determinação de valores de referência. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS**, 2019.

OLSON, S. W.; HOHENHAUS, A. Feline Non-Regenerative Anemia - Diagnostic and treatment recommendations. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. vol. 21,p. 615-630, 2019.

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

ROEDERN, M.V.; BURIKO, Y.; PRITTIE, J.; LAMB, J. Investigation of iron status and markers of inflammation in anaemic and non-anaemic hospitalised cats. **Journal of Small Animal Practice**, 2017.

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. p.153-161.

#### **4 CAPÍTULO 3: NEUTRÓFILOS TÓXICOS EM GATOS COM DOENÇAS SISTÊMICAS E VALOR PROGNÓSTICO DA AVALIAÇÃO.**

##### **RESUMO**

Neutrófilos tóxicos são neutrófilos com alterações morfológicas citoplasmáticas e nucleares devido à maturação acelerada na medula óssea, relacionados a processos infecciosos e inflamatórios. Os objetivos do estudo foram quantificar e classificar os neutrófilos tóxicos no sangue de gatos saudáveis e de gatos doentes, com diferentes doenças sistêmicas, e correlacionar o número de neutrófilos tóxicos com a gravidade da doença. No estudo foram avaliados três grupos: (G1) 60 gatos clinicamente saudáveis por avaliações clínica e laboratorial; (G2) 114 gatos doentes e com neutrófilos tóxicos, divididos em subgrupos de acordo com as doenças: infecciosa, inflamatória não infecciosa, metabólica, traumática/anatômica, neoplásica e neoplásica associada a doença infecciosa. Em 17 gatos com doenças infecciosas foram realizadas culturas bacteriológicas. Nos gatos saudáveis (G1) verificou-se presença 2% de neutrófilos tóxicos, sendo 0,97% de basofilia citoplasmática e 1% de Corpúsculo de Döhle (1%). No grupo dos gatos doentes, as porcentagens observadas em neutrófilos tóxicos nos subgrupos de doenças: infecciosa (29,5%), traumática/anatômica (23eoplásica associada a doença infecciosa (16%), neoplásica (12%) metabólica (10%) e inflamatória não infecciosa (9,5%). Na avaliação hematológica (6/17 gatos) que realizaram a cultura bacteriana houve moderada a acentuada presença de neutrófilos tóxicos no esfregaço sanguíneo em resposta a doença infecciosa sistêmica. Três pacientes foram a óbito. O aumento da quantidade de neutrófilos tóxicos no sangue periférico indicou grau de severidade da doença e tempo de tratamento, sendo indispensável a sua avaliação na rotina laboratorial como ferramenta no auxílio clínico.

Palavras-chave: basofilia; corpúsculo de Döhle; felinos; granulação; vacuolização.

## ABSTRACT

Toxic neutrophils are neutrophils with morphological changes in the cytoplasm and nucleus due to accelerated maturation in the bone marrow, associated with infectious and inflammatory processes. The objectives of this study were to quantify and classify toxic neutrophils in the blood of healthy cats and cats with different systemic diseases, correlating toxic neutrophils with disease severity. In this study three groups were evaluated: 60 clinically healthy cats by clinical and laboratory evaluation (G1); 114 unhealthy cats with diagnosis confirmed by complementary tests, presenting toxic neutrophils, divided into subgroups according to the diseases: infectious, non-infectious inflammatory, metabolic, traumatic/anatomical, neoplastic and neoplastic associated with infectious disease (G2); and 17 cats with infectious diseases confirmed by microbiological culture (G2). In G1, 41/60 cats presented amounts of toxic neutrophils (2%), being cytoplasmic basophilia (0.97%) and Dohle's Corpuscle (1%). In G2, in 114/114 cats the amount of toxic neutrophils was found in the subgroups of diseases: infectious (29.5%), traumatic/anatomic (23%), neoplasia associated with infectious disease (16%), neoplastic (12 %) metabolic (10%) and non-infectious inflammatory (9.5%). In G2, (6/17) cats showed moderate to accentuated toxic neutrophils in the blood smear in response to systemic infectious disease, three patients died. The quantitative increase of toxic neutrophils in the peripheral blood indicates the degree of severity of the disease and the length of treatment, being essential its evaluation in the laboratory routine as an implement in clinical assistance.

Keywords: cats; basophilia; vacuolization; granulation; Dohle bodies.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares que desempenham um papel fundamental no sistema imune inato, sendo a célula com maior predomínio na circulação sanguínea em gatos (NIVY et al., 2013), são produzidos na medula óssea a partir de progenitores da linhagem mieloide (SCHNELLE & BARGER, 2012).

A inflamação sistêmica aumenta a demanda de neutrófilos, seguida de uma maturação acelerada e consequentemente uma liberação rápida na circulação, resultando em persistência de características de células imaturas como: basofilia citoplasmática, corpúsculo de Döhle, granulação tóxica, vacuolização citoplasmática e neutrófilos gigantes (SCHNELLE & BARGER, 2012). As alterações morfológicas específicas são observadas no exame microscópico do esfregaço sanguíneo periférico com a coloração Romanowsky, e são decorrentes do processo de maturação na medula óssea sob certas condições ou em associação com determinadas doenças (SEGEV et al., 2006)

Segundo AROCH et al. (2005) a presença de toxicidade neutrofílica tem sido associada a processos sistêmicos, infecções bacterianas, bacteremia, abscessos e septicemia, processos inflamatórios graves, distúrbios mieloproliferativos, e toxicidade induzidas por drogas.

Segundo LAMBERT et al. (2016) o grau de alteração tóxica é útil na avaliação dos equinos, pois quanto mais severa a alteração tóxica, mais intenso é o estímulo inflamatório, ocorrendo a liberação de células precursoras de neutrófilos, pela medula óssea nas infecções sistêmicas.

Em gatos faltam estudos correlacionando a presença de neutrófilos tóxicos com infecções sistêmicas e sobrevida dos pacientes. Este estudo objetiva avaliar a presença de neutrófilos tóxicos em gatos saudáveis e com doenças sistêmicas: (1) analisar os tipos e proporção de neutrófilos tóxicos no sangue de gatos saudáveis; (2) identificar e quantificar as alterações tóxicas em gatos com diferentes doenças sistêmicas; (3) acompanhar a evolução clínica dos pacientes, para correlacionar a presença de neutrófilo tóxico com a gravidade da doença em gatos.

## 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 037/2019 (ANEXO).

### 4.2.2 Seleção de animais

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com gatos atendidos na rotina clínico-cirúrgica e de especialidades do Hospital Veterinário (HV) da UFPR, na Clínica Mania de Gato, especialista no atendimento de felinos, em uma organização não governamental.

Foram selecionados para o estudo 174 gatos de ambos os sexos, com raças e faixa etária diferentes.

Os gatos foram subdivididos em três grupos: (G1) controle, com 60 gatos clinicamente saudáveis pela avaliação clínica e laboratorial; (G2) 114 gatos doentes com diagnóstico confirmado da doença por exames complementares e com neutrófilos tóxicos visualizados no sangue por leitura do esfregaço sanguíneo, divididos em subgrupos pela doença: infecciosa 35 animais, em 17 gatos deste grupo foram realizadas culturas bacterianas, inflamatória não infecciosa 13 animais, traumática/anatômica 15 animais, metabólica 27 animais, neoplásica 14 animais e neoplásica associada a doença infecciosa 10 animais.

Os critérios de inclusão do grupo (G1) neste estudo foram exames clínicos (escore corporal, frequência cardíaca e respiratória, temperatura corpórea e anamnese), laboratoriais (hemograma, avaliação bioquímica hepática e renal) com resultados normais e testes rápidos de ELISA para detecção dos Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV).

Os gatos que apresentaram alterações nos exames clínicos e laboratoriais, em tratamento medicamentoso, suplementação com ferro e gestação foram excluídos do estudo.

Para os gatos do grupo G2 como critérios de inclusão foram selecionados pacientes com enfermidades, alterações clínicas e laboratoriais. Esses pacientes realizaram exames complementares, de acordo com a suspeita clínica, como

ultrassonografia, radiografia, exames citológicos e histológicos. Após diagnóstico, os gatos do grupo (G2) foram subdivididos de acordo com as doenças.

Gatos sem diagnóstico confirmado, pacientes que realizaram suplementação com ferro ou transfusão sanguínea e em gestação foram excluídos do estudo.

#### 4.2.3 Coleta de dados

Foram analisadas as fichas clínicas dos pacientes de ambos os grupos (G1 e G2) para obtenção de dados sobre: raça, sexo, idade, castração, acesso à rua, contactantes, vacinação, vermífugo, exames realizados, diagnóstico e evolução do paciente. A evolução do paciente foi avaliada com o acompanhamento do paciente que realizou retorno ao hospital e obteve alta clínica.

#### 4.2.4 Amostras e análise laboratorial do hemograma

Os pacientes foram submetidos a contenção física e as amostras de sangue foram por venopunção jugular, cefálica e femoral e acondicionadas em tubos de coletas com anticoagulante (EDTA) para a realização do hemograma e sem anticoagulante para obtenção e separação do soro e realização das análises bioquímicas. O sangue total foi mantido refrigerado e análise ocorreu dentro de duas horas após a coleta. A extensão sanguínea foi realizada dentro de duas horas pós-colheita, a coloração realizada foi May-Grunwald-Giemsa (MGG). Os parâmetros hematológicos: número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos totais e plaquetas foram quantificados pelo analisador automático (BC-2800 Vet, Mindray®); para a confirmação do hematócrito foram realizadas as leituras do hematócrito pela técnica de microhematócrito. A determinação das proteínas plasmáticas foi realizada pela técnica de refratometria.

No esfregaço sanguíneo foi realizada a contagem diferencial de leucócitos e análise de alterações morfológicas das células através de microscopia com a objetiva de 100X.

Os tubos sem anticoagulantes foram centrifugados por 5 minutos em 3.000 rpm e o soro foi separado em microtubos e congelados a -20°C para realização das análises bioquímicas.

#### 4.2.5 Análise dos Neutrófilos Tóxicos

Foram avaliados os neutrófilos tóxicos em 174 extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa (MGG). Entre as alterações tóxicas foram observados: basofilia e vacuolização citoplasmática, granulação tóxica, corpúsculos de Döhle, células gigantes e núcleo em forma de rosca (“donut”).

Foram contados 100 neutrófilos e obteve-se a porcentagem (%) de neutrófilos tóxicos para cada paciente. As alterações tóxicas foram graduadas em leve, moderada e acentuada, de acordo com a avaliação semiquantitativa de alterações tóxicas em neutrófilos (%), baseada nos critérios estabelecidos por HARVEY (2012) (Tabela 14).

**Tabela 14 - Avaliação semiquantitativa de alterações tóxicas em neutrófilos.**

<b>Classificação</b>	<b>Porcentagem de neutrófilos</b>
Leve	5 a 10 (%)
Moderada	11 a 30 (%)
Acentuada	> 30 (%)

Fonte: HARVEY (2012).

A interpretação e avaliação do grau de alteração morfológica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por AROCH et al. (2005) (Tabela 15).

**Tabela 15 - Avaliação semiquantitativa da gravidade das alterações tóxicas em neutrófilos.**

<b>Alteração morfológica nos Neutrófilos</b>	<b>Graus</b>		
	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>	<b>Acentuado</b>
Basofilia citoplasmática	Coloração acinzentado	Coloração azul-claro	Coloração Azul escuro
Corpúsculos de Döhle	Um a dois Corpúsculos	Três a quatro Corpúsculos	> Quatro corpúsculos
Vacuolização citoplasmática	Um a quatro vacúolos	Cinco a nove vacúolos	10 ou mais vacúolos
Granulação tóxica	Um a quatro grânulos	Cinco a nove grânulos	10 ou mais grânulos

Fonte: AROCH et al. (2005)

#### 4.2.6 Análises bioquímicas

Os exames bioquímicos foram realizados por espectrofotometria, em Analisador Bioquímico Automático (BS-200, Mindray®) com os reagentes específicos para cada teste, sendo mensurados os seguintes parâmetros: Albumina - método verde Bromocresol, Alanina aminotransferase (ALT) - método cinético, gama-glutamil transferase (GGT) - método cinético, ureia - método cinética UV, creatinina - método Cinético de Tempo Fixo (Colorimétrico), proteína total - método de Biureto, globulina (proteína total - albumina). Ao todo 23 análises bioquímicas foram excluídas para anular erros pré-analíticos como também amostras insuficientes para as análises dos exames bioquímicos

#### 4.2.7 Exame Microbiológico

Foram coletadas e analisadas 17 amostras de diferentes tipos como: urina, secreção ocular, nasal, conduto auditivo, efusões, lesões cutâneas em gatos com suspeita de doenças infecciosas com neutrófilos tóxicos. As coletas de material para análise foram realizadas com o auxílio de swabs estéreis em meio de Stuart para conservação e em frascos ou tubos estéreis mantidos em refrigeração de 4°C e encaminhados para a análise no período de 24 horas após a coleta. As amostras foram semeadas nos meios de cultura Ágar Base Sangue (ASA), Ágar Mac Conkey (MC), Ágar Chocolate (ACHO) e caldo Brain Heart Infusion (BHI). Em seguida as placas de MC, ASA e BHI foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C±2°C durante 24 a 48 horas. Após a incubação (24 horas iniciais), observou-se se havia presença ou ausência de colônias. Após o crescimento bacteriano realizou-se a identificação conforme a morfologia das colônias isoladas; nas formações de colônias suspeitas confeccionaram-se lâminas coradas pelo método de Gram. Nos microrganismos Gram (+), realizaram-se provas da catalase, coagulase (se +), realizou-se a diferenciação entre *S. aureus* e *S. intermedius* quando as bactérias foram morfológicamente compatíveis a *Staphylococcus*. Os microrganismos Gram (-) foram incubados em meios de TSI e caldo UREIA. Os exames bacteriológicos foram realizados no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - CDME.

Para a metodologia utilizada neste estudo foram seguidos os modelos de avaliação e análise da cultura bacteriana, avaliação de neutrófilos tóxicos e prognóstico estabelecidos no estudo realizado por FAM (2012) com cães. A quantificação (%) e grau

de alterações tóxicas em neutrófilos utilizou os modelos de avaliação estabelecidos por AROCH et al. (2005) e HARVEY (2012).

#### 4.2.8 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows®. As comparações entre dois grupos foram feitas com o teste t de Student; para comparações múltiplas foi usado Anova de uma via, com o post test de Newman Keuls, considerando o nível de significância  $P < 0,05$ .

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo observou-se maior número de gatos com neutrófilos tóxicos nas doenças infecciosas. Outros autores também observaram resultado semelhante (ARUCH, 2006), em gatos com alterações clínicas importantes associadas a doenças infecciosas, ocasionando alterações sistêmicas.

As doenças de base em gatos do G2 com a classificação dos neutrófilos tóxicos (%) e sobrevida estão apresentadas na (Tabela 16).

**Tabela 16 - Doenças em gatos associadas à classificação de neutrófilos tóxicos (%) e sobrevida do paciente.**

Diagnóstico	Nº total	NT (%)			Nº óbito
		Leve 5 a 10%	moderada 11 a 30 %	acentuada >30	
<b>Infecciosas</b>					
FeLV	14	2	8	4	5
Cistite	7	1	2	4	1
Peritonite (efusão séptica)	2	-	1	1	0
Píotorax	1	-	-	1	1
Gengivite	1	-	1	-	0
Coronavírus	1	-	1	-	0
Fratura exposta *	1	-	1	-	0
Aborto	1	-	-	1	0
Micoplasmose	1	-	1	-	1
Perfuração intestinal (efusão séptica)	1	-	-	1	1
<b>Metabólicas</b>					
Doença renal Crônica	15	11	3	1	3
Lipidose hepática	5	4	-	1	0
Falha Renal Aguda	2	1	-	1	0
Diabetes Mellitus	1	-	-	1	0
Catarata	1	1	-	-	0
Hipertireoidismo	1	-	-	1	0
<b>Traumáticas/anatômicas</b>					
Fratura de Fêmur	3	1	1	1	0
Hidrocefalia	1	1	-	-	1
Hérnia diafragmática	1	-	1	-	0
Trauma ocular	1	1	-	-	0
Fratura de coluna	1	1	-	-	0
Fratura de pelve	1	-	-	1	0
Fratura da tibia	1	-	-	1	0
Laceração cutânea (orelha)	1	-	1	-	0
Politraumatismo	1	-	-	1	1
Pneumotórax	1	-	-	1	1
<b>Neoplásicas</b>					
Linfoma	8	3	4	1	2
Tumor de mama	1	1	-	-	1
Carcinoma de células Escamosas	1	1	-	-	0
Fibrossarcoma	1	1	-	-	0
<b>Inflamatória não infecciosa</b>					
Urolitíase	4	3	1	-	0
Colangiohepatite	3	2	-	1	1
Doença Intestinal Inflamatória	2	2	-	-	0
Cistite Intersticial	1	1	-	-	0
Úlcera Indolente	1	-	1	-	0
<b>Neoplásicas associadas infecciosas</b>					
Linfoma/ FeLV/ FIV	8	2	5	1	3
Leucemia Linfocítica/ Felv	1	-	1	-	1
Carcinoma pouco diferenciado/FeLV	1	1	-	-	1

Avaliação semiquantitativa de alterações tóxicas em neutrófilos. Fonte: HARVEY, 2012.

\* Fratura Exposta com infecção secundária.

Na tabela 17, estão apresentadas as médias, e os desvios padrão dos valores dos leucócitos dos gatos dos grupos - saudáveis G1 e doentes G2. Os resultados dos

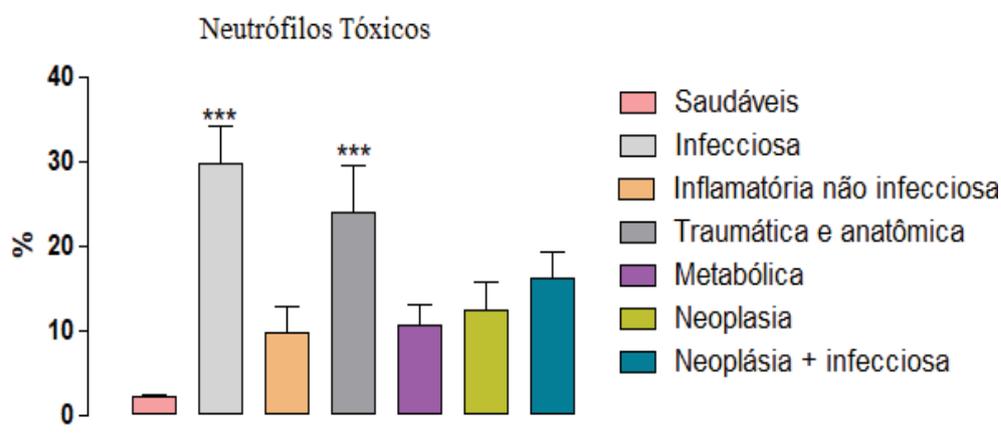
parâmetros leucocitários do G1 estavam normais sendo utilizados como critério para inclusão, e nos gatos doentes (G2), verificou-se alterações nos parâmetros.

**Tabela 17 - Média e desvio padrão dos parâmetros dos leucócitos em gatos dos grupos G1 e G2.**

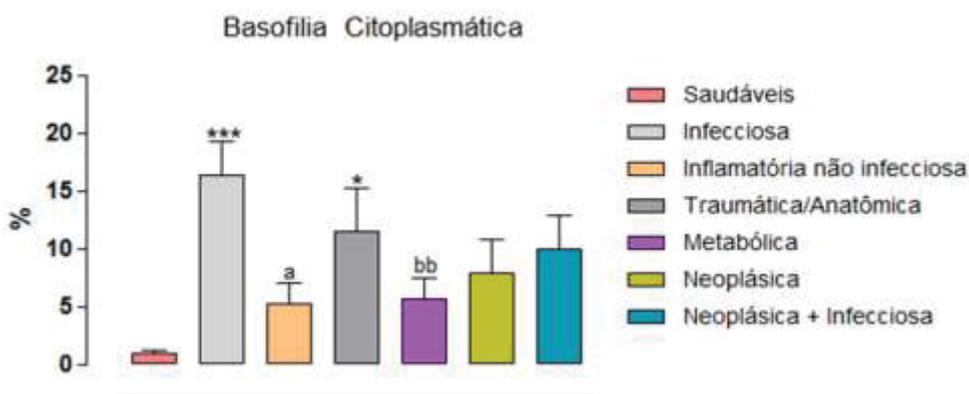
	G1	G2	Intervalo de referência
Nº Leucócitos Totais(µL)	11.265 ± 3.941	11.916 ± 7.998	5.500 a 19.500
Neutrófilos (µL)	6.835 ± 3.574	8.918 ± 7.249	2.500 a 12.500
Bastonetes (µL)	-	302,7 ± 985,4	0 a 300
Linfócitos (µL)	3.211 ± 1.400	2.069 ± 1.596	1.500 a 7.000
Eosinófilos(µL)	745,0 ± 480,0	433,0 ± 632,1	0 a 1.500
Monócitos (µL)	170,0 ± 214,0	151,0 ± 230,0	0 a 850

A figura 8 demonstra a quantidade de neutrófilos tóxicos nos grupos G1 e G2 por subgrupos. Nas figuras 9 e 10 estão apresentadas as quantidades de neutrófilos tóxicos de acordo com a alteração tóxica, nos grupos G1 e G2.

**Figura 8 - Número de neutrófilos tóxicos totais (%) nos grupos G1 (saudáveis) e G2 (subgrupo de doenças).**

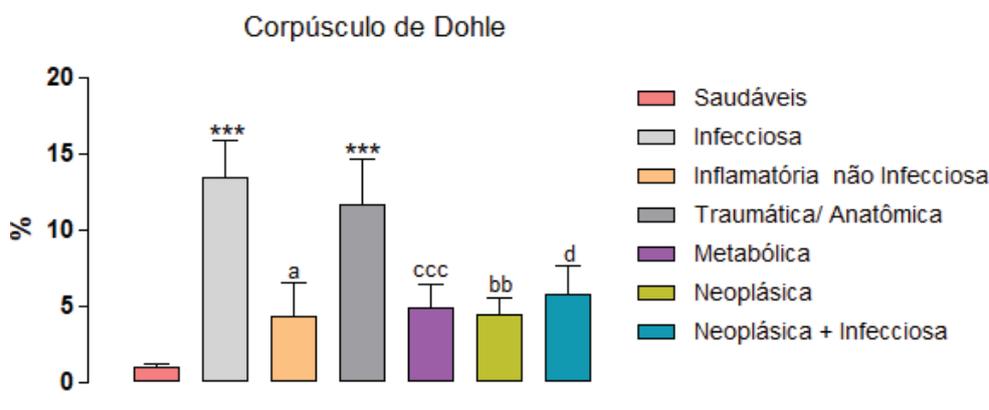


**Figura 9 - Quantificação de neutrófilos tóxicos com Basofilia Citoplasmática (%) nos grupos G1 (saudáveis) e G2 de acordo com o subgrupo de doenças.**



Diferença estatística entre os grupos de doenças: doenças inflamatórias não infecciosas (a  $P < 0.01$ ) quando comparada a doenças infecciosas e entre as doenças metabólicas (bb  $P < 0.001$ ) quando comparada com infecciosas.

**Figura 10 - Quantificação de neutrófilos tóxicos com Corpúsculo de Döhle nos grupos G1 (saudáveis) e G2 de acordo com o subgrupo de doenças.**



Diferença estatística entre os grupos de doenças: doenças inflamatórias não infecciosas (a  $P < 0.01$ ) quando comparada a doenças infecciosas; doenças neoplásicas (bb  $P < 0.001$ ) quando comparada as doenças infecciosas; doenças metabólicas (ccc  $P < 0.0001$ ) quando comparada as doenças infecciosas e nas doenças neoplásicas associadas a doenças infecciosas (d  $P < 0.01$ ) quando comparada com as doenças infecciosas.

Houve diferença significativa com relação a presença de neutrófilos tóxicos totais entre os grupos G1 (\*\* $P < 0.0001$ ) quando comparado ao subgrupo das doenças infecciosas e entre os grupos G1 (\*\* $P < 0.0001$ ) quando comparado ao subgrupo de doenças traumáticas/ anatômicas. Esses resultados ressaltam a presença de neutrófilos tóxicos associados a condições ou respostas inflamatórias sistêmicas e não somente a processos infecciosos localizados como citado por (SEGEV et al., 2006).

No estudo observou-se a presença de neutrófilos tóxicos totais (2%) na extensão sanguínea dos gatos do grupo G1, as alterações tóxicas observadas foram basofilia citoplasmática em 30 gatos (0,97%), e Corpúsculo de Döhle em 28 gatos (1%).

Na figura 9 houve uma diferença significativa entre os grupos G1 (\*\*P<0.0001) e o subgrupo de doenças infecciosas e entre o grupo G1 (\*P<0.01) e o subgrupo de doenças traumáticas e anatômicas. No primeiro subgrupo das doenças infecciosas, foram observadas as seguintes enfermidades: peritonite, cistite, otite, gengivite, dermatite, esporotricose, Micoplasmose, vírus da Leucemia Felina (FeLV). No segundo subgrupo das doenças traumáticas/anatômicas estão presentes as seguintes enfermidades: traumas com fraturas, pneumotórax, doenças cardíacas e hidrocefalia, ambos os subgrupos apresentam maior número de neutrófilos com basofilia citoplasmática no esfregaço sanguíneo. A presença de basofilia acentuada no citoplasma de neutrófilos é indicativo de inflamação grave (GOSSET & CARAKOSTAS, 1985). No estudo observou-se a presença moderada da basofilia citoplasmática nos pacientes com doenças infecciosas ou com respostas inflamatórias sistêmicas graves.

Na figura 10 observou-se diferença significativa da presença de corpúsculo de Döhle entre os grupos G1 (\*\*P<0.0001) e o subgrupo de doenças infecciosas e entre os grupos G1 (\*\*P<0.0001) e o subgrupo de doenças traumáticas e anatômicas.

Os neutrófilos tóxicos totais observados no G2 de acordo com as doenças foram: infecciosas (29,5%), traumática/anatômicas (23%), neoplásicas associadas com infecciosas (16%), neoplásicas (12%), metabólicas (10%) e inflamatória não infecciosa (9,5%). Com relação as principais alterações tóxicas observadas em cada neutrófilo no grupo G2 foram as seguintes: basofilia citoplasmática (56%), seguida pelo Corpúsculo de Döhle (44%) e a vacuolização citoplasmática (2,5%).

Observou-se diferença significativa entre os subgrupos de doenças com basofilia citoplasmática: inflamatórias não infecciosas (a P<0.01) quando comparada a doenças infecciosas e nas doenças metabólicas (bb P<0.001) quando comparada com infecciosas.

Também houve diferença significativa entre os subgrupos de doenças com corpúsculo de Döhle: doenças inflamatórias não infecciosas (a P<0.01) quando comparado a doenças infecciosas, entre as doenças inflamatórias não infecciosas (a P<0.01) comparada a doenças infecciosas, nas doenças neoplásicas (bb P<0.001) quando comparada as doenças infecciosas, nas doenças metabólicas (ccc P<0.0001) quando comparada as doenças infecciosas e nas doenças neoplásicas associadas a doenças infecciosas (d P<0.01) quando comparada com as doenças infecciosas.

A basofilia citoplasmática foi a principal alteração tóxica observada em gatos com neutrófilos tóxicos nesse estudo, seguida pela presença de corpúsculos de Döhle, sendo observada em maior quantidade principalmente nos gatos com doenças infecciosas; como descrito em estudos anteriores com cães por FAM (2012). Já em humanos as principais alterações morfológicas em neutrófilos é a granulação tóxica e corpúsculo de Döhle relacionadas principalmente a infecções bacterianas agudas (AL-GWAIZ & BABAY, 2006).

A presença de alterações tóxicas em pacientes saudáveis como basofilia citoplasmática (0,97%) e corpúsculo de Döhle (1%), foi considerada dentro da normalidade e sem importância clínica. Segundo HARVEY (2012) e WEISER (2015) e a presença de um a dois corpúsculos de Döhle é relatada frequentemente em gatos saudáveis, já VALENCIANO et al. (2010) cita que independentemente da quantidade de neutrófilos contendo corpúsculo de Döhle em gatos, deve -se sempre a interpretar como uma alteração tóxica leve.

No presente estudo sua presença em maior quantidade em gatos foi observada nas doenças sistêmicas; sua presença no citoplasma de neutrófilos é observada em infecções bacterianas e lesão teciduais com inflamação grave (AROCH et al., 2005; BAIN et al., 2017). Já em humanos segundo AL-GWAIZ & BABAY (2006) a presença do corpúsculo de Döhle é um achado importante nos pacientes com infecções bacterianas.

A análise do esfregaço sanguíneo é recomendada, principalmente na suspeita de pacientes críticos, em doenças inflamatórias para a avaliação da contagem diferencial e alterações morfológica (FERNANDEZ et al., 2019).

Os resultados das amostras das culturas bacteriológicas dos 17 gatos do grupo G2, com doenças infecciosas localizadas e sistêmicas, estão apresentadas na Tabela 18, conforme o modelo de avaliação estabelecido por FAM (2012) com cães.

**Tabela 18 - Locais e isolamento de bactérias do grupo G2 com doenças infecciosas localizadas, alteração leucocitária, quantificação (%) e grau de alterações tóxicas em neutrófilos e prognóstico.**

Gatos	Amostra	Bactérias	Alteração Leucocitária	NT%	% Alterações Tóxicas e Grau de Alteração Tóxica					Evolução
					BC	CD	VC	GT	D	
1	Swab de Lesão em face	<i>Staphylococcus sp.</i>	Linfopenia	8%	2 L	6 L	-	-	-	Vivo
2	Swab de secreção do Ouvido	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Sem Alterações	3%	3 L	-	-	-	Vivo	
3	Swab nasal	<i>Micrococcus spp.</i>	Sem Alterações	7%	5 L	2 L	-	-	Vivo	
4	Swab de secreção nasal	<i>Micrococcus spp.</i>	Neutrofilia	10%	2 M	8 L	-	-	Vivo	
5	Swab de secreção nasal	<i>Providência alcalifaciens</i>	Sem Alterações	4%	-	4 L	-	-	Vivo	
6	Swab de secreção nasal	<i>Staphylococcus spp.</i>	Leucocitose	8%	1 M	7 L	-	-	Vivo	
7	Swab de secreção nasal	<i>Providência alcalifaciens</i>	Leucocitose Neutrofilia	8%	6 M	2 L	-	-	Vivo	
8	Swab de secreção nasal	<i>Streptococcus spp.</i>	Linfopenia	2%	-	2 L	-	-	Vivo	
9	Swab de secreção nasal	<i>Enterobacter spp.</i>	Sem Alterações	4%	4 M	2 L	-	-	Vivo	
10	Swab de secreção ocular	<i>Staphylococcus spp</i>	Sem Alterações	4%	2 L	2 L	-	-	Vivo	
11	Swab de secreção de Ferida (mordida)	<i>Staphylococcus aureus</i>	DNNE	23%	15 M	8 L	-	-	Vivo	
12	Efusão Pleural	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DNNE	79%	40 L	39 L	-	-	Óbito	
13	Efusão Peritoneal	<i>Escherichia coli</i>	DNNE	57%	27 M	30 L	-	-	Óbito	
14	Efusão Peritoneal	<i>Escherichia coli</i>	DNNE	71%	47 M	18 L	-	1 L	Vivo	
15	Efusão Peritoneal	<i>Staphylococcus sp.</i>	DNNE	19%	8 L	11 L	-	-	Vivo	
16	Urina	<i>Escherichia coli</i>	Sem Alterações	43%	4 L	39 L	-	-	Vivo	
17	Urina	<i>Escherichia coli</i>	Neutrofilia Linfopenia	22%	21 M	1 L	-	-	Óbito	

BC- basofilia citoplasmática, CD- Corpúsculo de Döhle VC- vacuolização citoplasmática, GT- granulação tóxica, D- donut. Grau de alteração tóxica: L - Levemente, M - moderadamente. DNNE - desvio nuclear de neutrófilos a esquerda.

No presente estudo observou-se a presença de bactérias Gram positivas e negativas nas amostras coletadas de locais distintos. Houve a presença de alterações tóxicas em neutrófilos variando sua quantidade e alteração tóxica, nas infecções localizadas foram observadas menor quantidade de neutrófilos tóxicos quando comparado a infecções sistêmicas.

Nos gatos com infecções bacterianas localizadas as alterações morfológicas em neutrófilos foram basofilia citoplasmática e Corpúsculo de Döhle com variação da quantificação de neutrófilos tóxicos em 8% a 23% (leve a moderada). Cinco gatos apresentaram quantificação de alteração de neutrófilos < 5%, essa quantidade está abaixo na avaliação semiquantitativa de alterações tóxicas (%) em neutrófilos descrita por HARVEY (2012).

As bactérias do gênero *Staphylococcus sp*, foram isoladas com maior frequência, nas lesões de face, ferida por mordedura, secreção nasal, oral, ocular, conduto auditivo e efusão peritoneal. A bactéria *Staphylococcus aureus*, possui coagulase positiva, sendo considerada patogênica (QUINN et al., 2005), podendo induzir nos animais, desde infecções superficiais, como nas doenças de pele a infecções mais graves sistêmicas até mesmo a septicemia (PETON & LOIR, 2014).

Nos gatos com infecções bacterianas sistêmicas as alterações morfológicas em neutrófilos foram basofilia citoplasmática, Corpúsculo de Döhle, granulação tóxica e donut, maior número de neutrófilos tóxicos 22 a 79% com o grau de alteração tóxica leve a moderada e presença de mortalidade. A bactéria isolada com maior frequência foi a *Escherichia coli*, presente na urina e líquido peritoneal. Na formação do líquido cavitário a infecção geralmente ocorre pelo defeito na parede do intestino ou em outras vísceras devido a obstrução, infarto ou traumas diretos (BROOK, 2008). Em um gato do estudo com cistite a única alteração leucocitária observada foi a presença acentuada de neutrófilos tóxicos, indicando que sua presença isolada pode servir como único sinalizador hematológico de processo infeccioso ou inflamatório como citado por SEGEV et al. (2006) em estudos retrospectivos, em que 47% dos gatos apresentavam somente neutrófilos tóxicos, sem outras alterações leucocitárias.

Estudos realizado por WALKER et al. (2010) isolaram bactérias aeróbicas e anaeróbicas em cães e gatos com piotórax, sendo a última com maior prevalência. No presente estudo a bactéria isolada foi *Pseudomonas aeruginosa*, que resultou em 79% de neutrófilos tóxicos evidenciando uma importante infecção sistêmica.

Os resultados obtidos no presente estudo são inéditos devido à falta de dados retrospectivos na literatura com base na avaliação da resposta tóxica em neutrófilos associada às principais bactérias que desencadeiam essa resposta.

Em humanos, a presença da contagem absoluta de neutrófilos e a granulação tóxica foi mais sensível na suspeita das infecções bacterianas, porém em bebês e idosos o DNNE teve maior sensibilidade (AL-GWAIZ & BABAY, 2006). No atual estudo, o DNNE foi observado associado com neutrófilos tóxicos em quantidade moderada a acentuada em pacientes com infecções sistêmicas graves.

O grau e número de neutrófilos tóxicos variou com a bactéria isolada e principalmente com o local da infecção; houve diferença na resposta leucocitária e alteração tóxica entre as infecções locais e sistêmicas.

No presente estudo verificou-se que a quantidade de neutrófilos tóxicos moderada a acentuada na circulação está correlacionada com a resposta inflamatória sistêmica e consequentemente a maior gravidade da doença, sinais clínicos evidentes, alterações nos exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos, maior tempo de tratamento e monitoramento e não à mortalidade do paciente.

Abaixo estão as alterações tóxicas observadas através da microscopia em esfregaço sanguíneo de gatos do grupo G1(saudáveis) (Figura 11) e G2 (subgrupo de doenças infecciosas) (Figuras 12 e 13).

**Figura 11 - Neutrófilo segmentado com alterações tóxicas: basofilia citoplasmática e Corpúsculo de Döhle em extensões sanguíneas de gatos do grupo G1 (gatos saudáveis).**

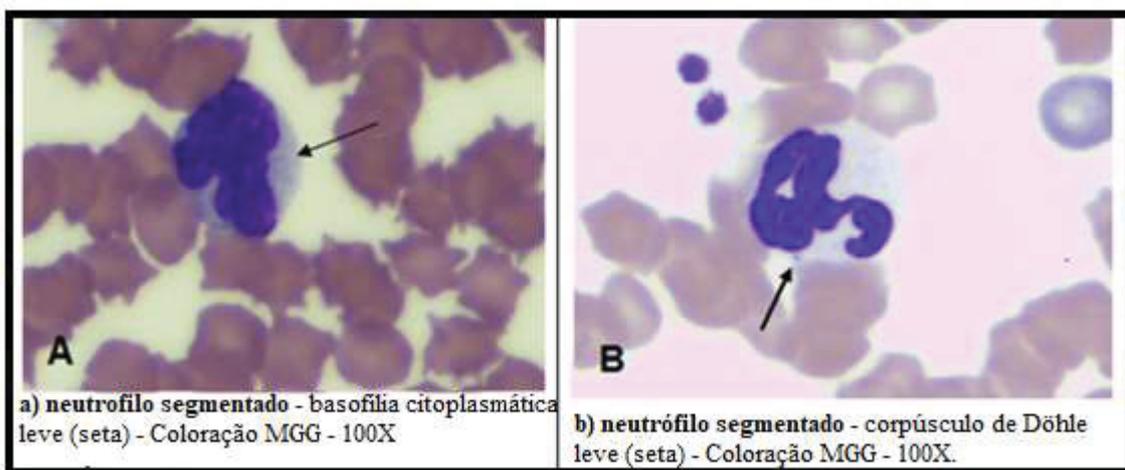


Figura 12 - Neutrófilos tóxicos: basofilia citoplasmática, corpúsculo de Döhle, vacuolização citoplasmática e em forma de “Donut” na extensão sanguínea de gato do grupo G2 (doentes) com doença infecciosa (perfuração intestinal – sepse).

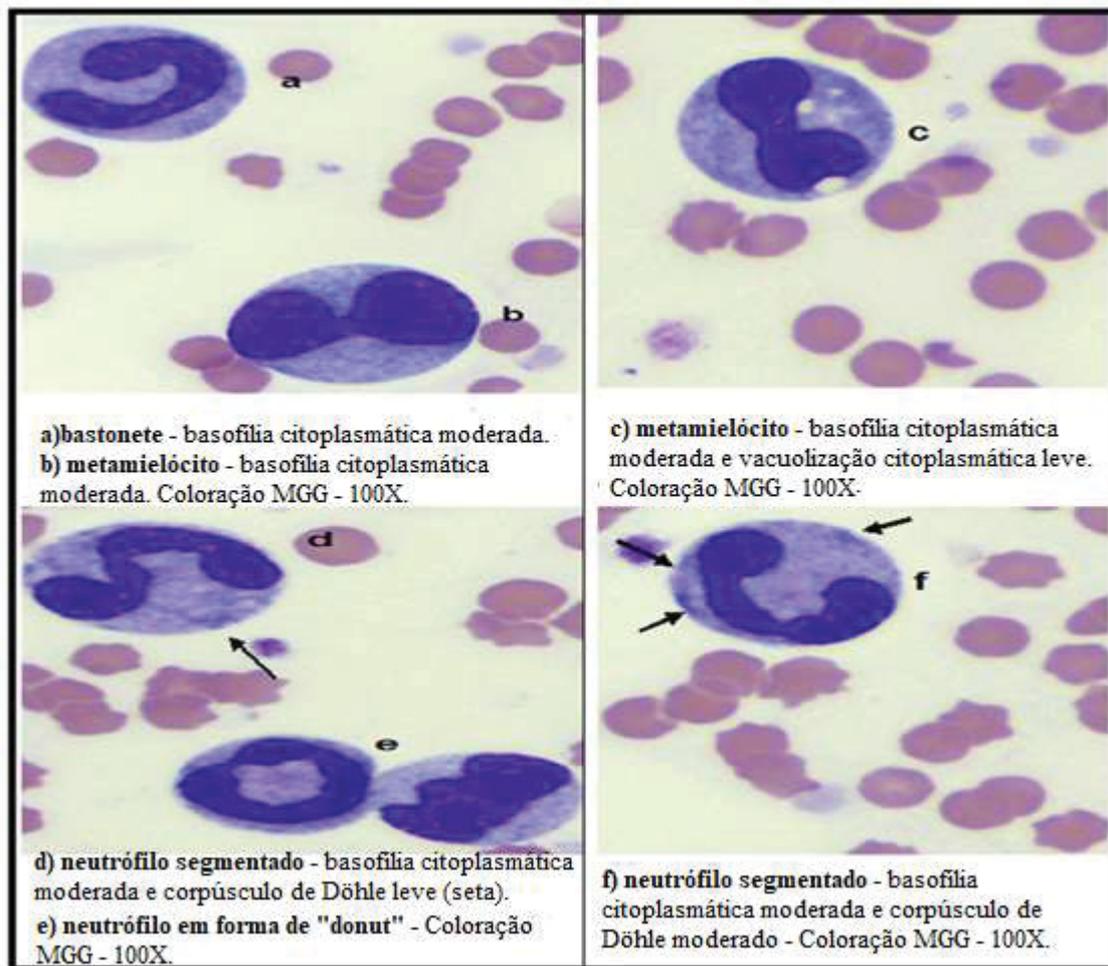
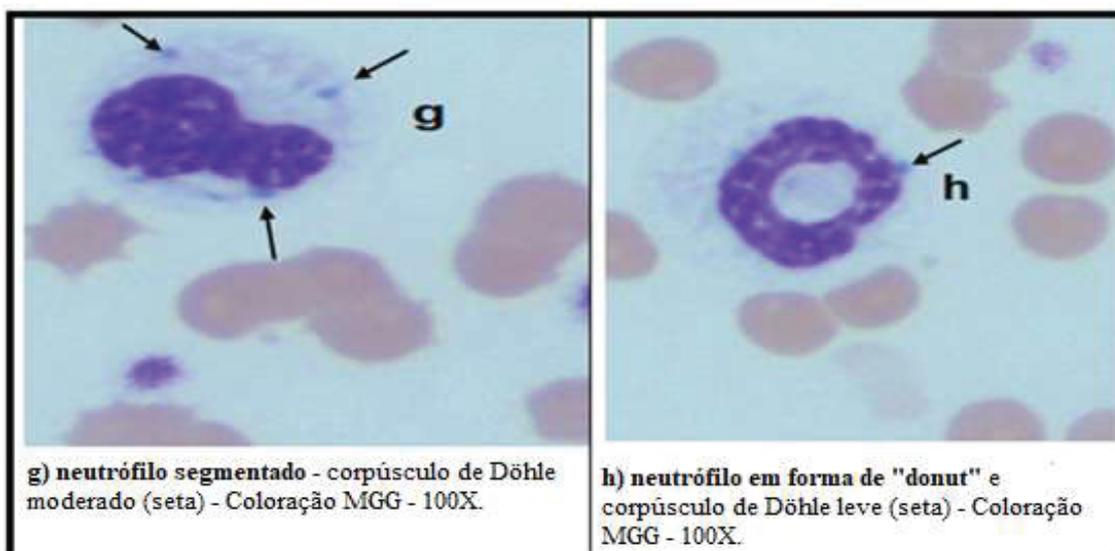


Figura 13 - Neutrófilos tóxicos: (g) corpúsculo de Döhle (h) forma de “Donut” em extensão sanguínea de gato do grupo G2 - doença infecciosa - FeLV.



#### 4.4 CONCLUSÃO

Na avaliação do esfregaço sanguíneo dos gatos saudáveis foi observada a presença de neutrófilos tóxicos em 2% as principais alterações tóxicas foram basofilia citoplasmática e corpúsculo de Döhle.

Nos gatos doentes os neutrófilos tóxicos foram observados nos pacientes com as seguintes enfermidades: infecciosas, metabólicas, traumática/anatômica, inflamatórias não infecciosas, neoplásicas, neoplásicas associadas a infecciosas, gerando quantidades e tipos diferentes de alterações tóxicas, principalmente entre infecções locais e sistêmicas.

Nos gatos com doenças infecciosas que realizaram culturas bacterianas o grau e número de neutrófilos tóxicos variou com a bactéria isolada e principalmente com o local da infecção; houve diferença na resposta leucocitária como DNNE e alteração tóxica nas infecções sistêmicas.

A avaliação de neutrófilos tóxicos deve ser realizada pela análise do esfregaço sanguíneo e sua presença em maior quantidade indica maior gravidade da doença, maior tempo de tratamento.

## REFERÊNCIAS

AL-GWAIZ, L.A; BABAY, H.H. The Diagnostic Value of Absolute Neutrophil Count, Band Count and Morphologic Changes of Neutrophils in Predicting Bacterial Infections. **Medical Principles and Practice**. vol.16, p.344-347, 2006.

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

BAIN, B.J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A. **Dacie and Lewis Practical Haematology E-Book**. P.61-92, 2017.

BROOK, I. Microbiology and Management of Abdominal Infections. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 2585-2591, 2008.

FAM, A.L.P.D. **Aspectos clínicos e laboratoriais de cães com neutrófilos tóxicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p.17-38, 2012. Dissertação de Mestrado.

FERNANDEZ, N. J.; GILROY, C.V.; WAGG, C. R.; KWONG, G. P.S.; ROY, M. F. Intra- and inter-rater agreement for the detection of band neutrophils and toxic change in horses. **Veterinary Clinical Pathology**. p. 1-9, 2019.

GOSSETT, K.A.; CARAKOSTAS, M.C. Effect of EDTA on morphology of neutrophils of healthy dogs and dogs with inflammation. **Veterinary Clinical Pathology**, v.13, p.22-25, 1985.

HARVEY. J, W. Evaluation of leukocytic disorders. In: **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Harvey JW (Ed). 1st edn. Elsevier Saunders: St. Louis, 2012.

LAMBERT, J.L.; FERNANDEZ, N.J.; ROY, M.F. Association of Presence of Band Cells and Toxic Neutrophils with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Outcome in Horses with Acute Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. vol. 30, p: 1284-1292, 2016.

NIVY, R., ITKIN, Y., BDOLAH-ABRAM, T., SEGEV, G., AROCH, I. Neutrophil Counts and Morphology in Cats: A Retrospective Case-Control Study of 517 Cases. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Vol. 68 (3), 2013.

PETON, V; LOIR, Y.L. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**. vol. 21, p. 602-615. 2014.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Editora Mosby: London. 4a edição, 2005, p. 55-132.

SCHNELLE, A.N.; BARGER, A; M. Neutropenia in dogs and cats: Causes and consequences. **Veterinary Clinical Small Animal**, p: 111-122, 2012.

SEGEV, G.; KLEMENT, E.; AROCH, I. Toxic neutrophils in cats: clinical and clinicopathologic features, and disease prevalence and outcome – a retrospective case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.20-31, 2006.

VALENCIANO, A. C.; DECKER, I.S.; COWELL, R.L. Interpretation of Feline Leukocyte Responses. In: WEISS, D.J. e WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.335-344.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária na Doença. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. ed. 2., p.276-305,2015.

WALKER, A.L.; JANG, S.S.; HIRSH.C. Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989 -1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 216(3), p. 359 -363, 2000.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Rev. educó contin. CRMV-SP I Continuous Education Journal CRMV-SP**, São Paulo, fascículo 5, v. 2, p. 196 - 205. 2002.

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

ANDREWS, G. A.; CHAVEY, P. S.; SMITH, J.E. Enzyme-linked Immunosorbent Assay to Measure Serum Ferritin and the Relationship between Serum Ferritin and Nonheme Iron Stores in Cats. **Veterinary Pathology**, vol. 31, p. 674-678, 1994.

AL-GWAIZ, L.A; BABAY, H.H. The Diagnostic Value of Absolute Neutrophil Count, Band Count and Morphologic Changes of Neutrophils in Predicting Bacterial Infections. **Medical Principles and Practice**. vol.16, p.344-347, 2006.

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

BAIN, B.J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A. **Dacie and Lewis Practical Haematology E-Book**. P.61-92, 2017.

BAGGIO, P.G.S. **Diagnóstico das anemias e avaliação dos parâmetros do ferro em cães saudáveis e anêmicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2019. 20-36p. Dissertação de Mestrado.

BOHN, A. Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 43, Nov 2013.

BROOK, I. Microbiology and Management of Abdominal Infections. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 2585-2591, 2008.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 24, n 2, p. 127-136, 2002.

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

FAM, A.L.P. D. **Aspectos clínicos e laboratoriais de cães com neutrófilos tóxicos**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p.17-38, 2012. Dissertação de Mestrado.

FERNANDEZ, N. J.; GILROY, C.V.; WAGG, C. R.; KWONG, G. P.S.; ROY, M. F. Intra- and inter-rater agreement for the detection of band neutrophils and toxic change in horses. **Veterinary Clinical Pathology**. p. 1-9, 2019.

GANZ, T.; NEMETH, E. Review - Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**. vol. 1763, p.690-699, 2006.

GEST, J.; LANGSTON, C.; E, A. Iron Status of Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**, vol.25, p. 1488-1493, 2015.

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

GRIMES, C. N; FRY.M.M. Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. **Veterinary Pathology**. p. 298-311, vol. 52(2), 2015.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. p. 390-397, 2008.

GOSSETT, K.A.; CARAKOSTAS, M.C. Effect of EDTA on morphology of neutrophils of healthy dogs and dogs with inflammation. **Veterinary Clinical Pathology**, v.13, p.22-25, 1985.

HARVEY, J. W. Evaluation of leukocytic disorders. In: **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Harvey JW (Ed). 1st edn. Elsevier Saunders: St. Louis, 2012.

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.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

KORMAN, R.M.; HETZEL, N.; KNOWLES, T.G.; HARVEY, A. M.; TASKER, S. A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15 (2), p. 81-90, 2012.

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.

NEMETH, E., TUTTLE, M. S., POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; MCVEY WARD, D.; GANZ, T.; KAPLAN, J. **Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization**. *Science* 306, p. 2090 -2093, 2004.

NIVY, R., ITKIN, Y., BDOLAH-ABRAM, T., SEGEV, G., AROCH, I. Neutrophil Counts and Morphology in Cats: A Retrospective Case-Control Study of 517 Cases. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Vol. 68 (3), 2013.

NUNES, N. J.D.S. Avaliação citológica e de estoques de ferro na medula óssea de gatos jovens clinicamente saudáveis: determinação de valores de referência. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS**, 2019.

OLSON, S. W.; HOHENHAUS, A. Feline Non-Regenerative Anemia - Diagnostic and treatment recommendations. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. vol. 21,p. 615-630, 2019.

OLVER, C.S; ANDREWS, G.A, SMITH, J.E; KANEK, J.J. Erythrocyte Structure and Function. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6thed. p. 123-129.2010.

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

PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S. K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis. **Biochemistry (including biophysical chemistry & molecular biology)**. v. 51, p. 5705–5724, 2012.

PETON, V; LOIR, Y.L. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**. vol. 21, p. 602-615. 2014.

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

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Editora Mosby: London. 4a edição, 2005, p. 55-132.

ROEDERN, M.V.; BURIKO, Y.; PRITTIE, J.; LAMB, J. Investigation of iron status and markers of inflammation in anaemic and non-anaemic hospitalised cats. **Journal of Small Animal Practice**, 2017.

SCHNELLE, A. N.; BARGER, A. M. Neutropenia in Dogs and Cats: Causes and Consequences. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 42, p. 111-122, 2012.

SEGEV, G.; KLEMENT, E.; AROCH, I. Toxic neutrophils in cats: clinical and clinicopathologic features, and disease prevalence and outcome – a retrospective case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.20-31, 2006.

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. p.153-161.

VALENCIANO, A. C.; DECKER, I.S.; COWELL, R.L. Interpretation of Feline Leukocyte Responses. In: WEISS, D.J. e WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.335-344.

WALKER, A.L.; JANG, S.S.; HIRSH.C. Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989 -1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, vol. 216(3), p. 359 -363, 2000.

WANG, J., PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**. v. 434, p.365–381, 2011.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária na Doença. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. ed. 2., p.276-305,2015.

WEISS, D. J. Iron and Copper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6thed. p. 167 - 171. 2010.

## ANEXO 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 037/2019, referente ao projeto “**Anemia por doença inflamatória em gatos**”, sob a responsabilidade **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.

Vigência do projeto	Setembro/2019 até Março/2021
Espécie/Linhagem	<i>Felis catus</i> (felino)
Número de animais	120
Peso/Idade	0,8 g – 12 kg/3 meses – 20 anos
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e de proprietários/particular – Curitiba, Paraná/BRA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 037/2019, regarding the project “**Anemia for inflammatory disease in cats**” 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.

Duration of the project	September/2019 until March/2021
Specie/Line	<i>Felis catus</i> (feline)
Number of animals	120
Wheight/Age	0.8 g – 12 kg/3 months – 20 years
Sex	Male and female
Origin	Veterinary Hospital of the Federal University of Paraná and privates – Curitiba, Paraná/BRA.

Curitiba, 05 de agosto de 2019

## ANEXO 2



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

OFÍCIO Nº 069/2021

**Para: Rosângela Locatelli Dittrich**  
**Assunto: Protocolo 037/2019**

Prezado(a) pesquisador(a),

Após avaliação sobre o pedido de alteração de prazo, de março de 2021 para agosto de 2021, bem como pedido de alteração de número de animais pesquisados, de 120 para 174, referente ao projeto/aula sob sua responsabilidade, de protocolo número 037/2019 intitulado “**Anemia por doença inflamatória em gatos**”, esta Comissão concorda pela prorrogação e alteração de número de animais, tendo em vista fatores que levaram a tal solicitação.

Curitiba, 19 de novembro de 2021

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alex Maiorka', is written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark.

Alex Maiorka  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**AG - UFPR**