

DANIELLE PASSARELLI

**Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente
a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados**

São Paulo

2011

DANIELLE PASSARELLI

Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento
Clínica Médica

Área de concentração
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof^a Dr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2448
FMVZ

Passarelli, Danielle

Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados / Danielle Passarelli. -- 2011.

109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara.

1. Anemia hemolítica imunomediada. 2. Cães. 3. Imunização.
4. Citometria de fluxo. 5. Proliferação de linfócitos. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a antígenos eritrocitários em cães com anemia hemolítica imunomediada e em cães recentemente imunizados", protocolado sob o nº1504/2008, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells against to red blood cell antigens of dogs with immune-mediated hemolytic anemia and of dogs recently vaccinated)", protocol number 1504/2008, utilizing 100 (one hundred) dogs under the responsibility Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 13 de janeiro de 2009

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PASSARELLI, Danielle

Título: Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Cida, e meus irmãos, Junior e Ricardo, pela compreensão e pelo apoio durante todos esses anos.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária/ USP e à Universidade de São Paulo, pela estrutura física e acadêmica necessárias para a confecção deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelo apoio durante todo o processo.

Aos amigos de pós-graduação - Samantha, Bruno, Milena, Dani Ramos, Priscila, Alexandre, Arine, Paula, Adriana Tiemi, Adriana de Siqueira, Cynthia, Malu, Aline da Hora, Aline, Fernanda, Ariane, Pryscilla e Fernando Souza - pelo apoio técnico, pelo apoio nas coletas, pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos e proprietários - Alexandre, Sabrina Sonza, Caio Nogueira, Cristina Takeda, Samantha, Maria Helena, Dona Rosa, Tais Rebouças, Luis Fernando e Raquel Minami - pelo “empréstimo” de seus cães, pelo apoio durante as coletas, pela paciência e pela amizade.

A todos os cães do estudo, por fornecerem involuntariamente o material necessário para a realização deste trabalho, contribuir com a ciência e, só por sua presença, nos dar alegria.

Às funcionárias do Laboratório Clínico do VCM/USP – Maria Helena, Maria Luiza, Carmen, Clara, Claudia, Cleide, Edna, Marli e Samantha – pelo apoio técnico e pela amizade.

Às médicas veterinárias do serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do HOVET/USP – Bruna, Denise, Khadine, Paula e Vera – e a toda equipe do Hospital Veterinário Pompéia pelo encaminhamento dos casos.

Aos enfermeiros do serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do HOVET/USP – Carlito e Milton – pelo apoio durante as coletas.

Aos funcionários do guichê de triagem do HOVET/USP pelo fornecimento dos prontuários dos animais e pela paciência.

Aos funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice pelo auxílio durante a elaboração desta dissertação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de mestrado (2008/08004-7) e pelo auxílio regular (2008/10885-1) que tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

PASSARELLI, D. **Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados.** [Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells against autologous red blood cell membranes of dogs recently immunized]. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Embora faltem evidências diretas da relação causal entre a vacinação recente e o desenvolvimento da anemia hemolítica imunomediada (AHIM) em cães, pode ser identificada uma associação temporal entre elas. Constituem-se em objetivos deste trabalho avaliar: a presença de imunoglobulinas (IgG e IgM) e complemento (C3) na superfície eritrocitária e o potencial do estímulo mitogênico de membranas eritrocitárias autólogas sobre os linfócitos periféricos de cães nos momentos pré-vacinal (imediatamente antes da vacinação com vacinas polivalente e antirrábica) e pós-vacinal (28 a 38 dias após a imunização). Vinte e um cães adultos e hípidos, machos e fêmeas, foram submetidos à anamnese, exame físico e avaliações laboratoriais nos dois momentos do estudo. O teste da antiglobulina direta (n=15) foi realizado com o reagente de Coombs polivalente, nas diluições de 1:2 a 1:8. A detecção de imunoglobulinas (IgG, IgM) e complemento (C₃) na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo (n=21) foi realizada utilizando anticorpos anti-IgG de cão produzido em ovelha cadeia pesada, anti-IgM produzido em cabra e anti-C3 de cão produzido em cabra, todos conjugados com fluoresceína de isotiocianato (FITC). As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por gradiente, marcadas com CFSE e estimuladas com Concanavalina A (ConA) e com membranas eritrocitárias autólogas em duas concentrações (ME1 e ME2). Foi utilizado o Índice de Proliferação (IP) como indicador da proliferação celular, obtido pela divisão das intensidades de fluorescência obtidas por citometria de fluxo das amostras basal e estimulada. As comparações das variáveis “hemácias marcadas com anti-Ig/C3” e “IP de linfócitos” foram realizadas utilizando-se o t-Student para amostras pareadas. As comparações dos IP de linfócitos frente aos diferentes antígenos (Con A, ME1 e ME2) foram realizadas por meio da ANOVA com medidas repetidas. Quando houve diferença significativa entre os índices, foram realizadas

comparações múltiplas (teste de Bonferroni). Foi considerado um nível de significância de 5%. Observou-se que os cães se encontravam em boas condições de saúde, nos dois momentos do estudo, com as variáveis hematológicas e bioquímicas mantidas próximas entre si e resultado do teste da antiglobulina direta negativo (n=21). A porcentagem de hemácias marcadas com IgG e IgM nos momentos pré-vacinal ($1,06 \pm 0,49\%$ e $1,42 \pm 1,59\%$) e pós-vacinal ($0,83 \pm 0,56\%$ e $1,35 \pm 1,71\%$) não foi alterada, com $p=0,261$ e $p=0,699$, respectivamente. A porcentagem de hemácias com C3 na superfície no momento pós-vacinação ($0,40 \pm 0,38\%$) foi, em média, menor do que no momento pré-vacinação ($0,71 \pm 0,33\%$), com $p=0,019$. Os índices de proliferação obtidos com a ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal ($2,15 \pm 0,83$; $1,03 \pm 0,07$; $1,05 \pm 0,11$) e pós-vacinal ($2,13 \pm 0,58$; $1,02 \pm 0,05$; $1,02 \pm 0,05$) não se modificaram, com $p=0,935$; $p=0,845$ e $p=0,222$, respectivamente. Em ambos os momentos, os índices de proliferação celular observados com o uso de ConA foram, em média, maiores do que os índices com ME1 e ME2 ($p < 0,001$). A baixa porcentagem de hemácias com IgG, IgM ou C3 na superfície e a ausência de resposta proliferativa dos linfócitos quando estimulados com membranas eritrocitárias, indicam que, neste experimento, não houve nenhuma evidência de que o estímulo vacinal pudesse estar relacionado ao desenvolvimento da AHIM.

Palavras-chave: Anemia hemolítica imunomediada. Cães. Imunização. Citometria de fluxo. Proliferação de linfócitos.

ABSTRACT

PASSARELLI, D. **Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells against autologous red blood cell membranes of dogs recently immunized.** [Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente imunizados]. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Despite the lack of evidence regarding a causal link between recent vaccination and development of immune mediated hemolytic anemia (IMHA) in dogs, a temporal association between them has been identified in some cases. The aim of this study was to evaluate: the presence of immunoglobulins (IgG and IgM) and complement (C3) on the surface of red blood cells and the potential for mitogenic stimulation of peripheral lymphocytes against autologous red blood cell membranes on dogs at pre-vaccination (immediately prior to vaccination with polyvalent and anti-rabies vaccines) and post-vaccination (after 28 and 38 days after vaccination). Twenty-one healthy adult dogs (both males and females) were subjected to physical examination and complementary laboratory exams in the aforementioned two instances of the study (i.e. pre-vaccination and post-vaccination). Direct antiglobulin test (n=15) was performed using the polyvalent Coombs reagent in 1:2 to 1:8 dilutions. Immunoglobulins (IgG, IgM) detection and identification of complement (C3) on the surface of red blood cells were done by flow cytometry (n=21) using antibodies anti-dog IgG heavy chain produced in sheep, anti-dog IgM produced in goat and anti-dog C3 produced in goat - all in conjunction with fluorescein isothiocyanate (FITC). The peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient, labeled with CFSE and stimulated with concanavalin A (Con A) and autologous erythrocyte membranes in two concentrations (EM1 and EM2). The Proliferation Index (PI), used as an indicator of cell proliferation, was obtained by dividing the fluorescence intensities of basal and stimulated samples, both obtained by flow cytometry. A comparison was made between the variables "labeled red blood cells with anti-Ig/C3" and "PI lymphocyte" using the paired Student's t-test. Comparisons of PI lymphocytes to different antigens (Con A, EM1 and EM2) were performed using ANOVA of repeated measures. Whenever significant differences between the indices were found, multiple

comparisons (Bonferroni test) were then performed. A 5% significance level was considered. At the two instances of the study, dogs were presented in good health status with both hematological and biochemical variables kept close together and negative results for direct antiglobulin test (n=21). The percentage of red blood cells labeled with IgG and IgM in the pre-vaccination ($1.06\pm 0.49\%$ and $1.42\pm 1.59\%$) and post-vaccination ($0.83\pm 0.56\%$ and $1.35\pm 1.71\%$) were kept similar, with $p=0.261$ and $p=0.699$, respectively. The percentage of erythrocytes with C3 on the surface at the time post-vaccination ($0.40\pm 0.38\%$) was on average lower than in the pre-vaccination ($0.71\pm 0.33\%$), $p=0.019$. The proliferation index obtained with ConA, ME1 and ME2 in the pre-vaccination (2.15 ± 0.83 , 1.03 ± 0.07 , 1.05 ± 0.11) and post-vaccination (2.13 ± 0.58 , 1.02 ± 0.05 , 1.02 ± 0.05) did not differ significantly, with $p=0.935$, $p=0.845$ and $p=0.222$, respectively. In both instances, rates of cell proliferation observed with the use of ConA were, on average, higher than the rates with ME1 and ME2 ($p<0.001$). The low percentage of erythrocytes with IgG, IgM or C3 on the surface and the absence of lymphocyte proliferative response when stimulated with erythrocyte membranes, indicate that, at least in this experiment, there is no evidence of any association between vaccine stimulation and development of IMHA in dogs.

Keywords: Immune mediated hemolytic anemia. Dogs. Immunization. Flow cytometry. Lymphocyte proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico de pontos FSC X SSC e histograma de FL1, em escalas logarítmicas, de hemácias analisadas por citometria de fluxo, sem marcação por anticorpos (hemácias não-marcadas) de um animal com eritograma normal e hemácias marcadas com anti-IgG FITC de um animal com AHIM. - São Paulo, - 2011.....	53
Figura 2 -	<i>Box plot</i> da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, 2011 -	67
Figura 3 -	<i>Box plot</i> da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgM FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, - 2011.....	68
Figura 4 -	<i>Box plot</i> da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, - 2011.....	68
Figura 5 -	<i>Box plot</i> da porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC dos cães do grupo I com teste de Coombs direto positivo (Coombs Pos) ou negativo (Coombs Neg). - São Paulo, - 2011.....	71
Figura 6 -	Membranas Eritrocitárias: de um lavado de hemácias originalmente vermelho (direita), o <i>pellet</i> obtido tornou-se esbranquiçado e o sobrenadante límpido e incolor (esquerda), indicando a ausência de hemoglobina nas membranas eritrocitárias obtidas. - São Paulo, - 2011.....	82
Figura 7 -	Gráficos de pontos FSC X SSC, ambos em escala linear (A e C) e FL1 X SSC, em escala logarítmica e escala linear, respectivamente, (B e D) de um ensaio de proliferação de linfócitos. - São Paulo, - 2011.....	85
Figura 8 -	<i>Box plot</i> do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e após a vacinação (n=15). - São Paulo, - 2011.....	89
Figura 9 -	<i>Box plot</i> dos índices de proliferação de linfócitos nos momentos pré e pós-vacinais (n=21). - São Paulo, - 2011.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados do hemograma e resultados do teste de Coombs direto de seis cães utilizados na padronização das técnicas de Coombs e de detecção de imunoglobulinas (IgG, IgM) e complemento (C ₃) na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo. - São Paulo, - 2011.....	51
Tabela 2 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpo anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC analisada por citometria de fluxo (n=6). - São Paulo, - 2011	54
Tabela 3 -	Identificação e características hematológicas dos cães do grupo I (anêmicos, com teste de Coombs positivo e/ou 2 ou mais critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011.....	60
Tabela 4 -	Identificação e características hematológicas dos cães do grupo II (anêmicos, com teste de Coombs negativo e um critério de inclusão). - São Paulo, - 2011.....	61
Tabela 5 -	Identificação e características hematológicas dos cães do grupo III (anêmicos, com teste de Coombs negativo e nenhum dos critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011.....	62
Tabela 6 -	Identificação e características hematológicas dos cães do grupo IV (controle). - São Paulo, - 2011	63
Tabela 7 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo I (anêmicos, com teste de Coombs positivo e/ou 2 ou mais critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011	64
Tabela 8 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo II (anêmicos, com teste de Coombs negativo e um critério de inclusão). - São Paulo, - 2011	65
Tabela 9 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo III (anêmicos, com teste de Coombs negativo e nenhum dos critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011.....	65
Tabela 10 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo IV (controle). - São Paulo, - 2011.....	66

Tabela 11 -	Estatística descritiva da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC dos cães dos grupos I, II, III e IV e valor de p obtido pela ANOVA. - São Paulo, - 2011.....	69
Tabela 12 -	Comparações múltiplas (teste de Dunnett) entre os grupos I, II, III e IV para a marcação de hemácias com anti-IgG FITC. - São Paulo, - 2011	69
Tabela 13 -	Comparações múltiplas (teste de Dunnett) entre os grupos I, II, III e IV para a marcação de hemácias com anti-IgM FITC. - São Paulo, - 2011.....	70
Tabela 14 -	Valores de hematócrito, número de reticulócitos absolutos, porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, e título obtido no teste de Coombs poliespecífico e monoespecífico para IgG dos cães do grupo I. - São Paulo, - 2011	70
Tabela 15 -	Comparação entre a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC e positividade ou não ao teste de Coombs direto. - São Paulo, - 2011.....	72
Tabela 16 -	Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C ₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e após a vacinação (n=15). - São Paulo, - 2011	88
Tabela 17 -	Índice de proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A e suspensão de membranas eritrocitárias (ME1 e ME2) em cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e 33 dias após a vacinação (n=21). - São Paulo, - 2011	90
Tabela 18 -	Comparações entre o índice de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal. - São Paulo, - 2011.....	92
Tabela 19 -	Comparações múltiplas (teste de Bonferroni) para os índices de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal. - São Paulo, - 2011.....	92
Tabela 20 -	Comparações entre o índice de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pós-vacinal. - São Paulo, - 2011.....	92
Tabela 21 -	Comparações múltiplas (teste de Bonferroni) para os índices de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pós-vacinal. - São Paulo, - 2011.....	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	CONCEITO	19
2.2	ETIOLOGIA	19
2.2.1	AHIM Primária	20
2.2.2	AHIM Secundária	20
2.2.3	Envolvimentos das Vacinas no Desenvolvimento da AHIM	21
2.3	IMUNOPATOGENESE	25
2.3.1	Perda da Autotolerância	26
2.3.2	Principais Antígenos Eritrocitários	28
2.3.3	Principais Imunoglobulinas Envolvidas	29
2.3.4	O Papel do Sistema Complemento	32
2.3.5	Tipos de Hemólise	33
2.3.6	Eritrócitos Senescentes	35
2.4	DIAGNÓSTICO	35
2.4.1	Diagnóstico Diferencial	36
2.4.2	Predisposição	36
2.4.3	Sinais Clínicos	37
2.4.4	Hemograma	38
2.4.5	Bioquímica Sérica	40
2.4.6	Exame de Urina	41
2.4.7	Autoaglutinação	42
2.4.8	Teste da Antiglobulina Direta (Teste de Coombs Direto)	42
2.4.9	Deteção de Imunoglobulinas e Complemento na Superfície Eritrocitária por Citometria de Fluxo	43
2.4.10	Mielograma	44
2.4.11	Outros Exames	45
2.5	TRATAMENTO	45
2.6	PROGNÓSTICO	47
	CAPÍTULO I: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA	48
3	PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE COOMBS DIRETO E DE DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO NA SUPERFÍCIE ERITROCITÁRIA POR CITOMETRIA DE FLUXO	48
3.1	ANIMAIS	48
3.2	TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETA (TESTE DE COOMBS DIRETO)	48
3.2.1	Controles	49

3.2.2	Preparo das suspensões de hemácias a 2 % em NaCl 0,9%	49
3.2.3	Teste de Coombs propriamente dito	50
3.3	TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS PARA A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE IGG, IGM E C ₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	51
4	DETECÇÃO DE IGG, IGM E C₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	55
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1.1	Animais	55
4.1.2	Obtenção das Amostras Sanguíneas	56
4.1.3	Hemograma	56
4.1.4	Teste da Antiglobulina Direta (Teste de Coombs Direto) ..	57
4.1.5	Detecção de IgG, IgM e C ₃ na Superfície de Eritrócitos por Citometria de Fluxo	58
4.1.6	Análise Estatística	59
4.2	RESULTADOS	60
4.3	DISCUSSÃO	72
4.4	CONCLUSÃO	76
CAPÍTULO II: RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO FRENTE A MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS AUTÓLOGAS DE CÃES RECENTEMENTE IMUNIZADOS		77
5	MATERIAIS E MÉTODOS	77
5.1	ANIMAIS	77
5.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	78
5.3	HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	78
5.4	TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETA (TESTE DE COOMBS DIRETO)	79
5.5	DETECÇÃO DE IGG, IGM E C ₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	80
5.6	PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	80
5.6.1	Antígenos	81
5.6.2	Ensaio de Proliferação de Linfócitos	82
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
6	RESULTADOS	87
7	DISCUSSÃO	94
8	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é a alteração imunohematológica mais comum dos cães (KLAG; GIGER; SHOFER, 1993; DUVAL; GIGER, 1996; DAY, 1999; BARKER, 2000; QUIGLEY et al., 2001) e é caracterizada pela destruição precoce das hemácias devido à fixação de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária (BORDIN; SOUZA-PINTO; KERBAUY, 1991; THOMPSON, 1997; BARKER, 2000; WILKERSON et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; THRALL et al., 2007; QUIGLEY; MACKIN, 2008). Ela pode ocorrer como um evento primário (idiopático) ou secundário a uma variedade de eventos, incluindo uso de fármacos, doenças infecciosas, vacinação, neoplasias, transfusões sanguíneas, dentre outros (KLAG; GIGER; SHOFER, 1993; THOMPSON, 1997; BARKER, 2000; CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; BALCH; MACKIN, 2007).

Pode ser identificada uma associação temporal entre a vacinação recente e a anemia hemolítica imunomediada (KLAG et al., 1993; DUVAL; GIGER, 1996; GREENE; SCHULTZ, 2006; BALCH; MACKIN, 2007), embora essa associação seja contestada por alguns autores (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002) e faltem evidências diretas da relação causal entre elas (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2002).

As vacinas têm sido associadas ao desenvolvimento de diversas doenças hematológicas imunomediadas, como a trombocitopenia imunomediada (TIM) em humanos após vacinação contra poliomielite, sarampo, rubéola, tifo, varíola, influenza e infecção pneumocócica e em cães após a vacinação contra cinomose (DUVAL; GIGER, 1996) e a anemia hemolítica imunomediada após vacinação de crianças contra difteria-coqueluche-tétano (DUVAL; GIGER, 1996) e em cães após vacinação com vírus vivo modificado da cinomose (GREENE; SCHULTZ, 2006).

Agentes atenuados podem iniciar o processo por mimetismo molecular, havendo semelhança entre os antígenos do agente e do hospedeiro, causando reação imunológica cruzada contra certos tecidos do hospedeiro (GREENE; SCHULTZ, 2006), como foi demonstrado para o LCMV-d (vírus da coriomeningite linfocítica) e a banda 3 do eritrócito nos modelos murinos induzindo viroticamente a anemia hemolítica imunomediada (DAY, 1999). Por outro lado, alguns agentes virais, são capazes de aglutinar hemácias, como no caso do vírus da cinomose e do

parvovírus canino, ambos presentes nas vacinas caninas polivalentes. A proteína F do vírus da cinomose permite a fusão celular como meio de propagação direta intercelular e a proteína HA do vírus pode se ligar e aglutinar hemácias de mamíferos e de aves (TIZARD, 2002).

Além de poder induzir o desenvolvimento de doenças imunomediadas, sugere-se que a vacinação possa exacerbar a AHIM pré-existente, já que pode estimular o sistema imune e ativar macrófagos. Em modelos de AHIM, por exemplo, observou-se que eritrócitos de cobaias revestidos por anticorpos são removidos da circulação mais rapidamente quando o sistema imune é previamente estimulado por *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (DUVAL; GIGER, 1996).

Alguns critérios podem comprovar a autoimunidade: 1. prova direta de que a doença pode ser transferida por células ou anticorpos; 2. identificação do antígeno, isolamento do antígeno e reprodução da doença; 3. isolamento de anticorpos auto-reagentes ou de linfócitos T auto-reagentes; 4. evidência circunstancial, como a ocorrência familiar, infiltrado linfocítico em órgãos-alvo da autoimunidade, presença de anticorpos dirigidos contra o DNA celular (anticorpo antinúcleo) e melhora com tratamento imunossupressor (SNYDER, 2007).

Desses critérios, a identificação de linfócitos T auto-reagentes, como foi demonstrado por Corato et al. (1997) por meio da proliferação celular, quando exposto ao antígeno em estudo, pode se constituir na técnica *in vitro* para a demonstração da sensibilização anormal do sistema imune contra o antígeno em questão. A predisposição familiar, também pode ser determinada pela mesma metodologia, identificando-se entre os parentes, principalmente membros da mesma ninhada, aqueles que apresentam maior reatividade a auto-antígenos.

Há evidências de que células B e T autorreativas estão presentes normalmente no organismo, sugerindo-se que auto-anticorpos tenham função de promover a marcação de células para a morte, com uma ação fisiológica (GIRELLO; KÜHN, 2002).

O diagnóstico definitivo da AHIM é firmado mediante a detecção de moléculas de anticorpo ou complemento na superfície dos eritrócitos circulantes (BARKER; ELSON, 1993; THOMPSON, 1997), sendo o teste da antiglobulina direta (TAD, teste de Coombs) o método mais utilizado para este fim. Embora esse teste apresente sensibilidade limitada, sua especificidade é alta (QUIGLEY et al., 2001).

Pequenas quantidades de imunoglobulinas e complemento estão presentes na superfície das hemácias de animais sadios, participando do processo de remoção de eritrócitos senescentes da circulação (BRAGA et al., 1998; QUIGLEY et al., 2001). Essas pequenas quantidades de anticorpos podem ser detectadas pela citometria de fluxo, mas não pelo teste da antiglobulina direta. A citometria de fluxo tem sido empregada para detectar anticorpos ligados a eritrócitos de humanos, pois anti-anticorpos fluorescentes se ligam às imunoglobulinas aderidas à membrana eritrocitária e essa fluorescência pode ser quantificada precisa e rapidamente (QUIGLEY et al., 2001).

Constituem-se, portanto, em objetivos deste trabalho avaliar em cães recentemente vacinados com protocolo vacinal utilizado rotineiramente,

1. a presença de imunoglobulinas (IgG e IgM) e complemento (C_3) na superfície das hemácias, comparando-se os momentos pré e pós-vacinais e
2. o potencial do estímulo mitogênico das membranas eritrocitárias sobre os linfócitos após o estímulo vacinal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) foi relatada em cães pela primeira vez em 1954 por Miller et al. (BARKER et al., 1992).

É uma doença caracterizada pela destruição precoce das hemácias devido à fixação de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária (BORDIN; SOUZA-PINTO; KERBAUY, 1991; THOMPSON, 1997; BARKER, 2000; WILKERSON et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; THRALL et al., 2007; QUIGLEY; MACKIN, 2008), que leva à diminuição do número dos eritrócitos circulantes, decorrente de hemólise intra ou extravascular (BARKER et al., 1992; DUVAL; GIGER, 1996; DAY 1999; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BRANDÃO et al., 2004; BALCH; MACKIN, 2007).

A AHIM é um dos tipos mais comuns de anemia dos pequenos animais (BARKER et al., 1992; DAY, 1999; BALCH; MACKIN, 2007; THRALL et al., 2007) e também a alteração imunohematológica mais comum nos cães (KLAG; GIGER; SHOFER, 1993; DUVAL; GIGER, 1996; DAY, 1999; BARKER, 2000; QUIGLEY et al., 2001).

2.2 ETIOLOGIA

A AHIM pode ocorrer como um evento primário (idiopático) ou secundário a uma variedade de doenças infecciosas ou neoplásicas (KLAG; GIGER; SHOFER, 1993; THOMPSON, 1997; BARKER, 2000; CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; BALCH; MACKIN, 2007). As freqüências relativas da anemia hemolítica imunomediada primária e secundária em cães são de 43% e 57%, respectivamente (WILKERSON et al., 2000). A alta freqüência de AHIM primária reflete, provavelmente, à incapacidade em encontrar a causa de base (BALCH; MACKIN, 2007).

2.2.1 AHIM Primária

Cerca de um terço dos casos de AHIM primária se associam a outras alterações imunológicas, como o lúpus eritematoso sistêmico ou trombocitopenia auto-imune, e com tumores linfóides, como a leucemia felina. O seu início pode estar associado com estresse óbvio, como vacinação, doença viral ou alterações hormonais, como na prenhez ou na piometra. Geralmente, no entanto, ela se desenvolve sem qualquer causa predisponente óbvia (TIZARD, 2002).

2.2.2 AHIM Secundária

A AHIM secundária é causada por uma resposta imunológica contra antígenos não-próprios que modificam ou se associam à membrana eritrocitária normal. Pode ser causada por numerosos processos de base: indução por fármacos, doenças infecciosas, vacinação, neoplasias, transfusões sanguíneas, dentre outros (MILLS, 1997; BALCH; MACKIN, 2007; QUIGLEY; MACKIN, 2008).

Dentre as doenças infecciosas relacionadas ao desenvolvimento da AHIM nos cães pode-se citar: a dirofilariose (*Dirofilaria immitis*), a micoplasmose (*Mycoplasma haemocanis*), a erliquiose (*Ehrlichia canis*), as riquetsioses (*Anaplasma phagocytophilum*), a babesiose, a leishmaniose e as infecções bacterianas crônicas (DAY; MACKIN, 2008; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

Os linfomas, doenças mieloproliferativas e hemangiossarcomas, também são citados como gatilho da doença, pois podem causar alterações na imunorregulação, pela produção clonal de linfócitos T neoplásicos, produção de auto-anticorpos por linfócitos B neoplásicos e lesão de hemácias com exposição de auto-antígenos (DAY; MACKIN, 2008).

A vacinação recente pode estar envolvida na patogênese da AHIM, havendo observação temporal entre a vacinação recente (por volta de quatro semanas) e o desenvolvimento da anemia (DAY; MACKIN, 2008; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

Medicamentos como sulfas, penicilinas, cefalosporinas, levamisole, insulina, acetaminofen, tetraciclina, fenilbutazona, dipirona, quinidina, clorpromazina podem

iniciar a AHIM por diversos mecanismos, como: adsorção do fármaco à hemácia (ex: penicilina, quinina, L-dopa, ácido aminossalicílico e fenacetina), formação de imunocomplexos e formação de auto-anticorpos (ex: cefalosporinas) (DAY; MACKIN, 2008).

2.2.3 Envolvimentos das Vacinas no Desenvolvimento da AHIM

Pode ser identificada uma associação temporal entre vacinação recente e a anemia hemolítica imunomediada. Há explicações teóricas para essa ligação causal: a vacinação pode ser um gatilho não específico que ativa macrófagos, induzir inflamatória e/ou desregula o equilíbrio do sistema imune (GREENE; SCHULTZ, 2006; BALCH; MACKIN, 2007).

Devido à conveniência, tornou-se comum empregar misturas de organismos em uma única vacina. Os cães podem receber vacinas que contêm os seguintes organismos: vírus da cinomose, adenovírus tipo 1 canino, adenovírus tipo 2 canino, parvovírus 2 canino, vírus da parainfluenza canina, bacterina de *Leptospira* e o vírus da raiva, com uma economia de tempo e esforço consideráveis. Mas, infelizmente, dois dos pré-requisitos de uma vacina ideal, a alta antigenicidade e a ausência de efeitos colaterais adversos, tendem a ser mutuamente incompatíveis (TIZARD, 2002).

As vacinas têm sido associadas ao desenvolvimento de diversas doenças hematológicas imunomediadas em humanos e cães. A trombocitopenia imunomediada (TIM) tem sido relatada em humanos após vacinação contra poliomielite, sarampo, rubéola, tifo, varíola, influenza e infecção pneumocócica e em cães após a vacinação contra cinomose (DUVAL; GIGER, 1996).

A anemia hemolítica imunomediada tem sido relatada após vacinação em crianças contra difteria-coqueluche-tétano. Mecanismos similares aos da trombocitopenia imunomediada são propostos para a anemia hemolítica imunomediada induzida por vacina. Há quatro mecanismos propostos para explicar a TIM após vacinação, mas as evidências diretas são escassas: 1) o vírus vacinal pode inibir a trombocitopoiese no estágio de megacariócitos. Mas em humanos, aspirados de medula mostraram aumento do número de megacariócitos e

macroplaquetas em esfregaço sangüíneo, sugerindo acelerada trombocitopoiese; 2) os componentes da vacina podem atacar ou alterar a membrana das plaquetas, iniciando uma resposta imune. Antígenos de superfície ou reações cruzadas entre as plaquetas e os componentes da vacina ainda não foram demonstrados; 3) componentes da vacina podem se combinar à proteínas e agir como haptenos, iniciando a formação de imunocomplexos. Esse parece ser o caso da trombocitopenia induzida por cinomose em cães infectados experimentalmente, embora a especificidade dos anticorpos ligados a plaquetas não tenha sido determinado; 4) a vacinação pode alterar a resposta imune e plaquetas normais são removidas da circulação por um sistema imune hiperreativo. Injeções com antígenos vacinais de pneumococcus em camundongos iniciam uma estimulação de linfócito B policlonal que pode resultar em TIM similar à TIM induzida por sepse (DUVAL; GIGER, 1996).

Imunoglobulinas eluidas da membrana das hemácias de pacientes humanos vacinados que apresentaram aglutinação têm antígeno especificidade para vários componentes da vacina de difteria-coqueluche-tétano. Esses achados sustentam o modelo imunomediados, com anticorpos formados contra componentes vacinais e que atacam a membrana eritrocitária (DUVAL; GIGER, 1996).

Em modelos de AHIM em cobaias, eritrócitos revestidos por anticorpos são removidos da circulação mais rapidamente quando o sistema imune é previamente estimulado por *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Esta evidência sugere que a estimulação do sistema imune e a ativação de macrófagos, como a induzida por vacinação, pode exacerbar a AHIM pré-existente (DUVAL; GIGER, 1996).

Klag, Giger e Shofer (1993), em seu estudo com 42 cães com AHIM, observaram que um deles havia sido vacinado duas semanas antes do diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada com uma vacina de vírus-vivo modificado de cinomose-parainfluenza-leptospirose-adenovírus-parvovírus, assim eles não excluíram a possibilidade da doença ter sido induzida pela vacina. Por outro lado, Carr, Panciera e Kidd (2002) não observaram associação entre a AHIM e a vacinação em seu estudo com 72 cães diagnosticados.

As respostas específicas dos linfócitos T nas doenças autoimunes caninas devem ser estudadas para se entender melhor clinicamente esse grupo de doenças. Se a vacinação pode induzir a anemia hemolítica imunomediada em alguns cães, então, provavelmente, há uma semelhança molecular entre a membrana do eritrócito

e os antígenos virais, como foi demonstrado para o LCMV-d (vírus da coriomeningite linfocítica) e a banda 3 do eritrócito nos modelos murinos induzindo viroticamente a anemia hemolítica imunomediada (DAY, 1999).

Duval e Giger (1996) fizeram um estudo retrospectivo e acompanharam 58 cães com AHIM por um período de 27 meses. Quinze (15) desses cães (26%) haviam sido vacinados no período de um mês (média de 13 dias; mediana de 14 dias; ocorrência 1 a 27 dias) anteriormente ao desenvolvimento da doença. Treze (13) cães haviam sido vacinados de 13 a 55 meses antes. Observaram também que os animais vacinados a até um mês do desenvolvimento da AHIM apresentavam significativa queda na contagem de plaquetas, quando comparados ao grupo que havia sido vacinado há mais de um mês. Os 58 cães do estudo haviam sido vacinados contra cinomose, adenovírus tipo 2, leptospirose, parainfluenza, parvovirose e raiva.

Suspeita-se que possa ocorrer anemia hemolítica imunomediada primária e anemia imunomediada não-regenerativa (autoimunidade de precursores eritróides) após vacinação com vírus vivo modificado da cinomose em cães. Isso pode ocorrer após infecção natural, mas raramente há relatos. Um-quarto dos cães estudados com anemia hemolítica imunomediada haviam sido vacinados com produtos polivalentes no período de um mês anterior ao início do estudo (GREENE; SCHULTZ, 2006). A trombocitopenia tem sido vista em infecções naturais pelo vírus da cinomose, semelhante ao vírus do sarampo humano (morbilivírus) (DUVAL; GIGER, 1996).

Alguns vírus podem se ligar e aglutinar hemácias de mamíferos e de aves. Essa hemaglutinação induzida por vírus pode auxiliar na caracterização de um vírus desconhecido. A inibição da hemaglutinação viral por meio de um anticorpo pode ser utilizada tanto como um método de identificação de um vírus específico como para medir os níveis de anticorpos no soro. Os organismos hemaglutinantes incluem os ortomixovírus, paramixovírus, alfavírus, flavivírus e bunivírus, bem como alguns adenovírus, reovírus, parvovírus e coronavírus. Também incluem alguns micoplasmas, como o *Mycoplasma gallisepticum* (TIZARD, 2002).

O vírus da cinomose é um membro do gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*. É um vírus relativamente grande (150-250 nm de diâmetro), com fita simples negativa de RNA, contida por um nucleocapsídeo helicoidal simétrico. É envolto por um envelope lipoprotéico derivado de glicoproteínas virais que

incorporam na membrana celular. Vírus como o da cinomose canina, que codificam proteínas capazes de se integrar à membrana celular, podem tornar as células infectadas susceptíveis a lesões por citólise imunomediada. O vírus da cinomose canina pode induzir uma fusão celular como meio de propagação direta intercelular. Análises genéticas do fragmento 388-bp do gene P (proteína polimerase) e região de codificação da H proteína (hemaglutinina) tem sido usadas para separar os genótipos selvagens e vacinais (GREENE; APPEL, 2006).

O coronavírus canino é um membro da família *Coronaviridae*, seu genoma viral é composto por uma fita simples de RNA enovelada, envolto por um envelope de glicoproteínas e hemaglutinina, sendo capaz de induzir aglutinação de eritrócitos naturalmente (MCCAWE; HOSKINS, 2006).

Não se sabe se os componentes da vacina induzem a produção de auto-anticorpos nos cães ou se os macrófagos ou o sistema imune são ativados pela vacinação e destroem células vermelhas com anticorpos pré-existentes em sua superfície (DUVAL; GIGER, 1996).

Embora os componentes vacinais sejam fornecidos em pequenas quantidades, elas contêm relativamente grandes quantidades de antígenos imunorreativos e de outros componentes que podem permanecer por longos períodos de tempo no organismo. Conseqüentemente a vacinação pode iniciar respostas imunes de dias a semanas após a inoculação (DUVAL; GIGER, 1996; GOSSETT, 2000).

Vírus vivo modificado, vírus morto e bacterinas mortas, assim como adjuvantes usados nas vacinas podem estimular ou interromper as funções do sistema imune ou iniciar o aumento de produção de anticorpos conduzindo à AHIM (DUVAL; GIGER, 1996; GREENE; SCHULTZ, 2006). Agentes atenuados podem iniciar o processo por mimetismo molecular, havendo semelhança entre os antígenos do agente e do hospedeiro, causando reação imunológica cruzada contra certos tecidos do hospedeiro (GREENE; SCHULTZ, 2006).

Vacinas contêm não somente patógenos virais ou bacterianos atenuados ou inativados, mas também adjuvantes e outros componentes. As vacinas contra doenças virais são tipicamente produzidas em culturas de tecidos e, portanto, podem conter traços de células heterólogas ou componentes séricos. E ainda, algumas proteínas como albumina sérica bovina e a gelatina, algumas vezes, são adicionadas às vacinas como estabilizantes. Em estudos com Beagles, observou-se

o desenvolvimento de anticorpos contra uma variedade de antígenos bovinos, murinos e suínos após a vacinação de rotina. Sugere-se que esses anticorpos são uma resposta imune natural contra antígenos heterólogos. Supõe-se que com repetidas imunizações, anticorpos contra antígenos heterólogos podem causar reação cruzada com antígenos caninos homólogos, resultando, eventualmente em doenças autoimunes em indivíduos predispostos (SCOTT-MONCRIEFF et al., 2002).

2.3 IMUNOPATOGENESE

A anemia hemolítica imunomediada é considerada predominantemente uma reação de hipersensibilidade do tipo II, hipersensibilidade citotóxica, em que anticorpos anti-eritrocitários, incluindo IgG, IgM e IgA, atacam direta ou indiretamente vários componentes da membrana da hemácia, levando a uma destruição prematura destas (THOMPSON, 1997; BALCH; MACKIN, 2007).

O primeiro evento que deve ocorrer para que componentes da membrana eritrocitária sejam reconhecidos como estranhos é a perda da autotolerância. A partir daí, epítomos de auto-antígenos eritrocitários são apresentados às células apresentadoras de antígenos, que liberam citocinas e ativam linfócitos T auto-reativos. Linfócitos B auto-reativos são então ativados, iniciam uma proliferação clonal e se diferenciam em plasmócitos, que sintetizam os auto-anticorpos (QUIGLEY; MACKIN, 2008).

Os mecanismos que podem levar anticorpos a ligarem-se à superfície eritrocitária são: 1) auto-anticorpos direcionam-se diretamente a epítomos da membrana eritrocitária (alteração imunológica primária – autoimunidade); 2) aloanticorpos ligam-se a aloantígenos (transfusão sanguínea, isoeritrolise neonatal) (DAY; MACKIN, 2008); 3) anticorpos direcionam-se contra epítomos exógenos aderidos à superfície eritrocitária (ex.: *M. haemofelis*, penicilina), ou seja, a destruição da hemácia ocorre, mas o ataque não foi direcionado especificamente à sua membrana celular (DAY; MACKIN, 2008); 4) medicamentos, como as ciclosporinas, podem aderir a uma molécula da membrana eritrocitária, formando um novo epítomo, que será reconhecido como estranho (DAY; MACKIN, 2008); 5) fármacos ou microrganismos podem expor determinantes antigênicos ocultos, que

serão reconhecidos como estranhos (FAGIOLO, 2004; DAY; MACKIN, 2008); 6) pode ocorrer uma reação imunológica cruzada, por um processo de mimetismo molecular, havendo semelhança entre os antígenos do agente e do hospedeiro (DAY, 1999; FAGIOLO, 2004; GREENE; SCHULTZ, 2006 DAY; MACKIN, 2008). E ainda, podem ocorrer falhas na tolerância imunológica central ou periférica e alterações imunorregulatórias (FAGIOLO, 2004).

Citocinas Th1/ Th2 ou desequilíbrio IL10/ IL12 podem induzir anemia hemolítica autoimune (AHAI). Em camundongos NZB e em humanos com AHAI, há um aumento da produção de citocinas Th2, como IL4 e IL10, e redução de INF γ e IL12. Particularmente, a IL10 parece atuar como mediador crítico para a produção de auto-anticorpos eritrocitários (FAGIOLO, 2004).

2.3.1 Perda da Autotolerância

Os linfócitos T e B geram receptores de ligação a antígenos aleatoriamente, portanto, a produção inicial de células auto-reagentes não pode ser evitada. Sendo assim, a indução de tolerância requer a deleção clonal ou a supressão funcional de linfócitos auto-reativos (TIZARD, 2002). A tolerância imunológica ocorre no período perinatal e, depois de alcançada a maturidade imunológica, existe uma incapacidade de reagir contra componentes próprios (GIRELLO; KÜHN, 2002; TIZARD 2002).

A autoimunidade desenvolve-se quando os mecanismos responsáveis pela autotolerância falham e o sistema imunológico passa a reagir contra as estruturas próprias do organismo. Os mecanismos que levam à auto-agressão são os mesmos dos processos normais de resposta que resultam na imunidade contra os patógenos exógenos ou na vigilância imunológica contra células tumorais ou infectadas por vírus (RIZZO; BARBUTO, 2001).

A autoimunidade pode resultar de fatores ambientais, genéticos e imunológicos, portanto, a etiologia das doenças autoimunes geralmente não é bem definida, havendo dificuldades em estabelecer e identificar os antígenos que iniciaram as respostas autoimunes e os linfócitos que medeiam essas reações (GIRELLO; KÜHN, 2002; QUIGLEY; MACKIN, 2008).

Há evidências de que células B e T autorreativas estão presentes normalmente no organismo, sugerindo-se que auto-anticorpos tenham função de promover a marcação de células para a morte, com uma ação fisiológica (GIRELLO; KÜHN, 2002).

Alguns critérios podem comprovar a autoimunidade, como: 1) prova direta de que a doença pode ser transferida por células ou anticorpos; 2) identificação do antígeno, isolamento do antígeno e reprodução da doença; 3) isolamento de anticorpos auto-reagentes ou de linfócitos T auto-reagentes; 4) evidência circunstancial, como a ocorrência familiar, infiltrado linfocítico em órgãos-alvo da autoimunidade, presença de anticorpos dirigidos contra o DNA celular (anticorpo antinúcleo) e melhora com tratamento imunossupressor (SNYDER, 2007).

Desses critérios, a identificação de linfócitos T auto-reagentes, como foi demonstrado por Corato et al. (1997) por meio da proliferação celular, quando exposto ao antígeno em estudo, pode se constituir na técnica *in vitro* para a demonstração da sensibilização anormal do sistema imune contra o antígeno em questão. A predisposição familiar, também pode ser determinada pela mesma metodologia, identificando-se entre os parentes, principalmente membros da mesma ninhada, aqueles que apresentam maior reatividade a antígenos próprios.

A análise da proliferação de linfócitos utilizando CFSE (diacetato de carboxifluoresceína succinidil éster) e citometria de fluxo foi iniciada em 1994 por Lyons e Parish. O CFSE consiste em uma molécula de fluoresceína contendo dois grupos acetato e um grupo funcional succinidil éster. Nesta forma, é permeável à membrana celular e não-fluorescente. Após sua difusão para o meio intracelular, esterases endógenas removem os grupos acetato, tornando a molécula altamente fluorescente e não-permeável à membrana celular (LYONS, 2000).

A intensidade de fluorescência do CFSE é inversamente proporcional à proliferação celular, pois, durante a mitose, o corante é dividido em partes iguais às células filhas. Portanto, a diminuição da fluorescência indica que os linfócitos proliferaram. Sendo assim o índice de proliferação (IP) pode ser calculado pela divisão da intensidade de fluorescência das células basais (sem estímulos antigênicos) pela intensidade de fluorescência das células estimuladas (TOMIYOSHI et al., 2009).

A concanavalina A (ConA) é uma lecitina extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*, utilizada como mitógeno inespecífico nas culturas de células

mononucleares, pois é capaz de se ligar não-covalentemente aos carboidratos da superfície dos linfócitos, promovendo um aumento da entrada de cálcio na célula, proporcionando o estímulo para a síntese de DNA e resultando na proliferação celular. A proliferação de linfócitos mediada pela concanavalina A é dependente de células acessórias, sendo necessária a presença de macrófagos e linfócitos B (McCOLE et al., 1998).

2.3.2 Principais Antígenos Eritrocitários

As hemácias, como as células nucleadas, possuem moléculas de superfície celular que podem agir como antígenos. A maioria dos antígenos de superfície das hemácias é de glicoproteínas ou glicolipídeos que são componentes integrais da membrana celular (TIZARD, 2002). Os antígenos mais comuns que podem iniciar a formação de auto-anticorpos são: a glicoforina, a banda 3 e a espectrina.

As glicoforinas são glicoproteínas da membrana plasmática e um dos mais comuns antígenos de membrana que iniciam a formação de auto-anticorpos (DAY, 1999; BARKER, 2000; TIZARD, 2002; BALCH; MACKIN, 2007).

A proteína de troca aniônica de membrana eritrocitária (banda 3) parece menos envolvida na formação de auto-anticorpos (BARKER; ELSON, 1993; DAY, 1999; TIZARD, 2002). Ela atua na retirada de CO₂ dos tecidos e regula o transporte de HCO³⁻, além de regular o metabolismo da glicose, manter a morfologia eritrocitária e remover células senescentes (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A proteína espectrina do citoesqueleto também pode ser alvo de auto-anticorpos (DAY, 1999; BARKER, 2000; TIZARD, 2002; BALCH; MACKIN, 2007). A espectrina e polipeptídeos associados são responsáveis pelo formato e deformabilidade dos eritrócitos, além de constituírem elementos estabilizadores da bicamada lipídica (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Animais com AHIM têm uma pobre regulação das funções supressoras dos linfócitos T ou têm uma superestimulação do sistema imune que levam à formação de auto-anticorpos contra antígenos da membrana eritrocitária próprios do animal (BARKER, 2000; BALCH; MACKIN, 2007).

2.3.3 Principais Imunoglobulinas Envolvidas

As principais imunoglobulinas envolvidas na anemia hemolítica imunomediada em cães são a imunoglobulina G (IgG), a imunoglobulina M (IgM) e a imunoglobulina A (IgA), que também foi identificada mais recentemente em menor número dos casos (THOMPSON, 1997; DAY, 1999).

Anticorpo é uma globulina sintetizada por plasmócitos, após estímulo de um imunógeno, e que possui propriedade de interagir com este de maneira específica. As moléculas de anticorpos são constituídas basicamente de duas subunidades protéicas chamadas cadeias leves (L) e duas subunidades designadas cadeias pesadas (H) (CALICH, 2001).

As cinco classes de imunoglobulinas conhecidas até agora (Ig A, Ig G, Ig M, Ig D, Ig E) diferem entre si na estrutura das cadeias pesadas, sendo, as cadeias leves, iguais para todas as classes de imunoglobulinas. Há, no entanto, dois tipos de cadeias leves com diferentes seqüências de aminoácidos, designadas pelas letras gregas κ (kappa) e λ (lambda). As cadeias pesadas, específicas para cada classe, são também designadas por letras gregas que simbolizam a sua estrutura: α - alfa (IgA); γ - gama (IgG), μ - mu (IgM), δ -delta (IgD) e ϵ - épsilon (IgE) (CALICH, 2001).

Os isotipos são as diferentes estruturas que existem dentro da mesma espécie animal, constituindo um padrão para essa espécie. As variantes na cadeia pesada que estão presentes em todos os membros da mesma espécie animal são as chamadas subclasses. Conhecem-se quatro subclasses de IgG humanas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. No camundongo as subclasses de IgG são denominadas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. As IgA são duas: IgA1 e IgA2 (CALICH, 2001). Os cães possuem quatro subclasses de IgG denominadas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, em ordem de abundância, bem como IgM, IgA e IgE. As evidências preliminares também sugerem que os cães são os únicos a possuírem 2 subclasses de IgE: IgE1 e IgE2 (TIZARD, 2002).

A IgG é produzida e secretada pelos plasmócitos encontrados no baço, linfonodos e medula óssea. É a imunoglobulina encontrada em maior concentração no sangue e, por essa razão, exerce papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. Como a IgG é a menor das moléculas de imunoglobulinas, ela pode escapar dos vasos sangüíneos mais facilmente que as outras

imunoglobulinas. A IgG liga-se prontamente a antígenos estranhos e podem ativar o sistema complemento somente se moléculas suficientes se acumularem de maneira correta na superfície do antígeno (TIZARD, 2002).

A IgM também é produzida e secretada pelos plasmócitos no baço, linfonodo e medula óssea. É a segunda maior concentração de imunoglobulina na maioria dos soros dos mamíferos. A forma secretada de IgM é um polímero (cinco subunidades). Ela é a principal classe de imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária. Também é produzida em uma resposta secundária, mas isso é mascarado pela predominância de IgG. Embora seja produzida em menor quantidade, a IgM é consideravelmente mais eficiente que a IgG na ativação do complemento, opsonização, neutralização de vírus e aglutinação. Em virtude do seu tamanho muito grande, as moléculas de IgM geralmente permanecem na corrente sanguínea (TIZARD, 2002).

A IgA é produzida pelos plasmócitos, predominantemente localizados logo abaixo da superfície corpórea e geralmente é secretada como dímero em menor quantidade que a IgM. É produzida nas paredes do trato intestinal, trato respiratório, sistema urinário, pele e glândula mamária, tendo importância crítica na proteção desses sistemas contra invasões microbianas. A IgA não ativa o sistema complemento e não pode agir como opsonina. Pode, no entanto, aglutinar um antígeno particulado e neutralizar vírus. O principal modo de ação da IgA é impedir a aderência de antígenos às superfícies corpóreas (TIZARD, 2002).

Uma das funções mais importantes das imunoglobulinas é o reconhecimento de antígenos mediado por imunoglobulinas expressas na superfície dos linfócitos B. O reconhecimento do antígeno é realizado pela interação do determinante antigênico com o sítio anticórpico específico. Em geral, os sítios combinatórios dos anticorpos são dirigidos contra bactérias, fungos, vírus e seus produtos. Reconhecem também epítomos presentes em parasitas protozoários e metazoários (CALICH, 2001).

A AHIM pode ser classificada em tipo frio ou quente de acordo com a ligação dos auto-anticorpos, usualmente essa ligação aos eritrócitos é máxima a 37°C, mas em alguns casos ocorre em baixas temperaturas (BARKER et al., 1992; BARKER, 2000)

A AHIM pode ser dividida em 5 classes nos cães dependendo do anticorpo envolvido, da temperatura ideal para os anticorpos reagirem e da natureza do processo hemolítico:

Classe I (auto-aglutininas de ação em solução salina): auto-anticorpos aglutinam hemácias na temperatura corpórea. Tanto os anticorpos IgG como os IgM encontram-se ativos. Há hemólise extravascular, pois a IgG não ativa eficientemente o complemento, não havendo hemólise intravascular marcante.

Classe II (hemolisinas intravasculares): os anticorpos IgM que agem na temperatura corpórea ativam o complemento e destroem as hemácias afetadas por meio de uma hemólise intravascular. As hemácias com complemento na superfície serão preferencialmente removidas pelas células de Kupffer no fígado ou nos linfonodos.

Classe III (classe de anticorpo incompleta): A maioria dos casos de AHIM nos cães e nos gatos é mediada por anticorpos IgG1 e IgG4, que podem reagir com as hemácias a 37°C, mas não podem ativar o complemento ou aglutinar as hemácias. As imunoglobulinas irão opsonizar as hemácias e essas serão fagocitadas por macrófagos esplênicos.

Classe IV (hemaglutininas frias): Alguns anticorpos IgM são chamados aglutininas frias, pois só podem aglutinar as hemácias quando a temperatura é de 10 a 4°C. À medida que o sangue circula nas extremidades o sangue pode se resfriar e haver aglutinação dentro dos capilares. Isso pode levar a estase vascular, isquemia tecidual e necrose.

Classe V (não-aglutininas de ação a frio): é mediada por anticorpos IgM, que se combinam às hemácias quando resfriadas a 4°C, mas não aglutinam. Não induzem necrose das extremidades, mas podem ativar o complemento, levando à hemólise intravascular (THOMPSON, 1997; TIZARD, 2002).

A AHIM devido a aglutininas de ação direta (classe I) ou a hemolisinas (classe II) é geralmente aguda, rapidamente progressiva e de mau prognóstico. Corticosteróides e a ciclofosfamida devem ser usados para tratar o animal doente. A esplenectomia ajuda pouco na AHIM mediada por IgM (classe II, IV e V), já que as hemácias são predominantemente destruídas no fígado (TIZARD, 2002).

2.3.4 O Papel do Sistema Complemento

O sistema complemento é um sistema formado por mais de 30 proteínas que podem ser encontradas solúveis no plasma ou ligadas à superfície de certos tipos celulares (ISAAC, 2001).

A aderência de anticorpo na superfície eritrocitária pode ativar o sistema complemento, resultando na deposição de suas proteínas sobre a membrana da hemácia. Devido à estrutura pentamérica da IgM, uma única molécula deste anticorpo aderida à superfície eritrocitária pode ativar a cascata clássica do complemento; entretanto, a superfície eritrocitária pode estar recoberta por um número elevado de moléculas de IgG, suficientes para que ocorra a ligação entre proteína inicial ativadora do complemento (C1q) e a região Fc de duas moléculas adjacentes de anticorpo (THOMPSON, 1997).

O componente C₃ tem papel central na ativação do sistema complemento pelas três vias (alternativa, clássica e das lectinas), que culminarão na via terminal comum, responsável pela formação e deposição do complexo de ataque à membrana, o qual promove a lise celular (ISAAC, 2001).

Anticorpos, por si, não destroem microrganismos invasores, eles indicam os organismos estranhos para destruição. O sistema complemento é desencadeado pela presença de anticorpos na superfície de um organismo (sistema imune adquirido) ou pelas estruturas de carboidratos presentes na superfície deles (sistema imune inato). O sistema complemento é parte essencial das defesas do corpo, mas deve ser cuidadosamente regulado, uma vez que a ativação descontrolada deva induzir à massiva destruição celular e tecidual (GIRELLO; KÜHN, 2002; TIZARD, 2002).

Além da lise, outras funções biológicas também importantes são geradas durante o processo de ativação do complemento: produção de fragmentos proteicos que facilitarão a fagocitose de microrganismos (opsoninas); produção de fatores quimiotáticos que atrairão para o local da ativação células inflamatórias; solubilização de imunocomplexos circulantes; produção de fragmentos proteicos com capacidade para desgranular mastócitos (anafilotoxinas); estímulo da síntese de imunoglobulinas, etc. (ISAAC, 2001; GIRELLO; KÜHN, 2002; TIZARD, 2002).

2.3.5 Tipos de Hemólise

A consequência da ativação do sistema complemento é a hemólise. Se a cascata for ativada de C1 até C9 ocorre hemólise intravascular, pois, no final, forma-se o complexo de ataque à membrana, constituindo poros que alteram a permeabilidade, provocando lise osmótica. Se as hemácias forem opsonizadas por IgG com fixação do complemento e ocorrer ligação aos receptores Fc das imunoglobulinas pelos macrófagos ou se as hemácias forem opsonizadas somente por componentes do sistema complemento, a cascata pode ser inibida no momento da fragmentação do C₃ por ação de proteínas reguladoras, havendo hemólise extravascular. Pode também haver lise osmótica eritrocitária nas condições do teste, ou seja, hemólise *in vitro*, especialmente se houver ligação Ag-Ac na temperatura ambiente (por anticorpos frios sem significado clínico) e isso não representar que este esteja ocorrendo *in vivo* (GIRELLO; KÜHN, 2002).

A hemólise intravascular é a destruição das células vermelhas na circulação. Trauma mecânico por lesão endotelial, fixação do complemento e agentes infecciosos podem causar degradação direta da membrana e destruição celular (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004). A hemólise extravascular é a destruição e remoção dos eritrócitos com alterações de membrana por macrófagos do fígado e do baço (THOMPSON, 1997; DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

Os processos hemolíticos intravasculares são aqueles decorrentes da interação de imunoglobulinas da classe M com os eritrócitos, promovendo a ativação do complemento e culminando em hemólise direta (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007). É considerada a forma mais grave e de manifestações clínicas mais agudas, ocorrendo em 10 a 20% dos cães (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). As principais características laboratoriais da hemólise intravascular são: hemoglobinemia, hemoglobinúria, aumento metemoglobina, diminuição haptoglobina, icterícia e hemossiderinúria (GIRELLO; KÜHN, 2002; BALCH; MACKIN, 2007). Com a destruição das hemácias, a hemoglobina livre no plasma liga-se à alfa2 globulina (haptoglobina), que é fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário (SMF) e, portanto, tem seus níveis diminuídos. Com isso, a hemoglobina livre é oxidada; a metemoglobina, excretada pelos rins, provocando o aparecimento de hemoglobinúria. A

hemossiderose no epitélio tubular renal resulta da deposição da hemoglobina filtrada. A icterícia surge dos altos níveis de bilirrubina não-conjugada ou bilirrubina indireta (GIRELLO; KÜHN, 2002; WEISS; TVEDTEN, 2004).

A hemólise extravascular é dependente dos fagócitos do sistema monocítico fagocitário (SMF) presentes no baço, no fígado e na medula óssea, capazes de retirar da circulação as hemácias revestidas por anticorpos e pelo complemento. Em geral são processos mediados por IgG, incapazes de gerar o processo hemolítico por si, e que necessitam da ação do sistema fagocitário para iniciá-lo. Estes são considerados os quadros hemolíticos mais freqüentes em cães, brandos e de melhor prognóstico. (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007). Como a hemoglobina entra no metabolismo da bilirrubina ao invés de cair diretamente na circulação, não há hemoglobinúria nem hemoglobinemia na hemólise extravascular (BALCH; MACKIN, 2007). A principal característica laboratorial da hemólise extravascular é a hiperbilirrubinemia (GIRELLO; KÜHN, 2002).

A ligação dos anticorpos e frações de complemento funciona como sinalização para macrófagos do SMF, que possuem receptores para a fração Fc (aproximadamente 1×10^6 / macrófago). Há perda de flexibilidade da membrana, provocada pela esferocitose. Esses glóbulos serão capturados na microcirculação, preferencialmente esplênica, provocando esplenomegalia. O baço é até 100 vezes mais eficiente que o fígado nessa remoção. Por isso, a esplenectomia pode ser indicada (diminuição do seqüestro de células opsonizadas) e a corticoterapia (diminuição da produção de auto-anticorpos) (GIRELLO; KÜHN, 2002). Devido ao catabolismo de hemácias pelas células fagocitárias surge anemia e icterícia. A hemoglobina liberada pelas células fagocitárias liga-se à haptoglobina, diminuindo seus níveis séricos (GIRELLO; KÜHN, 2002).

A caracterização em intra ou extravascular é de pouca utilidade, em sua grande maioria, são mistos e não apresentam um sítio preferencial para a ocorrência de hemólise (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

2.3.6 Eritrócitos Senescentes

Todos os eritrócitos possuem certa quantidade de IgG ligada à sua superfície (BRAGA et al., 1998; PEREIRA, 2006). Habitualmente, homens normais possuem menos de 50 moléculas de IgG por glóbulo vermelho, enquanto, geralmente, as hemácias de pacientes com anemia hemolítica imunomediada estão recobertas com grande quantidade de imunoglobulina. Durante o processo de envelhecimento das hemácias, ocorre um aumento do número de moléculas de IgG por glóbulo vermelho, o que favorece o reconhecimento e fagocitose celular pelos macrófagos (BRAGA et al., 1998).

A presença de imunoglobulinas e complemento nos eritrócitos de animais sadios pode, portanto, estar associada à remoção de eritrócitos senescentes da circulação (BRAGA et al., 1998; QUIGLEY et al., 2001). Essas pequenas quantidades de anticorpos nas hemácias podem ser detectadas pela citometria de fluxo, mas não pelo teste da antiglobulina direto (QUIGLEY et al., 2001).

2.4 DIAGNÓSTICO

A anemia é descoberta frequentemente após testes laboratoriais, mas o histórico e o exame físico podem fornecer indícios importantes sobre a presença de hemólise e sobre a causa de base (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

Não há um sinal único e patognomônico para o diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada, mas alguns critérios podem ser adotados, como: anemia regenerativa; evidência de hemólise caracterizada por hemoglobinemia ou hemoglobinúria; evidência de anticorpos direcionados contra eritrócitos, com autoaglutinação, esferocitose ou teste de Coombs positivo (DUVAL; GIGER, 1996; BALCH; MACKIN, 2007).

2.4.1 Diagnóstico Diferencial

A anemia hemolítica não imunomediada deve ser diferenciada da AHIM. As causas mais comuns de anemia hemolítica não imunomediada nos pequenos animais são defeitos hereditários, exposição a toxinas (zinco, acetaminofen, cebola, alho e outros agentes oxidantes que levam à formação de corpúsculos de Heinz), hipofosfatemia e anemia hemolítica microangiopática. Animais jovens com anemia hemolítica podem apresentar alterações hereditárias, como deficiência de piruvatoquinase (Basenjis e outras raças caninas), deficiência de fosfofrutoquinase (English Springer e Cocker Spaniel americano), fragilidade osmótica eritrocitária hereditária (Alaskan Malamutes e Schnauzer miniatura) (BALCH; MACKIN, 2007) e estomatocitose hereditária (Schnauzer miniatura) (INABA, 2000).

Algumas vezes é difícil definir se a anemia hemolítica é imunomediada ou não. Por exemplo, animais com babesiose ou micoplasmose é difícil determinar se a hemólise ocorreu devido à associação direta do parasita à hemácia ou se há AHIM secundária (BALCH; MACK, 2007).

2.4.2 Predisposição

A AHIM é mais comum em cães do que em gatos. Em cães já foram estabelecidas predisposições raciais, sexuais e etárias (BALCH; MACKIN, 2007). Cocker Spaniel, Old English Sheepdog, Poodle, Setter Irlandês, Golden Retriever, Springer Spaniel (THOMPSON, 1997; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; MILLER; HOHENHAUS; HALE, 2004; BALCH; MACKIN, 2007), Collies (THOMPSON, 1997; BALCH; MACKIN, 2007; QUIGLEY; MACKIN, 2008), Bichon Frisé, Pinscher, Schnauzer miniatura e Spitz (SCOTT-MONCRIEFF, 2009) são raças predispostas a desenvolver a anemia hemolítica imunomediada.

Muitos estudos indicam que fêmeas adultas são mais acometidas do que machos, podendo haver influência hormonal (THOMPSON, 1997; BARKER, 2000; DAY, 2000; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007; QUIGLEY; MACKIN, 2008; SCOTT-MONCRIEFF, 2009). Dentre os cães afetados

com idade inferior a um ano, os machos parecem ser mais predispostos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

A média de idade dos animais acometidos é de seis anos (DAY, 1999; DAY, 2000; TIZARD, 2002; BALCH; MACKIN, 2007), mas ela pode iniciar no primeiro ano de vida ou até aos 13 anos de idade (BALCH; MACKIN, 2007).

2.4.3 Sinais Clínicos

As principais queixas no caso de AHIM são letargia, anorexia, palidez, icterícia, vômito, diarreia, desmaios e fraqueza, geralmente de início abrupto (THOMPSON, 1997; BALCH; MACKIN, 2007; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

Ao exame físico os achados incluem: mucosas hipocoradas, mucosas ictéricas, febre, hepato e esplenomegalia (decorrentes da ativação do sistema monocítico fagocitário envolvido na destruição das hemácias), colúria, prostração, alterações de coagulação sangüínea, como petéquias, equimoses, hematúria ou sangramento vaginal persistente, poliúria, polidipsia, taquipnéia, taquicardia e sopro anêmico (THOMPSON, 1997; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

As mucosas ficam ictéricas quando os níveis de bilirrubina sérica se elevam a 2-3 mg/dL, e afeta a pele quando esses níveis são ainda maiores (BALCH; MACKIN, 2007).

Na AHIM aguda, os sinais refletem a anemia (mucosas pálidas, fraqueza, letargia, intolerância ao exercício, taquipnéia, taquicardia e anorexia) e a destruição das hemácias (hepato e esplenomegalia, linfadenopatia e febre), há ainda hemoglobinemia e hemoglobinúria. Devido à hipóxia hepática as enzimas hepáticas, como ALT e fosfatase alcalina, podem estar elevadas. Nos casos crônicos, em que a hemólise é extravascular crônica ou há aplasia adquirida pura de células vermelhas (PRCA), os sinais clínicos podem ser mínimos, incluindo episódios transitórios de icterícia. Quando a hemólise é intravascular aguda ou subaguda, há início abrupto (1-2 dias) de anemia intensa e icterícia (DAY; MACKIN, 2008).

2.4.4 Hemograma

Dentre as alterações laboratoriais observadas, a presença de anemia de grau moderado (hematócrito entre 20 a 29%) a intenso (hematócrito entre 13 e 19%), frequentemente com hematócrito inferior a 15%, de características regenerativas (macrocitose, policromasia, reticulocitose e presença de eritroblastos circulantes) é muito comum (MILLS, 1997; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007; WEISS; TVEDTEN, 2004).

Casos de AHIM arregenerativas são frequentes e sua ocorrência deve ser cuidadosamente investigada (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). Alguns autores afirmam que ela pode ocorrer em cerca de 50% dos casos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003), outros observaram em cerca de um terço dos pacientes (BALCH; MACKIN, 2007) ou ainda em cerca de 35% dos cães (BARKER, 2000). Alguns desses pacientes tiveram anemia aguda, mas não houve tempo suficiente para a adequada resposta regenerativa, outros têm anticorpos direcionados contra precursores eritróides da medula óssea (DAY, 1999; BARKER, 2000; BRANDÃO et al., 2004; BALCH; MACKIN, 2007), pode haver doença medular primária (BRANDÃO et al., 2004) ou ainda deficiência nutricional associada (hipoferremia), por exemplo (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; TIZARD, 2002). A AHIM não regenerativa ocorre devido a interferências imunomediadas na eritropoiese, portanto a eritropoese ainda é ativa. Mas ela pode evoluir para a aplasia adquirida pura de células vermelhas (PRCA), em que há destruição imunomediada de precursores eritróides da medula, com redução marcante de número e função das células vermelhas (DAY; MACKIN, 2008).

A anemia ocorre quando a taxa de destruição de eritrócitos excede a taxa de produção. Quando há níveis normais de hemoglobina na presença de acelerada destruição de eritrócitos, podemos dizer que há uma hemólise compensada. Esse fenômeno ocorre ocasionalmente em humanos com hemólise imunomediada, mas raramente é reportada em cães (MILLS, 1997).

Nos casos de AHIM não regenerativa, a anemia pode ser normocrômica normocítica, com contagem de reticulócitos baixa e presença ou ausência de esferocitose. Sinais de hemólise, como bilirrubinúria, hemoglobinúria, hepato e

esplenomegalia podem estar presentes. O teste de Coombs é positivo em aproximadamente 30% dos cães com AHIM não regenerativa (DAY; MACKIN, 2008).

Nos casos de AHIM regenerativa, a reticulocitose geralmente é marcante (WEISS; TVEDTEN, 2004). Uma contagem absoluta de reticulócitos maior que 60.000 reticulócitos/ μL de sangue indica regeneração eritrocitária em cães (BALCH; MACKIN, 2007). A regeneração eritrocitária pode ser classificada em: ausente (contagens de reticulócitos menores que 60.000 reticulócitos/ μL de sangue), discreta (contagens de reticulócitos de 150.000 reticulócitos/ μL de sangue), moderada (contagens de reticulócitos de 300.000 reticulócitos/ μL de sangue) ou intensa (contagens de reticulócitos superiores a 500.000 reticulócitos/ μL de sangue) (WEISS; TVEDTEN, 2004). A máxima regeneração pode ocorrer após 3 a 5 dias da perda de sangue ou hemólise (THRALL et al., 2007; DAY; MACKIN, 2008; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

A presença de esferócitos não é patognomônica da AHIM, marcada esferocitose é certamente altamente sugestiva desse diagnóstico. Esferócitos podem ser observados em 89 a 95% dos cães com AHIM (BALCH; MACKIN, 2007). Os esferócitos são hemácias pequenas e arredondadas sem halo de palidez central característico dos eritrócitos caninos, que tiveram sua estrutura tridimensional modificada após a retirada, por fagócitos, de uma parte de sua membrana que estivera recoberta por anticorpos ou complemento (MILLS, 1997; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007; THRALL et al., 2007). São células de meia-vida mais curta, que podem ter a função de transporte de oxigênio prejudicada. Sua presença indica o envolvimento de mecanismos imunomediados na gênese do processo anêmico, mas não determina se estes são primários ou secundários (MILLS, 1997; BARKER, 2000; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Quando há fixação do complemento, resultando em dano à membrana pelos complexos formados, ocorre lise intravascular. Nesse caso, ocasionalmente são constatadas hemácias “fantasmas” no esfregaço sanguíneo (THRALL et al., 2007; SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

A contagem total de leucócitos pode variar de valores extremamente baixos à leucocitose intensa. A leucopenia pode ser decorrente de processos imunomediados direcionados contra leucócitos, septicemia ou depressão medular (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003), enquanto a leucocitose parece ser

ocasionada pela estimulação de citocinas e fatores mediadores da inflamação liberados no processo hemolítico, ou ainda, pela estimulação inespecífica da mielopoiese (série mielóide e eritróide) secundária à anemia grave, que estimula a linhagem mielóide periférica de forma inespecífica (leucocitose por neutrofilia, com ou sem desvio à esquerda). O desenvolvimento de leucocitose intensa em casos de AHIM pode ser indicativo de necrose tecidual resultante de hipóxia anêmica ou tromboembolismo – sugerindo pior prognóstico, assim como a presença de hiperbilirrubinemia (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007).

Em seres humanos, a presença de leucocitose é um indicativo de trombose e infarto coronariano, em distinção à insuficiência coronariana não acompanhada por necrose tecidual (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

A ocorrência de trombocitopenia imunomediada com surgimento de hemorragias (petéquias) na pele e mucosas é freqüente, cerca de 50-70% dos casos, o que pode indicar não apenas um distúrbio imunomediados direcionado contra as plaquetas, como também o consumo plaquetário exacerbado decorrente da coagulação intravascular disseminada (CID) ou septicemia (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007).

2.4.5 Bioquímica Sérica

Os exames bioquímicos não apresentam alterações características que auxiliem no diagnóstico da AHIM. Os resultados demonstram alterações relacionadas aos danos promovidos pela hemólise, desidratação e hipóxia dos órgãos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). São importantes para detectar a presença de hemólise, coagulação intravascular disseminada e doenças de base (BALCH; MACKIN, 2007).

A icterícia ocorre comumente em cães com AHIM, ela ocorre porque a *clearance* da bilirrubina hepática é reduzida nas doenças hemolíticas e o *turnover* da bilirrubina é aumentado (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002). Na anemia intensa, a hipóxia pode induzir uma necrose centrizonal hepática severa. Hiperbilirrubinemia (concentração sérica de bilirrubina maior que 10 mg/dL) tem sido identificada como

um fator de risco de mortalidade e tromboembolismo na AHIM (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

Mais de 75% dos cães apresentam hiperbilirrubinemia acompanhada pela presença de bilirrubinúria e algumas vezes hemoglobinúria, que confere coloração escura característica à urina (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Pode ocorrer também aumento discreto da atividade sérica das transaminases hepáticas – decorrentes da hipóxia anêmica do órgão -, necrose hepática, hematopoiese extramedular em tecido hepático ou colestase pela hiperplasia do sistema monocítico fagocitário. A ocorrência de hiperglobulinemia é decorrente da resposta inflamatória, e conseqüente produção de imunoglobulinas (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

A hipoalbuminemia foi um fator de grande risco para o tromboembolismo. Ela pode resultar das reações de fase aguda e indica gravidade da doença (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

A azotemia pré-renal pode ser freqüente em animais desidratados. A azotemia renal é rara e é sugestiva de lesão renal decorrente da isquemia, coagulação intravascular disseminada, septicemia ou nefropatia por hemoglobinúria intensa (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; THRALL et al., 2007).

2.4.6 Exame de Urina

O exame de urina tem utilidade na documentação de hemoglobinúria ou bilirrubinúria. A presença de proteinúria excessiva pode indicar extensa lesão glomerular, relacionada à deposição do complexo imune associada à lise intravascular de eritrócitos circulantes. A presença de cilindrúria sugere lesão tubular (THOMPSON, 1997).

2.4.7 Autoaglutinação

O diagnóstico definitivo de AHIM é firmado mediante a detecção de moléculas de anticorpo ou complemento na superfície dos eritrócitos circulantes (THOMPSON, 1997; BARKER; ELSON, 1993).

A autoaglutinação das amostras sanguíneas nos tubos de colheita ou em lâmina de vidro é observada em cerca de 40 a 89% dos cães portadores dessa afecção (BALCH; MACKIN, 2007).

A aglutinação de hemácias (hemácias dispostas como em cachos de uva) e a formação de hemácias em *rouleaux* (hemácias empilhadas como moedas) podem parecer autoaglutinação quando se avalia macroscopicamente o sangue, portanto elas devem ser diferenciadas. Em casos de desidratação e hiperproteinemia pode ocorrer a formação de hemácias em *rouleaux*, portanto, para que se tenha certeza de que a aglutinação é verdadeira, deve-se realizar o teste de aglutinação direto. Esse teste pode ser realizado acrescentando-se uma gota do sangue total em EDTA e uma gota de solução salina (NaCl 0,9%) sobre uma lâmina de microscopia e observando-o em microscopia óptica (THOMPSON, 1997; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007).

Alguns autores indicam a lavagem de hemácias e posterior ressuspensão com salina para avaliar a aglutinação verdadeira (THOMPSON, 1997; BALCH; MACKIN, 2007).

A autoaglutinação persistente após a adição de salina pode representar uma AHIM intensa e pode ser associada a altos índices de mortalidade (BALCH; MACKIN, 2007).

2.4.8 Teste da Antiglobulina Direta (Teste de Coombs Direto)

O teste da antiglobulina direta (TAD) ou teste de Coombs direto demonstra a presença de anticorpos ou complemento na superfície de eritrócitos (WILKERSON et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004) e indica a existência de processos

imunomediados, sendo positivos em 35-60% dos casos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

O TAD apresenta sensibilidade limitada, já que, em humanos, por exemplo, a reação é positiva somente quando há aproximadamente 200 a 500 moléculas de IgG e 400 a 1.100 moléculas de C₃ por hemácia (GIRELLO; KÜHN, 2002). Entretanto, a especificidade é alta, de 100% quando se observa a interação entre o anti-soro e a imunoglobulina ligada à hemácia, resultando em aglutinação macroscópica (QUIGLEY et al., 2001).

O teste apresenta várias desvantagens, incluindo a alta ocorrência de falsos negativos, o alto custo devido à grande quantidade de anti-soro requerido e a subjetividade na interpretação dos resultados (QUIGLEY et al., 2001).

Falso-negativos podem ocorrer em cães previamente tratados com drogas imunossupressoras, em casos de remissão da doença ou quando há pequena quantidade de anticorpos anti-eritrocitários aderidos às hemácias. Doenças associadas – como neoplasias, hemobartonelose, babesiose, infecções bacterianas -, a administração de medicamentos como penicilinas, sulfas, etc, e transfusões de sangue prévias, bem como o preparo inadequado da técnica, também podem originar resultados falso-negativos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Resultados positivos do teste de Coombs, isoladamente, não confirmam o diagnóstico da doença, razão pela qual é necessário avaliá-los criteriosamente, em conjunto com as demais alterações clínicas e laboratoriais (GIRELLO; KÜHN, 2002; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

2.4.9 Detecção de Imunoglobulinas e Complemento na Superfície Eritrocitária por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite avaliar as células baseado em tamanho, complexidade interna e a quantidade de fluorescência na superfície celular. Tem sido usada para detectar anticorpos ligados a eritrócitos em humanos, pois anticorpos fluorescentes podem ser usados para ligar-se a imunoglobulinas aderidas à membrana eritrocitária. Essa fluorescência pode ser quantificada precisa e rapidamente (QUIGLEY et al., 2001).

Esse teste tem como particularidade a análise rápida, quantitativa e multiparamétrica de uma célula individual, viva ou morta, entre diversas populações, possibilitando assim, que um determinado tipo celular seja rapidamente identificado, caracterizado, quantificado e selecionado (QUIGLEY et al., 2001; VAZ, 2001).

Basicamente inicia-se o ensaio pelo tratamento das células com marcadores fluorescentes. As células marcadas são, então, colocadas numa câmara de fluxo contínuo onde fluem em meio líquido, sendo alinhadas em fila única por uma corrente de pressão de modo a passarem, uma a uma, por uma fonte de excitação luminosa. Os raios de luz são emitidos em todas as direções, de maneira que cada célula é esquadrihada individualmente. As medidas da luz fluorescente emitidas pelos marcadores permitem a quantificação de características antigênicas, bioquímicas e biofísicas. Anticorpos marcados com fluorocromos são usados freqüentemente como marcadores de moléculas associadas às células em estudo (VAZ, 2001; TIZARD, 2002).

Os gráficos de pontos (*dot-plot*) são usados nos ensaios que utilizam dois parâmetros medidos simultaneamente em cada célula. A medida da intensidade de fluorescência de cada fluorocromo é registrada em cada um dos eixos x e y, e o número de células fluorescentes é registrado no eixo z. No *dot-plot* cada ponto representa uma célula (VAZ, 2001).

Pequenas quantidades de anticorpos nas hemácias de cães sadios podem ser detectadas pela citometria de fluxo, mas não pelo teste da antiglobulina direta (QUIGLEY et al., 2001).

2.4.10 Mielograma

O mielograma é especialmente útil nos casos de AHIM pouco regenerativas ou arregenerativas. A presença de hiperplasia da série eritróide e figuras de eritrofagocitose intramedular sugerem eritropoiese ineficiente, ou seja, a destruição das hemácias em decorrência de processo imunomediado ainda dentro da medula óssea, impedindo sua liberação para a circulação (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Em pacientes com AHIM há tipicamente uma hiperplasia da série eritróide. Mas quando a resposta imune afeta diretamente a série eritróide na medula, pode haver decréscimo da série eritróide ou bloqueio maturativo da série. A AHIM crônica progride para lesão medular e mielofibrose secundária (BALCH; MACKIN, 2007).

2.4.11 Outros Exames

Exames laboratoriais adicionais são indicados para animais com anemia hemolítica com o objetivo de identificar a etiologia da doença. Testes sorológicos e moleculares podem ser usados para a procura de agentes infecciosos, como: *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Babesia*, *Leptospira*, *Mycoplasma haemocanis* e *Anaplasma phagocytophilum*. Deve-se também fazer teste para *Dirofilaria immitis* e exame parasitológico para procura de *Ancylostoma caninum* (BALCH; MACKIN, 2007).

O diagnóstico por imagem é importante para detectar doenças de base que mimetizam ou iniciam a AHIM. Radiografias abdominais podem mostrar as dimensões do baço e do fígado, assim como detectar corpos estranhos metálicos gastrointestinais (zinco) ou neoplasias. O ultrassom abdominal e a radiografia torácica, principalmente em animais idosos, podem excluir neoplasias de base (BALCH; MACKIN, 2007).

O tromboembolismo pulmonar é uma complicação do estado de hipercoagulação associada à AHIM. Esse diagnóstico é difícil, pois não há sinais patognomônicos radiográficos (BALCH; MACKIN, 2007).

2.5 TRATAMENTO

A distinção entre AHIM primária e secundária é crucial para o tratamento. A primária requer tratamento agressivo com imunossupressores. A secundária raramente responde ao tratamento imunossupressor se a causa de base não for eliminada (BALCH; MACKIN, 2007).

O tratamento de suporte tem por objetivo a manutenção do equilíbrio hídrico, ácido-básico e a perfusão orgânica (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; DAY; MACKIN, 2008). A transfusão sanguínea é um meio rápido para a reposição de elementos sanguíneos, principalmente hemácias, enquanto a terapia imunossupressora está sendo instituída, mas pode acelerar ainda mais o processo imunomediados de destruição eritrocitária (DAY; MACKIN, 2008)

A terapia imunossupressora impede a destruição dos eritrócitos e, conseqüentemente, a manutenção do quadro anêmico (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; THRALL et al., 2007). Os glicocorticóides são os agentes imunossupressores mais utilizados, eles bloqueiam a interação dos receptores Fc do fagócito com as imunoglobulinas ligadas às hemácias, suprimindo a atividade fagocitária do órgão e coibindo a hemólise extravascular (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; THRALL et al., 2007; DAY; MACKIN, 2008). Após algumas horas também diminui a ligação de imunoglobulinas e componentes do sistema complemento aos eritrócitos (DAY; MACKIN, 2008). Os agentes citotóxicos, como a azatioprina, a ciclofosfamida, o danazol e a ciclosporina A, são frequentemente associados à terapia imunossupressora com corticosteróides para animais com doenças imunomediadas intensas ou refratárias ao tratamento com glicocorticóides (DAY, 1999; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). Mas, até estudos recentes, o uso desses agentes não demonstrou muitos efeitos benéficos aos animais (DAY; MACKIN, 2008).

A plasmaferese, remoção do plasma do animal doente e reposição com plasma fresco de animais sadios, tem como objetivo remover auto-anticorpos circulantes, portanto não há muitos efeitos benéficos quando utilizada isoladamente, pois os auto-anticorpos ligados às hemácias são os responsáveis pela hemólise (DAY; MACKIN, 2008).

A administração de gamma globulina humana na dose de 0,5-1,5 g/kg IV administrada lentamente (por mais de 4 horas) tem como objetivo saturar receptores Fc dos macrófagos. Não foi observada reação anafilática (DAY; MACKIN, 2008).

A esplenectomia é um tratamento controverso, com a remoção do baço, remove-se o sítio de remoção das hemácias e o produtor de auto-anticorpos (DAY; MACKIN, 2008).

2.6 PROGNÓSTICO

A mortalidade é variável, com relatos que variam de 25 a 50% (THRALL et al., 2007; DAY; MACKIN, 2008; SCOTT-MONCRIEFF, 2009) ou até acima de 70% (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

A principal causa de morte é o tromboembolismo (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; SCOTT-MONCRIEFF, 2009), sendo outras causas infecções, coagulação intravascular disseminada e falha no controle da anemia (SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

Fatores de mau prognóstico são a necessidade de tratamento com múltiplas drogas, autoaglutinação persistente, concentração de bilirrubinas séricas elevada, marcante trombocitopenia e/ou intensa leucocitose (SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

Em muitos estudos a icterícia é um fator de risco importante (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002). Embora alguns relatos indiquem maior taxa de mortalidade em cães que apresentam autoaglutinação ou hemólise intravascular, isso é controverso (THRALL et al., 2007; DAY; MACKIN, 2008).

O tromboembolismo pulmonar tem sido identificado comumente em cães com AHIM e o trombo pode atingir outros órgãos. A etiologia do tromboembolismo na AHIM é incerta (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

Em seu estudo com cães vacinados e não vacinados dentro de um mês da apresentação de AHIM, Duval e Giger (1996) observaram que a taxa de mortalidade foi semelhante em ambos os grupos, sendo 60% no grupo vacinado e 44% no grupo não vacinado recentemente. Em ambos os grupos, as mortes ocorreram nas primeiras três semanas depois da apresentação da AHIM e os altos níveis de mortalidade estavam associados com a presença de icterícia e autoaglutinação.

CAPÍTULO I: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA

3 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE COOMBS DIRETO E DE DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO NA SUPERFÍCIE ERITROCITÁRIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A padronização da técnica de Coombs direto (teste da Antiglobulina Direta) consistiu em testes de diluições dos anticorpos e de controles positivos e negativos. A titulação dos anticorpos conjugados com fluoresceína de isotiocianato constituiu a principal etapa da padronização da técnica de detecção de imunoglobulinas e complemento na superfície eritrocitária por citometria de fluxo.

3.1 ANIMAIS

Amostras sanguíneas de três (3) cães sem alterações hematológicas e três (3) cães com anemia regenerativa provenientes do atendimento clínico e cirúrgico do Hospital Veterinário da FMVZ/ USP foram selecionadas para as padronizações iniciais das técnicas de Coombs direto e de detecção de imunoglobulinas e complemento na superfície eritrocitária por citometria de fluxo. O projeto de pesquisa foi realizado mediante parecer favorável da Comissão de Bioética da Unidade de Ensino.

3.2 TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETA (TESTE DE COOMBS DIRETO)

O teste da Antiglobulina Direta foi modificado a partir da técnica descrita por Quigley et al. (2001), utilizando-se o Reagente de Coombs polivalente (anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃ produzido em cabra - 392-5/ VMRD Inc., USA) e os anticorpos

monoespecíficos: anti-IgG de cão, cadeia pesada, produzido em ovelha (A40-118A-10/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA); anti-IgM produzido em cabra (A40-116A-14/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) e anticorpo anti-C₃ de cão produzido em cabra (A40-109A-5/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA).

3.2.1 Controles

Controle negativo da reação de Coombs: foram utilizadas amostras de sangue de três (3) cães sem indicação de anemia (Tabela 1).

Controle positivo do teste: foi utilizado o reagente comercial *Canine anti-Sheep Red Blood Cells Positive Control for Coombs* (372-2/ VMRD Inc., USA). A determinação da diluição do anticorpo capaz de sensibilizar as hemácias de ovinos foi determinada reagindo-se 0,1 mL de suspensão a 2% de hemácias de ovinos com 0,1 mL das diluições 1:2, 1:4 e 1:8 do anticorpo. A diluição do anticorpo selecionada foi a menor em que não houve aglutinação (dose de subaglutinação), isto é, a diluição 1:2. Suspensão a 2% de hemácias de ovinos sensibilizadas foram colocadas na bateria dos testes para reagir com o reagente de Coombs (Anexo A). Hemácias de ovinos foram sensibilizadas com o reagente e utilizadas como controle positivo da reação da antiglobulina direta, toda vez que eram adquiridos novos lotes dos reagentes de Coombs ou dos anticorpos monoclonais específicos.

3.2.2 Preparo das suspensões de hemácias a 2 % em NaCl 0,9 %

Amostras de sangue total, acondicionadas em tubos com anticoagulante EDTA – K₂ (Vacutainer[®] Becton Dickinson, USA) foram centrifugadas a 290 g por 5 minutos a temperatura ambiente para a remoção do plasma e da capa leucocitária. Em seguida, foi realizada, por quatro vezes, a lavagem das hemácias com solução salina (NaCl 0,9% - SF). No final da última lavagem o sobrenadante foi removido e as hemácias lavadas foram ressuspensas em solução fisiológica salina (NaCl 0,9%),

obtendo-se uma suspensão a 2% de eritrócitos (4,9 mL de solução fisiológica para 100 μ L de papa de hemácias).

3.2.3 Teste de Coombs propriamente dito

As amostras sanguíneas a serem analisadas, incluindo as amostras dos três (3) cães com anemia regenerativa (Tabela 1), previamente preparadas sob a forma de suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,9 %, foram inicialmente submetidas ao teste de Coombs com o reagente comercial polivalente, contendo anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃. Foram preparadas as diluições do soro (reagente de Coombs polivalente) com Solução Fisiológica (NaCl 0,9%) na diluição de 1:2, 1:4, 1:8 e assim sucessivamente, até a diluição 1:2.048, em duas placas com 96 poços com fundo em "u" (3799 - Costar Corning, USA). Resumidamente, em todos os poços foram depositados 50 μ L de SF e no primeiro poço, 50 μ L do reagente de Coombs. Após homogeneização, 50 μ L dessa mistura foram transferidos para o segundo poço, e assim sucessivamente até o décimo primeiro poço. Desse último poço foram desprezados 50 μ L da mistura. O décimo segundo poço continha apenas SF (controle negativo). A cada um dos poços foram colocados 50 μ L da suspensão de hemácias a 2%. Após homogeneização, uma das placas foi incubada a 4°C e a outra a 37°C, por 40 minutos. As reações foram consideradas positivas quando as hemácias permaneceram suspensas em solução. O título final, portanto, foi a última diluição do reagente no qual não foi observada a formação de botão de eritrócitos no fundo do poço.

Um (1) dos seis cães apresentou reação positiva ao teste de Coombs polivalente a 37° C (título 128) e a 4° C (título 512), portanto, sua amostra foi submetida a novos testes de aglutinação, utilizando-se os anticorpos mono-específicos (anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃) em reações separadas e distintas. Os procedimentos de diluição e de reação foram os mesmos anteriormente realizados para o teste de Coombs propriamente dito. Essa amostra teve resultado positivo ao teste mono-específico com o anticorpo anti-IgG, com título 512 a 37° C e 1.024 a 4°

C, sendo negativa aos testes monoespecíficos com os anticorpos anti-IgM e anti-C₃ (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados do hemograma e resultados do teste de Coombs direto de seis cães utilizados na padronização das técnicas de Coombs e de detecção de imunoglobulinas (IgG, IgM) e complemento (C₃) na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo. - São Paulo, - 2011

Animal	Hemograma					Teste de Coombs			
	He (X10 ⁶ /μL)	Ht (%)	Leu* (/μL)	Plaq (/μL)	Ret (/μL)	Reativo de Coombs		Anti-IgG	
						4°C	37°C	4°C	37°C
1 (Boxer, fêmea, 8 anos)	5,94	42	11.700	315.000	23.760	neg	neg	neg	neg
2 (Labrador, fêmea, 8 anos)	6,53	44,6	5.400	377.000	19.590	neg	neg	neg	neg
3 (Schnauzer, fêmea, 10 anos)	5,91	43,6	6.300	401.000	11.000	neg	neg	neg	neg
4 (Labrador, macho, 8 anos)	2,68	21,2	51.600	274.000	75.040	neg	neg	neg	neg
5 (SRD, fêmea, 7 anos)	0,8	8	40.700	31.000	230.400	512	128	1.024	512
6 (Golden Retriever, macho, 5 anos)	1,9	15	15.000	65.000	281.000	neg	neg	neg	neg

Legenda: He (hemácias), Ht (hematócrito), Leu* (leucócitos corrigidos), Plaq (plaquetas), Ret (reticulócitos absolutos), neg (negativo). Todos os animais tiveram resultados negativos aos testes de Coombs monoespecíficos com anti-IgM e anti-C₃.

3.3 TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS PARA A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE IGG, IGM E C₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Procedeu-se a titulação de anticorpos para definir a concentração que apresentasse melhor eficiência para a detecção de imunoglobulinas e complemento na superfície eritrocitária. Foram utilizados anticorpos anti-IgG de cão produzido em ovelha, cadeia pesada (A40-118F-13/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), anti-IgM produzido em cabra (A40-116F-20/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) e anti-C₃ de cão produzido em cabra (A40-109F-14/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), todos conjugados com fluoresceína de isotiocianato (FITC).

Cem (100) μL da suspensão de hemácias a 2% em Solução Fisiológica Salina

(NaCl 0,9%) de cada animal foram incubados com 1 μ L , 3 μ L ou 10 μ L de anti-IgG, anti-IgM ou anti-C₃, em temperatura ambiente e protegidos da luz por 40 minutos em reações separadas e independentes. Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de solução fisiológica em cada tubo, sendo a mistura submetida a centrifugação a 150 *g* por 1 minuto para a remoção de anticorpo excedente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 500 μ L de salina fisiológica 0,9%. Como branco da reação, foi utilizada uma suspensão de hemácias a 2% não marcadas com anticorpos.

As amostras foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company[®] 2007 BD), com aquisição de 50.000 eventos totais, em *software* CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company[®]). O *software* FlowJo (Tree Star) foi utilizado para a análise dos resultados. A partir de um *gate* estabelecido na população de interesse (hemácias) em gráfico de pontos FSC X SSC (Forward Scatter, tamanho *versus* Side Scatter, granulosidade ou complexidade interna), em escala logarítmica, foi criado um histograma (FL1), em escala logarítmica, determinando-se o ponto de positividade (final da curva de uma amostra não marcada), determinando-se, assim, a porcentagem de células marcadas na amostra teste (Figura 1). Os resultados das titulações dos três anticorpos estão representados na tabela 2.

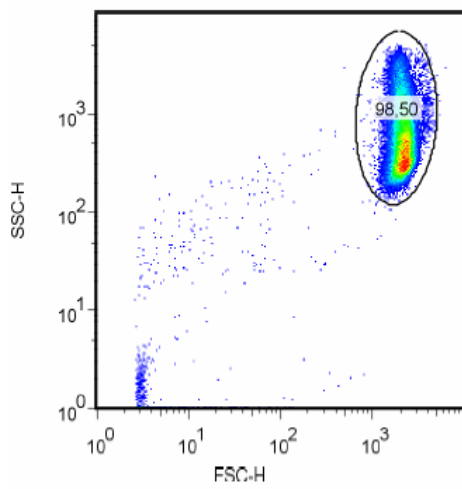
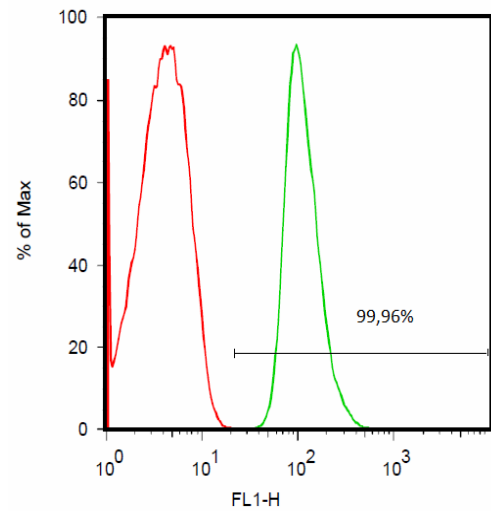


Gráfico de Pontos FSC X SSC Seleção
(*gate*) da população de interesse
(eritrócitos).



Histograma de FL1

Hemácias não-marcadas (linha vermelha):
determinação do ponto de positividade (barra).

Hemácias marcadas com anti-IgG FITC (linha

Figura 1 – Gráfico de pontos FSC X SSC e histograma de FL1, em escalas logarítmicas, de hemácias analisadas por citometria de fluxo, sem marcação por anticorpos (hemácias não-marcadas) de um animal com eritograma normal e hemácias marcadas com anti-IgG FITC de um animal com AHIM. - São Paulo, - 2011

Tabela 2 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpo anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC analisada por citometria de fluxo (n=6). - São Paulo, - 2011

Animal	Hemácias Marcadas (%)								
	Anti-IgG			Anti-IgM			Anti-C ₃		
	10 µL	3 µL	1 µL	10 µL	3 µL	1 µL	10 µL	3 µL	1 µL
1	4,9	0,52	0,07	11,16	0,64	0,15	7,89	0,43	0,13
2	2,39	0,23	0,07	3,15	0,32	0,09	0,99	0,06	0,03
3	3,03	0,21	0,01	2,57	0,09	0,02	1,43	0,08	0,01
4	17,21	14,48	14,71	21,33	14,40	14,04	21,20	16,41	15,87
5	59,44	51,04	38,87	11,07	8,05	6,95	9,14	5,11	4,03
6	14,66	9,34	7,07	21,18	16,10	14,80	11,74	2,23	0,84

Na concentração de 10 µL, houve fluorescência considerada inespecífica nas amostras dos cães 1, 2 e 3 (sem alterações hematológicas). À medida que a concentração de anticorpos foi sendo diminuída, também houve diminuição da fluorescência inespecífica, mantendo-se, porém, a dos animais anêmicos (4, 5 e 6). Assim, a concentração de 1 µL foi considerada satisfatória para a quantificação de hemácias marcadas com anti-IgG, IgM ou C₃.

4 DETECÇÃO DE IGG, IGM E C₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a avaliação das técnicas quanto à capacidade diagnóstica da AHIM, cães anêmicos e cães sem alterações hematológicas foram submetidos aos exames laboratoriais constituídos por hemograma completo, contagem de reticulócitos, teste de Coombs direto e detecção de IgG, IgM e C₃ na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo. As informações sobre o histórico dos animais, pertinentes aos fatores predisponentes ou desencadeantes da AHIM, foram obtidas pelos médicos veterinários que haviam procedido ao exame clínico do animal e constavam nos respectivos prontuários.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de hematologia e de Imunologia do Departamento de Clínica Médica (VCM) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo.

4.1.1 Animais

Para a avaliação das técnicas quanto à capacidade diagnóstica da anemia hemolítica imunomediada, foram selecionadas amostras sanguíneas de 58 cães sem alterações hematológicas e 60 cães anêmicos (hematócrito < 32%), que posteriormente foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo I - dezessete (17) cães anêmicos que apresentaram teste de Coombs positivo e/ou dois dos seguintes critérios de inclusão: presença de esferócitos visualizados no esfregaço sanguíneo corado (maior ou igual a 1+), número de reticulócitos absolutos igual ou maior que 150.000/ μ L ou leucocitose por neutrofilia (leucócitos

totais maior ou igual a 20.000/ μL e neutrófilos segmentados absolutos maior ou igual a 11.800/ μL).

Grupo II - vinte e três (23) cães anêmicos, com apenas um dos critérios acima mencionados.

Grupo III - vinte (20) cães anêmicos, porém de caráter não-regenerativo, teste de Coombs negativo e sem leucocitose.

Grupo IV - cinquenta e oito (58) cães hígdos, de ambos os sexos, sem distinção racial e sem alterações hematológicas marcantes.

Todos os cães foram provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ/ USP. O projeto de pesquisa foi realizado mediante parecer favorável da Comissão de Bioética da Unidade de Ensino.

4.1.2 Obtenção das Amostras Sanguíneas

As amostras sangüíneas foram coletadas, por meio de punção da veia jugular, cefálica ou femoral e acondicionadas em frasco com anticoagulante EDTA – K₂ (Vacutainer[®] Becton Dickinson, USA), para a realização do hemograma, da contagem de reticulócitos, do teste da antiglobulina direta (teste de Coombs direto) e da detecção de IgG, IgM e C₃ na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo.

4.1.3 Hemograma

As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, assim como as determinações do hematócrito e da concentração de hemoglobina, foram realizadas com o auxílio de contador automatizado (BC-2800 VET , Mindray[®], China).

A contagem diferencial de leucócitos e as avaliações morfológicas dos

elementos figurados do sangue foram realizadas em esfregaços sangüíneos preparados a partir de sangue fresco (sem contato com o anticoagulante) e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

A contagem manual de reticulócitos foi realizada com a incubação por 6 minutos em temperatura ambiente de uma mistura de iguais quantidades de sangue e do corante azul de cresil brilhante (Laborclin, Brasil). Três esfregaços foram preparados e contados os reticulócitos em 1000 hemácias. Os valores foram expressos em reticulócitos absolutos (reticulócitos por μL) (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000).

4.1.4 Teste da Antiglobulina Direta (Teste de Coombs Direto)

O teste da Antiglobulina Direta foi modificado a partir da técnica descrita por Quigley et al. (2001), utilizando-se o Reagente de Coombs polivalente (anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃ produzido em cabra - 392-5/ VMRD Inc., USA) e os anticorpos monoespecíficos: anti-IgG de cão, cadeia pesada, produzido em ovelha (A40-118A-10/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA); anti-IgM produzido em cabra (A40-116A-14/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) e anticorpo anti-C₃ de cão produzido em cabra (A40-109A-5/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA).

Amostras de sangue de cães sem indicação de anemia (hematócrito > 37%; leucometria entre 6.000 a 15.000 leucócitos/ μL e plaquetometria entre 200.000 – 500.000 plaquetas/ μL), provenientes do HOVET- FMVZ/ USP, foram utilizadas como controle negativo da técnica. O reagente comercial *Canine anti-Sheep Red Blood Cells Positive Control for Coombs* (372-2/ VMRD Inc., USA) foi utilizado como controle positivo, toda vez que eram adquiridos novos lotes do reagente de Coombs.

Amostras de sangue total em EDTA foram centrifugadas a 290 g por 5 minutos a temperatura ambiente para a remoção do plasma e da capa leucocitária. Em seguida, foi realizada, por quatro vezes, a lavagem das hemácias com solução salina (NaCl 0,9% - SF). No final da última lavagem o sobrenadante foi removido e as hemácias lavadas foram ressuspensas em SF, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos a 2% (4,9 mL de solução fisiológica para 100 μL de papa de hemácias).

Inicialmente, foram realizadas diluições seriadas (1:2 a 1:2.048) do reagente comercial polivalente com solução fisiológica, em duas placas de 96 poços com fundo em "u" (3799 - Costar Corning, USA), sendo o volume final de cada poço igual a 50 μ L. O último poço continha apenas SF (controle negativo). A cada um dos poços foram adicionados 50 μ L da suspensão de hemácias a 2%. Após homogeneização, uma das placas foi incubada a 4°C e a outra a 37°C, por 40 minutos. As reações foram consideradas positivas quando as hemácias permaneceram suspensas em solução. O título final, portanto, foi a última diluição do reagente no qual não foi observada a formação de botão de eritrócitos no fundo do poço. Nos casos em que na última diluição ainda havia aglutinação, o soro de Coombs foi diluído adicionalmente até se obter o título final.

Quando as amostras-testes apresentavam resultados positivos no teste de Coombs polivalente, foram submetidas a novos testes de aglutinação, utilizando-se os anticorpos monoespecíficos (anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃) em reações separadas e distintas. Os procedimentos de diluição e de reação foram os mesmos anteriormente realizados para o teste de Coombs propriamente dito. O título da reação foi considerado a maior diluição em que não se observou a formação do botão de hemácias.

4.1.5 Detecção de IgG, IgM e C₃ na Superfície de Eritrócitos por Citometria de Fluxo

A detecção de imunoglobulinas (IgG, IgM) e complemento (C₃) na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo foi realizada conforme descrito por Quigley et al. (2001), com modificações. Foram utilizados anticorpos anti-IgG de cão produzido em ovelha, cadeia pesada (A40-118F-13/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), anti-IgM produzido em cabra (A40-116F-20/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) e anti-C₃ de cão produzido em cabra (A40-109F-14/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), todos conjugados com fluoresceína de isotiocianato (FITC), previamente titulados.

Cem (100) μ L da suspensão de eritrócitos a 2% em salina fisiológica foram incubados, a temperatura ambiente, por 40 minutos, no escuro, com um (1) μ L de

anticorpo anti-IgG de cão, anti-IgM ou anti-C₃ de cão, marcados com fluoresceína de isotiocianato (FITC). Após a incubação, foram adicionados 2 mL de solução fisiológica em cada tubo, sendo a mistura submetida a centrifugação a 150 g por 1 minuto para a remoção de anticorpo excedente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em 500 µL de solução fisiológica. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company® 2007 BD) e a análise dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* Flow Jo (Tree Star, Inc.) quanto à porcentagem de células marcadas.

4.1.6 Análise Estatística

Para a análise descritiva das variáveis quantitativas foram utilizadas como medidas resumos a média e a mediana e para apontar a variabilidade dos dados foram apresentados desvio-padrão, mínimo e máximo.

A análise da quantidade de IgG, IgM e C₃ na superfície das hemácias entre os quatro grupos (I, II, III, IV) foi realizada comparando-se a média das variáveis entre os grupos através da Análise de Variância (ANOVA). Como não foi verificada a homogeneidade das variâncias, foi feito um ajuste através do teste de Brown-Forsythe (BF) (NETER et al., 1996). Havendo diferença entre as medidas foram realizadas comparações múltiplas (comparação entre dois a dois grupos) através do teste de Dunnett (NETER et al., 1996).

As comparações das quantidades de IgG, IgM e C₃ na superfície eritrocitária em relação aos resultados positivos e negativos ao teste de Coombs para o grupo I foram realizadas através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (MAGALHÃES; LIMA, 2000). Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%.

4.2 RESULTADOS

As tabelas 3, 4, 5 e 6 apresentam a identificação (raça, sexo e idade) e os valores hematológicos (hematócrito, reticulócitos absolutos, esferócitos observados em esfregaço sanguíneo corado, leucócitos totais e neutrófilos segmentados absolutos) dos cães dos grupos I, II, III e IV, respectivamente.

Tabela 3 – Identificação e características hematológicas dos cães do grupo I (anêmicos, com teste de Coombs positivo e/ou 2 ou mais critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011

Identificação				Características Hematológicas				
Nº	Raça	Sexo	Idade	Ht (%)	Ret (/mm ³)	Esf (cruzes)	Leu (/mm ³)	Neu (/mm ³)
1	Pit Bull	F	7a 6m	11	330600	ausentes	75500	64175
2	Golden Retriever	M	5a 10m	15	281200	++	15000	13950
3*	SRD	F	7a 11m	8	230400	ausentes	40700	26862
4*	Sheepdog	F	8a	14	582400	+++	15200	11552
5	SRD	M	10a	21	173850	ausentes	48900	43521
6	SRD	M	9a 9m	16	220800	ausentes	72500	65975
7	SRD	F	Adulta	25	266400	ausentes	21900	18834
8	Poodle	M	15a 7m	20	225000	+	31400	27318
9	Poodle	F	12a 4m	13	356400	+	30500	21045
10	Akita	F	10a	18	235600	+	69300	59598
11	Boxer	M	10a	23	198000	ausentes	30100	27391
12	SRD	F	11a 6m	16	378400	+	27000	23760
13*	SRD	M	6a 6m	17	444400	ausentes	108600	102084
14	Lhasa Apso	M	8a 7m	35	295800	ausentes	30400	26752
15*	Poodle	M	8a 7m	8	138000	++	22200	14430
16*	Whippet	M	7a	10	11690	ausentes	29000	26390
17	Pit Bull	M	7a 4m	13	171600	+	22400	19264
N			16	17	17		17	17
Média			9,15	16,6	267091		40624	34877
Mediana			8,58	16,0	235600		30400	26752
Desvio Padrão			2,47	6,8	129183		25972	24443
Mínimo			5,83	8,0	11690		15000	11552
Máximo			15,58	35,0	582400		108600	102084

Legenda: * Teste de Coombs Direto positivo; SRD (sem raça definida); F (fêmea); M (macho); a (anos); m (meses); Ht (hematócrito); Ret (reticulócitos absolutos); Esf (esferócitos); Leu (leucócitos totais corrigidos); Neu (neutrófilos segmentados). Cruzes: (+), +, ++, +++.

Tabela 4 – Identificação e características hematológicas dos cães do grupo II (anêmicos, com teste de Coombs negativo e um critério de inclusão). - São Paulo, - 2011

Identificação					Características Hematológicas			
N°	Raça	Sexo	Idade	Ht (%)	Ret (/mm ³)	Esf (cruzes)	Leu (/mm ³)	Neu (/mm ³)
1	Labrador	M	8 a 7m	21,2	75040	ausentes	51600	39732
2	Lhasa Apso	F	2a	32	61100	ausentes	21500	19780
3	SRD	M	8m	26	R	ausentes	22800	19152
4	SRD	F	13a	24	160000	ausentes	17700	16638
5	SRD	M	8 a 8m	29	125400	ausentes	51800	45584
6	Pastor Alemão	M	7 a 5m	29	R	ausentes	34200	30438
7	Weimaraner	M	6m	22	81000	ausentes	31800	26394
8	American S Terrier	F	8m	19	201600	ausentes	8300	5810
9	Pit Bull	F	12a	12	128000	++	12500	11750
10	Poodle	M	16a 4m	27	R	ausentes	66800	63460
11	Lhasa Apso	M	2m	21	272000	ausentes	10800	5400
12	Labrador	M	9a 11m	20	83200	ausentes	23600	22184
13	Pastor Alemão	M	4a 7m	24	64000	ausentes	36000	34200
14	Chow Chow	F	3a 9m	22	R	ausentes	78900	52863
15	SRD	M	10a	23	259000	ausentes	16000	12960
16	Poodle	F	11a 2m	24	80000	ausentes	33400	30394
17	SRD	F	12a 10m	10	18000	ausentes	43800	33288
18	Setter Irlandês	F	9 a 10m	20	83200	ausentes	49600	35216
19	SRD	F	14a 9m	16	52800	ausentes	22100	20332
20	Boxer	M	11a 7m	21,6	93670	ausentes	61900	55710
21	Husky Siberiano	F	11a 4m	15	79200	(+)	34800	30972
22	Poodle	M	12a	31	8800	ausentes	40400	35552
23	Poodle	F	8a 5m	21	R	ausentes	22900	21297
n			23	23	18		23	23
Média			8,27	22,2	107001		34487	29092
Mediana			9,83	22,0	82100		33400	30394
Desvio Padrão			4,91	5,6	73498		18814	15326
Mínimo			0,17	10,0	8800		8300	5400
Máximo			16,33	32	272000		78900	63460

Legenda: SRD (sem raça definida); F (fêmea); M (macho); a (anos); m (meses); Ht (hematócrito); Ret (reticulócitos absolutos); Esf (esferócitos); Leu (leucócitos totais corrigidos); Neu (neutrófilos segmentados); R (raros). Cruzes: (+), +, ++, +++.

Tabela 5 – Identificação e características hematológicas dos cães do grupo III (anêmicos, com teste de Coombs negativo e nenhum dos critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011

Identificação					Características Hematológicas			
Nº	Raça	Sexo	Idade	Ht (%)	Ret (/mm ³)	Esf (cruzes)	Leu (/mm ³)	Neu (/mm ³)
1	Pastor Alemão	M	1a 11m	26	R	ausentes	6700	4556
2	Bull Terrier	M	4a 9m	29	99000	ausentes	3400	2652
3	SRD	M	7a	27	R	ausentes	4200	3698
4	Cocker Spaniel	M	Adulto	30	R	ausentes	9800	5978
5	Blue Riler	F	7a	16	R	ausentes	3200	2816
6	SRD	F	6a10m	18	87000	ausentes	7400	5624
7	Golden Retriever	M	8m	32	R	ausentes	7800	4836
8	SRD	F	8a	28	R	ausentes	19700	15563
9	SRD	F	11a 2m	28	56000	ausentes	15700	15229
10	SRD	F	8a	24	R	ausentes	19300	5404
11	SRD	F	8a 11m	25	117000	ausentes	4200	2352
12	Pinscher	M	16a 10m	29	R	ausentes	18800	15792
13	Bull Terrier	F	9a	21	R	ausentes	12700	10287
14	SRD	M	2m	14	115200	ausentes	18200	14742
15	Labrador	M	4a 10m	28	R	ausentes	5300	3763
16	Dachshund	M	12a 11m	14	50400	ausentes	12700	11811
17	SRD	M	3m	15	R	ausentes	10700	8132
18	Dachshund	F	11a	29	R	ausentes	8500	7480
19	Cocker Spaniel	F	12a	17	R	ausentes	10700	8988
20	SRD	F	12a	21	R	ausentes	6200	5766
N			19	20	6		20	20
Média			7,54	23,6	87433		10260	7773
Mediana			8,00	25,5	93000		9150	5872
Desvio Padrão			4,64	6,0	28770		5574	4604
Mínimo			0,17	14,0	50400		3200	2352
Máximo			16,83	32,0	117000		19700	15792

Legenda: SRD (sem raça definida); F (fêmea); M (macho); a (anos); m (meses); Ht (hematócrito); Ret (reticulócitos absolutos); Esf (esferócitos); Leu (leucócitos totais corrigidos); Neu (neutrófilos segmentados); R (raros). Cruzes: (+), +, ++, +++.

Tabela 6 – Identificação e características hematológicas dos cães do grupo IV (controle). - São Paulo, - 2011

Identificação					Características Hematológicas			
Nº	Raça	Sexo	Idade	Ht (%)	Ret (/mm ³)	Esf (cruzes)	Leu (/mm ³)	Neu (/mm ³)
1	Poodle	F	11a	57	89000	ausentes	6000	3360
2	Labrador	F	7a	59	52800	ausentes	9200	3772
3	SRD	F	9a	49	22200	ausentes	7100	5538
4	SRD	F	2a	54	49200	ausentes	9500	4560
5	Labrador	F	9a	44	13600	ausentes	13600	6936
6	Labrador	F	10a	39	23600	ausentes	15100	10117
7	SRD	F	8a	46	53600	ausentes	11400	7980
8	SRD	F	8a	55	112000	ausentes	8500	4760
9	SRD	F	8a	54	80000	ausentes	8700	5568
10	SRD	M	4a	56	R	ausentes	9300	4650
11	Daschund	F	4a	48	R	ausentes	6700	4087
12	SRD	F	9a	53	114000	ausentes	7800	6630
13	SRD	F	5a	58	R	ausentes	10000	8000
14	SRD	M	12a	46	95200	ausentes	9600	7680
15	SRD	M	7a	51	R	ausentes	7400	4662
16	Poodle	F	8a	54	32000	ausentes	12900	6579
17	Whippet	F	1a	59	R	ausentes	6600	5874
18	SRD	F	7a	52	R	ausentes	10100	6565
19	Pequinês	M	20a	47	R	ausentes	10300	6592
20	Labrador	M	7a	49	R	ausentes	12800	6912
21	Pinscher	F	5m	38	R	ausentes	10300	6798
22	Bernese	M	5a 6m	44	61200	ausentes	11500	8395
23	SRD	F	7a 5m	48	R	ausentes	8000	6320
24	Dachshund	F	4a	59	16800	ausentes	8300	6557
25	Dachshund	F	7a 11m	60	36000	ausentes	7000	5530
26	Poodle	M	11a 3m	49	73000	ausentes	7900	6083
27	Yorkshire	M	4a 10m	59	R	ausentes	8400	5208
28	SRD	F	11a 2m	38	6200	ausentes	8600	4988
29	Poodle	F	8a 2m	53,4	R	ausentes	12000	7440
30	Lhasa Apso	F	4a	44	27200	ausentes	13600	11016
31	Dachshund	M	10a	47	13200	ausentes	6200	4836
32	Poodle	F	5a 2m	47	20700	ausentes	12000	9600
33	Yorkshire	M	7a	47,5	40320	ausentes	8500	6205
34	Maltes	F	1a 5m	47	R	ausentes	13000	7280
35	Poodle	M	6a 2m	49	37000	ausentes	9600	6624
36	Boxer	M	10a 6m	49	7600	ausentes	8500	6205
37	Dachshund	F	4a 6m	53	7900	ausentes	8400	6636
38	Dachshund	F	10a 11m	49	23700	ausentes	8300	6557
39	SRD	F	10a 8m	46	22200	ausentes	11200	7392
40	Pit Bull	F	3a 11m	50	50400	ausentes	7400	4514
41	Rottweiler	F	10a 3m	49	30400	ausentes	9000	5580
42	Pit Bull	F	5a 7m	46	R	ausentes	9200	7452
43	SRD	M	10a 9m	40	5800	ausentes	15700	13345
44	Fox Paulistinha	M	11a 6m	51	7600	ausentes	10300	6798
45	SRD	M	Adulto	47,1	78540	ausentes	9200	3220
46	SRD	M	Adulto	48,7	67950	ausentes	7600	4864
47	SRD	M	Adulto	52,6	16460	ausentes	6700	3082
48	SRD	M	Adulto	54,1	63280	ausentes	10300	4635
49	Akita	M	Adulto	44,9	62460	ausentes	14600	8614
50	SRD	F	Adulto	47,6	27520	ausentes	10900	6540
51	SRD	M	Adulto	49	14340	ausentes	6900	3312
52	Pit Bull	M	Adulto	47,2	64080	ausentes	11400	7410
53	Pit Bull	F	Adulto	44,6	12460	ausentes	8100	3888
54	SRD	M	Adulto	44,9	56480	ausentes	13400	6298
55	SRD	F	Adulto	37,4	17490	ausentes	8500	4845
56	SRD	F	Adulto	47	7190	ausentes	7700	5159
57	SRD	M	Adulto	49,6	36600	ausentes	5900	3540
58	SRD	M	Adulto	47,7	21810	ausentes	7900	3792
n			44	58	44		58	58
Média			7,48	49,2	40252		9562	6162
Mediana			7,67	49,0	31200		9100	6252
Desvio Padrão			3,62	5,4	29446		2403	1964
Mínimo			0,42	37,4	5800		5900	3082
Máximo			20,00	60,0	114000		15700	13345

Legenda: SRD (sem raça definida); F (fêmea); M (macho); a (anos); m (meses); Ht (hematócrito); Ret (reticulócitos absolutos); Esf (esferócitos); Leu (leucócitos totais corrigidos); Neu (neutrófilos segmentados); R (raros). Cruzes: (+), +, ++, +++.

As tabelas 7, 8, 9, 10 representam as porcentagens de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães dos grupos I, II, III e IV, respectivamente.

Tabela 7 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo I (anêmicos, com teste de Coombs positivo e/ou 2 ou mais critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011

Nº	Ht (%)	Ig G (%)	Ig M (%)	C ₃ (%)
1	11	10,65	15,10	10,87
2	15	7,07	14,80	0,84
3	8	38,87	6,95	4,03
4	14	99,96	26,67	7,95
5	21	43,51	48,22	39,34
6	16	12,32	24,44	2,96
7	25	14,41	21,29	6,88
8	20	3,95	7,41	3,13
9	13	7,49	35,92	4,72
10	18	16,4	24,16	4,18
11	23	13,16	12,70	7,97
12	16	5,21	9,10	1,63
13	17	54,25	24,87	6,99
14	35	1,17	1,79	0,90
15	8	33,94	47,9	3,74
16	10	96,02	47,44	4,14
17	13	10,23	7,61	1,56
Média	16,6	27,57	22,14	6,58
Mediana	16,0	13,16	21,29	4,14
Desvio Padrão	6,8	30,58	15,10	8,89
Mínimo	8,0	1,17	1,79	0,84
Máximo	35,0	99,96	48,22	39,34

Tabela 8 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo II (anêmicos, com teste de Coombs negativo e um critério de inclusão). - São Paulo, - 2011

N°	Ht (%)	Ig G (%)	Ig M (%)	C ₃ (%)
1	21,2	14,71	14,04	15,87
2	32	8,37	8,46	1,39
3	26	0,66	0,70	0,50
4	24	3,72	9,24	4,20
5	29	1,16	2,08	0,30
6	29	6,05	4,77	1,78
7	22	6,09	6,07	1,19
8	19	6,49	8,86	1,91
9	12	5,32	7,82	1,79
10	27	2,15	1,26	1,38
11	21	3,97	7,57	0,99
12	20	0,25	0,46	0,10
13	24	41,91	42,08	40,71
14	22	3,03	4,03	4,76
15	23	9,27	12,36	1,59
16	24	2,65	2,77	1,94
17	10	71,35	67,67	68,21
18	20	8,28	14,18	1,16
19	16	17,11	12,45	11,62
20	21,6	2,15	3,21	0,94
21	15	32,91	30,73	28,36
22	31	2,60	2,24	2,29
23	21	1,50	1,22	1,24
Média	22,2	10,94	11,49	8,44
Mediana	22,0	5,32	7,57	1,78
Desvio Padrão	5,6	16,68	15,70	16,42
Mínimo	10,0	0,25	0,46	0,10
Máximo	32,0	71,35	67,67	68,21

Tabela 9 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo III (anêmicos, com teste de Coombs negativo e nenhum dos critérios de inclusão). - São Paulo, - 2011

N°	Ht (%)	Ig G (%)	Ig M (%)	C ₃ (%)
1	26	1,59	2,19	0,83
2	29	1,31	1,79	0,79
3	27	2,22	0,81	0,56
4	30	0,36	0,78	0,27
5	16	4,22	3,30	0,88
6	18	8,61	11,92	1,92
7	32	4,19	3,51	3,59
8	28	1,77	3,76	0,41
9	28	0,27	0,46	0,12
10	24	4,83	5,67	5,32
11	25	2,67	2,49	2,14
12	29	4,82	2,89	3,43
13	21	3,39	3,23	3,42
14	14	0,84	2,34	0,49
15	28	0,54	0,49	0,11
16	14	5,57	5,43	4,96
17	15	35,21	49,62	33,96
18	29	2,91	4,65	0,17
19	17	77,18	75,11	74,21
20	21	2,99	0,41	0,54
Média	23,6	8,27	9,04	6,91
Mediana	25,5	2,95	3,06	0,86
Desvio Padrão	6,0	17,86	18,88	17,48
Mínimo	14,0	0,27	0,41	0,11
Máximo	32,0	77,18	75,11	74,21

Tabela 10 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, dos cães do grupo IV (controle). - São Paulo, - 2011.

N°	Ht (%)	Ig G (%)	Ig M (%)	C ₃ (%)
1	57	0,69	0,84	1,07
2	59	0,25	0,32	0,44
3	49	0,78	1,39	1,59
4	54	1,2	1,39	1,01
5	44	1,11	1,89	0,74
6	39	1,02	4,47	0,55
7	46	2,23	0,83	0,79
8	55	1,3	0,87	0,56
9	54	1,34	0,47	0,79
10	56	0,99	0,68	0,51
11	48	1,03	0,35	0,22
12	53	0,45	0,54	0,38
13	58	1,63	5,81	0,72
14	46	0,64	0,74	0,71
15	51	1,23	0,71	0,56
16	54	0,47	0,32	0,34
17	59	0,37	0,26	1,03
18	52	0,77	1,69	1,24
19	47	2,13	2,53	0,71
20	49	1,06	0,59	0,44
21	38	0,49	0,62	0,42
22	44	1,85	1,81	0,27
23	48	0,34	0,27	0,23
24	59	0,02	0,04	0,03
25	60	0,21	0,16	0,1
26	49	1,59	1,47	1,7
27	59	2,11	0,52	0,49
28	38	0,39	0,29	0,25
29	53,4	0,17	0,18	0,17
30	44	1,03	1,31	0,83
31	47	0,78	0,42	0,57
32	47	1,92	2,13	0,59
33	47,5	0,96	1,64	0,57
34	47	1,23	2,1	0,49
35	49	1,53	0,74	0,45
36	49	0,96	0,6	0,39
37	53	0,57	0,35	0,31
38	49	1,02	0,58	0,39
39	46	0,44	0,41	0,31
40	50	1,07	1,27	0,36
41	49	2,09	0,8	0,37
42	46	1,32	1,15	0,56
43	40	0,74	1,2	0,65
44	51	1,66	2,33	0,4
45	47,1	0,62	0,79	0,32
46	48,7	1,31	1,15	0,81
47	52,6	1,61	0,74	0,63
48	54,1	2,63	1,66	1,44
49	44,9	1,71	1,48	1,03
50	47,6	0,99	0,91	0,68
51	49	2,31	0,76	0,54
52	47,2	1,81	2,95	0,81
53	44,6	1,64	1,15	1,12
54	44,9	1,16	1,19	0,35
55	37,4	1,98	1,05	1,21
56	47	2,27	1,14	1,04
57	49,6	3,24	1,76	1,72
58	47,7	2,03	1,79	0,78
Média	49,2	1,22	1,17	0,65
Mediana	49,0	1,09	0,86	0,56
Desvio Padrão	5,4	0,69	1,00	0,38
Mínimo	37,4	0,02	0,04	0,03
Máximo	60,0	3,24	5,81	1,72

As figuras 2, 3 e 4 representam *box plots* da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃ FITC analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV.

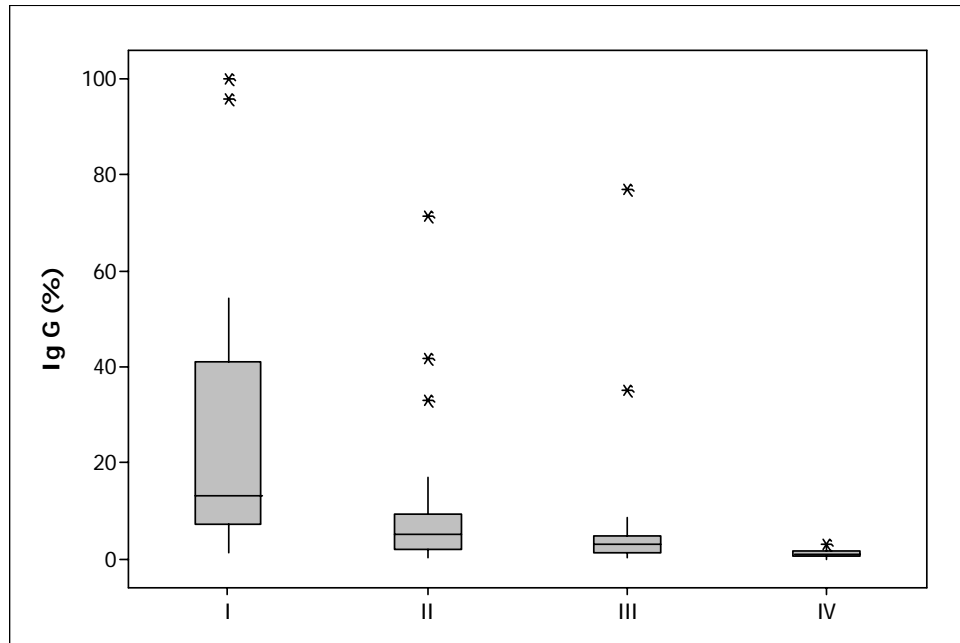


Figura 2 – *Box plot* da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, - 2011

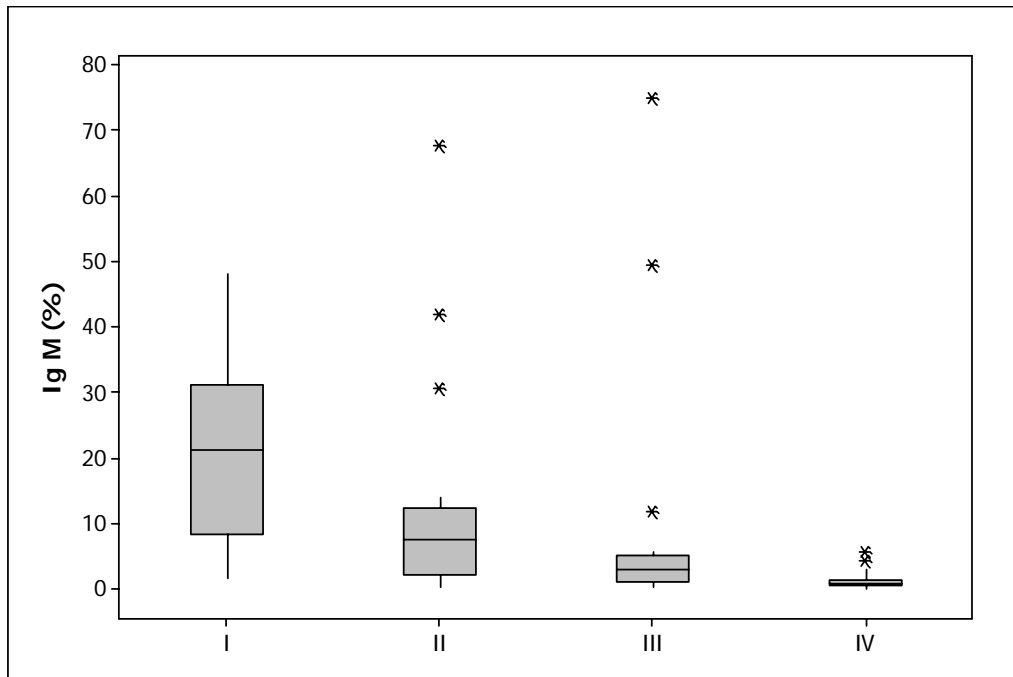


Figura 3 – *Box plot* da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgM FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, - 2011

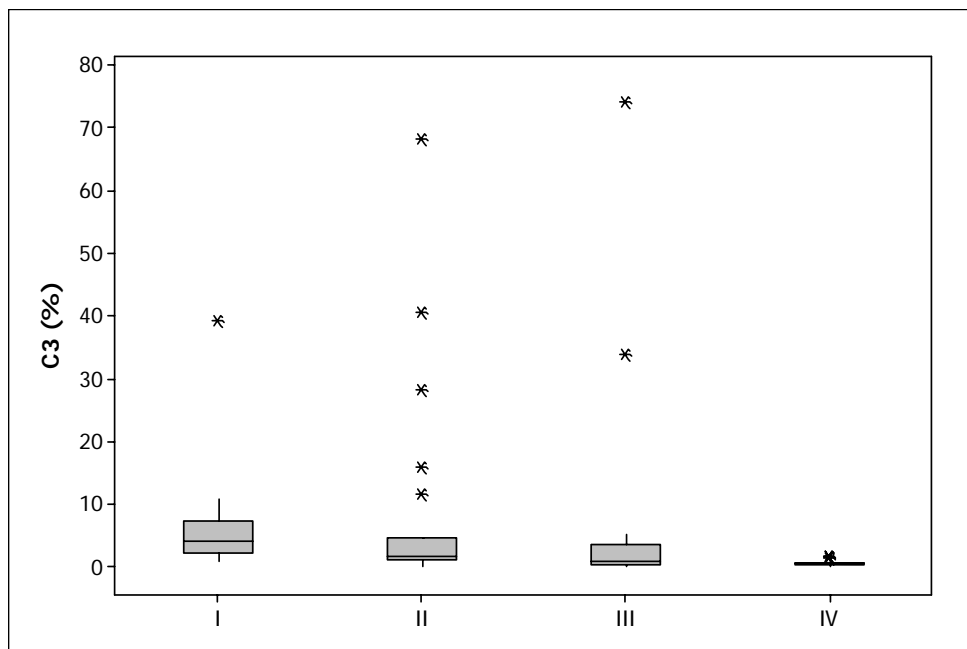


Figura 4 – *Box plot* da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães dos grupos I, II, III e IV. - São Paulo, - 2011

A análise da tabela 11 permite observar que houve diferença na porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC ($p=0,001$) e com anti-IgM FITC ($p< 0,001$) entre os grupos I, II, III e IV.

Tabela 11 – Estatística descritiva da porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC dos cães dos grupos I, II, III e IV e valor de p obtido pela ANOVA. - São Paulo, - 2011

		Grupos				p-valor
		I	II	III	IV	
IgG (%)	n	17	23	20	58	0,001 (BF)
	média	27,57	10,94	8,27	1,22	
	mediana	13,16	5,32	2,95	1,09	
	desvio padrão	30,58	16,68	17,86	0,69	
	mínimo	1,17	0,25	0,27	0,02	
	máximo	99,96	71,35	77,18	3,24	
IgM (%)	n	17	23	20	58	<0,001(BF)
	média	22,14	11,49	9,04	1,17	
	mediana	21,29	7,57	3,06	0,86	
	desvio padrão	15,10	15,70	18,88	1,00	
	mínimo	1,79	0,46	0,41	0,04	
	máximo	48,22	67,67	75,11	5,81	
C ₃ (%)	n	17	23	20	58	0,064 (BF)
	média	6,58	8,44	6,91	0,65	
	mediana	4,14	1,78	0,86	0,56	
	desvio padrão	8,89	16,42	17,48	0,38	
	mínimo	0,84	0,10	0,11	0,03	
	máximo	39,34	68,21	74,21	1,72	

Pelos resultados das comparações múltiplas (Tabela 12) nota-se que houve diferença entre o grupo IV (controle) e o grupo I ($p=0,015$), evidenciando que, em média, a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC do grupo I é maior que os valores do grupo IV.

Tabela 12 - Comparações múltiplas (teste de Dunnett) entre os grupos I, II, III e IV para a marcação de hemácias com anti-IgG FITC. - São Paulo, - 2011

Comparações de Interesse			p-valor
Grupo IV	X	Grupo I	0,015
Grupo IV	X	Grupo II	0,059
Grupo IV	X	Grupo III	0,417
Grupo I	X	Grupo II	0,269
Grupo I	X	Grupo III	0,163
Grupo II	X	Grupo III	0,996

Pelos resultados das comparações múltiplas (Tabela 13) nota-se que houve diferença entre o grupo IV (controle) e os grupos I ($p < 0,001$) e II ($p = 0,027$), evidenciando que, em média, a marcação de hemácias com anti-IgM FITC do grupo controle é menor que os valores dos dois outros grupos.

Tabela 13 - Comparações múltiplas (teste de Dunnett) entre os grupos I, II, III e IV para a marcação de hemácias com anti-IgM FITC. - São Paulo, - 2011

Comparações de Interesse			p-valor
Grupo IV	X	Grupo I	<0,001
Grupo IV	X	Grupo II	0,027
Grupo IV	X	Grupo III	0,360
Grupo I	X	Grupo II	0,196
Grupo I	X	Grupo III	0,136
Grupo II	X	Grupo III	0,998

Como mostra a tabela 14, cinco cães do grupo I (3, 4, 13, 15 e 16) apresentaram resultado positivo ao teste de Coombs poliespecífico e três (3, 4 e 13) ao teste de Coombs monoespecífico para o anticorpo anti-IgG. Nenhum desses cinco cães teve resultados positivos ao teste de Coombs monoespecífico para os anticorpos anti-IgM e anti-C₃.

Tabela 14 – Valores de hematócrito, número de reticulócitos absolutos, porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo, e título obtido no teste de Coombs poliespecífico e monoespecífico para IgG dos cães do grupo I. - São Paulo, - 2011

N°	Eritrograma		Citometria de Fluxo			Teste de Coombs			
	Ht (%)	Ret (/ mm ³)	IgG	IgM	C ₃	Poliespecífico: Reativo de Coombs		Monoespecífico: Anti-IgG	
			%	%	%	4°C	37°C	4°C	37°C
3	8	230.400	38,87	6,95	4,03	512	128	1024	512
4	14	582.400	99,96	26,67	7,95	4096	2048	8192	4096
13	17	444.400	54,25	24,87	6,99	256	64	2048	neg
15	8	138.000	33,94	47,9	3,74	2048	64	neg	neg
16	10	11.690	96,02	47,44	4,14	64	64	neg	neg

Legenda: Ht (hematócrito), Ret (reticulócitos absolutos). Os cinco animais tiveram resultado negativo ao teste de Coombs monoespecífico com os anticorpos anti-IgM e anti-C₃.

A figura 5 mostra o *box plot* da porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC dos cães do grupo I com teste de Coombs direto positivo (n=5) ou negativo (n=12).

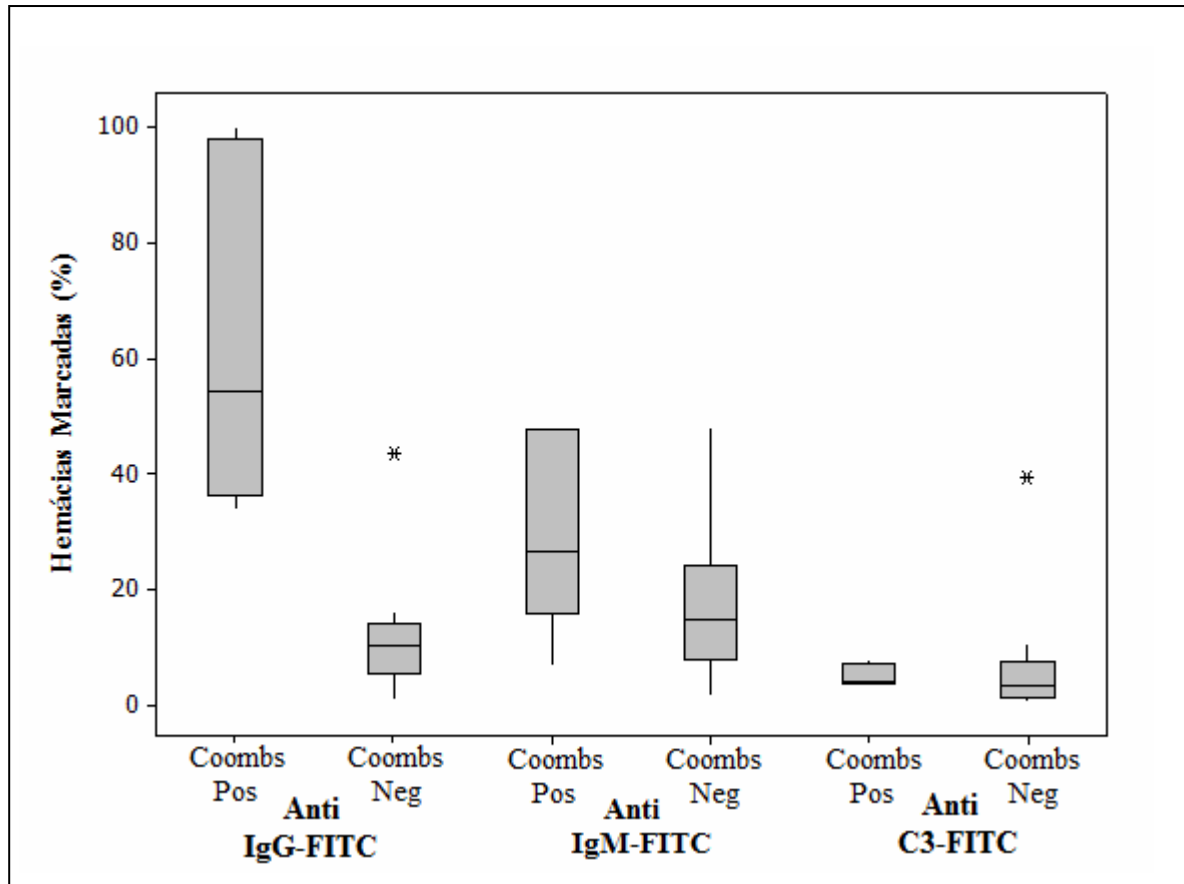


Figura 5 – *Box plot* da porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC dos cães do grupo I com teste de Coombs direto positivo (Coombs Pos) ou negativo (Coombs Neg). - São Paulo, - 2011

Comparando a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC pela citometria de fluxo dos animais que tiveram teste de Coombs positivo (n=5) e teste de Coombs negativo (n=12), houve diferença em relação às hemácias marcadas com anti-IgG FITC (p=0,001) evidenciando que, em média, a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC para o grupo de animais com teste de Coombs negativo é menor que o grupo com teste positivo (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação entre a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC e positividade ou não ao teste de Coombs direto. - São Paulo, - 2011.

		Teste de Coombs		p-valor
		Negativo	Positivo	
Anti-IgG FITC (%)	n	12	5	0,001
	média	12,13	64,61	
	mediana	10,44	54,25	
	desvio padrão	10,86	31,41	
	mínimo	1,17	33,94	
	máximo	43,51	99,96	
Anti-IgM FITC (%)	n	12	5	0,195
	média	18,55	30,77	
	mediana	14,95	26,67	
	desvio padrão	13,25	17,25	
	mínimo	1,79	6,95	
	máximo	48,22	47,90	
Anti-C₃ FITC (%)	n	12	5	0,574
	média	7,08	5,37	
	mediana	3,66	4,14	
	desvio padrão	10,62	1,95	
	mínimo	,84	3,74	
	máximo	39,34	7,95	

4.3 DISCUSSÃO

Não há um sinal único e patognomônico para o diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada, mas alguns critérios podem ser adotados, como: anemia regenerativa; evidência de hemólise caracterizada por hemoglobinemia ou hemoglobinúria; evidência de anticorpos direcionados contra eritrócitos, com autoaglutinação, esferocitose ou teste de Coombs positivo (DUVAL; GIGER, 1996; BALCH; MACKIN, 2007). De acordo com os critérios previamente estabelecidos, a saber: anemia (Ht<32%), presença de esferócitos visualizados no esfregaço sanguíneo corado (maior ou igual a 1+), número de reticulócitos absolutos igual ou maior que 150.000/ μ L ou leucocitose por neutrofilia (leucócitos totais maior ou igual a 20.000/ μ L e neutrófilos segmentados absolutos maior ou igual a 11.800/ μ L); os cães anêmicos foram agrupados em três grupos (I, II e III). O grupo IV foi constituído por animais sem alterações hematológicas marcantes.

Neste estudo, dos 17 cães incluídos no grupo I, cinco (29,42%) apresentaram teste de Coombs positivo para o reativo de Coombs e três (17,65%) para o anticorpo

monoespecífico anti-IgG, representando a sensibilidade limitada do teste. Falso-negativos podem ocorrer em cães previamente tratados com drogas imunossupressoras, após transfusões sanguíneas prévias, em casos de remissão da doença, quando há baixos títulos de anticorpos antieritrocitários aderidos às hemácias, ou quando a técnica é preparada inadequadamente (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). Resultados falso-positivos podem ocorrer em doenças inflamatórias crônicas, problemas técnicos, amostras de baixa qualidade (presença de coágulos, dextrose), pacientes em sepse, hipergamaglobulinemia ou interferência por drogas (ex: amiodarona) (SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

A realização do teste de Coombs sob duas temperaturas teve por finalidade a tentativa de classificar a AHIM de acordo com a ligação dos auto-anticorpos, em frio ou quente. Foi observado neste estudo que as reações realizadas a 4°C forneceram títulos maiores que as reações realizadas a 37°C em quatro, dos cinco animais com teste poliespecífico positivo. Na hemólise à temperatura corpórea há predomínio de auto-anticorpos IgG (BARKER et al., 1992; BARKER, 2000; TIZARD, 2002; DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004), em que a máxima ligação aos eritrócitos ocorre à 37°C. Na hemólise à baixa temperatura, os auto-anticorpos IgM (aglutininas frias) ligam-se às hemácias de 0 a 4° (TIZARD, 2002; DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004). Como todas as amostras foram negativas para anti-IgM, mesmo à baixa temperatura (4°C), conclui-se que não foram observados casos de AHIM classe IV (hemaglutininas frias) e classe V (não-aglutininas de ação a frio), ou que estes anticorpos estavam aderidos em baixa quantidade nas hemácias, gerando resultados negativos. O teste de Coombs a 4°C é indicado para cães com sinais de aglutinação a frio (por exemplo: necrose de extremidades), pois aglutinação inespecífica de hemácias pode ocorrer em cães saudáveis nesta temperatura (SCOTT-MONCRIEFF, 2009).

A porcentagem de hemácias com imunoglobulinas e/ou complemento na superfície determinada por citometria é uma técnica empregada para o diagnóstico da AHIM em humanos (QUIGLEY et al., 2001) e testada para esse fim também em cães e equinos (WILKERSON, et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; MORLEY et al., 2008), tem se mostrado uma técnica mais sensível do que o teste de Coombs para esse diagnóstico, mas a especificidade pode ser considerada mais baixa (WARDROP et al., 2010).

Morley et al. (2008) consideraram marcações de hemácias maiores que 5% como positivas, pois a média mais dois desvios padrões dos resultados obtidos para cães sadios foi 5% para IgG e IgM. Wilkerson et al. (2000) observaram as seguintes porcentagens de hemácias marcadas com anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃, respectivamente para cães sadios (médias \pm 2 desvios padrões): $0,16 \pm 0,2\%$; $0,5 \pm 0,4\%$ e $0,5 \pm 0,4\%$. No presente estudo, a análise dos resultados permite observar que, nos animais não anêmicos (grupo IV), a porcentagem de hemácias marcadas gira em torno de 1%, mas essa porcentagem pode chegar a 3,24% de IgG, 5,81% de IgM e 1,72% de C₃ em alguns animais. Essa marcação pode representar hemácias senescentes, recobertas por anticorpos e futuramente removidas da circulação, fisiologicamente (BRAGA et al., 1998; QUIGLEY et al., 2001).

Em 12 animais com diagnóstico clínico de AHIM, Wilkerson et al. (2000), encontraram as seguintes porcentagens de hemácias marcadas com anti-IgG e anti-IgM, respectivamente (mínima-máxima): 5-88%; 4-38%. Dentre os 17 animais com suspeita clínica de AHIM (grupo I), observou-se as seguintes porcentagens de hemácias marcadas com anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃, respectivamente (mínima-máxima): 1,17-99,96%; 1,79-48,22%; 0,84-39,34%. A análise dos dados do estudo e da literatura indica que a marcação de hemácias em cães com AHIM pode ser variável, havendo a necessidade de investigar possíveis interferentes, como uso prévio de corticóides, transfusão sanguínea recente ou remissão da doença.

Entre os cães incluídos no grupo II, em que apenas um dos critérios de inclusão foi preenchido, também foi observada uma ampla variação de hemácias com IgG (0,25% a 71,35%) e IgM (0,70 a 67,77%) na superfície. No grupo de animais anêmicos em que não houve suspeita clínica de AHIM (grupo III), dois cães apresentaram 35,21% e 77,18% de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC e 49,62% e 75,11% de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgM FITC, respectivamente. Altas marcações de hemácias pela citometria de fluxo em cães dos grupos II e III podem significar a presença de AHIM não regenerativa, AHIM aguda (não houve tempo para regeneração medular) ou falso-positivos (ex: inflamação crônica, sepse).

O mielograma é indicado nos casos suspeitos de AHIM arregenerativas ou pouco regenerativas (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BALCH; MACKIN, 2007). Na septicemia por microorganismos gram negativos ou nas infecções localizadas pode haver ativação da cascata por via alternativa e promover

a ligação de frações peptídicas do complemento às hemácias (GIRELLO; KÜHN, 2002), resultando em falsos positivos ao teste de Coombs e alta marcação de hemácias pela citometria de fluxo.

A análise estatística (ANOVA) demonstrou que houve diferença nas marcações de hemácias com anti-IgG FITC e com anti-IgM FITC entre os grupos. Nas comparações múltiplas, em média, a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG do grupo I é maior que os valores do grupo IV (controle). E, em média, a porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgM do grupo I e II é maior que os valores dos grupo IV, não havendo diferenças entre os grupos I e II e nem I e III, todos constituídos por cães anêmicos.

Foi observado que, em média, a porcentagem de IgG na superfície de hemácias para o grupo de animais com teste de Coombs negativo é menor que o grupo com teste positivo. Ou seja, quando o teste de Coombs foi positivo, a marcação de hemácias com anti-IgG pela citometria de fluxo foi maior. Quigley et al. (2001) sugeriram que há relação entre o número de imunoglobulinas/ complemento ligados as hemácias e a severidade da AHIM, já que três cães de seu experimento apresentavam anemia intensa e alta marcação de hemácias pela citometria de fluxo, mas em pesquisas utilizando ensaios de imunoabsorbância ligados a enzima (enzyme-linked immunosorbent assays) não foi possível estabelecer esta relação, sugerindo maiores pesquisas a respeito.

A maior sensibilidade da citometria de fluxo em relação ao teste de Coombs na detecção de anticorpos anti-eritrocitários pode ser de grande valor para a triagem de cães anêmicos. Morley et al. (2008), em seu estudo com 147 cães anêmicos, observaram que em casos de hipofosfatemia e intoxicação por zinco (destruição das hemácias por alterações na membrana celular), em casos de infecção por parasitas eritrocitários (por exemplo, micoplasmas) ou em casos de anemia aplásica, a marcação de hemácias pela citometria de fluxo foi baixa. Em contraste, anemias imunomediadas estavam associadas à detecção de níveis elevados de anticorpos anti-eritrocitários, fato importante para a decisão do tratamento do animal.

A avaliação adequada dos testes de diagnóstico é importante para a compreensão de como estes testes podem ser aplicados ao ambiente clínico. No passado, o método mais comum para avaliar os testes de diagnóstico era utilizando um padrão-ouro e comparando-se os resultados do novo teste a ele. Esse método pressupunha que o padrão ouro era perfeito e, portanto, não ocorreriam erros de

classificação dos resultados, mas sabe-se que sempre há algum grau de erro em qualquer teste. Portanto, métodos estatísticos alternativos estão disponíveis atualmente, permitindo a caracterização de testes de diagnóstico sem assumir que um teste serve como padrão-ouro. Estes testes são análises de probabilidade, como por exemplo, o método Bayesiano utilizado por Morley et al. (2008), que fornecem teoricamente estimativas não enviesadas da sensibilidade e especificidade do teste e da prevalência da doença nas populações do estudo.

4.4 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que critérios clínicos, resultados positivos ao teste de Coombs e altas marcações de hemácias pela citometria de fluxo, isoladamente, não confirmam o diagnóstico da AHIM, havendo a necessidade de avaliação criteriosa juntamente com as demais alterações clínicas e laboratoriais.

O método de quantificação de hemácias marcadas com imunoglobulinas e complemento por citometria de fluxo deve ser melhor avaliado quanto à sua especificidade, sensibilidade e valores preditivos (positivo e negativo) para a sua aplicação no diagnóstico definitivo da anemia hemolítica imunomediada.

CAPÍTULO II: RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO FRENTE A MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS AUTÓLOGAS DE CÃES RECENTEMENTE IMUNIZADOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Cães hígidos e que não haviam sido vacinados há mais de um ano constituíram o grupo experimental para a avaliação da resposta proliferativa de linfócitos frente à membranas eritrocitárias autólogas. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico detalhado, constituído por anamnese, exame físico e avaliação laboratorial (hemograma completo, contagem de reticulócitos, dosagens séricas de uréia, creatinina, proteína total, albumina, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina) no momento pré-vacinal e 28 a 38 dias após a imunização. Todos os cães receberam uma dose de vacina comercial polivalente (Recombitek® C6/CV, Merial, Brasil) e antirrábica (Rabisin-I, Merial, Brasil), solicitando-se ao proprietário que observasse possíveis reações pós-vacinais. O ensaio da proliferação de linfócitos do sangue periférico sob estimulação por antígenos (concanavalina A e membranas eritrocitárias autólogas) e o teste de Coombs direto foram realizados em todos os cães do grupo (n=21), nos momentos pré e pós-vacinais. A quantificação de imunoglobulinas e componente C₃ do sistema complemento na membrana eritrocitária por citometria de fluxo foi realizada em quinze (15) cães, também nos momentos pré e pós-vacinais.

5.1 ANIMAIS

Foram incluídos no experimento, vinte e um (21) cães domiciliados, hígidos, adultos, de 2 a 12 anos de idade, sendo 3 machos e 18 fêmeas. Da totalidade dos cães, 11 não tinham uma raça definida e os demais foram das raças Daschund, (n=1) Fox Paulistinha (n=1), Poodle (n=1), Shih tzu (n=2), Yorkshire (n=2) e Labrador (n=3). Todos os cães foram provenientes da cidade de São Paulo, eram domiciliados

e foram incluídos no estudo mediante ciência e autorização prévia de seus responsáveis. O projeto de pesquisa foi realizado mediante parecer favorável da Comissão de Bioética da Unidade de Ensino.

5.2 *OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS*

As amostras sangüíneas foram coletadas, por meio de punção da veia jugular, cefálica ou femoral, sendo fracionadas em três alíquotas. Uma alíquota de sangue (3 mL) foi acondicionada em frasco com anticoagulante EDTA – K₂ (Vacutainer[®] Becton Dickinson, USA), para a realização do hemograma, da contagem de reticulócitos, do teste da antiglobulina direta (teste de Coombs direto) e detecção de IgG, IgM e C₃ na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo. A segunda alíquota de sangue (8 mL) também foi acondicionada em frasco com anticoagulante EDTA – K₂ (Vacutainer[®] Becton Dickinson, USA) para a realização dos ensaios de proliferação de linfócitos e obtenção de membranas eritrocitárias autólogas. A terceira alíquota (3 mL) foi acondicionada em tubo com ativador de coágulo (Vacutainer[®] Becton Dickinson, USA), para a obtenção do soro e realização das provas bioquímicas.

5.3 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, assim como as determinações do hematócrito e da concentração de hemoglobina, foram realizadas com o auxílio de contador automatizado (BC-2800 VET , Mindray[®], China). As contagens diferenciais de leucócitos e as avaliações morfológicas dos elementos figurados do sangue foram realizadas em esfregaços sangüíneos preparados a partir de sangue fresco (sem contato com o anticoagulante) e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982). A contagem manual de reticulócitos foi realizada com a incubação por 6 minutos em temperatura ambiente de uma mistura de iguais

quantidades de sangue e do corante azul de cresil brilhante (Laborclin, Brasil). Três esfregaços foram preparados e 1000 hemácias contadas. Os valores foram expressos em reticulócitos contados por μL (reticulócitos absolutos) (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000).

As dosagens de uréia, creatinina, proteína total, albumina, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (Labmax 240, Labtest®, Japão) e kits comerciais (Diasys; Bio Systems S.A. e Roché).

5.4 TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETA (TESTE DE COOMBS DIRETO)

O teste da antiglobulina direta foi modificado a partir da técnica descrita por Quigley et al. (2001), utilizando-se o reagente de Coombs polivalente (anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃ de cão produzidos em cabra - 392-5/ VMRD Inc., USA).

Amostras de sangue de cães sem indicação de anemia (hematócrito > 37%; leucometria entre 6.000 a 15.000 leucócitos/ μL e plaquetometria entre 200.000 – 500.000 plaquetas/ μL), provenientes do HOVET- FMVZ/ USP, foram utilizadas como controle negativo da técnica, no momento pós-vacinal. O reagente comercial *Canine anti-Sheep Red Blood Cells Positive Control for Coombs* (372-2/ VMRD Inc., USA) (Anexo A) foi utilizado como controle positivo, toda vez que eram adquiridos novos lotes do reagente de Coombs.

Inicialmente, foram realizadas diluições seriadas (1:2, 1:4 e 1:8) do reagente comercial polivalente com solução fisiológica, em duas placas de 96 poços com fundo em "u" (3799 - Costar Corning, USA), sendo o volume final de cada poço igual a 50 μL . O último poço continha apenas SF (controle negativo). A cada um dos poços foram adicionados 50 μL da suspensão de hemácias a 2%. Após homogeneização, uma das placas foi incubada a 4°C e a outra a 37°C, por 40 minutos. As reações foram consideradas positivas quando as hemácias permaneceram suspensas em solução. O título final, portanto, seria a última diluição do reagente no qual não fosse observada a formação de botão de eritrócitos no fundo do poço.

5.5 DETECÇÃO DE IGG, IGM E C₃ NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A detecção de imunoglobulinas (IgG, IgM) e complemento (C₃) na superfície de eritrócitos por citometria de fluxo foi realizada conforme descrito por Quigley et al. (2001), com modificações. Foram utilizados anticorpos anti-IgG de cão produzido em ovelha, cadeia pesada (A40-118F-13/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), anti-IgM produzido em cabra (A40-116F-20/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) e anti-C₃ de cão produzido em cabra (A40-109F-14/ Bethyl[®] Laboratories Inc., USA), todos conjugados com fluoresceína de isotiocianato (FITC), previamente titulados.

Cem (100) µL da suspensão de eritrócitos a 2% em salina fisiológica foram incubados, a temperatura ambiente, por 40 minutos, no escuro, com um (1) µL de cada anticorpo, em reações independentes. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de solução fisiológica em cada tubo, sendo a mistura submetida a centrifugação a 150 g por 1 minuto para a remoção de anticorpo excedente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensão em 500 µL de solução fisiológica. Como branco da reação, foi utilizada uma suspensão de hemácias a 2% não marcadas.

As amostras foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company[®] 2007 BD), com aquisição de 50.000 eventos totais, em *software* CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company[®]). Para a análise dos resultados foi utilizado o *software* FlowJo (Tree Star).

5.6 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

O isolamento de células mononucleares de sangue periférico e ensaios de proliferação celular foram realizados com modificações de Corato et al. (1997).

5.6.1 Antígenos

Foram preparadas alíquotas de 10 μ L a partir da diluição de 100 μ g de Concanavalina A (C2010-25mg - Sigma-Aldrich Inc., USA) em 1 mL de RPMI 1640 modificado de Dutch (R7638 - Sigma-Aldrich Inc., USA). Estas alíquotas foram estocadas a -20 °C até o momento do uso.

As membranas eritrocitárias (ME) foram obtidas conforme técnica modificada de Domingues et al. (2007), por lise hipotônica. Aproximadamente dois (2) mL de sangue em EDTA foram centrifugados a 800 *g* por 5 minutos para remoção do plasma e da capa leucocitária. A papa de hemácias obtida foi lavada três vezes com tampão fosfato salino (NaH_2PO_4 1 mM; Na_2HPO_4 4mM; NaCl 147 mM), pH 7,4. O concentrado de hemácias foi então submetido à centrifugação com tampão fosfato hipotônico (NaH_2PO_4 1 mM; Na_2HPO_4 4mM), pH 8,0, a 4°C, por 20 minutos, a 20.200 *g*, por 5 a 8 lavagens, até que o sobrenadante estivesse límpido (Figura 6). Na última lavagem foi utilizado o tampão fosfato salino e o *pellet* foi ressuspenso neste mesmo tampão, em volume final de 500 μ L, e estocado a -20°C até o momento do uso.

A dosagem de proteínas nas preparações de membranas eritrocitárias foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva-padrão a partir de diluições de padrão de proteínas totais comercial a 4,0g/dL (Labtest, Brasil). A concentração protéica das membranas eritrocitárias foi padronizada em 100 μ g /mL, diluindo-se a amostra inicial com RPMI 1640 modificado de Dutch (Sigma-Aldrich Inc., USA).



Figura 6 – Membranas Eritrocitárias: de um lavado de hemácias originalmente vermelho (direita), o *pellet* obtido tornou-se esbranquiçado e o sobrenadante límpido e incolor (esquerda), indicando a ausência de hemoglobina nas membranas eritrocitárias obtidas. - São Paulo, - 2011

5.6.2 Ensaio de Proliferação de Linfócitos

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico, o sangue total preservado em EDTA foi diluído em igual volume de RPMI 1640 modificado de Dutch (Sigma-Aldrich Inc., USA) e posteriormente acrescido em frasco com Ficoll-Paque Plus (17-1440-02 - GE Healthcare, USA), na mesma quantidade inicial de sangue total. A mistura foi centrifugada a 650 *g* durante 40 minutos em temperatura de 20°C.

O anel esbranquiçado de células mononucleares foi transferido para um novo tubo cônico, acrescido de 15 mL de RPMI 1640 modificado de Dutch (Sigma-Aldrich Inc., USA) e submetido à nova centrifugação a 290 *g* por 10 minutos a 20° C. Após desprezar o sobrenadante, as hemácias contaminantes no *pellet* de células mononucleadas foram lisadas, acrescentando-se 5 mL de uma solução de NaCl a 0,2% (solução hipotônica) e, após 20 segundos, mais 5 mL de uma solução de NaCl a 1,6% (solução hipertônica). A mistura foi submetida à nova centrifugação (10 minutos a 290 *g* a 20°C) e o sedimento ressuspenso em 1 mL de RPMI.

As células mononucleares obtidas foram diluídas com azul de tripan a 0,4% (Sigma-Aldrich Inc., USA) e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular obtida foi de 90 a 95%.

As células foram então incubadas com 1 μ L de CFSE a 5mM (21888-25mg-F - CFSE PM=557,47 - Sigma-Aldrich Inc., USA) por 20 minutos a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (10 minutos, 290 g, 20°C) e ressuspensas em 1mL de meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (F4135-100mL - Sigma-Aldrich Inc., USA) e 10 mL/L de RPMI de uma solução de 200 mM de L-glutamina, 10.00 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL estreptomicina (G6784-5mL - Sigma-Aldrich Inc., USA).

As células foram novamente diluídas com azul de tripan (Sigma-Aldrich Inc., USA) e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis foram padronizadas na concentração de 1,25 x 10⁶ células/ mL e posteriormente cultivadas em placa de fundo em “u” de 96 poços, em RPMI 1640 modificado de Dutch (Sigma-Aldrich Inc., USA) suplementado como acima.

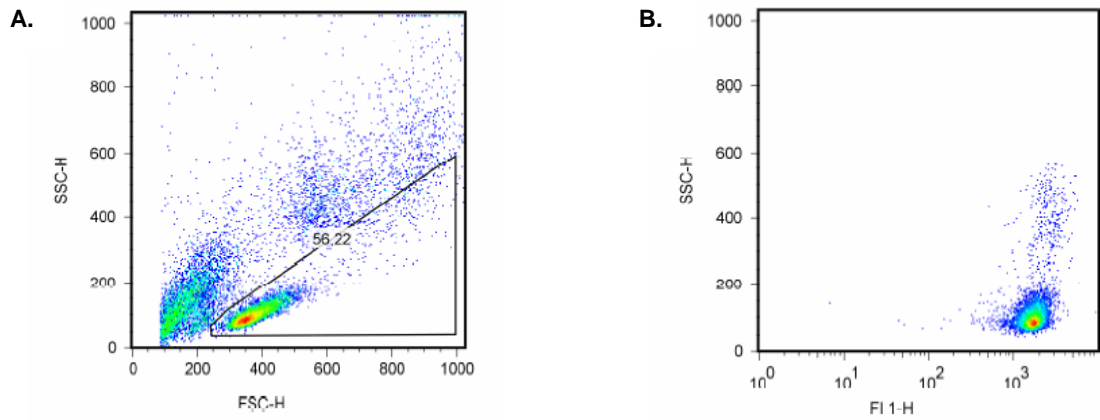
Cada poço de cultivo teve volume final de 100 μ L, sendo cada amostra dividida em: amostra não-marcada (células não incubadas com CFSE), amostra basal (células marcadas com CFSE, sem nenhum tipo de estímulo antigênico), amostra estimulada com Con A (células marcadas com CFSE e estimuladas com 1 μ L de Con A a 100 μ g/ mL), amostra estimulada com ME1 (células marcadas com CFSE e estimuladas com 1 μ L da suspensão padronizada de membranas eritrocitárias a 100 μ g/ mL) e amostra estimulada com ME2 (células marcadas com CFSE e estimuladas com 2 μ L da suspensão padronizada de membranas eritrocitárias a 100 μ g/ mL).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. As células estimuladas com Con A foram avaliadas após 5, 6 ou 7 dias de cultivo e as células estimuladas com membranas eritrocitárias autólogas foram avaliadas após 10 dias de cultivo.

As amostras foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company[®] 2007 BD), com aquisição de 10.000 eventos do *gate*, em *software* CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company[®]). Para a análise dos resultados foi utilizado o *software* FlowJo (Tree Star).

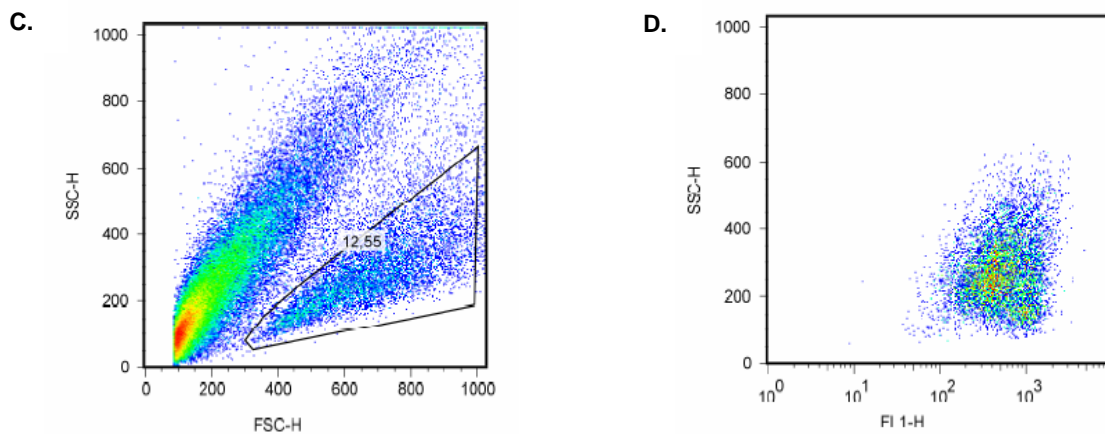
A partir de um *gate* estabelecido na população de interesse (linfócitos) em gráfico de pontos FSC X SSC (Forward Scatter, tamanho *versus* Side Scatter, granulidade ou complexidade interna), em escala linear, foi criado um gráfico de pontos de FL1 (canal para leitura da cor verde) X SSC (complexidade interna ou granulidade), em escala logarítmica e linear, respectivamente, visualizando-se a perda de fluorescência nas amostras proliferadas em relação à amostra basal (não-estimulada) (Figura 7).

Foi utilizado o Índice de Proliferação (IP), obtido pela divisão da intensidade de fluorescência da amostra basal pela intensidade da fluorescência da amostra estimulada, como indicador da proliferação celular. Índice igual ou menor que 1 indica ausência de proliferação e índice maior que 1, proliferação celular. Quanto maior o índice, maior a proliferação celular (TOMIYOSHI et al., 2009).



Amostra Basal (não estimulada)

- A. Determinação do *gate* na população de interesse (linfócitos)
- B. Alta fluorescência em gráfico FL1 X SSC



Amostra Estimulada (Concanavalina A)

- C. Determinação do *gate* na população de interesse (linfócitos)
- D. Queda da fluorescência em gráfico FL1 X SSC

Figura 7 – Gráficos de pontos FSC X SSC, ambos em escala linear (A e C) e FL1 X SSC, em escala logarítmica e escala linear, respectivamente, (B e D) de um ensaio de proliferação de linfócitos. - São Paulo, - 2011

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise descritiva das variáveis quantitativas foram utilizadas como medidas resumos a média e a mediana e para apontar a variabilidade dos dados foram apresentados desvio-padrão, mínimo e máximo.

As comparações das variáveis “marcação de hemácias pela citometria de fluxo” e “índice de proliferação dos linfócitos” entre os grupos pré e pós-vacinais foram realizadas através do t-Student para amostras pareadas (MAGALHÃES; LIMA, 2000).

As comparações dos índices de proliferação de linfócitos estimulados com os diferentes antígenos (Con A, ME1 e ME2) entre si, tanto no momento pré como no momento pós-vacinação, foram realizadas através da Análise de Variância (ANOVA) com Medidas Repetidas. Quando esta forma específica não foi encontrada, os testes foram corrigidos baseados na correção de Greenhouse-Geisser. Quando houve diferença significativa entre os índices, foram realizadas comparações múltiplas (dois a dois), utilizando-se o teste de Bonferroni (NETER et al., 1996).

Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

Observou-se que, em média 33 dias após a aplicação das vacinas polivalente e antirrábica, os cães se encontravam em boas condições de saúde, com as variáveis hematológicas e bioquímicas sendo mantidas próximas às encontradas no momento pré-vacinal (Anexos B e C). O teste de Coombs foi negativo para os 21 animais, em ambos os momentos do estudo.

Apenas uma pequena proporção de hemácias apresentavam IgG, IgM e C₃ em sua superfície, quando marcadas com anticorpos específicos conjugados com isocianato de fluoresceína (FITC) e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de hemácias marcadas com IgG, IgM e C₃ no momento imediatamente anterior à aplicação das vacinas foi de 1,06±0,49; 1,42±1,59 e 0,71±0,33% (média ± desvio padrão), respectivamente. Essa proporção não foi alterada após a vacinação para as marcações com anti-IgG e anti-IgM, 0,83±0,56% (p=0,261) e 1,35±1,71% (p=0,699), respectivamente. A porcentagem de hemácias com C₃ na superfície no momento pós-vacinação (0,40±0,38%) foi, em média, menor que no momento pré-vacinação (p=0,019) (Tabela 16 e Figura 8).

Tabela 16 - Porcentagem de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e após a vacinação (n=15). - São Paulo, - 2011

N°	Anti-IgG FITC (%)		Anti-IgM FITC (%)		Anti-C ₃ FITC (%)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
7	0,69	1,57	0,84	1,28	1,07	1,7
8	0,25	0,42	0,32	0,57	0,44	0,31
9	0,78	2,3	1,39	3,1	1,59	0,23
10	1,2	0,68	1,39	1,06	1,01	0,28
11	1,11	1,04	1,89	1,49	0,74	0,4
12	1,02	1,16	4,47	3,13	0,55	0,44
13	2,23	0,62	0,83	0,52	0,79	0,18
14	1,3	0,71	0,87	0,43	0,56	0,42
15	1,34	1,01	0,47	0,28	0,79	0,28
16	0,99	0,44	0,68	0,34	0,51	0,33
17	1,03	0,33	0,35	0,22	0,22	0,19
18	0,45	0,59	0,54	1,08	0,38	0,58
19	1,63	1,12	5,81	6,43	0,72	0,34
20	0,64	0,2	0,74	0,11	0,71	0,13
21	1,23	0,31	0,71	0,18	0,56	0,22
Média	1,06	0,83	1,42	1,35	0,71	0,40
Mediana	1,03	0,68	0,83	0,57	0,71	0,31
Desvio padrão	0,49	0,56	1,59	1,71	0,33	0,38
Mínimo	0,25	0,20	0,32	0,11	0,22	0,13
Máximo	2,23	2,30	5,81	6,43	1,59	1,70
P	0,261		0,699		0,019	

Legenda: Pré (momento pré-vacinal), Pós (momento pós-vacinal).

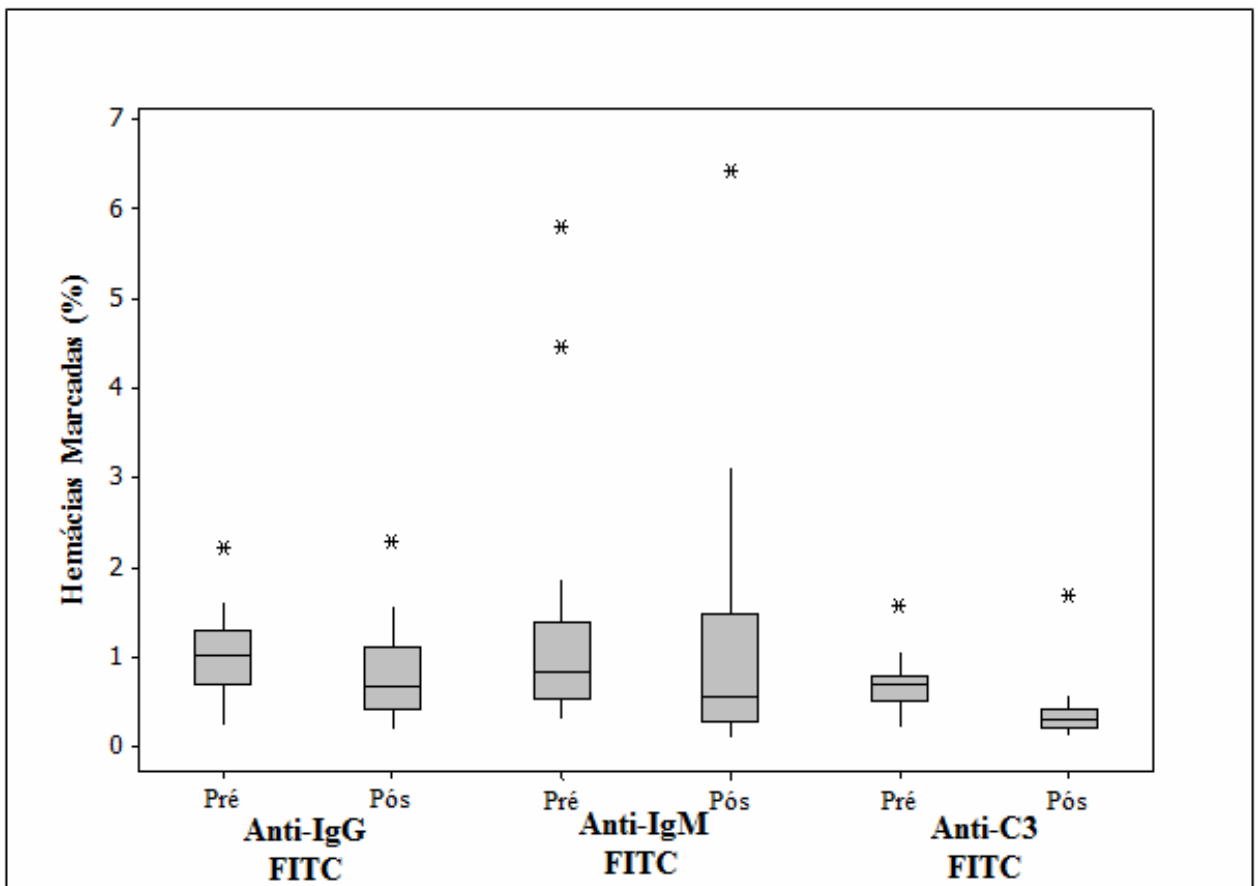


Figura 8 – *Box plot* do percentual de hemácias marcadas com anticorpos anti-IgG FITC, anti-IgM FITC e anti-C₃ FITC, analisadas por citometria de fluxo dos cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e após a vacinação (n=15). - São Paulo, - 2011

A concanavalina A foi um estímulo eficaz para a proliferação de linfócitos, sendo o índice de proliferação (IP) $2,15 \pm 0,83$; nas amostras coletadas antes da vacinação. As membranas eritrocitárias autólogas, nas concentrações testadas (ME1 e ME2), não estimularam a proliferação de linfócitos, sendo os índices de proliferação, neste momento; $1,03 \pm 0,07$ e $1,05 \pm 0,11$; respectivamente. O mesmo foi observado no momento pós-vacinal, sendo os índices de proliferação $2,13 \pm 0,58$ para ConA e $1,02 \pm 0,05$ para ME1 e ME2 (Tabela 17 e Figura 9)

Os índices de proliferação promovidos pela ConA, ME1 e ME2 nos momentos pré e pós vacinais não se modificaram, com $p=0,935$; $p=0,845$ e $p=0,222$, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 - Índice de proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A e suspensão de membranas eritrocitárias (ME1 e ME2) em cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica, antes e 33 dias após a vacinação (n=21). - São Paulo, - 2011

N°	Concanavalina A		ME1		ME2	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	0,97	2,42	1,02	1,08	1,05	0,92
2	0,90	2,58	1,07	1,03	1,00	1,03
3	1,46	2,56	0,96	1,06	1,00	1,04
4	2,71	2,89	1,14	0,94	1,09	1,00
5	2,63	2,40	1,08	1,08	1,29	1,01
6	3,00	2,89	1,01	1,09	1,36	1,03
7	2,38	2,22	0,98	0,95	1,03	0,97
8	2,55	2,16	0,99	0,99	0,98	0,99
9	1,25	1,33	0,92	1,08	0,86	1,11
10	2,39	1,68	0,95	0,98	1,06	0,98
11	1,51	1,53	0,99	0,99	1,00	1,01
12	1,46	1,81	0,99	1,02	1,00	1,02
13	1,43	1,43	1,09	0,99	1,04	0,94
14	1,48	1,72	1,16	1,01	1,15	1,01
15	3,04	1,50	1,17	1,00	1,18	1,00
16	3,51	2,98	1,00	1,04	0,99	1,07
17	2,19	2,94	1,02	0,98	1,01	0,98
18	1,64	1,49	1,02	1,18	1,03	1,15
19	2,22	1,46	0,99	0,99	0,95	1,03
20	2,47	2,73	1,01	1,01	1,01	1,01
21	3,97	2,11	1,03	1,01	1,02	1,01
Média	2,15	2,13	1,03	1,02	1,05	1,02
Mediana	2,22	2,16	1,01	1,01	1,02	1,01
Desvio padrão	0,83	0,58	0,07	0,05	0,11	0,05
Mínimo	0,90	1,33	0,92	0,94	0,86	0,92
Máximo	3,97	2,98	1,17	1,18	1,36	1,15
P	0,935		0,845		0,222	

Legenda: Pré (momento pré-vacinal), Pós (momento pós-vacinal), ME1 (1 µL da suspensão padronizada de membranas eritrocitárias a 100 µg/ mL), ME2 (2 µL da suspensão padronizada de membranas eritrocitárias a 100 µg/ mL).

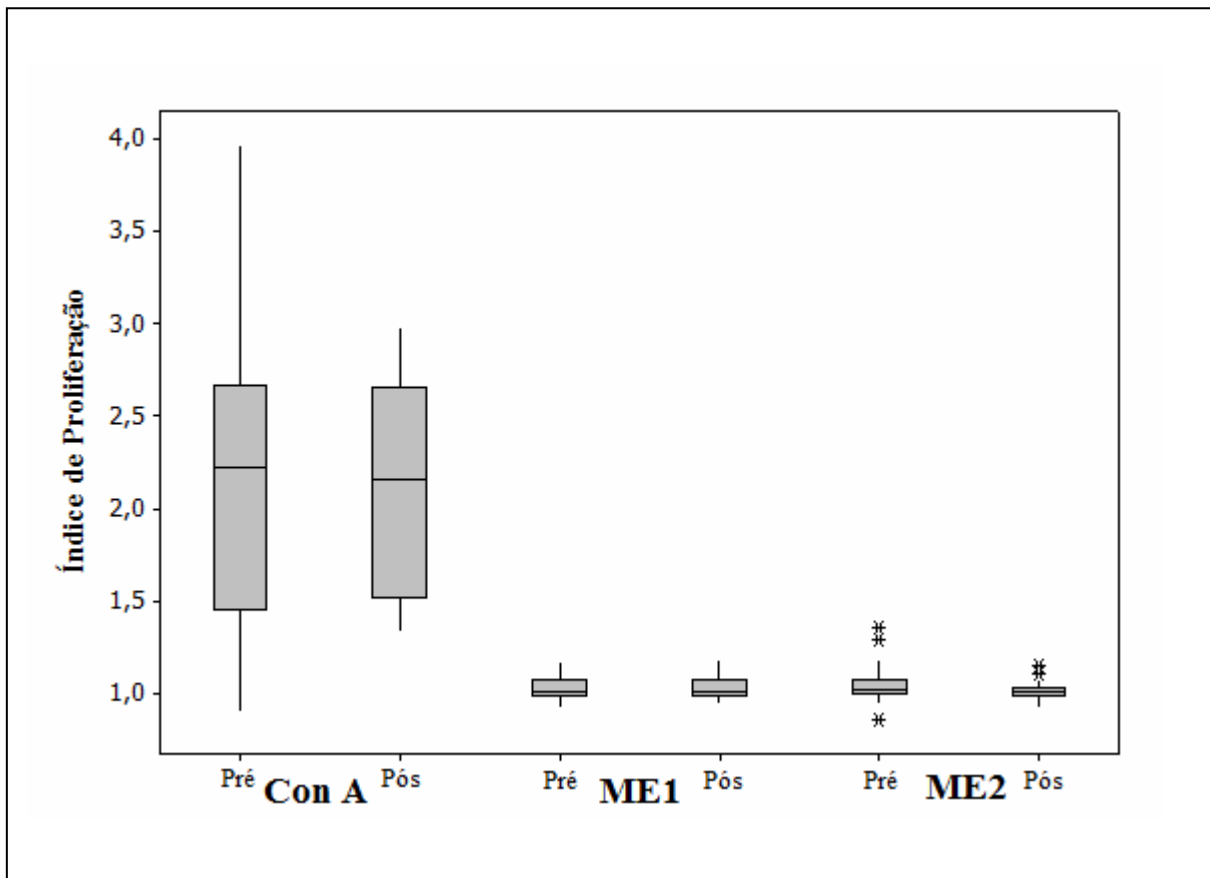


Figura 9 – *Box plot* dos índices de proliferação de linfócitos nos momentos pré e pós-vacinais (n=21). - São Paulo, - 2011

Quando se comparou o IP de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal, a diferença foi nitidamente ressaltada, com $p < 0,001$ (Tabela 18). Pelos resultados das comparações múltiplas para o momento pré-vacinal (Tabela 19), pode-se observar que houve diferença na estimulação com ConA em relação aos demais índices, evidenciando que no momento pré-vacinação os valores de ConA foram, em média, maiores que os demais índices.

Tabela 18 – Comparações entre o índice de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal. - São Paulo, - 2011

	<i>ConA</i>	<i>ME1</i>	<i>ME2</i>
n	21	21	21
média	2,15	1,03	1,05
mediana	2,22	1,01	1,02
desvio padrão	0,83	0,07	0,11
mínimo	0,90	0,92	0,86
máximo	3,97	1,17	1,36

p-valor < 0,001

Tabela 19 - Comparações múltiplas (teste de Bonferroni) para os índices de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pré-vacinal. - São Paulo, - 2011.

Comparações Múltiplas				p-valor
ConA	X	ME1		<0,001
ConA	X	ME2		<0,001
ME1	X	ME2		0,815

Quando se comparou o IP de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pós-vacinal, a diferença também foi nitidamente ressaltada, com $p < 0,001$ (Tabela 20). Pelos resultados das comparações múltiplas para o momento pós-vacinal (Tabela 21), pode-se observar que houve diferença de ConA em relação aos demais índices, evidenciando que no momento pós-vacinação os valores de ConA foram, em média, maiores que os demais índices.

Tabela 20 – Comparações entre o índice de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pós-vacinal. - São Paulo, - 2011.

	ConA	ME1	ME2
n	21	21	21
média	2,13	1,02	1,02
mediana	2,16	1,01	1,01
desvio-padrão	0,58	0,05	0,05
mínimo	1,33	0,94	0,92
máximo	2,98	1,18	1,15

p-valor < 0,001

Tabela 21 - Comparações múltiplas (teste de Bonferroni) para os índices de proliferação de linfócitos frente aos antígenos ConA, ME1 e ME2 no momento pós-vacinal. - São Paulo, - 2011.

Comparações Múltiplas			p-valor
ConA	X	ME1	<0,001
ConA	X	ME2	<0,001
ME1	X	ME2	>0,999

7 DISCUSSÃO

Após a publicação do trabalho de Duval e Giger (1996), relatando a possível associação temporal entre a vacinação e o desenvolvimento da anemia hemolítica imunomediada, vários autores procuraram realmente comprovar a possibilidade de que as vacinas se constituíssem em um dos fatores desencadeantes da AHIM (KLAG; GIGER; SHOFRER, 1993; CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; SCOTT-MONCRIEFF et al., 2002).

Aparentemente ainda não se comprovou que a vacinação poderia resultar na indução de AHIM, com deposição de IgG ou IgM na superfície das hemácias, ou ainda, com o desenvolvimento de linfócitos capazes de reagir contra os antígenos da superfície eritrocitária, faltando, de acordo com Scott-Moncrieff et al. (2002), evidências diretas da relação causal entre vacinação e anemia hemolítica imunomediada.

A vacinação pode levar anticorpos a ligarem-se à superfície eritrocitária por diversos mecanismos, sendo os principais: mimetismo molecular, adesão de epítopos exógenos à superfície eritrocitária (o ataque não foi direcionado especificamente à sua membrana celular) ou exposição de determinantes ocultos. Além disso, imunoglobulinas ou imunocomplexos podem se adsorver não especificamente (ligação não pelo componente Fab) à membrana eritrocitária, não necessariamente levando à destruição celular (DAY; MACKIN, 2008).

Não se sabe se os componentes da vacina induzem a produção de auto-anticorpos nos cães ou se os macrófagos ou o sistema imune são ativados pela vacinação e destroem células vermelhas com anticorpos pré-existentes em sua superfície (DUVAL; GIGER, 1996).

As vacinas polivalentes utilizadas rotineiramente são constituídas por vírus vivos atenuados (cinomose, adenovirose tipo 2, parainfluenza, parvovirose e coronavirose *Morbillivirus*, parvovírus canino e adenovírus tipo 2) e outros antígenos oriundos de organismos inativados (4 sorovares de leptospiros). A vacina contra o vírus da cinomose também pode ser produzida com vetores recombinantes contendo os genes que codificam as glicoproteínas HA (hemaglutinina) e F (fusão) do vírus. As vacinas antirábicas são produzidas com vírus da raiva, cultivado em células, inativado e adicionadas de adjuvantes.

Vírus vivo modificado, vírus morto e bacterinas mortas, assim como os adjuvantes usados nas vacinas, podem estimular ou interromper as funções do sistema imune ou iniciar o aumento de produção de anticorpos conduzindo à AHIM (DUVAL; GIGER, 1996; GREENE; SCHULTZ, 2006).

No presente estudo, a realização dos ensaios de proliferação de linfócitos frente a membranas eritrocitárias autólogas e de quantificação de imunoglobulinas e C₃ na superfície eritrocitária foi feita imediatamente antes da vacinação e em média 33 dias após a imunização, pois em estudos retrospectivos que tentam relacionar o aparecimento da AHIM e a vacinação, de 58 cães acompanhados, 15 haviam sido vacinados no período de um mês (média de 13 dias; mediana de 14 dias; ocorrência 1 a 27 dias) anteriormente ao desenvolvimento da doença e treze (13) cães haviam sido vacinados de 13 a 55 meses antes (DUVAL; GIGER, 1996). Klag, Giger e Shofer (1993), em seu estudo com 42 cães com AHIM, observaram que um deles havia sido vacinado há duas semanas antes do diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada com uma vacina de vírus-vivo modificado de cinomose-parainfluenza-leptospirose-adenovírus-parvovírus, assim eles não excluíram a possibilidade da doença ter sido induzida pela vacina. Por outro lado, Carr, Panciera e Kidd (2002) não observaram associação entre a AHIM e a vacinação em seu estudo com 72 cães diagnosticados.

A porcentagem de hemácias com imunoglobulinas e/ou complemento na superfície determinada por citometria é uma técnica empregada para o diagnóstico da AHIM em humanos (QUIGLEY et al., 2001) e testada para esse fim também em cães e equinos (WILKERSON, et al., 2000; QUIGLEY et al., 2001; MORLEY et al., 2008). A presença de imunoglobulinas (IgG e IgM) e complemento (C₃) na superfície das hemácias de cães sadios é realizada para a determinação do ponto de positividade do teste. Morley et al. (2008) consideraram marcações maiores que 5% como positivas, pois a média mais dois desvios padrões dos resultados obtidos para cães sadios foi 5% para IgG e IgM. Wilkerson et al. (2000) observaram as seguintes porcentagens de hemácias marcadas com anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃, respectivamente para cães sadios (médias \pm 2 desvios padrões): $0,16 \pm 0,2\%$; $0,5 \pm 0,4\%$ e $0,5 \pm 0,4\%$. Para equinos sadios observaram as seguintes porcentagens de hemácias marcadas com anti-IgG e anti-IgM (médias \pm 2 desvios padrões): $0,4 \pm 0,4\%$ e $0,4 \pm 0,5\%$. No presente estudo, no momento pré-vacinal, os animais haviam sido vacinados há 12 meses ou mais e a porcentagem de hemácias

marcadas com anti-IgG, anti-IgM e anti-C₃ foi, respectivamente (médias \pm desvio padrão): 1,06 \pm 0,49%; 1,42 \pm 1,59% e 0,71 \pm 0,33%. Sendo valores, portanto, em torno de 1%, sem significado clínico.

Não houve diferença entre a marcação de hemácias com anti-IgG ou anti-IgM antes e após a vacinação, não havendo indícios, portanto, de que estes mecanismos tenham ocorrido nos 15 cães testados. Mas os valores de anti-C₃ no momento pós-vacinação (marcações de 0,13 a 1,70%) foram, em média, menores que no momento pré-vacinação (marcações de 0,22 a 1,59%). Isso pode ser explicado pelo fato que, na temperatura ambiente, condição em que os testes foram realizados, pode haver ligação antígeno-anticorpo por anticorpos frios sem significado clínico, que fixam complemento, não significando que essa ligação ocorra *in vivo* (GIRELLO; KÜHN, 2002) ou essa variação pode representar apenas variações individuais e fisiológicas nos diferentes momentos testados.

Segundo Snyder (2007) um dos critérios para a comprovação da autoimunidade é o isolamento de linfócitos T auto-reagentes. Para testar a hipótese de que a vacinação pode induzir uma anemia hemolítica imunomediada, a resposta mitogênica de linfócitos frente a antígenos da membrana eritrocitária autóloga de 21 cães foi avaliada. A análise do índice de proliferação de linfócitos pode ser a técnica *in vitro* para a demonstração da sensibilização anormal do sistema imune contra hemácias autólogas, ou seja, a proliferação de linfócitos frente a membranas eritrocitárias autólogas poderia representar a presença de linfócitos auto-reagentes, como foi demonstrado por Corato et al. (1997).

Houve proliferação de linfócitos nos dois momentos do estudo quando o estímulo foi a Concanavalina A, demonstrando que esse antígeno age como mitógeno inespecífico de linfócitos (McCOLE et al., 1998) e que os linfócitos, após isolamento, eram viáveis e responsivos a estímulos.

As membranas eritrocitárias autólogas, nas duas concentrações testadas, não estimularam a proliferação de linfócitos, antes ou após o estímulo vacinal, não houve indícios, portanto, da presença de linfócitos auto-reagentes contra a membrana eritrocitária após a vacinação.

Corato et al. (1997) observaram que de 11 cães saudáveis, dois tiveram discreta proliferação de linfócitos estimulados por membranas eritrocitárias autólogas. De quatro (4) cães recuperados da AHIM, todos responderam a esse estímulo, concluindo que, embora cães hígidos abriguem linfócitos auto-reagentes à

membrana eritrocitária, em cães geneticamente suscetíveis à doença, estas células reagem prontamente. Portanto, como alguns cães são suscetíveis ao desenvolvimento da AHIM, o uso de vacinas não se encontra fora de riscos.

Na anemia hemolítica imunomediada, os auto-anticorpos formados direcionam-se principalmente contra as glicoforinas, a espectrina e, menos frequentemente, a banda 3 (BARKER; ELSON, 1993; DAY, 1999; TIZARD, 2002). As membranas eritrocitárias produzidas através de lise hipotônica (DOMINGUES et al., 2007) preservam a arquitetura da membrana da hemácia, sendo, portanto, a resposta proliferativa de linfócitos gerada por qualquer um dos componentes.

Em estudos de anemia hemolítica autoimune (AHA) de humanos, foram produzidos peptídeos sintéticos que correspondem à sequência do grupo Rh que mais frequentemente inicia a formação de auto-anticorpos e testou-se, *in vitro*, sua capacidade de estimular linfócitos T normais. A resposta celular foi de linfócitos T CD45RA+ (*naive*), indicando que as células não estavam ativadas anteriormente *in vivo*. Estudos posteriores tentaram avaliar se pacientes com AHA respondem a antígenos do grupo Rh. Peptídeos sintéticos correspondentes à sequência de proteínas do grupo Rh associadas à expressão dos antígenos D e Cc/Ee, estimularam a proliferação de células mononucleares do sangue periférico e células do baço de pacientes com anemia hemolítica autoimune com auto-anticorpos contra o Rh, enquanto que as células de quase todos os pacientes com outros tipos de anemias ou de doadores saudáveis não responderam. A resposta pode ser bloqueada com anticorpos do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) classe II. Portanto a produção de autoanticorpos parece ser causada pela ativação do MHC classe II restrito a linfócitos T helper auto-reativos à epítomos ocultos do Rh, que escaparam da deleção clonal e anergia durante a indução da autotolerância e permanecem quiescentes (FAGIOLO, 2004).

Corato et al. (1997) testaram a capacidade mitogênica de linfócitos frente estímulos das glicoforinas e espectrinas. Os linfócitos de um dos quatro cães recuperados de AHIM proliferaram quando estimulados com glicoforinas e um dos quatro com espectrina. Do grupo de animais suscetíveis (parentes de cães que tiveram AHIM diagnosticada, n=6), três proliferaram à glicoforinas e um (1) à espectrinas. De 11 cães saudáveis, dois tiveram discreta proliferação de linfócitos estimulados por membranas eritrocitárias autólogas e nenhuma proliferação com demais antígenos eritrocitários.

A proliferação de linfócitos estimulados com ConA por Corato et al. (1997) foi máxima com 2 dias de cultivo e as melhores respostas mitogênicas frente à membranas eritrocitárias, glicoforinas e espectrina foram entre 7 e 10 dias, sendo a proliferação avaliada através da incorporação de ^3H -timidina ao DNA celular e o índice de proliferação calculado pela relação entre a fluorescência de amostra estimulada e não estimulada. Nas condições do presente estudo, utilizando CFSE como marcador de proliferação celular e citometria de fluxo, a resposta proliferativa de linfócitos à concanavalina A foi melhor entre o 5° e 7° dias de cultivo. Para a leitura de resposta proliferativa frente às membranas eritrocitárias foi escolhido o 10° dia de cultivo, período em que as células foram consideradas viáveis.

Além dos mecanismos já descritos que possivelmente levam à autoimunidade (exposição de determinantes antigênicos ocultos, ativação de linfócitos T e/ou B policlonais, mimetismo molecular e falhas na tolerância imunológica central ou periférica), alterações imunorregulatórias também estão envolvidas com a AHIM. Citocinas Th1/ Th2 ou desequilíbrio IL10/ IL12 podem induzir AIHA: em camundongos NZB e em humanos com AHAI, há um aumento da produção de citocinas Th2, como IL4 e IL10, e redução de INF γ e IL12. Particularmente, a IL10 parece atuar como mediador crítico para a produção de autoanticorpos eritrocitários (FAGIOLLO, 2004), sendo necessários mais estudos desequilíbrios Th1/ Th2 em animais afetados.

Nenhum dos 21 cães do estudo apresentava parentesco com animais acometidos pela doença, portanto, talvez não fossem predispostos à AHIM. Os linfócitos não proliferaram nem antes e nem depois da vacinação quando estimulados com membranas eritrocitárias autólogas, assim como não houve alteração na porcentagem de hemácias marcadas com anti-IgG, anti-IgM e anti-C $_3$ pela citometria de fluxo. Novos estudos devem ser realizados na tentativa de encontrar evidências diretas da relação causal entre vacinação e AHIM.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o diagnóstico de doenças autoimunes relacionadas à vacinação, deve seguir os seguintes critérios: consistência (demonstrado em diferentes grupos de pacientes, independente do método de investigação e investigadores), especificidade (sintomas devem ser distintos e específicos, excluindo manifestação espontânea ou outro estímulo externo), relação temporal, resultados consistentes (diferentes populações, diferentes investigadores, métodos diferentes), comparações entre o efeito adverso

em populações vacinadas e não vacinadas (RUBINSTEIN, 2004). Nenhum desses critérios foi observado após a aplicação da vacina nos animais deste experimento.

8 CONCLUSÃO

A baixa porcentagem de hemácias com IgG, IgM ou C₃ na superfície eritrocitária e a ausência de resposta proliferativa dos linfócitos quando estimulados com membrana eritrocitária antes e após a vacinação, indicam que, neste experimento, não houve nenhuma evidência de que o estímulo vacinal pudesse estar relacionado ao desenvolvimento da AHIM em cães.

REFERÊNCIAS

BALCH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 29, n. 4, p. 217-225, 2007.

BARKER, R. N. Anemia associated with immune responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 169-177.

BARKER, R. N.; ELSON, C. J. Red cell-reactive non-specific immunoglobulins and autoantibodies in the sera of normal and anaemic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 39, p. 339-354, 1993.

BARKER, R. N.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; STOKES, C. R.; ELSON, C. J. Autoimmune haemolysis in the dog: relationship between anaemia and the levels of red blood cell bound immunoglobulins and complement measured by an enzyme-linked antiglobulin test. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, n. 1-2, p. 1-20, 1992.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, São Paulo, 50 p.

BORDIN; J. O.; SOUZA-PINTO, J. C.; KERBAUY, J. Measurement of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 9, p. 895-899, 1991.

BRAGA, G. W.; BORDIN, J. O.; MOREIRA JR., G.; KURODA, A. Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene®. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n.1, p.16-20, 1998.

BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K.; FRANCHINI, M. L. Anemia hemolítica imunomediada em cão: diagnóstico e tratamento. **Clínica Veterinária**, v. 8, n. 44, p. 46-54, 2003.

BRANDÃO, L. P.; IKESAKI, J. Y.; MIYASHIRO, S. I.; FRANCHINI, M. L.; HAGIWARA, M. K. Anemia hemolítica imunomediada não regenerativa em um cão. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 34, n. 2, p. 557-561, 2004.

CALICH, V. L. G. Imunoglobulinas: estrutura e função. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2001. p. 55-84.

CARR, A. P.; PANCIERA, D. L.; KIDD, L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n. 5, p. 204-509, 2002.

CORATO, A.; SHEN, C. R.; MAZZA, G.; BARKER, R. N.; DAY, M. J. Proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from normal dogs and dogs with autoimmune haemolytic anaemia to red blood cell antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, p.191-204, 1997.

DAY, M. J. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2-4, p. 215-224, 1999.

DAY, M. J. Immune-mediated hemolytic anemia. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 799-806.

DAY, M. J.; MACKIN, A. J. Immune-mediated haematological disease. In: DAY, M. J. **Clinical Immunology of the Dog and Cat**. 2. ed. London: Manson Publishing, 2008. p. 94-121.

DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599-2606, 2004.

DOMINGUES, C. C.; CUNHA, E. S.; WINCK, F. V.; MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. Avaliação de detergentes na solubilização de proteínas de membrana eritrocitária humana em eletroforese bidimensional. **Revista de Ciências Biológicas e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 38-46, 2007.

DUVAL, D.; GIGER, U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 5, p. 290-295, 1996.

FAGIOLO, E. Immunological tolerance loss vs. erythrocyte self antigens and cytokine network dysregulation in autoimmune hemolytic anaemia. **Autoimmunity Reviews** n. 3, p. 53-59, 2004.

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 110-116.

GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. B. Anemia hemolítica auto-imune (AHA): aspectos laboratoriais. In: **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 167-191.

GOSSETT, K. A. Anemias associated with drugs and chemicals. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 185-189.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41.

GREENE, C. E.; SCHULTZ, C. Immunoprophylaxis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 1069-1119.

INABA, M. Chapter 156: Red blood cell membrane defects. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1012-1019.

ISAAC, L. Sistema Complemento. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2001. p. 99-118.

KLAG, A.R.; GIGER, U.; SHOFER, F. S. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 5, p. 783-788, 1993.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.

MAGALHÃES, M. N.; LIMA, A. C. P. **Noções de probabilidade e estatística**. 3. ed. São Paulo: IME-USP, 2001. 392 p.

MCCAW, D. L.; HOSKINS, J. D. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41.

MCCOLE, D. F.; DOHERTY, M. L.; BAIRD A. W.; DAVIS, W. C.; MCGILL, K.; TORGERSON, P. R. Concanavalin A-stimulated proliferation of T cell subset-depleted lymphocyte populations isolated from *Fasciola hepatica*-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 66, p. 289-300, 1998.

MILLS, J. N. Compensated immune mediated haemolytic anaemia in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 1, p. 24-26, 1997.

MILLER, S. A.; HOHENHAUS, A. E.; HALE, A. S. Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 232-235, 2004.

MORLEY, P.; MATHES, M.; GUTH, A.; DOW, S. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 22, p. 886–892, 2008.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168-178, 2007.

NETER, J.; KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. 4. ed. Chicago: Times Mirror Higher Education Group, 1996. 1408 p.

PEREIRA, Patrícia Mendes. **Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste da antiglobulina direta, autoaglutinação, presença de esferócitos) e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imunomediada em cães**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

QUIGLEY, K. A.; BRIAN, J. C.; HAINES, D. M.; JACKSON, M. L. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 297-300, 2001.

RIZZO, L. V.; BARBUTO, J. A. M. Tolerância Imunológica. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora RevinteR, 2001. p. 211-222.

RUBINSTEIN, E. Vaccination and autoimmune diseases: the argument against. **Israel Medical Association Journal**. n. 6, p. 433-435, 2004.

SCOTT-MONCRIEFF, J. C. Diagnostic Testing for Autoimmune Disease. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Small Animal Internal Medicine**. 4. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2009. p. 1407-1428.

SCOTT-MONCRIEFF, J. C.; OLIVERA, J. A.; GLICKMAN, N. W.; GLICKMAN, L. T.; HOGENLISCH, H. Evaluation of antithyroglobulin antibodies after routine vaccination in pet and research dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 4, p. 515-521, 2002.

SNYDER, P. W. Diseases of immunity. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. St. Louis: Elsevier Mosby Saunders, 2007. p. 193-251.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 89-109.

THOMPSON, J. P. Moléstias Imunológicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2766-2802.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. M. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 558–567, 2009.

VAZ, C. A. C. Interação antígeno/anticorpo *in vitro*. In: CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2001. p.119-163.

WEISS, D.; TVEDTEN, H. Erythrocyte Disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2004. p. 38-62.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, E.; SHUMAN, W.; HARKIN, K.; COX, J.; RUSH, B. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 190-196, 2000.

ANEXO A - Controle Positivo do Teste da Antiglobulina Direta (Teste de Coombs Direto)

O reagente comercial *Canine anti-Sheep Red Blood Cells Positive Control for Coombs* (372-2/ VMRD Inc., USA) foi utilizado como controle positivo da técnica de Coombs, sempre que um novo lote de reativo de Coombs (392-5/ VMRD Inc., USA) ou de anticorpos monoespecíficos anti-IgG, anti-IgM ou anti-C₃ (Bethyl[®] Laboratories Inc., USA) foi adquirido.

O princípio do teste é sensibilizar hemácias de ovinos com anticorpos caninos anti-ovelha e realizar o teste de Coombs com estas hemácias. O resultado do teste deve ser positivo para comprovar a qualidade dos reagentes utilizados nos testes de antiglobulina direta poli ou monoespecíficos.

Este teste pode ser dividido nas seguintes etapas: determinação da dose de subaglutinação, sensibilização das hemácias de ovinos, realização do teste de Coombs.

Determinação da Dose de Subaglutinação

A dose de subaglutinação é a diluição do anticorpo canino anti-ovelha capaz de sensibilizar hemácias de ovinos, ou seja, é a menor diluição do anticorpo em que não há aglutinação microscópica.

Inicialmente preparou-se uma suspensão de hemácias de ovinos a 2% em solução fisiológica (4,9 mL de solução fisiológica para 100 µL de papa de hemácias lavadas) e diluições do anticorpo comercial (1:2, 1:4 e 1:8). Adicionou-se 0,1 mL da solução de hemácias a 2% a 0,1 mL de cada diluição do anticorpo, em reações separadas e independentes. Após homogeneização, os microtubos foram incubados a 37° C, em banho-maria, por 30 minutos.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 1 minuto, a 290g, à temperatura ambiente. Para desassociar qualquer aglutinação inespecífica, homogeneizou-se fortemente o conteúdo de cada microtubo. Vinte (20) µL de do conteúdo de cada microtubo foi observado entre lâmina e lamínula com microscópio ótico no aumento de 40 vezes.

A diluição do anticorpo selecionado para a sensibilização de hemácias de ovinos foi a menor em que não houve aglutinação (dose de subaglutinação), que, no caso foi a diluição 1:2.

Sensibilização das Hemácias de Ovinos

Após a escolha da dose de subaglutinação, a segunda etapa foi sensibilizar as hemácias do ovino.

As hemácias a 2% foram incubadas com o anticorpo diluído a 1:2 (dose de subaglutinação) a 37° C, em banho-maria, por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 150g por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* obtido com metade do volume inicial do tubo, com solução fisiológica salina 0,9%.

Teste de Coombs

A última etapa foi a realização do teste de Coombs, poli e monoespecíficos, utilizando as hemácias ovinas sensibilizadas ao invés das hemácias do cão teste.

Em duas placas com 96 poços com fundo em "u" (3799 - Costar Corning, USA) foram preparadas as diluições do reagente de Coombs e dos anticorpos monoespecíficos com Solução Fisiológica (NaCl 0,9%) na diluição de 1:2, 1:4 e 1:8. Resumidamente, em todos os poços foram depositados 50 µL de SF e no primeiro poço, 50 µL do reagente de Coombs. Após homogeneização, 50 µL dessa mistura foram transferidos para o segundo poço, e assim sucessivamente até o terceiro poço. Desse último poço foram desprezados 50 µL da mistura. O quarto poço continha apenas SF (controle negativo). A cada um dos poços foram colocados 50 µL da suspensão de hemácias sensibilizadas de ovinos a 2%. Após homogeneização, uma das placas foi incubada a 4°C e a outra a 37°C, por 40 minutos. As reações foram consideradas positivas sempre que realizadas, pois as hemácias permaneceram suspensas (aglutinaram).

Anexo B - Concentrações séricas de uréia (mg/dL), creatinina ((mg/dL), proteína (g/dL), albumina (g/dL) e atividades séricas de ALT (U/L) e FA (U/L) em cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica (n= 21), no momento pré-vacinal e 33 dias após a vacinação. - São Paulo, - 2011.

Nº	Uréia (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		PT (g/dL)		Albumina (g/dL)		ALT (U/L)		FA (U/L)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	32,10	36,70	0,64	0,57	7,50	8,00	3,40	3,60	32,30	48,20	32,80	43,80
2	58,20	44,80	1,00	1,00	7,40	7,40	3,40	3,40	20,90	22,10	28,00	26,50
3	63,20	48,60	1,00	0,77	7,70	7,60	3,90	3,70	16,20	18,10	8,00	8,30
4	79,80	65,70	0,65	0,65	6,90	7,00	3,30	3,00	9,00	10,90	21,50	18,80
5	40,60	57,70	0,77	0,69	7,60	7,60	3,10	2,80	30,40	29,10	20,10	20,80
6	40,70	53,40	1,00	0,79	6,40	6,80	3,30	3,40	19,80	29,80	10,20	11,20
7	33,00	28,10	0,77	0,92	8,10	7,50	3,50	3,40	28,70	22,50	16,70	25,90
8	30,70	30,90	0,72	0,86	7,60	6,80	3,50	3,60	11,90	11,20	31,30	23,70
9	31,10	22,20	0,73	0,76	7,90	7,10	3,80	3,70	16,00	24,50	25,70	50,00
10	34,40	18,00	0,87	1,00	7,60	6,70	3,30	3,50	42,80	34,40	20,20	33,60
11	23,70	17,00	0,68	0,74	8,40	7,90	3,10	3,40	26,60	29,10	33,30	41,90
12	30,90	25,10	0,73	0,67	7,60	6,80	3,10	2,90	10,50	11,70	10,50	12,40
13	33,40	29,90	0,68	0,70	8,90	7,80	3,00	3,20	16,40	14,50	16,70	24,50
14	30,60	32,10	0,86	0,93	7,90	6,60	3,20	3,20	35,50	32,50	8,60	13,30
15	33,90	27,8	0,81	0,69	8,50	7,3	2,90	3,1	25,10	20,4	13,70	20,2
16	39,70	32,80	0,67	0,50	6,30	6,80	3,40	3,40	32,80	33,90	16,90	24,10
17	21,90	32,80	0,72	0,77	7,00	7,20	3,30	3,40	21,30	20,90	34,60	21,70
18	35,70	35,50	0,81	0,86	7,30	6,70	3,70	3,40	21,80	24,70	42,30	53,00
19	36,70	27,30	0,82	0,89	7,70	7,20	3,60	3,60	22,20	21,40	17,70	22,20
20	47,70	23,90	0,97	0,84	7,10	6,70	3,70	3,60	18,10	31,40	92,50	70,30
21	27,60	19,20	1,30	1,00	7,20	6,60	3,50	3,40	19,30	21,90	16,00	13,80
Média	38,36	34,09	0,82	0,80	7,55	7,14	3,38	3,38	22,7	24,6	24,6	28,0
Mediana	33,90	31,50	0,77	0,78	7,60	7,05	3,40	3,40	21,3	23,5	20,1	23,9
Desvio padrão	13,77	13,53	0,16	0,14	0,64	0,46	0,27	0,25	8,7	9,3	18,2	16,2
Mínimo	21,90	17,00	0,64	0,50	6,30	6,60	2,90	2,80	9,0	10,9	8,0	8,3
Máximo	79,80	65,70	1,30	1,00	8,90	8,00	3,90	3,70	42,8	48,2	92,5	70,3
P	0,066		0,415		0,007		0,543		0,148		0,224	

Legenda: Pré (momento pré-vacinal), Pós (momento pós-vacinal); PT (proteína total sérica); ALT (alanina aminotransferase); FA (fosfatase alcalina).

Anexo C - Valores hematológicos dos cães vacinados com vacina polivalente e antirrábica (n= 21), no momento pré-vacinal e 33 dias após a vacinação. São Paulo, 2011.

N°	He (x10 ⁶ /µL)		Hb (g/dL)		Ht(%)		Reticulócitos (µL)		Leucócitos (µL)		Neutrófilos (µL)		Eosinófilos (µL)		Linfócitos (µL)		Monócitos (µL)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pré	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
1	7,9	7,7	17,4	17,5	52	52	15800	7700	8400	7300	4788	2920	504	146	2352	3212	756	1022
2	8,69	8,5	20,7	19,4	59,2	58	8690	8500	7300	7000	4088	3640	511	420	2190	2520	511	420
3	8,88	8,4	20,5	20,2	62,5	58	26640	8400	17000	15500	10370	8370	510	465	5440	6200	680	465
4	8,9	8,2	18,8	18	55	52	8900	16400	6700	6000	3819	3240	134	120	2211	2160	536	480
5	7,4	7,9	16,4	17,4	48	52	7400	7900	5500	7200	3190	3456	110	144	1540	3024	660	576
6	8,4	9,6	18	20,3	52	61	25200	19200	7400	7500	4662	3600	296	450	1850	2550	592	900
7	8,9	8,3	18,9	18,3	57	55	89000	83000	6000	6400	3360	2880	240	320	2040	2752	360	448
8	8,8	7,2	19,7	16,5	59	50	52800	R	9200	8700	3772	5481	1288	870	3956	2088	92	261
9	7,4	6,9	17	16,2	49	47	22200	27000	7100	7000	5538	4690	213	280	781	1960	568	70
10	8,2	8,3	18,4	19,1	54	56	49200	58100	9500	11500	4560	6555	855	1265	3325	3335	760	345
11	6,8	7	16	16,1	44	48	13600	R	13600	8700	6936	4525	544	174	5576	3045	544	957
12	5,9	6	13,6	14,1	39	41	23600	R	15100	10900	10117	6431	1057	654	3473	3270	453	545
13	6,7	6,7	15,9	16	46	45	53600	R	11400	8300	7980	5312	1026	415	1482	1494	798	1079
14	8	7,6	18,6	18,1	55	53	112000	R	8500	7600	4760	4484	510	608	1785	1824	850	684
15	8	7,8	18,2	17,7	54	53	80000	R	8700	6600	5568	3696	870	528	1653	2112	609	264
16	7,9	7,3	19,1	17,5	56	50	R	R	9300	8200	4650	3526	372	574	3162	3280	1116	820
17	6,8	7,6	16,5	19	48	53	R	136800	6700	7300	4087	4891	201	219	1943	1752	469	438
18	7,6	7,5	17,9	17,7	53	53	114000	15000	7800	9500	6630	7600	78	190	468	1425	624	285
19	8,2	8,7	19,5	18,7	58	58	R	34800	10000	9100	8000	7098	500	273	1000	1365	500	364
20	6,8	7	16,2	15,6	46	46	95200	R	9600	9600	7680	6720	288	384	1248	2112	384	384
21	7,8	7,3	16,7	16,3	51	47	R	14600	7400	6700	4662	3685	740	603	1776	1809	222	603
Média	7,8	7,7	17,8	17,6	52,3	51,8	46931,2	33646,15	9152,4	8409,5	5677,0	4895,2	516,5	433,4	2345,3	2537,6	575,4	543,3
Mediana	7,9	7,6	18,0	17,7	53,0	52,0	26640,0	16400,00	8500,0	7600,0	4760,0	4525,0	504,0	415,0	1943,0	2160,0	568,0	465,0
Desvio padrão	0,8	0,8	1,7	1,6	5,7	5,0	37584,1	38234,29	2957,8	2176,7	2105,4	1648,6	341,4	275,9	1370,2	1061,4	222,0	274,4
Mínimo	5,9	6,0	13,6	14,1	39,0	41,0	7400,0	7700,00	5500,0	6000,0	3190,0	2880,0	78,0	120,0	468,0	1365,0	92,0	70,0
Máximo	8,9	9,6	20,7	20,3	62,5	61,0	114000,0	136800,00	17000,0	15500,0	10370,0	8370,0	1288,0	1265,0	5576,0	6200,0	1116,0	1079,0
p	0,379		0,455		0,602		0,432		0,067		0,020		0,152		0,354		0,589	

Legenda: He (hemácias), Ht (hematócrito), Pré (momento pré-vacinal), Pós (momento pós-vacinal), R (raros).