

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CLASSIFICAÇÃO DE ANEMIAS EM CÃES ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS
ANALÍTICOS

MARIA FRANCISCA ROSEIRA MURALHA PATENA FORTE

ORIENTADORA:

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor
Villa de Brito

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CLASSIFICAÇÃO DE ANEMIAS EM CÃES ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS
ANALÍTICOS

MARIA FRANCISCA ROSEIRA MURALHA PATENA FORTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor José Henrique Duarte Correia

VOGAIS:

Doutora Graça Maria Alexandre Pires Lopes de
Melo

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor
Villa de Brito

ORIENTADORA:

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor
Villa de Brito

2021

Nome: Maria Francisca Roseira Muralha Patena Forte

Título da Tese ou Dissertação: Classificação de anemias em cães através de diferentes métodos analíticos

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Publicação de artigo científico.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 8 de Abril de 2021

Assinatura: Maria Francisca Roseira Muralha Patena Forte 

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Teresa Villa de Brito, por todos os ensinamentos que partilhou comigo, pela orientação que me deu ao longo de todo este percurso, pela prontidão (e paciência!) em ajudar-me sempre que precisava, por nunca me ter deixado desanimar nem desistir quando surgiram obstáculos. Muito obrigada por ter sempre acreditado em mim e no nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. José Henrique Duarte Correia por possibilitar a realização do estágio no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte, onde pude aprender tantas coisas.

Um especial e enorme obrigada à Dra. Salomé, à Dra. Alexandra e à Dra. Pâmela. Por todos os conhecimentos que partilharam comigo, por toda a paciência que tiveram, por estarem sempre a torcer por mim e por estarem sempre disponíveis com um sorriso a ajudar-me! Mas também por toda a amizade que partilharam comigo, por todos os docinhos, por todas as conversas e risotas! Levo-vos com muito carinho no meu coração!

Ao Professor Telmo Nunes e ao meu querido primo Zé Miguel, por toda a ajuda preciosa na análise estatística, sem a qual não teria sido possível terminar este trabalho.

A todos os médicos veterinários e enfermeiros, no Hospital Escolar Veterinário, que me ajudaram a recolher amostras sempre que precisei. E por todos os conhecimentos e amizade que partilharam comigo ao longo do estágio!

Aos meus pais, ao meu irmão e irmãs, por nunca desistirem de mim! Por todo o consolo que me dão quando mais preciso. Por me fazerem sempre rir e querer ser o melhor que posso! Por me ensinarem a amar e a cuidar!

Ao Zé, por todo o amor, amizade e carinho que sempre partilhou comigo. Por nunca me deixar desistir, por acreditar sempre em mim mesmo quando eu acho que não consigo mais, por me fazer rir em todos os momentos, e por me ajudar todos os dias a ser melhor

À Nené, que ao longo destes anos se tornou não só melhor amiga, mas também uma irmã. Por estar sempre pronta a ajudar-me, por me consolar, por se rir sempre de tudo o que eu digo, por me incentivar a ser o melhor de mim, e fazer dela as minhas batalhas.

À Fernanda, por toda a amizade que partilhou comigo nestes anos todos, por tantos desabafos e gargalhadas que partilhamos juntas.

À Sara, Alex, Megui, Nídia, e tantos outros amigos que a faculdade me deu! Por tornarem este percurso mais divertido e leve, com histórias e aventuras que levarei com muito carinho para o resto da minha vida!

Ao Pai, porque toda a vida vem de Ti, porque sem Ti não sou nada.

Queira eu o que Tu queres.

Resumo

A anemia, definida como a diminuição da contagem total de eritrócitos (RBC), mas também do hematócrito (HT) e da concentração de hemoglobina (Hgb), é a alteração hematológica mais comum encontrada na prática clínica veterinária, e pode ser a causa da doença ou um marcador de doença subjacente. No que diz respeito ao mecanismo fisiopatológico que lhe dá origem, estes são essencialmente de três tipos: perda (hemorragia), destruição (hemólise) e diminuição da produção. As anemias podem ser classificadas com base na resposta da medula óssea em regenerativas e não regenerativas.

O presente estudo teve como principal objetivo classificar anemias de uma forma mais simples, prática e objetiva relacionando: o eritrograma, a avaliação da morfologia dos eritrócitos no esfregaço sanguíneo, a contagem de reticulócitos (manual e automática) e por fim do teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT).

A amostra em estudo incluiu 35 cães com anemia, dos quais 54,3% (n=19) apresentaram uma anemia não regenerativa, e 45,7% (n=16) uma anemia regenerativa. Em relação aos índices eritrocitários, metade dos cães (FR=50,0%) com anemia regenerativa e a maioria (FR=84,2%) com anemia não regenerativa apresentaram uma anemia normocítica normocrômica. Nos cães com anemia regenerativa verificou-se que com o aumento da gravidade da anemia existia um aumento da resposta reticulocitária, apesar de não se ter verificado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,6758$). Observou-se uma maior ocorrência de anisocitose quando a anemia era regenerativa do que nos casos de anemia não regenerativa ($p_{\text{Fisher}}=0,014$). Relativamente à relação do RDW com a anisocitose, obteve-se uma ROC-curve, que indicou um valor de RDW de 15,6%, com sensibilidade de 95% e especificidade de 60%, muito diferente do *cut-off* facultado pelo analisador ProCyte Dx de 21,7%, com sensibilidade 10% e especificidade de 100% o que prova que este último poderá levar a um subdiagnóstico de anisocitose. Não foi encontrada uma correlação entre a resposta regenerativa da anemia e o ROFT ($p=0,700$), e apenas 22,9% dos cães em estudo tiveram um ROFT positivo, ainda que nenhum tivesse um diagnóstico de anemia hemolítica imuno-mediada. Ao compararmos a contagem manual e automática absoluta de reticulócitos (C_{MaRet} e C_{AaRet}) concluímos que os dois métodos se equivalem. E que, provavelmente, a C_{AaRet} produz resultados superiores ao da contagem manual.

Apesar dos exames laboratoriais automáticos serem mais rápidos, de evitarem erros entre operadores, e oferecerem informações úteis para a determinação da causa da anemia, é importante conhecermos as suas limitações, não devendo prescindir da observação e avaliação do esfregaço de sangue.

Palavras-chave: anemia, cão, esfregaço de sangue, hemograma, contagem de reticulócitos, teste rápido de fragilidade osmótica.

Abstract

Anaemia, defined as a decreased in total red blood cell (RBC) count, haematocrit (HT), or haemoglobin concentration (Hgb), is the most common hematologic abnormality encountered in veterinary clinical practice and can be the cause of disease or a marker of underlying disease. Regarding the pathophysiological mechanism that causes anaemia, these are essentially of three types: loss, destruction, and decreased production of RBCs. Anaemias can be classified based on the bone marrow response into regenerative and non-regenerative.

The aim of this study was to classify anaemias in a more simple, practical, and objective way, relating: the complete blood count, the evaluation of the erythrocyte morphology in the blood smear, the reticulocyte count (manual and automatic) and finally the rapid osmotic fragility test (ROFT).

The study included 35 dogs with anaemia, of which 54,3% (n=19) had non-regenerative anaemia, and 45,7% (n=16) had regenerative anaemia. Regarding the erythrocyte indices, half of the dogs (FR=50,0%) with regenerative anaemia and most of the dogs (FR=84,2%) with non-regenerative anaemia had normochromic normocytic anaemia. In dogs with regenerative anaemia, it was found that with an increase in the severity of anaemia, there was an increase in reticulocyte response, although there was not a statistically significant difference ($p=0,6758$). A greater occurrence of anisocytosis was observed when anaemia was regenerative than in cases of non-regenerative anaemia ($p_{\text{Fisher}}=0,014$). Regarding the relation between RDW and anisocytosis, a ROC-curve was obtained, which indicated an RDW value of 15,6%, with a sensitivity of 95% and specificity of 60%, very different from the *cut-off* provided by the ProCyte Dx haematology analyser of 21,7%, with sensitivity of 10% and specificity of 100%, which proves that the latter may lead to an underdiagnosis of anisocytosis. No correlation was found between the regenerative response of anaemia and the ROFT ($p=0,700$), and only 22,9% of the dogs under study had a positive ROFT, although none had a diagnosis of immune-mediated haemolytic anaemia. When comparing the manual and automatic absolute reticulocyte count (MaRetC and AaRetC) we conclude that the two methods are equivalent. And probably, the AaRetC produces higher results than the manual count.

Although automatic laboratory tests are faster, avoid inter-observer variation, and provide useful information for determining the cause of anaemia, it is important for clinicians to be aware of their limitations, and not neglect the observation and evaluation of the blood smear.

Keywords: anaemia, dog, blood smear, complete blood count, reticulocyte count, rapid osmotic fragility test.

Índice

I.	Relatório das atividades desenvolvidas no estágio.....	1
1.	Estágio Curricular no Hospital Escolar Veterinário da FMV-UL.....	1
2.	Estágio no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte	5
II.	Revisão Bibliográfica.....	6
1.	A Eritropoiese e os principais componentes da membrana e citoesqueleto do eritrócito.....	6
2.	Anemia	8
2.1.	Classificação	8
2.1.1.	Anemia regenerativa.....	9
2.1.1.1.	Anemia hemolítica	10
2.1.1.2.	Anemia hemorrágica.....	10
2.1.2.	Anemia não regenerativa.....	10
2.2.	Sinais clínicos e laboratoriais.....	12
2.3.	Mecanismos de compensação da anemia	12
2.4.	Diagnóstico laboratorial	13
2.4.1.	Eritrograma.....	13
2.4.1.1.	Hematócrito, contagem total de eritrócitos e concentração de hemoglobina.....	13
2.4.1.2.	Índices eritrocitários (VCM, CHCM e RDW).....	13
2.4.2.	Contagem de reticulócitos: manual e automática.....	15
2.4.3.	Morfologia no esfregaço sanguíneo.....	15
2.4.4.	Teste de fragilidade eritrocitária.....	16
III.	Classificação de anemias em cães através de diferentes métodos analíticos	17
1.	Introdução e objetivos do estudo	17
2.	Materiais e métodos	17
2.1.	Animais.....	17
2.1.1.	Grupo de Estudo – Grupo com Anemia	17
2.1.2.	Grupo Saudável – Grupo Controlo.....	18

2.1.3.	Critérios de exclusão	18
2.2.	Colheita de sangue e acondicionamento da amostra.....	18
2.3.	Análise da história clínica dos animais em estudo	18
2.4.	Análises laboratoriais.....	19
2.4.1.	Eritrograma.....	19
2.4.2.	Observação e avaliação da morfologia eritrocitária.....	21
2.4.3.	Contagem manual de reticulócitos.....	21
2.4.4.	Teste rápido de fragilidade osmótica	22
2.5.	Análise Estatística	24
3.	Resultados.....	25
3.1.	Caracterização da amostra	25
3.2.	Caracterização da amostra de acordo com a regeneração.....	26
3.3.	Relação da resposta regenerativa da anemia e o grau de anisocitose	27
3.4.	Relação da resposta regenerativa da anemia com os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose	28
3.5.	Gravidade da anemia	29
3.6.	Relação entre a contagem absoluta de reticulócitos dos animais com anemia regenerativa e a gravidade da anemia	30
3.7.	Relação entre o RDW e a Anisocitose	30
3.8.	Relação da resposta regenerativa da anemia e o teste rápido de fragilidade osmótica.....	32
3.9.	Comparação entre a contagem manual e automática absoluta de reticulócitos ..	35
4.	Discussão.....	37
5.	Conclusão.....	44
IV.	Bibliografia	46
V.	ANEXOS.....	50
	Anexo 1 Número e percentagem de animais segundo os seus índices eritrocitários.....	50
	Anexo 2 Número e percentagem de cães segundo o tipo de resposta regenerativa da anemia e os seus índices eritrocitários.	50

Anexo 3 Caracterização dos animais com anemia regenerativa: índices eritrocitários, causa, doença e/ou sinais clínicos.....	51
Anexo 4 Caracterização dos animais com anemia não regenerativa: índices eritrocitários, causa, doença e/ou sinais clínicos.....	52

Índice de Figuras

Figura 1 Modelo esquematizado da eritropoiese e tempo aproximado de resposta de certos fatores de crescimento durante a eritropoiese – segundo Olver (2010).....	7
Figura 2 Esquema do protocolo do teste rápido de fragilidade osmótica segundo Piek (2017).	23
Figura 3 ROFT negativo de um cão da amostra em estudo.....	33
Figura 4 ROFT positivo de um cão da amostra em estudo.....	33
Figura 5 ROFT positivo de um cão da amostra em estudo.....	34

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo na amostra em estudo.	25
Gráfico 2 Distribuição das raças na amostra em estudo.....	25
Gráfico 3 Número e percentagem de cães segundo o tipo de resposta regenerativa da anemia e os seus índices eritrocitários	28
Gráfico 4 Frequência relativa da classificação da gravidade de anemia.....	30
Gráfico 5 ROC curve da variável RDW comparada com a presença ou ausência de anisocitose	31
Gráfico 6 Reta de correlação da Contagem Absoluta Manual e Automática de Reticulócitos.	35
Gráfico 7 Análise de Bland-Altman entre os valores obtidos pela CMaRet e CAaRet.....	36

Índice de Tabelas

Tabela 1 Classificação da gravidade da anemia no cão. (segundo Tvedten 2010).....	9
Tabela 2 Diagnósticos diferenciais de anemia não regenerativa. (segundo Hohenhaus and Winzelberg 2017)	11
Tabela 3 Classificação de anemias por índices de eritrocitários e etiologia (segundo Harvey 2012b).....	14
Tabela 4 Alterações na forma eritrocitária associadas a causas e doenças/condições (segundo Tvedten 2010)	15
Tabela 5 Intervalos de referência de diferentes parâmetros em cães do analisador hematológico ProCyte Dx.....	19

Tabela 6 Preparação das amostras para realização do ROFT. (segundo Piek 2017).....	22
Tabela 7 Número e percentagem de animais segundo o tipo de anemia e a sua causa.....	26
Tabela 8 Número e percentagem de animais segundo o seu tipo de anemia e o grau de anisocitose.	27
Tabela 9 Número de animais com anemia não regenerativa segundo os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose	29
Tabela 10 Número de animais com anemia regenerativa segundo os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose	29
Tabela 11 Número e percentagem de animais segundo o tipo de anemia e a sua gravidade.	30
Tabela 12 Número e percentagem de animais segundo o tipo de anemia e o ROFT	32

Lista de abreviaturas e siglas

AE1 – *anion exchanger 1*/ banda 3

AHIM – anemia hemolítica imuno-mediada

BFU-E – *burst forming unit-erythroid*/ unidade formadora de crescimento rápido eritróide

CAaRet – contagem automática absoluta de reticulócitos

CFU-E – *colony forming unit-erythroid*/ unidade formadora de colónias-eritróide

CHCM – concentração média de hemoglobina corpuscular

CID – coagulação intravascular disseminada

CMaRet – contagem manual absoluta de reticulócitos

CMP – *common myeloid progenitor*/ células estaminais hematopoiéticas num precursor mielóide comum

CO₂ – dióxido de carbono

COFT – *classic osmotic fragility test* / teste clássico de fragilidade osmótica

DP – desvio padrão

DRC – doença renal crónica

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*/ ácido etilendiamino tetra-acético

EPO – eritropoietina

EPO-R – recetores específicos de eritropoietina

FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

FR – frequência relativa

GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* /fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

GPA – *glycophorin A*/ glicoforina A

HCM – hemoglobina corpuscular média

HCO₃⁻ – bicarbonato

HEV – Hospital Escolar Veterinário

Hgb – hemoglobina

HSC – células estaminais hematopoiéticas

HT – hematócrito

IFN-γ – interferão gama

IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*/ somatomedina C

IL – interleucina

IL-1 – interleucina 1

IL-3 – interleucina 3

IL-6 – interleucina 6

Inc. – *incorporated*

MEP – *megakaryocyte–erythroid progenitor cell*/ progenitor megacariócito eritróide
MO – medula óssea
NaCl – cloreto de sódio
O₂ – oxigénio
OF – *erythrocyte osmotic fragility*/ fragilidade osmótica dos eritrócitos
OR – *odds ratio*
PAAF – punção aspirativa com agulha fina
RBC – eritrócito
RDW – *red cell distribution width*
RNA – ácido ribonucleico
ROFT – *rapid osmotic fragility test*/ teste rápido de fragilidade osmótica
SCF – *stem cell factor*/ fator de células estaminais
TC – tomografia computadorizada
TNF – *tumor necrosis factor*/ fator de necrose tumoral
TPO – trombopoietina
TRAIL – *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*/ ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
VCM – volume corpuscular médio

Lista de símbolos

% – percentagem
T – temperatura
~ – aproximadamente
< – menor que
= – igual
> – maior que
± – desvio padrão
≤ – menor ou igual que
® – marca registada
∞ – infinito
μl – microlitro
fL – fentolitro
g – *força centrífuga*
g/dl – grama por decilitro
ml – mililitro
°C - graus Celsius
p – p-value

I. Relatório das atividades desenvolvidas no estágio

1. Estágio Curricular no Hospital Escolar Veterinário da FMV-UL

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), no período compreendido entre 10 de Setembro de 2018 a 15 de Março de 2019.

Ao longo do estágio, foram realizadas diferentes atividades clínicas em turnos rotativos, com horários das 8h às 15h e das 14h às 21h, nos serviços de Medicina Geral, Oftalmologia, Medicina Interna, na Unidade de Isolamento de Doenças Infecto-Contagiosas, Ecografia, Radiologia, Cirurgia, Oncologia e, ainda, no serviço de Dermatologia. Já no serviço de Internamento, as atividades clínicas foram realizadas em turnos de 12 horas, das 8h às 20h ou das 20h às 8h, sempre com o acompanhamento do médico-veterinário responsável e dos auxiliares/enfermeiros veterinários. Assim, ao longo destes 6 meses, no total, foram realizadas 960 horas de estágio nos diferentes serviços:

- **Medicina Geral**

No serviço de Medicina Geral, e durante 8 semanas, foram realizadas inúmeras atividades clínicas de assistência aos médicos veterinários de serviço. Neste serviço, o contacto recorrente com os proprietários dos pacientes permitiu desenvolver a relação veterinário-titular-paciente e aplicar técnicas de comunicação de modo a interpretar a informação fornecida pelos proprietários e, assim, obter uma história clínica clara e correta. Na maioria destas consultas, era realizada a anamnese e o exame clínico objetivo dos pacientes, com supervisão/confirmação pelo médico veterinário responsável e, posteriormente, existia a discussão dos dados clínicos obtidos, com o intuito de incluir os possíveis diagnósticos diferenciais e, ainda, era realizada a elaboração de um plano de diagnóstico que incluía a aplicação de eventuais métodos complementares de diagnóstico, assim como o planeamento da terapêutica necessária para cada doente.

Nestas consultas também foi possível realizar a administração de vacinas e de fármacos, colheita de sangue, colheita de urina, quer por cistocentese (com auxílio do ecógrafo) quer por algaliação, colheitas de amostras para citologia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), colocação de cateteres endovenosos, preparação de sistemas de soro, prescrição de receitas.

As principais consultas neste serviço eram consultas de rotina (vacinação e desparasitação) e, também, de seguimento. No entanto, existiram também consultas de animais com afeções do foro digestivo, urinário, neurológico ou músculo-esquelético.

Juntamente, com alguma frequência foram observadas consultas de urgência, principalmente de animais com traumatismos, em estado convulsivo, com obstrução do trato urinário inferior, com crise de dispneia, entre outros. Nas consultas de urgências foi possível aprender a realizar a triagem e a priorizar estes animais, bem como auxiliar o médico veterinário assistente na disponibilização de uma via endovenosa aberta, na preparação e administração de fármacos, na realização de oxigenoterapia, entubação, técnicas de reanimação e exames complementares de diagnóstico.

- **Internamento**

No serviço de internamento, foram realizados turnos de internamento duas a três vezes por mês. No serviço de internamento foi possível participar na transmissão de casos para o turno seguinte e, de seguida, realizar a monitorização dos animais, preparar e administrar de medicamentos, bem como fornecer a sua alimentação. Quando necessário, realizou-se as colheitas de sangue e de urina, a medição da pressão arterial, a algaliação e a medição do volume de urina em animais algaliados. Também foi possível discutir os casos clínicos dos animais internados com o médico veterinário de serviço e assistir às altas clínicas.

- **Oftalmologia**

No serviço de Oftalmologia foi realizada assistência ao médico veterinário de serviço durante 2 semanas. Nesta, foi possível a participação em consultas de primeira opinião e de referência, nas quais as principais afeções observadas eram úlceras na córnea, glaucomas e cataratas, bem como a realização dos exames oftalmológicos: verificação dos reflexos palpebral, corneal, pupilar e de ameaça, realização do teste de Schirmer, tonometria, teste da fluoresceína, biomicroscopia e exame do fundo do olho. Também foi possível participar em ecografias oculares, eletrorretinografias e em cirurgias, nomeadamente de correção de entrópion, de correção de cataratas e de enucleação do globo ocular.

- **Imagiologia**

No serviço de Imagiologia foram realizadas 4 semanas, distribuídas pelo serviço de Ecografia e Radiologia (radiografia e tomografia computadorizada – TC). No serviço de Ecografia foi possível assistir, principalmente, a ecografias abdominais e cardíacas de cariz diagnóstico ou de monitorização, participar na interpretação dos exames e ainda ajudar na realização de cistocenteses, colecistocenteses, bem como de biópsias hepáticas e esplênicas. Na radiologia e na TAC foi feita a contenção e posicionamento dos animais e ainda a interpretação e discussão dos resultados dos exames com o médico veterinário assistente. Na radiologia, quando necessário, foi realizada a sedação ou anestesia geral dos animais, com posterior

monitorização anestésica dos mesmos. Na TC foi realizada sobretudo a cateterização dos animais e a sua indução e monitorização anestésica e o acompanhamento dos animais até ao internamento e no seu recobro.

- **Oncologia**

No serviço de oncologia foram efetuadas 2 semanas, a acompanhar o médico veterinário assistente nas suas consultas. Nestas era esclarecido, aos proprietários, quais as possíveis hipóteses de tratamento, o processo de quimioterapia, os cuidados a ter, possíveis efeitos secundários, a taxa de sucesso, o prognóstico e a sua relação com a qualidade de vida do animal. Também foi possível aprender e discutir as diferentes abordagens terapêuticas para cada caso. Foi, ainda, possível acompanhar o enfermeiro de serviço nas sessões de quimioterapia na receção do animal, na sua cateterização e na colheita de amostras de sangue para sua análise, preparação dos quimioterápicos a administrar e pôr em prática os cuidados a ter com a sua administração e manipulação. A monitorização dos animais durante a sessão de quimioterapia também foi realizada.

- **Unidade de Isolamento de Doenças Infecto-Contagiosas (UIDI)**

Neste serviço foram executadas 2 semanas, com a supervisão do médico veterinário assistente. Aqui foi possível pôr em prática conceitos referentes à proteção individual e à proteção ambiental, devido ao carácter contagioso, e por vezes zoonótico das doenças dos pacientes internados neste serviço. Na unidade de Isolamento contactámos com variados casos, nomeadamente cães com leptospirose e com parvovirose, a gatos FIV e FeLV positivos ou com panleucopénia felina. Todos os dias era realizado o exame clínico geral dos animais internados, preparada e administrada a sua medicação e avaliada a evolução clínica dos pacientes, bem como discutir e planear os próximos passos a seguir. Quando necessário também era feita colheita de sangue e urina e algaliação. Foi, também, possível acompanhar consultas de alta médica, nas quais, quando necessário, eram explicados todos os cuidados a ter na manipulação e na monitorização da evolução clínica dos animais, bem como na administração da sua medicação.

- **Cirurgia**

No serviço de Cirurgia foram completadas 4 semanas. Aqui acompanhámos o animal desde a sua receção até ao seu recobro e, por vezes, acompanhámos e realizamos a sua alta cirúrgica. Após a receção era realizada, na sala de preparação pré-cirúrgica, a cateterização dos animais, a administração da pré-medicação anestésica, a indução anestésica, entubação, a tricotomia e desinfeção da área a intervencionar, bem como o início da monitorização

anestésica do animal, não só de animais de companhia como cães e gatos, mas também de alguns animais exóticos como coelhos, porquinhos-da-Índia e periquitos. Quando no bloco operatório, foram postas em prática todas as condições de assepsia inerentes a este espaço. Neste serviço tivemos oportunidade de ser: anestesista, que implicava fazer a monitorização do animal desde o início da administração da medicação pré-anestésica até ao seu recobro; circulante, que envolvia desde o correto posicionamento do animal na mesa de cirurgia, a colocação do pulso-oxímetro ao auxílio da preparação do cirurgião; ajudante de cirurgião, que envolvia ajudar na exposição de órgãos ou vasos, na hemóstase e cauterização de vasos, e na realização de suturas. Foi ainda possível realizar castrações a gatos, como cirurgiã principal sob a supervisão do cirurgião de serviço. Ao longo desta rotação tivemos oportunidade de observar e por vezes ajudar diversas intervenções cirúrgicas, desde ovariectomias, mastectomias parciais e totais, nodulectomias, remoções de massas abdominais, cistectomias, hemilaminectomias, cirurgias ortopédicas (correção de fraturas, TTAs, amputações, etc.), destartarizações e remoção dentária, bem como ajudar em cirurgias menos comuns como uma pericardiectomia, observar a remoção de um maxilar e a reconstrução facial conseguinte.

- **Medicina Interna**

No serviço de Medicina Interna pudemos acompanhar o médico veterinário do serviço durante 2 semanas. As consultas deste serviço eram na sua maioria de referência, de 2ª opinião e de acompanhamento, principalmente do foro endócrino, mas também digestivo e ainda respiratório. Foi possível auxiliar o médico veterinário na anamnese, no exame físico e na colheita de amostras, bem como discutir possíveis diagnósticos diferenciais e exames complementares a realizar. Também foi possível acompanhar o médico veterinário na realização de endoscopias respiratórias e digestivas e de lavagens broncoalveolares.

- **Dermatologia**

Na área de Dermatologia, pudemos acompanhar o médico veterinário do serviço nas consultas durante 2 semanas. Neste serviço acompanhámos variados casos de animais com doenças dermatológicas, sendo os casos mais observados a dermatite atópica e a otite. Foi possível realizar recolha de amostras para citologia por meio de fita-cola, por aposição com lâmina e com recurso a zaragatoa, com posterior coloração e observação ao microscópico ótico ou envio das amostras para análise, e ainda participar em testes intradérmicos.

2. Estágio no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte

O estágio laboratorial no Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte foi realizado sob a supervisão da Professora Doutora Maria Teresa Villa de Brito, no período de Junho de 2019 a Dezembro de 2019.

Durante este período aprendi com a Doutora Salomé Gonçalves, com a Doutora Alexandra Basso e com a Doutora Pâmela Valente não só conceitos básicos do trabalho laboratorial, como segurança e cuidados, mas também diversas técnicas laboratoriais de rotina e o funcionamento das diversas máquinas.

Sob supervisão desenvolvi várias capacidades laboratoriais e ajudei no trabalho de rotina diária como a preparação amostras para análises bioquímicas (centrifugação, e separação do soro ou plasma para análise), a realização e coloração de esfregaços sanguíneos de animais de companhia, bem como de espécies pecuárias e exóticas, seguida da sua observação e avaliação microscópica. Efetuei ainda contagens manuais de reticulócitos e análises urina de tipo I e/ou sedimento urinário. Tive também oportunidade de observar a realização de caracterização de líquido cefalorraquidiano (LCR) de líquidos de derrame e de líquidos de lavagem bronco-alveolares.

Durante este período de tempo pude recolher amostras sanguíneas de cães com anemia para a realização do estudo da presente dissertação de mestrado.

II. Revisão Bibliográfica

1. A Eritropoiese e os principais componentes da membrana e citoesqueleto do eritrócito

A eritropoiese consiste na proliferação e na diferenciação progressiva das células estaminais hematopoiéticas (HSC) em eritrócitos (Mills 2012). Este processo ocorre na medula óssea, mais concretamente nas ilhotas eritróides, à volta dos macrófagos centrais, os quais desempenham diversos papéis como: a fagocitose do material nuclear extrudido, o armazenamento e o fornecimento de ferro necessário para a síntese de hemoglobina (Villiers, 2016a).

O processo da eritropoiese envolve três componentes básicos: as células estaminais, as citocinas e um microambiente apropriado (Mills 2012). Assim, os primeiros passos da diferenciação eritróide começam com a diferenciação das células estaminais hematopoiéticas num precursor mielóide comum (*Common Myeloid Progenitor – CMP*), que consegue diferenciar-se em qualquer célula do sangue exceto em linfócito. Os CMPs, por sua vez, diferenciam-se no progenitor megacariócito eritróide (*Megakaryocyte–Erythroid Progenitor cell – MEP*) (Olver 2010) e, de seguida, na unidade formadora de crescimento rápido eritróide (*Burst Forming Unit-Erythroid – BFU-E*). Esta última diferencia-se na unidade formadora de colónias-eritróide (*Colony Forming Unit-Erythroid – CFU-E*), após a qual ocorre a diferenciação final. Na segunda fase da maturação eritróide, ocorre a diferenciação dos precursores nucleados de rubriblastos em prorrubríctos, rubríctos basofílicos, rubríctos policromatófílicos, metarrubríctos e reticulócitos. Nesta etapa existe uma acumulação gradual de hemoglobina, uma diminuição progressiva do tamanho das células e uma condensação nuclear de forma a existir a extrusão nuclear nestas células (Zivot et al. 2018).

A fase final do desenvolvimento eritróide envolve a maturação do reticulócito em eritrócito. Neste período, o eritrócito adquire a sua forma bicôncava, a qual assegura a sua estabilidade e flexibilidade, através de uma extensa remodelação da membrana (figura 1).(Zivot et al. 2018).

Durante a eritropoiese ocorrem várias interações entre as células em diferentes estádios e os fatores de crescimento, as quais contribuem, desta forma, para a diferenciação e proliferação eritróide.

Os fatores de crescimento de ação inicial e intermédia tais como: o fator de células estaminais (*Stem Cell Factor – SCF*), a interleucina 3 (IL-3), o fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – GM-CSF*) e a trombopoietina (TPO) estimulam a diferenciação do precursor mielóide comum em progenitor megacariócito eritróide (Harvey 2012a).

A eritropoietina (EPO) é o principal fator de crescimento que promove a viabilidade, a proliferação e a diferenciação das células desde o estágio BFU-E até ao de rubrícitos policromatófilicos (PR). Estas células expressam recetores específicos de EPO (EPO-R) na superfície celular. Apenas a células BFU-E mais maduras expressam recetores da EPO e são, portanto, responsivas à EPO (Jelkmann 2011; Zivot et al. 2018).

A somatomedina C (*Insulin-Like Growth Factor 1* – IGF-1) e a insulina aumentam o crescimento e a diferenciação das células eritróides (Olver 2010). Na figura 1 pode ser observado, aproximadamente, o tempo de resposta de certos fatores de crescimento durante a eritropoiese.

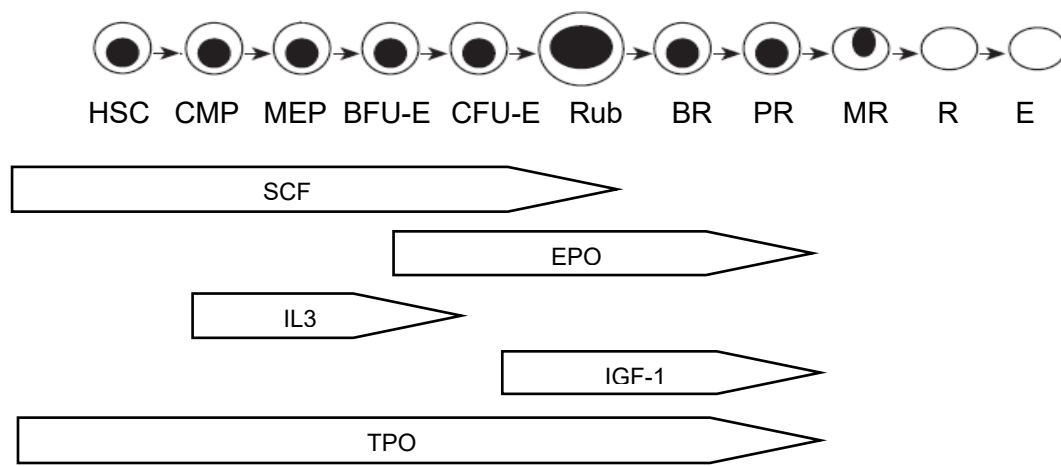


Figura 1| Modelo esquematizado da eritropoiese e tempo aproximado de resposta de certos fatores de crescimento durante a eritropoiese – segundo Olver (2010).

Legenda: BFU-E: unidade formadora de crescimento rápido eritróide; BR: prorrubrícitos; CFU-E: unidade formadora de colónias-eritróide; CMP: precursor mielóide comum; E: eritrócitos; EPO, eritropoietina; HSC, células estaminais hematopoiéticas; IGF-1: somatomedina C (*Insulin-Like Growth Factor 1*); IL3: interleucina 3; MEP: progenitor megacariócito eritróide; MR: metarrubrícitos; PR: rubrícitos policromatófilicos; R, reticulócitos; Rub: rubriblastos; SCF: fator de células estaminais; TPO: trombopoietina.

Também existem inibidores humorais da eritropoiese, dentro dos quais se incluem o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor* – TNF), o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* – TRAIL), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e interferão gama (IFN- γ) (Chasis and Mohandas 2008).

A organização estrutural da membrana eritrocitária permite que o eritrócito sofra deformações rápidas e reversíveis, mantendo a sua integridade mecânica (Narla and Mohandas 2017).

A membrana eritrocitária é constituída por uma bicamada fosfolipídica e por determinadas proteínas. A bicamada fosfolipídica forma a barreira entre o meio intracelular e extracelular. As proteínas que compõem a membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais, como a banda 3 e as glicoforinas, e em periféricas, como a

espectrina (Murador and Deffune 2007; Da Costa et al. 2016). Das diferentes proteínas que constituem a membrana dos glóbulos vermelhos destacam-se a banda 3 e as glicoforinas.

A banda 3, ou *anion exchanger 1* (AE1), considerada a principal proteína integral da membrana, é responsável por ancorar o citoesqueleto à membrana, mas também tem outras funções como a remoção de CO₂ dos tecidos, a regulação do transporte de HCO₃⁻ e do metabolismo da glicose (Murador and Deffune 2007; Olver 2010).

As glicoforinas são também proteínas integrais da membrana dos eritrócitos, e existem cinco tipos de glicoforinas (Winzeler 2017). A glicoforina A (*glycophorin A* – GPA) é a maior sialoglicoproteína transmembranar dos eritrócitos e a sua concentração nos glóbulos vermelhos é responsável por 80% da carga negativa destas células. Esta propriedade das glicoforinas permite minimizar e prevenir a aglutinação eritrocitária (Murador and Deffune 2007).

O principal componente proteico do citoesqueleto é a espectrina, uma proteína de membrana periférica, que interage diretamente com a bicamada fosfolipídica e com outras proteínas membranares do citoesqueleto (Sarkar et al. 2018).

2. Anemia

A anemia, é uma das alterações hematológicas mais comuns encontrada na prática clínica veterinária, e pode ser a causa da doença ou um marcador de doença subjacente (Chervier et al. 2012). É caracterizada por uma diminuição da massa de glóbulos vermelhos no sangue, cuja principal função é o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos, e do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. Uma diminuição no número de eritrócitos, diminui a capacidade do corpo de realizar a troca de gases de forma adequada (Yilmaz and Shaikh 2020).

Tradicionalmente, a anemia definida como a diminuição da contagem total de eritrócitos (RBC), mas também do hematócrito (HT) e da concentração de hemoglobina (Hgb) (Stokol 2017).

2.1. Classificação

De um modo geral, a anemia pode ser classificada quanto à gravidade, quanto aos índices eritrocitários e quanto à regeneração. O primeiro é determinado pelo grau de diminuição do HT (tabela 2), sendo importante considerar a raça, idade e sexo do animal ao interpretar os resultados (Stokol 2017).

Tabela 1| Classificação da gravidade da anemia no cão. (segundo Tvedten 2010).

Classificação	HT (%)
Ligeira	30-37,3
Moderada	20-29
Grave	13-19
Muito grave	<13

A determinação dos índices eritrocitários pode auxiliar no diagnóstico diferencial de anemia. Os índices eritrocitários incluem o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM). Estes parâmetros permitem aferir sobre o tipo de eritrócitos que está a ser produzido pela medula óssea. Com base no valor do VCM estas podem ser classificadas em normocíticas (VCM normal), macrocíticas (VCM aumentado) e microcíticas (VCM diminuído). E de acordo com o seu CHCM em normocrómicas (CHCM normal) e hipocrómicas (CHCM diminuído) (Belay et al. 2018). As anemias não são classificadas como hiperocrómicas uma vez que o aumento do CHCM é geralmente um artefacto, podendo ocorrer em casos de hemólise intravascular, de lipidémia, de presença elevada de corpos de Heinz, entre outros (Harvey 2012b).

A avaliação da resposta regenerativa é o primeiro passo na avaliação de uma anemia. Se a anemia é acompanhada de reticulocitose é considerada regenerativa e, o mecanismo subjacente é hemorragia ou hemólise. Por outro lado, no caso de a anemia não ter reticulocitose associada, ou esta ser baixa, é referida como não regenerativa e indica uma alteração na produção de eritrócitos pela medula óssea, para a qual existem inúmeras causas (Grimes and Fry 2015). No entanto, como a medula óssea leva de 2 a 5 dias para responder a uma anemia, uma anemia por hemorragia ou por hemólise aguda pode revelar-se inicialmente não regenerativa (Piek 2017). Neste caso a anemia pode ser considerada pré-regenerativa.

2.1.1. Anemia regenerativa

Nas anemias regenerativas existe uma resposta da medula óssea face a um episódio de destruição de eritrócitos (hemólise) ou de perda de sangue (hemorragia) com a libertação de eritrócitos imaturos na circulação. Estas são inicialmente normocíticas normocrómicas, mas evoluem para anemias macrocíticas hipocrómicas ou macrocíticas normocrómicas se tiver decorrido tempo suficiente para a libertação de um número significativo de reticulócitos da medula óssea (Harvey 2012b).

2.1.1.1. Anemia hemolítica

As anemias hemolíticas ocorrem devido ao aumento da destruição de eritrócitos no organismo. Os eritrócitos podem sofrer lise em circulação (hemólise intravascular), ou podem sofrer fagocitose pelas células do sistema mononuclear-fagocítico no baço e/ou no fígado (hemólise extravascular) (Harvey 2012b).

As principais causas de anemia hemolítica são: imuno-mediação (pode ser primária ou secundária a agentes infecciosos, incompatibilidade de grupos sanguíneos, ou fármacos), infecção (*Babesia* spp., *Mycoplasma haemocanis*;, entre outros), lesão oxidativa (intoxicação por zinco, alguns fármacos, etc.) lesões endoteliais (hemangiossarcoma, coagulação intravascular disseminada (CID), vasculite, dirofilariose, entre outros), defeitos hereditários na membrana eritrocitária (estomatocitose no Malamute-do-Alasca, por exemplo) ou alterações das vias metabólicas enzimáticas (deficiência de fosfofructoquinase e deficiência de piruvato quinase) (Bonfanti et al. 2004; Piek 2017; Stokol 2017; Foote et al. 2020).

2.1.1.2. Anemia hemorrágica

Nas anemias hemorrágicas existe uma perda de sangue. Esta pode ser uma perda para o interior do corpo (para uma cavidade: abdominal, torácica, etc.) ou para o exterior do corpo (Stokol 2017).

As principais causas de anemia hemorrágica são: traumatismos (por exemplo: hemoperitoneu por torção esplênica ou traumatismo do fígado), traumatismo cirúrgico, hemangiossarcoma no baço (hemoperitoneu por rotura), neoplasias intestinais (por exemplo: carcinoma, leiomiossarcoma, linfoma), ulceração do tubo digestivo, queimaduras, parasitas (ancilostomídeos, coccídeos, pulgas, entre outros), alterações hemostáticas (trombocitopenia, por exemplo) e coagulopatias (Marchetti et al. 2005; Tvedten 2010; Harvey 2012b; Stokol 2017; Kundrapu and Noguez 2018).

Uma hemorragia externa crónica pode dar origem a uma anemia por deficiência de ferro, que tanto pode ser regenerativa como não regenerativa. Neste caso, o fator determinante para a ocorrência da anemia não é a perda de sangue *per se* mas sim da depleção do ferro que advém da mesma (Stokol 2017).

2.1.2. Anemia não regenerativa

As anemias não regenerativas são uma alteração clínica comum na prática veterinária. Os dois principais mecanismos patológicos que levam à anemia não regenerativa são redução ou ineficácia da eritropoiese ou diminuição do tempo de vida dos eritrócitos.

A anemia não regenerativa pode ocorrer, menos frequentemente, como resultado de alterações patológicas ao nível da medula óssea e, mais frequentemente, como uma

complicação de vários tipos de doenças e de processos patológicos exteriores à medula óssea (Grimes & Fry 2015).

A anemia normocítica normocrômica é a forma mais comum de anemia não regenerativa e ocorre geralmente por doenças extramedulares, particularmente anemia por doença inflamatória. As anemias não regenerativas também podem ser microcíticas hipocrômicas, tal como se verifica nas anemias por deficiência em ferro (Stokol 2017). Existe uma extensa lista de diagnósticos diferenciais possíveis de anemia não regenerativa. Na tabela 2 são enunciados alguns dos principais diagnósticos tendo em conta se a anemia ocorre por causas medulares ou extramedulares. (Hohenhaus and Winzelberg 2017):

Tabela 2| Diagnósticos diferenciais de anemia não regenerativa. (segundo Hohenhaus and Winzelberg 2017)

Causas Medulares	Causas Extramedulares
<p>Primárias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anemia aplástica; • Síndromes mielodisplásicas; • Síndromes mieloproliferativas; • Dismielopoiese; • Mielofitose: leucemia aguda e crónica, mieloma múltiplo; • Necrose da medula óssea. 	<ul style="list-style-type: none"> • Renal: lesão renal aguda, doença renal crónica; • Endócrino: hipoadrenocorticism, hipotiroidismo; • Gastrointestinal: deficiência sérica de cobalamina; • Pancreatite; • Neoplasia; • Falta de ferro: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Perda de sangue crónica pelo tubo digestivo (massa gastrointestinal, doença inflamatória intestinal significativa, ectasia vascular, parasitas gastrointestinais); ▪ Hematúria crónica (hematúria renal, massa urogenital); ▪ Outras perdas externas crónicas: massa dérmica, hemorragia orofaríngea, epistaxe, etc..
<p>Secundárias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecioso: parvovirose, erliquiose, sépsis; • Reação a fármacos: antibióticos, medicamentos quimioterápicos, estrogénios, fenobarbital, etc.; • Neoplasia: tumor de células de Sertoli, linfoma, etc.; • Congénita: osteosclerose por deficiência de piruvato quinase, má absorção de cobalamina, deficiência de cobre; • Imune: variante não regenerativa do AHIM, aplasia pura dos eritrócitos. 	

Legenda: AHIM – anemia hemolítica imuno-mediada.

2.2. Sinais clínicos e laboratoriais

Os sinais clínicos, que levam o proprietário de um animal a procurar um médico veterinário no caso de anemia, incluem letargia, anorexia, depressão, mucosas pálidas, icterícia, hematúria, entre outros sinais que podem variar mediante da causa subjacente (Piek et al. 2008; Hohenhaus and Winzelberg 2017; Kundrapu and Noguez 2018).

A realização do hemograma, a contagem de reticulócitos e a observação do respectivo esfregaço sanguíneo também nos dão informações importantes que confirmam a suspeita de anemia, mas também ajudam na sua classificação e, até mesmo, apontam imediatamente para a sua causa.

A contagem de reticulócitos permite-nos avaliar a resposta regenerativa da anemia. Assim, uma contagem $>110,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ é consistente com a regeneração e uma contagem $\leq 110,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ é considerada não regenerativa (Stanley et al. 2019).

A avaliação do esfregaço sanguíneo pode fornecer informação valiosa para o diagnóstico da doença subjacente. Alguns exemplos de alterações que podem ser observadas incluem: anisocitose, identificação de hemoparasitas, auto-aglutinação, inclusões eritrocitárias (corpos de Heinz, por exemplo), hipocromasia, poiquilocitose (Tvedten 2010; Buttarello 2016).

2.3. Mecanismos de compensação da anemia

Existem 3 mecanismos compensatórios fisiológicos para anemia, dos quais o primeiro é o aumento do débito cardíaco. O fornecimento de oxigénio é calculado multiplicando o débito cardíaco pela concentração de hemoglobina. Assim, os doentes com uma diminuição da concentração de hemoglobina, aumentam o débito cardíaco de modo a manter o fornecimento de oxigénio. Desta forma, animais com insuficiência cardíaca, aterosclerose, entre outras, apresentam concentrações de hemoglobina mais elevadas quando comparados com animais com função cardíaca normal (Cascio and DeLoughery 2017).

O aumento do volume do plasma é o segundo mecanismo compensatório. Este mecanismo provoca uma diminuição da viscosidade do plasma, permitindo que os eritrócitos circulantes consigam movimentar-se com maior eficiência. O aumento do volume plasmático também aumenta o débito cardíaco e ajuda a manter a pressão sanguínea (Cascio and DeLoughery 2017).

Por último, o 2,3-difosfoglicerato dos eritrócitos aumenta, que leva à diminuição da afinidade do oxigénio pela hemoglobina, e assim a um aumento do fornecimento de oxigénio aos tecidos. O elevado gradiente de pressão de oxigénio e nos alvéolos permite a oxigenação total da hemoglobina, apesar da diminuição da sua afinidade pelo O_2 , e uma maior libertação de O_2 a nível tecidual (Cascio and DeLoughery 2017).

2.4. Diagnóstico laboratorial

2.4.1. Eritrograma

2.4.1.1. Hematócrito, contagem total de eritrócitos e concentração de hemoglobina

O hematócrito, a contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina são parâmetros laboratoriais utilizados na rotina diária da prática de patologia clínica (Kundrapu and Noguez 2018).

Estes parâmetros devem estar, igualmente, reduzidos de forma proporcional à redução da massa eritróide, bem como refletir, da mesma forma, a gravidade da anemia no animal. Quando o HT, RBC e a Hgb não diminuem de forma semelhante numa anemia, os eritrócitos não têm um tamanho e uma concentração de hemoglobina normal. A avaliação das alterações nos índices eritrocitários (VCM e CHCM) pode ajudar a compreender os processos patológicos ou as causas da anemia. Os erros pré-analíticos e analíticos, também, podem causar discordância entre estes parâmetros (Tvedten 2010).

2.4.1.2. Índices eritrocitários (VCM, CHCM e RDW)

Como já foi referido, o VCM e CHCM são parâmetros utilizados na classificação das anemias podendo dar-nos informações valiosas no diagnóstico diferencial das mesmas. O VCM indica o tamanho médio dos eritrócitos. O CHCM, que indica a concentração média de hemoglobina por eritrócito, é calculado dividindo a Hgb pelo HT (Villiers, 2016b). Na tabela 3 são descritas possíveis causas para anemia de acordo com o seu VCM e CHCM.

O *red cell distribution width* (RDW) é, também, um parâmetro eritrocitário realizado pelos sistemas automatizados hematológicos. O RDW é usado para avaliar a anisocitose, e estima a variação no tamanho dos glóbulos vermelhos (Sim et al. 2017). É um indicador mais sensível da alteração do tamanho dos eritrócitos que o VCM, uma vez que, para este último, tem de existir um número relativamente elevado de células com tamanhos variados para que o valor médio seja alterado. Assim, o RDW descreve toda a população de eritrócitos em vez de um valor médio (Villiers, 2016b).

Tabela 3| Classificação de anemias por índices de eritrocitários e etiologia (segundo Harvey 2012b).

Índices Eritrocitários		Classificação	Doença ou Causa
VCM	N	Normocítica	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia hemolítica aguda ou hemorrágica aguda, se a MO ainda não teve tempo suficiente para a libertação de um número significativo de reticulócitos. • Anemia hemorrágica crónica • Inflamação crónica e neoplasia (às vezes ligeiramente microcítica) • Doença renal crónica • Deficiências endócrinas • Aplasia eritróide • Medula óssea aplástica e hipoplásica • Intoxicação por chumbo • Deficiência em cobalamina
CHCM	N	Normocrómica	
VCM	↑	Macroscítica	<ul style="list-style-type: none"> • Anemias regenerativas com reticulocitose acentuada • Estomatocitose hereditária • Artefacto por armazenamento prolongado da amostra de sangue
CHCM	↓	Hipocrómica	
VCM	↑	Macroscítica	<ul style="list-style-type: none"> • Anemias regenerativas • Síndromes mielodisplásicas • Anemia imuno-mediada não regenerativa • Mielofibrose • Macroscitose do caniche • Deficiência em folato (rara) • Artefacto em animais com hipernatremia persistente (pode ser hipocrómica)
CHCM	N	Normocrómica	
VCM	↓	Microscítica	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiência crónica em ferro • Shunts porto-sistémicos (vasos colaterais porto-sistémicos) • Anemia por doença inflamatória (geralmente normocítica) • Tratamento prolongado de EPO recombinante • Deficiência de cobre (rara) • Diseritropoiese familiar do Springer spaniel inglês (raro) • Artefacto em animais com hiponatremia persistente
CHCM	N / ↓	Normocrómica / Hipocrómica	

Legenda: VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular; N: normal; ↑: aumentado; ↓: diminuído; EPO: eritropoietina; MO: medula óssea.

2.4.2. Contagem de reticulócitos: manual e automática

A contagem manual de reticulócitos é realizada em esfregaços de sangue corados com corantes supravitais como, por exemplo, o novo azul de metileno e o azul cresil brilhante. Estes corantes provocam a precipitação do RNA ribossômico que formam agregados azuis observados nos reticulócitos (Tvedten 2010).

Os sistemas automatizados são mais precisos e exatos que os métodos de contagem manual. Com efeito, uma vez que é possível contar números muito mais elevados de células, a existência de erros cometida entre operadores é evitada e a variação na qualidade da coloração, como precipitados, é minimizada (Tvedten and Moritz 2010).

2.4.3. Morfologia no esfregaço sanguíneo

A observação do esfregaço sanguíneo pode dar informações adicionais sobre a morfologia dos eritrócitos como o grau de policromasia e de anisocitose, e a poiquilocitose. As formas eritrocitárias anormais devem ser classificadas o mais especificamente possível, uma vez que podem ajudar a determinar a causa da anemia (Tvedten 2010). Na tabela 4 estão descritas algumas doenças ou afeções/causas e alterações morfológicas eritrocitárias associadas.

Tabela 4| Alterações na forma eritrocitária associadas a causas e doenças/condições (segundo Tvedten 2010)

Formas Eritrocitárias	Doença ou Condição
Esferócito	<ul style="list-style-type: none">• Anemia hemolítica imuno-mediada• Transfusão sanguínea• Infecções parasitárias• Esferocitose hereditária• Intoxicação por zinco• Hipofosfatemia
Esquisócito e Queratócito	<ul style="list-style-type: none">• Coagulação intravascular disseminada• Insuficiência cardíaca congestiva• Glomerulonefrite• Mielofibrose• Hemangiossarcoma
Acantócito	<ul style="list-style-type: none">• Coagulação intravascular disseminada• Hemangiossarcoma• Shunts porto-sistêmicos• Hepatite crônica• Linfossarcoma• Glomerulonefrite

Tabela 4 | continuação

Formas Eritrocitárias	Doença ou Condição
Equinócito	<ul style="list-style-type: none"> • Artefacto • Linfossarcoma • Glomerulonefrite
Corpos de Heinz	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestão de cebola • Vitamina K • Tratamento com azul de metileno • Propilenoglicol • Intoxicação por zinco
Excentrócito	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento com vitamina K • Ingestão de cebola

2.4.4. Teste de fragilidade eritrocitária

A fragilidade osmótica dos eritrócitos (*erythrocyte osmotic fragility* – OF) é distinta nas anemias hemolíticas e anemias não hemolíticas.

A OF descreve a capacidade de as células incorporarem uma solução hipotónica. Assim, devido à sua relação área-volume, os eritrócitos normais conseguem fazê-lo em quantidades limitadas, sem se danificarem (Ciepiela et al. 2018).

Na anemia hemolítica imuno-mediada, existe frequentemente, num esfregaço sanguíneo, uma abundante esferocitose. Alguns autores sugerem que, quando colocados numa solução hipotónica, os esferócitos hemolisam em concentrações mais altas de NaCl do que os eritrócitos normais, devido à sua menor relação entre volume e superfície que leva a um aumento da OF (Paes et al. 2013).

Dois protocolos foram descritos, em cães, para avaliar a OF. O primeiro, ao qual chamamos de teste clássico de fragilidade osmótica (*classic osmotic fragility test* – COFT) e um segundo designado de teste rápido de fragilidade osmótica (*rapid osmotic fragility test* – ROFT) (Paes et al. 2013).

O teste clássico de fragilidade osmótica, por ser moroso e precisar de equipamento especializado, torna-se pouco prático e pouco adequado para uso na prática clínica diária, estando a ser substituído pelo teste rápido de fragilidade osmótica que é uma alternativa de mais simples execução (Ogunyemi and Olayemi 2016). Este teste é uma alternativa objetiva à identificação de esferócitos no esfregaço e pode ser realizada na prática clínica (Piek 2017).

III. Classificação de anemias em cães através de diferentes métodos analíticos

1. Introdução e objetivos do estudo

A anemia é uma das afeições mais comuns na prática médico-veterinária, e como tal, a sua avaliação clínica e laboratorial deve ser abordada de uma forma lógica. A anemia pode ser classificada de diversas formas que podem ajudar a determinar a sua causa em específico, e assim instituir uma terapêutica eficaz. O hemograma oferece dados muito importantes para o seu diagnóstico e, de acordo com a causa da anemia, os eritrócitos podem apresentar uma morfologia característica. Por sua vez, a contagem de reticulócitos permite-nos aferir sobre a resposta regenerativa da medula óssea. Por vezes, é necessário realizar-se uma biópsia da medula óssea para obter-se um diagnóstico definitivo. Para além do hemograma, da morfologia eritrocitária no esfregaço de sangue e da contagem de reticulócitos, a história pregressa, o exame clínico, e os resultados de outros testes diagnósticos (por exemplo, diagnóstico imagiológico) são também importantes para o diagnóstico final da causa da anemia (Harvey 2012b; Cascio and DeLoughery 2017).

O principal objetivo deste estudo foi classificar anemias de uma forma mais simples, prática e objetiva relacionando: o eritrograma, a avaliação da morfologia dos eritrócitos no esfregaço sanguíneo, a contagem de reticulócitos (manual e automática) e por fim o teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT).

Na medida em que ainda não existe nenhum teste *gold standard* para o diagnóstico da anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) canina, um outro objetivo deste estudo foi tentar perceber o valor diagnóstico do ROFT neste tipo de anemias, comparativamente à observação de esferócitos em esfregaços sanguíneos.

O presente estudo também teve como propósito comparar a contagem automática de reticulócitos, de um analisador hematológico automático, com a contagem manual de reticulócitos, de modo a comparar a sensibilidade de ambos os testes.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

2.1.1. Grupo de Estudo – Grupo com Anemia

O grupo de animais com anemia foi constituído por cães com mais de 6 meses, de qualquer raça e sexo com anemia confirmada.

Os animais do presente estudo foram selecionados de cães que compareceram à consulta no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária, no período de Junho a Dezembro de 2019.

2.1.2. Grupo Saudável – Grupo Controlo

O grupo de animais saudáveis foi constituído por cães com mais de 6 meses, de qualquer raça e sexo considerados saudáveis que não apresentavam alterações significativas no exame físico, no hemograma e análises bioquímicas.

À semelhança dos animais que constituem o grupo de estudo, os animais do grupo de controlo foram selecionados a partir de cães apresentados à consulta no HEV.

2.1.3. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram estabelecidos com base em diversas premissas que podem alterar os resultados das diferentes variáveis em estudo. Desta forma, os animais com menos de 6 meses foram excluídos, uma vez que os cachorros apresentam valores de referência hematológicos que, para além de serem diferentes dos adultos, variam com o analisador hematológico automático. Os cães com hiperlipidémia ou com defeitos hereditários da membrana eritrocitária também foram excluídos, visto que segundo Paes *et al.* (2013) podem levar a um aumento da fragilidade osmótica eritrocitária..

2.2. Colheita de sangue e acondicionamento da amostra

Todas as amostras de sangue dos animais do presente estudo foram recolhidas no HEV por venopunção da veia jugular, cefálica ou safena. Desta forma, foram colhidos 1 ml de sangue para um tubo de EDTA e armazenados a uma temperatura de 2-5°C. Todas as amostras foram processadas num espaço de 2 horas após a colheita no Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte da FMV-ULisboa.

2.3. Análise da história clínica dos animais em estudo

Em todos os animais em estudo foi analisada a sua história clínica e assim, feito um levantamento dos sinais clínicos e doenças apresentadas, de modo a classificar a anemia segundo a sua causa em: hemolítica ou hemorrágica (quando regenerativa) e medular ou extramedular (quando não regenerativa), bem como relacioná-los com os seus índices eritrocitários.

2.4. Análises laboratoriais

2.4.1. Eritrograma

O Eritrograma foi realizado no aparelho ProCyte Dx® Hematology Analyzer (*Idexx Laboratories, Inc.*), contemplando diversos parâmetros, nomeadamente o hematócrito, a contagem total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina, o VCM, CHCM e RDW, bem como a contagem de reticulócitos.

Na tabela 5, podem ser consultados os diferentes intervalos de referência dos parâmetros analisados neste estudo através do analisador hematológico ProCyte Dx*.

Tabela 5| Intervalos de referência de diferentes parâmetros em cães do analisador hematológico ProCyte Dx

Parâmetro	Intervalo de Referência
HT	37,3% – 61,7%
RBC	5,65 x10 ⁶ /µl – 8,87 x10 ⁶ /µl
Hgb	13,1 g/dl – 20,5 g/dl
VCM	61,6 fl – 73,5 fl
CHCM	32,0 g/dl – 37,9 g/dl
RDW	13,6% – 21,7%
Contagem de Reticulócitos	10,0 x10 ³ /µl – 110,0 x10 ³ /µl

Legenda: HT: hematócrito; RBC: eritrócitos; Hgb: concentração de hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular; RDW: *red cell distribution width*.

De acordo com estes intervalos de referência, foi feito o diagnóstico de anemia quando um cão apresentava um valor de HT<37,3%, de RBC<5,65x10⁶/µl e/ou Hgb<13,1g/dl. Para classificar a gravidade da anemia utilizaram-se os intervalos contemplados na tabela 1, assim, foi considerada como ligeira uma anemia com um HT entre 30% – 37,3%, como moderada uma anemia com HT entre 20% – 29%, como grave com um HT entre 13% – 19% e como muito grave com um HT<13%.

Em relação à classificação das anemias quanto ao seu VCM, quando este se encontrou dentro do intervalo de referência esta foi classificada como normocítica, quando o valor do VCM foi <61,5 fl ou >73,5 fl, esta foi considerada microcítica ou macrocítica, respetivamente. Quanto ao seu CHCM, estas foram classificadas como normocrómicas quando este se encontrou dentro dos valores de referência, e como hipocrómicas ou hiperocrómicas quando o CHCM foi <32,0 g/dl ou 37,9 g/dl, respetivamente.

Relativamente ao RDW considerou-se que existia anisocitose quando este foi >21,7%.

Para classificarmos a anemia como regenerativa ou não regenerativa considerou-se uma contagem de reticulócitos $>110,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ consistente com uma resposta regenerativa.

O analisador hematológico ProCyte Dx utiliza três tecnologias: citometria de fluxo a laser, fluorescência ótica, impedância de fluxo laminar, bem como o método SLS-hemoglobina.

A citometria de fluxo a laser analisa eritrócitos e reticulócitos. As suspensões celulares são canalizadas através de um orifício estreito no qual é focado um feixe laser de luz vermelha. Cada célula da suspensão celular interage isoladamente¹ com o feixe laser vermelho, dispersando frontalmente e lateralmente a sua luz. A análise da dispersão da luz dá informações sobre o tamanho, a complexidade, o conteúdo e estrutura de cada célula (IDEXX Laboratories 2016).

Na fluorescência ótica, o corante de reticulócitos liga-se a ácidos nucleicos nas células e é excitado pela luz vermelha do laser. Os espectros de fluorescência são capturados exclusivamente da luz normal dispersa lateralmente, apresentando um maior comprimento de onda do que o do laser utilizado. Este método é o *gold-standard* para determinar reticulócitos (IDEXX Laboratories 2016).

A impedância de fluxo laminar é o método mais rápido para analisar o tamanho e o número de glóbulos vermelhos. Neste método, uma suspensão celular diluída é canalizada para uma abertura de detecção, onde é aplicado um sinal elétrico. A variação da resistência elétrica medida pode determinar o tamanho e o tipo de cada célula. O analisador ProCyte Dx dispõe de uma tecnologia de manipulação do fluxo da amostra que garante que apenas uma célula esteja na abertura de cada vez, evitando contagens coincidentes ou recirculação da amostra (IDEXX Laboratories 2016).

O método SLS-hemoglobina, permite-nos saber a concentração de hemoglobina na amostra sem utilização de substâncias tóxicas, ao contrário de outros métodos. O reagente destrói os glóbulos vermelhos e glóbulos brancos na amostra, e os grupos hidrofílicos do SLS ligam-se ao grupo heme e formam um complexo colorido estável (SLS-HGB), que é analisado através um método fotométrico (Yufa, Dongsheng, Yan, & Bo, 2013).

¹ A passagem do fluxo pelo orifício estreito impede fisicamente a passagem de mais que uma célula em simultâneo

2.4.2. Observação e avaliação da morfologia eritrocitária

Para a avaliação de esfregaços sanguíneos, utilizou-se a coloração de Giemsa de acordo com o protocolo realizado neste laboratório. Assim, os esfregaços de sangue foram fixados com metanol durante 5-7 minutos, de seguida colocou-se o corante de Giemsa, igualmente durante 5-7 minutos, e, por fim, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com solução tampão e deixadas a secar.

A observação microscópica dos esfregaços foi feita, inicialmente, com objetivas de menor potência (x5, x10, x40) de modo a verificar a presença de autoaglutinação eritrocitária, de agregados leucocitários ou de agregados plaquetários, de microfilárias e de outros hemoparasitas. Posteriormente, o esfregaço foi observado numa ampliação de x1000 na zona da mono-camada. Nesta zona, a morfologia eritrocitária foi avaliada e registada como normal ou anormal. Observações adicionais sobre a morfologia dos eritrócitos, como o grau de policromasia, anisocitose e poiquilocitose também foram realizadas.

A anisocitose eritrocitária foi classificada de acordo com Harvey (2012b) em: ligeira (+) quando foram observados 7-15 eritrócitos com tamanhos diferentes por campo, moderada (++) quando foram observados 16-20 e abundante (+++) quando foram observados 21-29.

2.4.3. Contagem manual de reticulócitos

Para a contagem manual de reticulócitos utilizou-se o protocolo do Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte da FMV-ULisboa.

Assim, foram colocadas partes iguais 50 microlitros (μ l) de sangue e 50 μ l do corante azul de cresil brilhante, num *ependorf*. Seguidamente, a amostra foi homogeneizada e incubada a 37°C, em banho-maria, durante 20-30 minutos. Após este período, a amostra foi novamente homogeneizada e realizou-se um esfregaço sanguíneo, o qual após secagem foi observado ao microscópio.

O esfregaço foi observado com uma objetiva de menor potência (x10 ou x40) de modo a avaliar a distribuição dos reticulócitos. De seguida, avaliou-se o esfregaço na região da mono-camada, agora com uma objetiva de maior potência (x100), na qual se realizou a contagem dos reticulócitos.

O cálculo da percentagem de reticulócitos foi realizado da seguinte forma: foram observados quinze campos, com objetiva de x100 em óleo de imersão, e em cada campo foram contados os eritrócitos e os reticulócitos, obtendo-se a percentagem de reticulócitos. Para a contagem absoluta de reticulócitos multiplicou-se a o número de reticulócitos previamente calculado pela contagem de eritrócitos obtida pelo analisador hematológico (equação 1):

Equação 1:

$$\text{Contagem absoluta de reticulócitos} = \% \text{reticulócitos} \times \text{RBC}(/\mu\text{L})$$

A anemia foi considerada como regenerativa quando a contagem manual de reticulócitos foi $>110,0 \times 10^3/\mu\text{l}$, à semelhança do valor dado pela contagem automática de reticulócitos.

2.4.4. Teste rápido de fragilidade osmótica

O teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT) foi realizado com sangue fresco, até 2 horas após a sua colheita (Paleari and Mosca 2008). O protocolo laboratorial realizado foi aquele descrito por Piek (2017).

Para que se pudesse validar o teste existiu sempre um controlo, cujo teste foi realizado ao mesmo tempo e nas mesmas condições utilizando uma amostra de sangue de um cão saudável.

O material utilizado para a realização do ROFT consistiu em: quatro tubos de ensaio, uma seringa de 5 mililitros, duas pipetas de *Pasteur* e as amostras de sangue fresco em tubo de EDTA correspondentes ao animal em estudo e ao animal do controlo.

Para a realização do teste, a amostra de sangue do animal em estudo foi inicialmente separada em dois tubos, isto é, 5 gotas de sangue foram colocadas num tubo com 5 mililitros de solução de NaCl a 0,9% e outras 5 gotas num tubo com 5 mililitros de uma solução de NaCl a 0,55%. Estes tubos foram centrifugados a 2440g durante 5 minutos. O mesmo processo foi realizado, no mesmo tempo e condições, com o sangue do animal saudável (controlo). O modo de preparação das amostras realizado está descrito na tabela 6.

Tabela 6| Preparação das amostras para realização do ROFT. (segundo Piek 2017)

Tubo	0,9% NaCl	H ₂ O	Sangue controlo	Sangue paciente
1 (C)	5 ml	-	5 gotas	-
2 (C)	3 ml	2 ml	5 gotas	-
3 (E)	5 ml	-	-	5 gotas
4 (E)	3 ml	2 ml	-	5 gotas

Legenda: (C) – tubo com a amostra controlo; (E) – tubo com a amostra em estudo

O teste foi considerado negativo quando não foi observada qualquer diferença de cor do sobrenadante em ambos os tubos. Por sua vez, foi considerado positivo quando o sobrenadante no tubo com solução de NaCl a 0,55% estava com uma coloração avermelhada.

A figura 2 demonstra de forma esquematizada o protocolo do ROFT segundo Piek (2017).

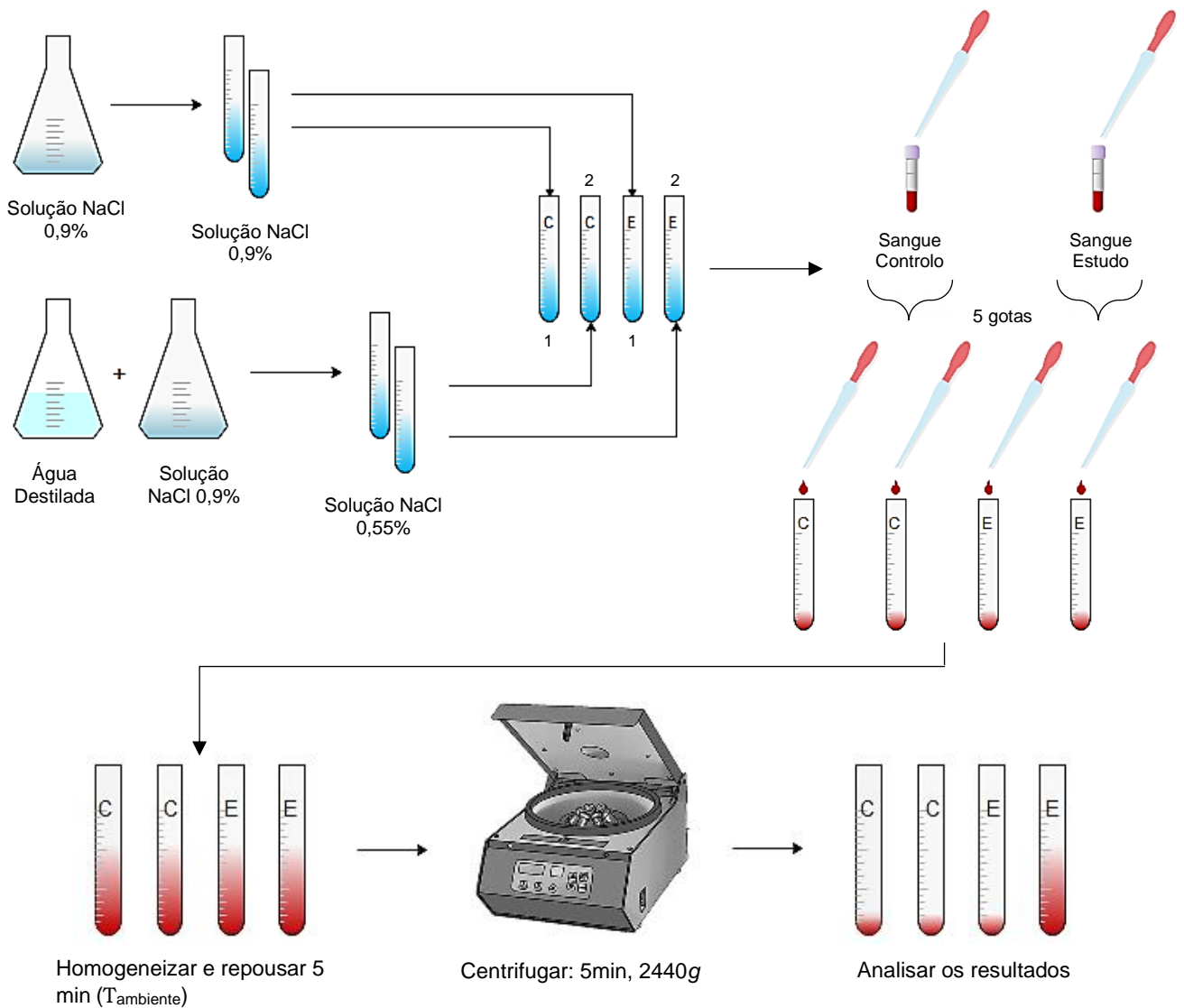


Figura 2 | Esquema do protocolo do teste rápido de fragilidade osmótica segundo Piek (2017).

Legenda: C – tubo com amostra controle; E – tubo com amostra em estudo; 1 – tubo com NaCl a 0,9%; 2 – tubo com NaCl a 0,55%.

2.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa R® (R Core Team 2019). Foi realizado o Teste Exato de Fisher e o cálculo da razão de probabilidades (*Odds Ratio*, OR) para verificar a relação do tipo de anemia com o grau de anisocitose. Para a comparação de variáveis, que não apresentavam distribuições normais, foi aplicado o teste não-paramétrico Kruskal Wallis com a realização de um teste Post-Hoc. Para determinação do valor de *cut-off* da variável RDW foi realizado um Teste Diagnóstico, utilizando como *gold standard* a anisocitose observada ao microscópico dicotomizada em “presença” (+ e ++) ou “ausência” (-) de anisocitose, com determinação de sensibilidade, especificidade e de uma ROC curve. A comparação entre os valores das contagens absolutas manuais e automáticas de reticulócitos foi feita segundo a Correlação de Pearson e a análise proposta por Bland-Altman (Bland and Altman 2010). Para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

A amostra em estudo, constituída por animais com anemia, era composta por 35 animais, dos quais 17 eram fêmeas e 18 machos. Das 17 fêmeas em estudo 4 eram inteiras (FR=11,4%) e 13 eram esterilizadas (FR=37,1%). Já relativamente aos machos, 12 eram inteiros (FR=34,3%) e 6 eram castrados (FR=17,1%) (Gráfico 1). As idades dos animais do grupo em estudo foram compreendidas entre 1 ano e 21 anos, com uma média de idades de 10,3 (\pm 4,3) anos de idade. As raças dos diferentes animais da amostra estão representadas no gráfico 2. -

Gráfico 1| Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo na amostra em estudo.

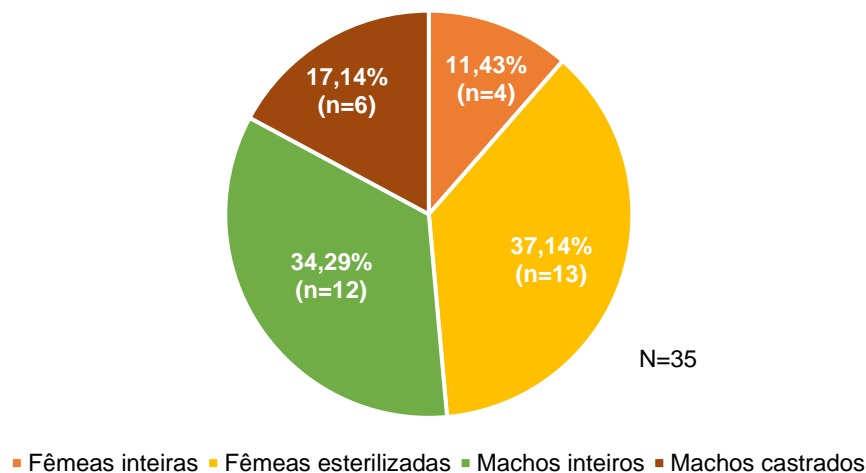
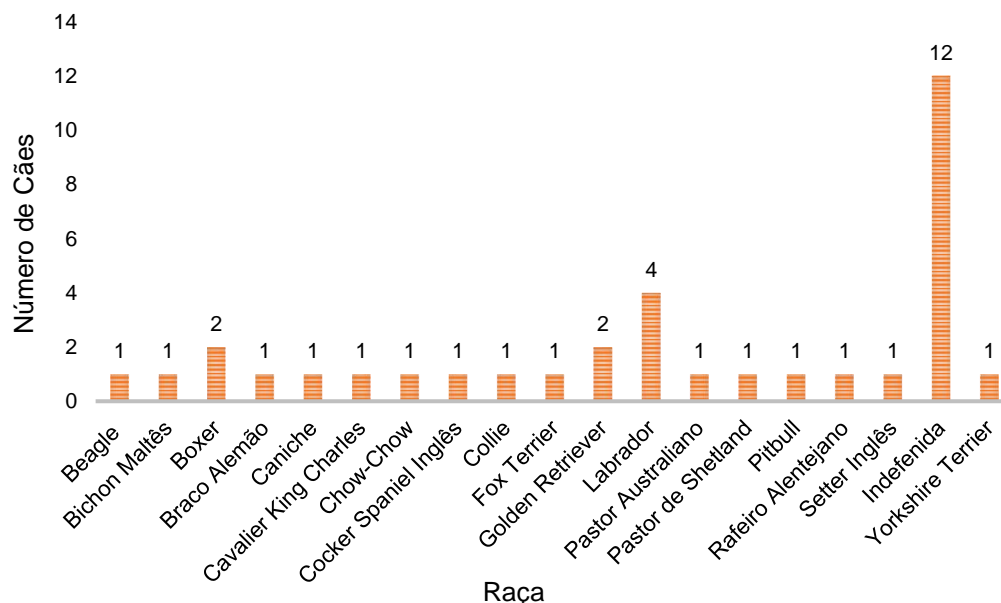


Gráfico 2| Distribuição das raças na amostra em estudo



3.2. Caracterização da amostra de acordo com a regeneração

De acordo com a regeneração, 19 animais foram classificados com uma anemia não regenerativa (FR=54,3%) e 16 animais com uma anemia regenerativa (FR=45,7%). No entanto, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre cães com uma resposta regenerativa e não regenerativa ($p=0,6121$).

As causas dos animais com anemia com base na doença e/ou sinais clínicos estão discriminadas no anexo 3 e 4. Nos animais com anemia não regenerativa ($n=19$), 13 apresentaram uma causa extramedular (FR=68,4%) e 6 uma causa medular (FR=31,6%). Nestes últimos, identificou-se uma causa medular primária em 3 animais (FR=15,8%) e nos restantes animais uma causa medular secundária (FR=15,8%). Nos animais com anemia regenerativa ($n=16$), 9 apresentaram uma anemia hemorrágica (FR=56,3%), em 3 a anemia era hemorrágica interna (FR=18,8%) e em 6 uma hemorrágica externa (FR=37,5%). Dos restantes 7 animais, com anemia regenerativa, 6 tinham uma anemia hemolítica, dentro dos quais apenas 1 animal tinha uma hemólise intravascular (FR=6,2%), 5 tinham uma hemólise extravascular (FR=31,2%), e apenas 1 dos animais apresentou, simultaneamente uma anemia regenerativa por causa hemorrágica e por causa hemolítica (FR=6,2%) (Tabela 7).

Tabela 7| Número e percentagem de animais segundo o tipo de anemia e a sua causa.

Tipo de Anemia	Causa	Frequência Relativa (%)	Total
Não Regenerativa	Medular	Primária	15,8% (n=3)
		Secundária	15,8% (n=3)
	Extramedular	68,4% (n=13)	
		100% (n=19)	54,3% (n=19)
Regenerativa	Hemorrágica	Interna	18,8% (n=3)
		Externa	37,5% (n=6)
	Hemolítica	Intravascular	6,2% (n=1)
		Extravascular	31,2% (n=5)
	Hemorrágica e Hemolítica	6,2% (n=1)	
	100% (n=16)	45,7% (n=16)	
			100% (N=35)

3.3. Relação da resposta regenerativa da anemia e o grau de anisocitose

Nos animais com anemia não regenerativa (n=19), 11 não apresentaram anisocitose (-) (FR=57,9%) e os 8 restantes uma anisocitose ligeira (+) (FR=42,1%) Não existiu nenhum animal com anemia não regenerativa com uma anisocitose moderada (++).

Dos animais com anemia regenerativa (n=16), 4 não apresentaram anisocitose (-) (FR=25,0%), 7 apresentaram uma anisocitose ligeira (+) (FR=43,8%) e 5 uma anisocitose moderada (++) (FR=31,2%). (Tabela 11).

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o tipo de anemia e o grau de anisocitose ($p_{\text{Fisher}}=0,014$).

Foi comparado o grupo de cães com anemia regenerativa sem anisocitose (-) com os cães com anisocitose ligeira (+) e obteve-se um *odds* de 1,75. Ao compararmos o grupo de cães com anemia não regenerativa sem anisocitose (-) com cães com anisocitose ligeira (+) obteve-se um *odds* de 0,73. Assim, ao compararmos os casos de cães com anemia regenerativa e não regenerativa com anisocitose ligeira e sem anisocitose obteve-se um *odds ratio* (OR) de 2,41.

Foi também comparado o grupo de cães com anemia regenerativa sem anisocitose com os cães com anisocitose moderada (++) e obteve-se um *odds* de 1,25. Ao compararmos o grupo de cães com anemia não regenerativa sem anisocitose (-) com cães com anisocitose moderada (++) obteve-se um *odds* de 0. Desta forma, ao compararmos os casos de cães com anemia regenerativa e não regenerativa com anisocitose moderada e sem anisocitose obteve-se um *odds ratio* (OR) infinito (∞).

Tabela 8| Número e percentagem de animais segundo o seu tipo de anemia e o grau de anisocitose.

Tipo de Anemia	Anisocitose			Total
	-	+	++	
Não Regenerativa	n=11 (57,9%)	n=8 (42,1%)	n=0 (0,0%)	n=19 (100%)
Regenerativa	n=4 (25,0%)	n=7 (43,8%)	n=5 (31,2%)	n=16 (100%)
Total	15 (42,9%)	15 (42,9%)	5 (14,3%)	N=35 (100%)

Legenda: - : ausência de anisocitose; + : anisocitose ligeira; ++ : anisocitose moderada.

3.4. Relação da resposta regenerativa da anemia com os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose

Neste estudo, 24 cães apresentaram uma anemia normocítica normocrômica (FR=68,5%) (anexo 1). Observou-se que nos cães com anemia não regenerativa (n=19), 16 tinham uma anemia normocítica normocrômica (FR=84,2%). Já nos cães com anemia regenerativa (n=16), 8 apresentaram uma anemia normocítica normocrômica (FR=50,0%), e 2 anemia macrocítica normocrômica (FR=12,5%) (Gráfico 3). No anexo 2 pode ser consultada a tabela com o número e percentagem dos cães segundo o tipo de resposta regenerativa da anemia e os seus índices eritrocitários.

Dos cães com anemia não regenerativa normocítica normocrômica (n=16), 10 não apresentaram anisocitose e 6 apresentaram anisocitose ligeira. Num cão, com anemia microcítica hipercrômica, e noutro, com anemia normocítica hipercrômica, foi observada uma anisocitose ligeira (Tabela 9).

No que diz respeito à anemia regenerativa, um cão com anemia macrocítica hipocrômica apresentou uma anisocitose moderada. Dois cães com anemia macrocítica normocrômica apresentaram uma anisocitose ligeira. Num cão com anemia microcítica hipocrômica não foi observada anisocitose. Dos dois cães com anemia microcítica normocrômica, um apresentou anisocitose ligeira e noutro não apresentou anisocitose. No cão com anemia normocítica hipocrômica foi observada uma anisocitose ligeira. Num dos cães com anemia normocítica normocrômica não foi observada anisocitose, em 3 animais foi observada uma anisocitose ligeira e em 4 animais uma anisocitose moderada (Tabela 10).

No anexo 3 e no anexo 4 pode ser consultada a caracterização dos animais com anemia regenerativa e não regenerativa, respetivamente, de acordo com: os índices eritrocitários, grau de anisocitose, causa, doença e/ou sinais clínicos.

Gráfico 3| Número e percentagem de cães segundo o tipo de resposta regenerativa da anemia e os seus índices eritrocitários

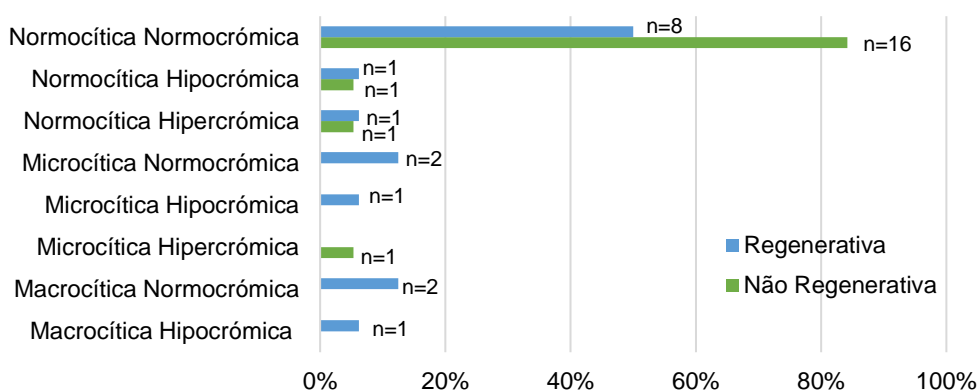


Tabela 9| Número de animais com anemia não regenerativa segundo os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose

Índices Eritrocitários	Grau de Anisocitose			Total
	-	+	++	
Microcítica, Hiperocrômica	n=0	n=1	n=0	n=1
Normocítica, Hiperocrômica	n=0	n=1	n=0	n=1
Normocítica, Hipocrômica	n=1	n=0	n=0	n=1
Normocítica, Normocrômica	n=10	n=6	n=0	n=16
				N=18

Legenda: - : ausência de anisocitose; + : anisocitose ligeira; ++ : anisocitose moderada.

Tabela 10| Número de animais com anemia regenerativa segundo os seus índices eritrocitários e o grau de anisocitose

Índices Eritrocitários	Grau de Anisocitose			Total
	-	+	++	
Macroscítica, Hipocrômica	n=0	n=0	n=1	n=1
Macroscítica, Normocrômica	n=0	n=2	n=0	n=2
Microscítica, Hipocrômica	n=1	n=0	n=0	n=1
Microscítica, Normocrômica	n=1	n=1	n=0	n=2
Normocítica, Hiperocrômica	n=1	n=0	n=0	n=1
Normocítica, Hipocrômica	n=0	n=1	n=0	n=1
Normocítica, Normocrômica	n=1	n=3	n=4	n=8
				N=16

Legenda: - : ausência de anisocitose; + : anisocitose ligeira; ++ : anisocitose moderada.

3.5. Gravidade da anemia

Os animais da amostra em estudo foram caracterizados de acordo com o grau de gravidade da anemia consoante o que está mencionado na Tabela 1. Assim, 11 animais foram classificados como tendo uma anemia ligeira (FR=31,4%) e 18 animais como tendo uma anemia moderada (FR=51,4%). Já as anemias graves surgiram em 4 animais (FR=11,4%) e as anemias muito graves em apenas 2 animais (FR=5,7%) (Gráfico 4).

Nos cães com anemia não regenerativa (n=19), 8 tinham uma anemia ligeira (FR=42,1%), outros 8 uma anemia moderada (FR=42,1%), 1 cão uma anemia grave (FR=5,3%) e, apenas, 2 cães uma anemia muito grave (FR=10,5%).

Nos animais com anemia regenerativa (n=16) 3 apresentaram uma anemia ligeira (FR=18,8%), 10 uma anemia moderada (FR=62,5%), 3 uma anemia grave (FR=18,8%), não existindo nenhum cão no estudo com anemia regenerativa muito grave (FR=0,0%) (Tabela 10).

Gráfico 4| Frequência relativa da classificação da gravidade de anemia

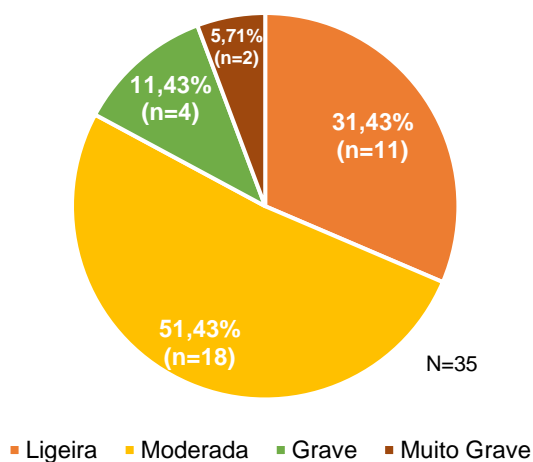


Tabela 11| Número e porcentagem de animais segundo o tipo de anemia e a sua gravidade.

Tipo de anemia	Gravidade da anemia				Total
	Ligeira	Moderada	Grave	Muito Grave	
Não Regenerativa	42,1% (n=8)	42,1% (n=8)	5,3% (n=1)	10,5% (n=2)	100% (n=19)
Regenerativa	18,8% (n=3)	62,5% (n=10)	18,8% (n=3)	0,0% (n=0)	100% (n=16)

3.6. Relação entre a contagem absoluta de reticulócitos dos animais com anemia regenerativa e a gravidade da anemia

Foi também realizada uma relação entre a contagem absoluta de reticulócitos dos animais com anemia regenerativa e a gravidade da anemia. Assim, nos animais com anemia regenerativa ligeira a contagem absoluta de reticulócitos teve uma mediana de $190,355 \times 10^3/\mu\text{l}$, com anemia moderada uma mediana de $191,190 \times 10^3/\mu\text{l}$, e com anemia grave uma mediana de $218,561 \times 10^3/\mu\text{l}$. No entanto, não existiu uma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes graus de gravidade e a contagem absoluta de reticulócitos ($p=0,6758$).

3.7. Relação entre o RDW e a Anisocitose

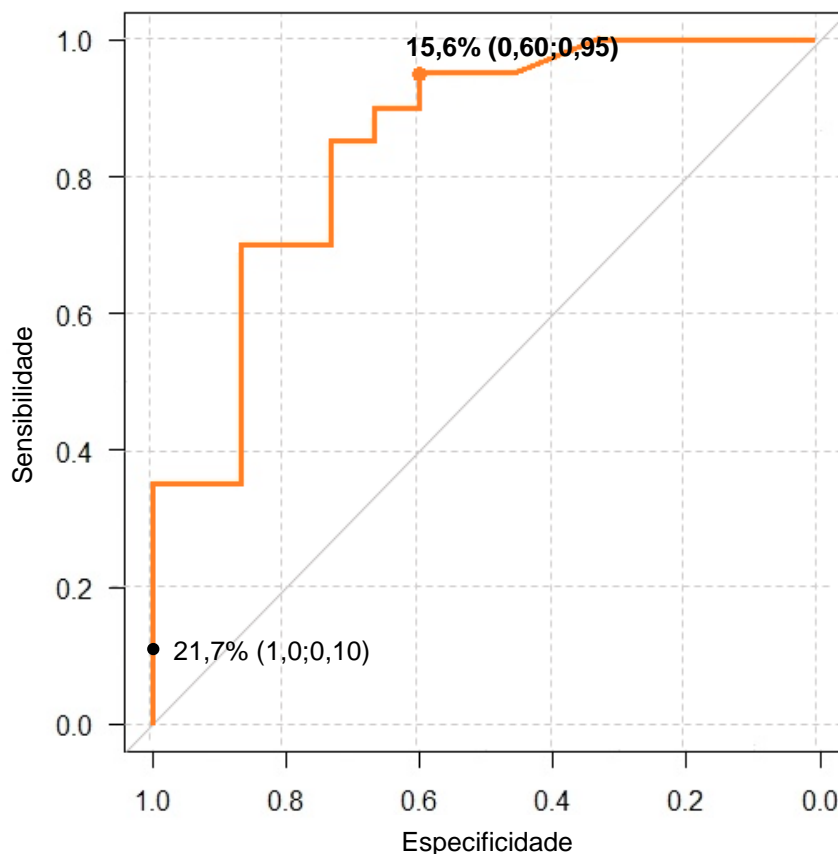
Dos animais em estudo que não apresentaram anisocitose (-), o RDW teve uma mediana de 15,3%, com um mínimo de 14,30% e um máximo de 18,7%. Nos animais com uma anisocitose ligeira (+), a média do RDW foi 17,2%, com um valor de RDW mínimo de 15,2%

e um máximo de 31,0%. Dos animais com uma anisocitose moderada (++) , o RDW teve uma média de 19,3%, sendo que o valor mínimo observado foi de 17,6% e o máximo de 23,8%.

Verificou-se que existia uma diferença estatisticamente significativa entre o grau de anisocitose e o RDW (Kruskal-Wallis: $p=0,0005601$). Com o teste Post-hoc verificou-se que existia uma diferença significativa entre o grupo que não apresenta anisocitose (-) e o grupo com uma anisocitose moderada (++) ($p=0,0119$). Porém, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo que não apresentava anisocitose (-) e o grupo com anisocitose ligeira (+) ($p=0,0599$) nem entre o grupo com anisocitose ligeira (+) e o grupo com anisocitose moderada (++) ($p=0,3569$).

Ao realizar-se um Teste Diagnóstico para determinar o valor de *cut-off* da variável RDW na amostra dos animais em estudo, utilizando como *gold standard* a anisocitose, obteve-se um valor de *cut-off* de RDW de 15,6% (melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade), com uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 60% (Gráfico 5). Para um valor de RDW de 21,7% a especificidade foi de 100% e a sensibilidade de 10%. O valor de especificidade 100% obteve-se para um RDW maior que 19,0%, e a sensibilidade de 100% para um RDW menor que 15,2%. A área sob a curva teve um valor de 84,7% (IC 95% de 71,2% a 98,1%).

Gráfico 5| ROC curve da variável RDW comparada com a presença ou ausência de anisocitose



3.8. Relação da resposta regenerativa da anemia e o teste rápido de fragilidade osmótica

Dos 19 animais em estudo com anemia não regenerativa, 14 apresentaram um teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT) negativo (FR=73,7%) e 5 um teste positivo (FR=26,3%). Os 16 animais com uma anemia regenerativa, 13 apresentaram um ROFT negativo (FR=81,2%), e 3 apresentaram um teste positivo (FR=18,8%) (Tabela 12). Não foi observada a existência de correlação entre a resposta regenerativa da anemia e o ROFT ($p=0,700$). Na figura 3 podemos ver um exemplo de um ROFT negativo obtido no estudo, e nas figuras 4 e 5 dois exemplos diferentes de um ROFT positivo, na figura 4 primeiro com uma ligeira alteração da cor no sobrenadante da amostra, e na figura 5 uma alteração moderada na cor do sobrenadante.

Tabela 12| Número e percentagem de animais segundo o tipo de anemia e o ROFT

Tipo de Anemia	ROFT		Total
	Negativo	Positivo	
Não Regenerativa	73,7% (n=14)	26,3% (n=5)	100% (n=19)
Regenerativa	81,2% (n=13)	18,8% (n=3)	100% (n=16)

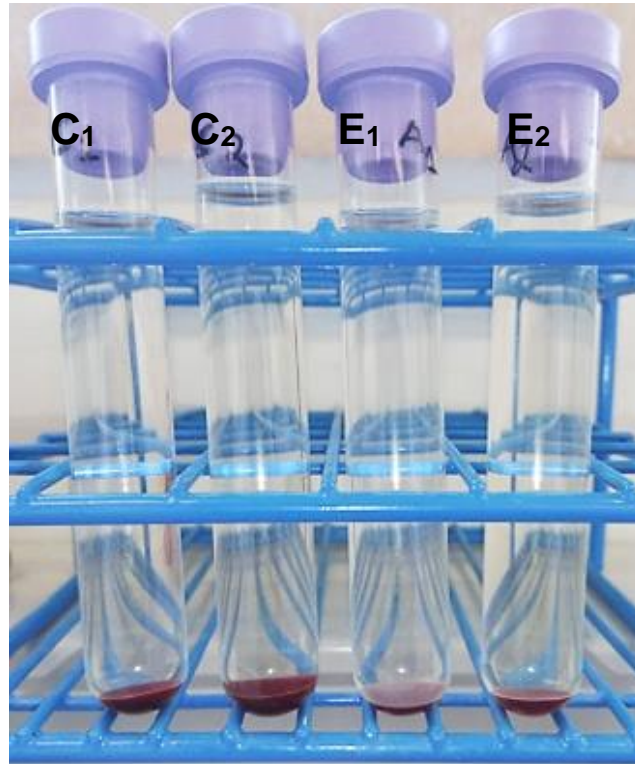


Figura 3| ROFT negativo de um cão da amostra em estudo.

Legenda: C₁ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,9%; C₂ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,55%; E₁ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,9%; E₂ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,55%.



Figura 4| ROFT positivo de um cão da amostra em estudo.

Legenda: C₁ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,9%; C₂ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,55%; E₁ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,9%; E₂ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,55%.

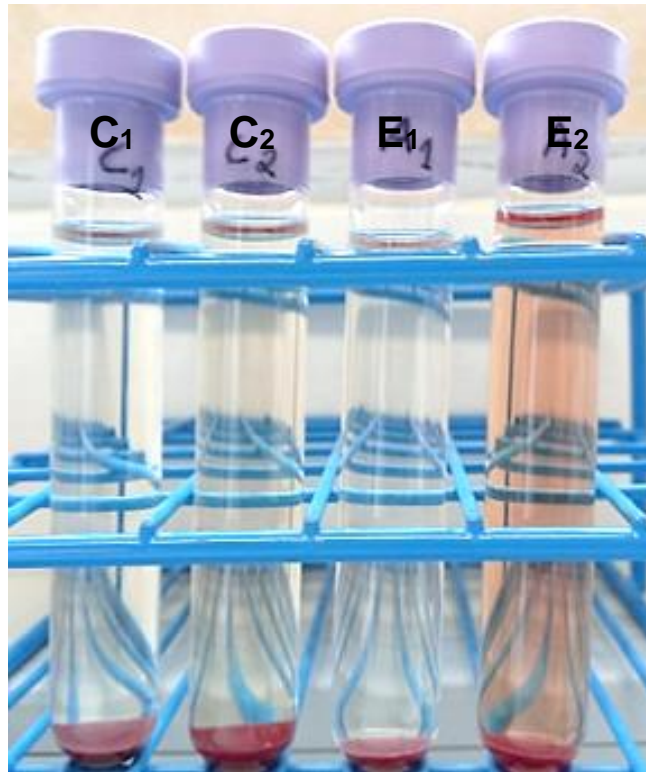


Figura 5| ROFT positivo de um cão da amostra em estudo.

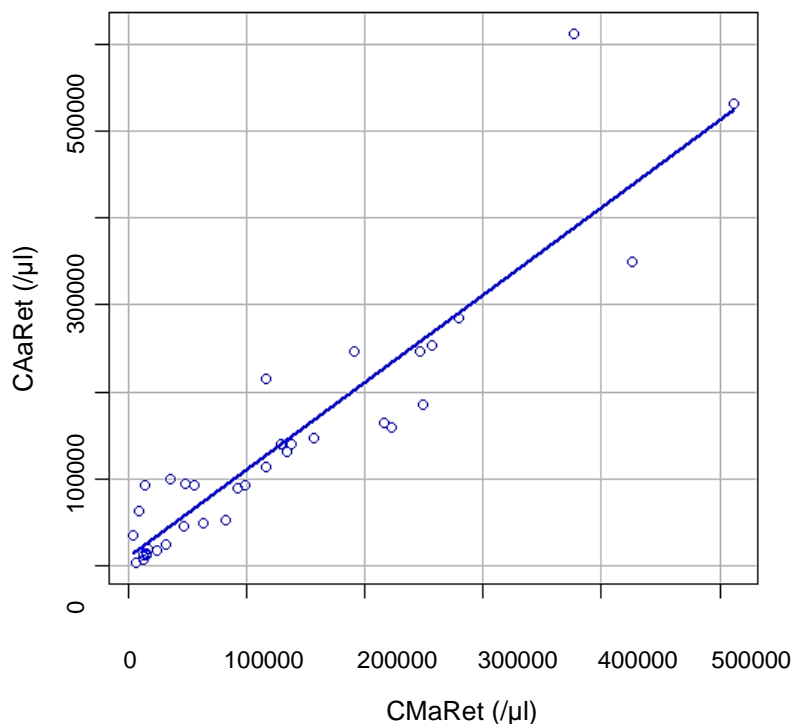
Legenda: C₁ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,9%; C₂ – tubo da amostra controlo com NaCl a 0,55%; E₁ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,9%; E₂ – tubo da amostra em estudo com NaCl a 0,55%.

3.9. Comparação entre a contagem manual e automática absoluta de reticulócitos

O gráfico 7 da correlação mostrou uma concordância espectral entre os dois métodos de contagem, assim, obteve-se uma correlação forte entre elas ($R: 0,92$), significativa ($p=3,925 \times 10^{-15}$).

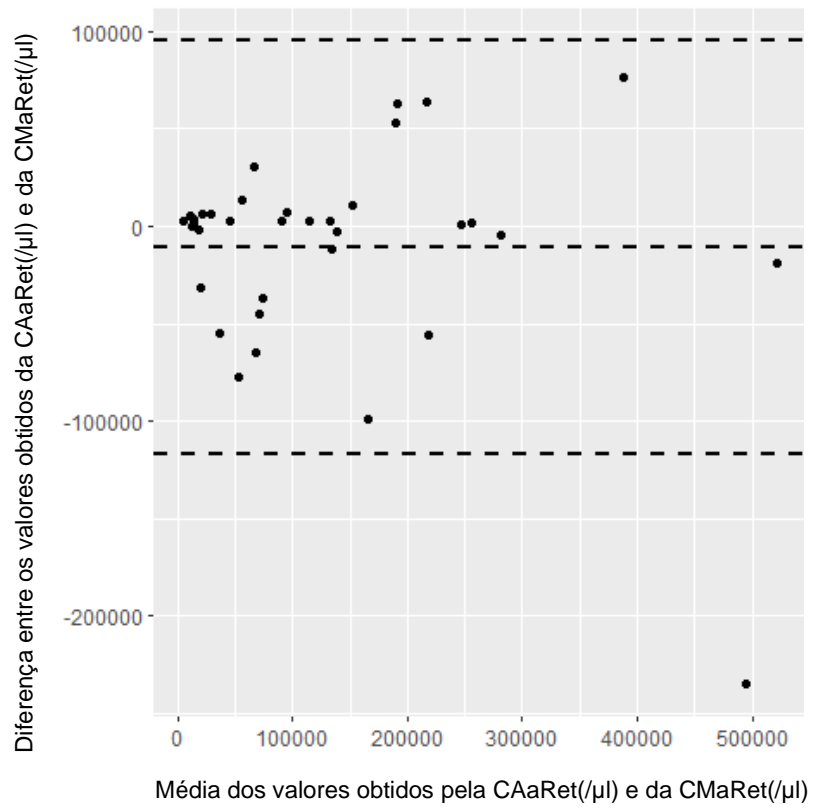
A análise estatística realizada pelo método de Bland-Altman, demonstrou que apenas 1 ponto em 35 (2,9%) está fora do intervalo $média \pm 1,96 DP$. O valor médio da diferença entre as contagens manuais e automáticas é negativo (~ -10.000). No entanto, o intervalo de confiança para essa diferença inclui o valor 0, pelo que a hipótese nula (média das diferenças é igual 0) não pode ser rejeitada, ou seja, os dois métodos equivalem-se.

Gráfico 6| Reta de correlação da Contagem Absoluta Manual e Automática de Reticulócitos.



Legenda: **CMaRet (/µl)** - Contagem Manual Absoluta de Reticulócitos;
CAaRet(/µl) - Contagem Automática Absoluta de Reticulócitos;

Gráfico 7| Análise de Bland-Altman entre os valores obtidos pela CMAret e CAaRet



4. Discussão

A anemia é uma das alterações hematológicas mais frequentemente encontrada na prática clínica veterinária (Stokol 2017). A detecção rápida da anemia e a determinação da etiologia são essenciais para o tratamento do paciente, uma vez que o tratamento depende do tipo, da causa e da gravidade da anemia. No entanto, o diagnóstico de anemia pode ser particularmente desafiante, já que a maioria dos pacientes é assintomático e a causa subjacente pode ser multifatorial (Kundrapu and Noguez 2018). Assim, para além do hemograma realizado pelo contador automático aparelho ProCyte Dx* Hematology Analyzer (*Idexx Laboratories, Inc.*), classificamos anemias, dos animais do presente estudo, com diferentes métodos analíticos, nomeadamente a observação e avaliação ao microscópio óptico do esfregaço de sangue, o teste rápido de fragilidade osmótica, e a contagem manual de reticulócitos.

No total dos cães em estudo (n=35), em relação à resposta regenerativa da anemia, a resposta foi de não regenerativa em 19 cães (FR=54,3%) e de regenerativa em 16 cães (FR=45,7%). De acordo com Hohenhaus & Winzelberg (2017) a anemia não regenerativa é a mais comum em cães e, apesar de no presente estudo a frequência relativa de cães com anemia não regenerativa ter sido superior aos cães com anemia regenerativa, não se verificou uma diferença significativa entre cães com uma resposta regenerativa e cães com uma resposta não regenerativa (p=0,6121), o que pode ser devido a um número insuficiente de cães da amostra em estudo.

Foi também estudada a frequência das causas das anemias dentro das anemias regenerativas e não regenerativas. Nos cães com anemia não regenerativa (n=19), em 13 cães a causa da anemia foi extramedular, e nos restantes 6 medular. Estes valores são concordantes com o descrito por Grimes & Fry (2015), que afirmam que a causa mais frequente de anemia não regenerativa é a extramedular, por processos patológicos ou doenças exteriores à medula óssea. Nos cães com anemia regenerativa (n=16), em 9 cães a causa foi perda de sangue (hemorragia), dos quais em 3 a hemorragia foi interna e em 6 a hemorragia foi externa. A destruição de eritrócitos (hemólise) foi encontrada em 6 cães, nos quais 5 a hemólise foi extravascular e apenas 1 apresentou hemólise intravascular. Num cão, a causa da anemia foi por perda de sangue e por destruição de eritrócitos.

Relativamente à relação entre o grau de anisocitose e o tipo de resposta regenerativa da anemia, confirmou-se ($p_{\text{Fisher}}=0,014$) a maior ocorrência de anisocitose quando a anemia é regenerativa do que nos casos de anemia não-regenerativa. Com efeito, dos 19 cães com anemia não regenerativa, 11 cães (FR=57,9%) não tinham anisocitose (-) e apenas 8 (FR=42,1%) tinham uma anisocitose ligeira (+). Já nos 16 cães com anemia regenerativa, 12 tinham anisocitose [7 (FR=43,8%) com anisocitose ligeira (+) e 5 (FR=31,2%) com anisocitose moderada (++)], contra apenas 4 (FR=25,0%) sem anisocitose.

Ao compararmos os casos de cães com anemia regenerativa e não regenerativa com anisocitose ligeira e sem anisocitose obteve-se um *odds ratio* (OR) de 2,40, o que significa que a *chance* ou *possibilidade* (*odds*) de ter anisocitose ligeira quando a anemia é regenerativa é 2,40 vezes maior do que a *chance* ou *possibilidade* de ter anisocitose ligeira quando a anemia é não regenerativa. Da mesma forma, ao compararmos os casos de cães com anemia regenerativa e não regenerativa com anisocitose moderada e sem anisocitose obteve-se um *odds ratio* (OR) infinito (∞), o que significa que a anisocitose moderada ocorre certamente quando a anemia é regenerativa.

A anisocitose (ligeira e moderada – os dois graus observados na amostra em estudo) foi observada em 75% dos cães com anemia regenerativa. Já nos cães com anemia não regenerativa foi observada anisocitose, mas apenas ligeira (+), em 42,1% dos casos. Estes resultados vão de encontro ao descrito por Villiers (2016a), que refere que a anisocitose, entre outros, é uma das formas de identificar uma resposta regenerativa da anemia num esfregaço de sangue. Por outro lado, este autor, também, menciona que numa anemia não regenerativa é raro encontrar-se eritrócitos de diferentes tamanhos.

Relativamente ao tipo de resposta regenerativa da anemia e aos seus índices eritrocitários, observou-se que dos cães com anemia não regenerativa (n=19), 16 animais tinham uma anemia normocítica normocrómica (FR=84,2%), o que vai ao encontro do descrito por Paltrinieri (2014), que afirma que a anemia normocítica normocrómica é a mais comum nas anemias não regenerativas. Um dos cães com anemia não regenerativa apresentou uma anemia microcítica hiperocrómica e, um outro, uma anemia normocítica hiperocrómica. No entanto, uma vez que as anemias hiperocrómicas não estão descritas na medicina veterinária, este aumento do CHCM foi provavelmente um artefacto devido a hemólise *in vitro* (Comazzi et al. 2004; Tvedten 2010). O aumento do CHCM também poderia ter ocorrido devido à presença de corpos de Heinz, apesar de estes não terem sido identificados na observação do esfregaço de sangue (Tvedten 2010). No cão com anemia normocítica hipocrómica, uma vez que estes índices eritrocitários normalmente não ocorrem, e também não foi observada policromasia no esfregaço de sangue do animal, a diminuição do CHCM foi, provavelmente, um erro analítico.

Nos cães com anemia regenerativa (n=16), a anemia normocítica normocrómica foi a mais frequente, tendo sido observada em 8 dos cães (FR=50,0%). Apesar das anemias regenerativas serem normalmente macrocíticas, devido ao aumento da libertação de reticulócitos por parte da medula óssea, segundo Paltrinieri (2014) uma anemia por perda de sangue ou por destruição eritrocitária, nos primeiros dias é normocítica normocrómica. Esta situação deve-se ao número muito baixo de reticulócitos no sangue e assim, o VCM não é modificado e ainda não existe anisocitose e policromasia. No entanto, a observação ao microscópio dos esfregaços de sangue revelou que apenas num dos cães com anemia normocítica normocrómica não foi observada, anisocitose o que vai ao encontro do o descrito por Hodges &

Christopher (2011), que afirmam que a observação do esfregaço sanguíneo demonstra ser mais sensível que os índices eritrocitários na deteção de poucos eritrócitos macrocíticos.

A anemia macrocítica normocrômica foi observada em 2 cães (FR=12,5%) com anemia regenerativa, o que está de acordo com o descrito por Harvey (2012b). Com efeito, nas anemias regenerativas, a diminuição do CHCM nem sempre está presente. Um cão apresentou uma anemia macrocítica hipocrômica. Estes índices eritrocitários são característicos das anemias regenerativas, uma vez que os reticulócitos são libertados no sangue em número suficiente para provocar um aumento do VCM e uma diminuição de HCM ou CHCM (Paltrinieri 2014). Apesar de apenas ter sido observada uma anemia macrocítica hipocrômica, num estudo realizado por Hodges & Christopher (2011), à semelhança do presente estudo, apenas um cão em dez com anemia regenerativa apresentou uma anemia macrocítica hipocrômica. Tal facto deve-se a uma resposta regenerativa fraca e que pode não ser suficiente para afetar os índices eritrocitários.

Um dos cães com anemia regenerativa apresentou uma anemia microcítica hipocrômica, e dois cães uma anemia microcítica normocrômica. Apesar destes dois tipos de anemia não serem, frequentemente, observados nos cães com anemia regenerativa, sabemos que no primeiro caso a causa de anemia foi a espoliação sanguínea (infestação por pulgas), que poderá ter levado a uma anemia por deficiência em ferro. No caso dos dois cães com anemia microcítica normocrômica, a causa subjacente de um deles foi hematuria intermitente, isto é, tinha uma perda de sangue para o exterior, o que poderá ter conduzido à diminuição do VCM. Já no outro cão, a anemia deveu-se a uma síndrome de fragmentação eritrocitária, por cirrose hepática, o que vai ao encontro do descrito por Bradbury (2017), que afirma que uma doença hepática crónica pode causar uma anemia microcítica normocrômica. Neste caso, pensamos que a diminuição do VCM poderá ter sido devida ao aparecimento de esquisócitos originados pela síndrome de fragmentação eritrocitária, por estes serem mais pequenos que os eritrócitos normais. Outro cão tinha uma anemia normocítica hiperocrômica e um outro, uma anemia normocítica hipocrômica. No entanto, estes índices são raros e provavelmente deveram-se a erros analíticos; para além disso, no caso do cão com anemia normocítica hipocrômica foi observada anisocitose ligeira no esfregaço.

A maioria dos nossos animais tinha uma anemia moderada (FR=51,43%; n=18) ou ligeira (FR=31,43%; n=11), sendo os casos de cães com anemia grave (FR=11,43%; n=4) e muito grave (FR=5,71%; n=2) menos frequentes, tal como observado por Chervier et.al (2012). Verificou-se que os cães com anemia regenerativa e com um grau de anemia moderada e grave tinham frequências superiores comparativamente aos cães com anemia não regenerativa (FR=62,5%, FR= 18,8% *versus* FR=42,1%, FR=5,3%, respetivamente). Para além disso, nos cães com anemia regenerativa existia, com o aumento da gravidade da anemia, um aumento da resposta reticulocitária (mediana da contagem absoluta de reticulócitos

dos cães com anemia ligeira, moderada e grave, respetivamente: $190,355 \times 10^3/\mu\text{l}$, $191,190 \times 10^3/\mu\text{l}$, $218,561 \times 10^3/\mu\text{l}$). Apesar de não se ter verificado uma diferença significativa ($p=0,6758$), estes resultados estão de acordo com Villiers (2016b). De facto, segundo este autor, numa anemia regenerativa, em que é mantida a atividade normal da medula óssea, a magnitude da resposta dos reticulócitos deve corresponder à gravidade da anemia.

Ao estudarmos a relação do RDW com a anisocitose, verificámos que apenas a distribuição do RDW para o grupo com anisocitose moderada (++) se distinguia significativamente da distribuição do RDW para o grupo sem anisocitose (-) ($p=0,0199$). Assim, o $\text{RDW} > 21,7\%$ que, de acordo com o intervalo de referência dado pelo analisador hematológico, é o valor acima do qual se considera a presença de anisocitose, permite concluir com relativa segurança a ocorrência de anisocitose (verdadeiros positivos), mas não identifica muitos outros casos de ocorrência de anisocitose (falsos negativos).

De modo a quantificar a sensibilidade e especificidade do RDW para detetar a ocorrência de anisocitose, realizou-se um teste diagnóstico para o RDW utilizando a anisocitose observada ao microscópio como *gold standard*. Assim, obtivemos uma ROC-curve, que indicou que um valor de RDW de 15,6% detinha um melhor poder estatístico de discriminação, com sensibilidade de 95% e especificidade de 60%. Desta forma, podemos aferir, de acordo com a amostra em estudo, que para um valor de RDW acima de 15,6% a probabilidade de um cão apresentar anisocitose é de 95%. Ao compararmos a sensibilidade e especificidade do *cut-off* obtido no estudo com o facultado pelo analisador ProCyte Dx (21,7%), percebemos que, apesar deste último, de acordo com a amostra, ter uma especificidade de 100%, tem uma sensibilidade muito fraca, isto é, de apenas 10%, o que poderá levar a um subdiagnóstico de anisocitose (muitos falsos negativos).

O RDW descreve a variação do tamanho de toda a população de eritrócitos, e está geralmente aumentado no caso de cães com anemia regenerativa e com anemia por deficiência em ferro, o que significa que aumenta quando estão presentes eritrócitos de maiores dimensões ou eritrócitos de menores dimensões (Villiers 2016b). No entanto, quando existe um número reduzido de eritrócitos com tamanhos diferentes, esta variação de tamanho pode não ser suficiente para levar ao aumento do RDW. De facto, já foi demonstrado que a observação e avaliação do esfregaço de sangue é mais sensível que os índices eritrocitários para detetar números baixos de eritrócitos macrocíticos (Hodges and Christopher 2011). Uma vez que o RDW também aumenta com populações mista de eritrócitos normocíticos e microcíticos, não é tão específica na identificação de uma resposta regenerativa da anemia (Hodges and Christopher 2011), ao contrário da classificação da anisocitose por observação do esfregaço ao microscópio.

Em relação ao tipo de resposta regenerativa e ao teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT), dos cães com anemia não regenerativa, 14 ($\text{FR}=73,7\%$) apresentaram um ROFT

negativo e 5 (FR=26,3%) um teste positivo. Nos animais com anemia regenerativa, 13 cães (FR=81,2%) apresentaram um ROFT negativo, e 3 (FR=18,8%) apresentaram um teste positivo. Não houve uma correlação entre a resposta regenerativa da anemia e o ROFT ($p=0,700$).

Num estudo realizado por Paes et al. (2013), os autores concluíram que é muito provável um cão ter anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) quando estamos perante um teste ROFT positivo, caracterizado por um sobrenadante límpido sem alteração de cor no primeiro tubo e vermelho no segundo tubo. No presente estudo, os cães com um teste ROFT positivo apresentaram apenas uma ligeira/ moderada alteração de cor no sobrenadante do segundo tubo.

Em dois cães do nosso estudo com um ROFT positivo, um tinha uma lesão compatível com um tumor esplénico e um outro um trombo na veia esplénica e gástrica. Estas lesões poderão ter desencadeado uma síndrome de fragmentação eritrocitária e assim o aparecimento de esquisócitos, que de acordo com Barcellini and Fattizzo (2015), é um marcador de hemólise. Com efeito, o teste positivo poderá dever-se ao sangue já se encontrar ligeiramente hemolizado.

Em relação aos restantes cães com um teste ROFT positivo, não foram encontradas possíveis causas que pudessem levar a este resultado. Desta forma, o teste positivo poderá dever-se ou a uma possível hiperlipidémia, que segundo Paes et al. (2013) pode originar um aumento no OF, ou a hemólise da amostra por recolha e/ou acondicionamento inadequado da amostra de sangue. Apesar de a lipidémia ter sido um critério de exclusão neste estudo, alguns cães poderão não ter sido excluídos do estudo por falha na sua identificação ou por esta ser ligeira.

O anticoagulante escolhido no acondicionamento da amostra de sangue também poderá ter levado ao aparecimento de falsos positivos no ROFT, uma vez que já foi descrito por Kafka and Yermiahu (1998) que o uso de EDTA como anticoagulante em seres humanos demonstrou aumentar a OF dos eritrócitos. No entanto, o EDTA é um anticoagulante utilizado frequentemente na prática clínica e o seu uso simplificava as análises laboratoriais necessárias para o estudo, tendo sido decidido a sua utilização em lugar da heparina, que seria o anticoagulante mais adequado.

Foi feito um esforço para que as amostras fossem processadas até duas horas após a colheita de sangue tal como recomendado por Paleari and Mosca (2008). No entanto, é possível que algumas amostras do estudo possam ter sido analisadas com um intervalo superior a duas horas após a sua colheita levando ao aparecimento de falsos positivos no ROFT.

No presente estudo, houve suspeita de AHIM em apenas dois cães. Ambos apresentavam uma anemia regenerativa; contudo, não foram identificados esferócitos no esfregaço de sangue. A AHIM idiopática que está entre as doenças imunomediadas mais comuns que afetam cães (Goggs et al. 2015) é caracterizada pela destruição de eritrócitos revestidos por

imunoglobulinas, por complemento ou ambos (McCullough 2003). A observação de extensa esferocitose na análise do esfregaço de sangue coloca esta doença como hipótese de diagnóstico. No entanto, a identificação de esferócitos é subjetiva e requer alguma experiência (Piek 2017). Paes et al. (2013) afirmam que é possível que o ROFT tenha uma sensibilidade superior para diagnóstico de AHIM, uma vez que um número baixo ou moderado de esferócitos pode não ser detetado no esfregaço de sangue. De acordo com Piek (2017), o aumento da OF na AHIM deve-se à presença de esferócitos, ou outras alterações na membrana mediado pelo complemento. Com efeito, uma vez que os esferócitos têm uma baixa relação área-volume, hemolisam-se facilmente em soluções de NaCl <0,9% (Ciepiela et al. 2018).

Num dos cães com suspeita de AHIM não foi realizado mais nenhum teste de diagnóstico para sua confirmação, como por exemplo o Teste de Coomb's Direto. Porém, a falta de identificação de esferócitos no esfregaço de sangue e o ROFT negativo não sustentavam o diagnóstico de AHIM.

No outro caso de suspeita de AHIM, o cão já estava a receber terapêutica com corticosteróides, quando foi realizado o Teste de Coomb's Direto, o qual foi negativo. Um estudo realizado por Kamesaki et al. (2009) no Homem, com AHIM, revelou que todos os pacientes com um Teste de Coomb's Direto negativo já tinham iniciado uma terapêutica com corticosteróides antes da realização do teste. Assim, no caso deste animal, o teste negativo poderá ter sido devido ao facto de já estar a ser tratado com corticosteróides. De facto, de acordo com Slappendel (1998) e Paes et al. (2013) o Teste de Coomb's Direto pode tornar-se rapidamente negativo em cães com AHIM após o início do tratamento corticosteróides, enquanto que o OF dos eritrócitos pode manter-se elevado durante mais tempo. Contudo, o ROFT foi negativo no caso deste cão, o que poderá dever-se ao facto de o animal já ter iniciado a terapêutica há tempo suficiente para levar à diminuição do OF dos eritrócitos, ou ainda que não tinha AHIM.

A importância da contagem de reticulócitos está na avaliação da resposta da medula óssea à anemia e, assim, na determinação do tipo de resposta regenerativa daquela (Cascio and DeLoughery 2017). Desta forma, é de todo o interesse perceber a precisão da contagem manual e automática de reticulócitos. Ao compararmos a contagem manual e automática absoluta de reticulócitos concluímos que os dois métodos se equivalem. O valor médio da diferença entre as contagens manuais e automáticas foi negativo (~ -10.000) o que demonstraria que o método contagem manual de reticulócitos produzia resultados superiores ao de contagem automática. No entanto, devido à presença de um *outlier*, o mais provável é que este valor médio não reflita o que foi mencionado acima, sendo na realidade mais provável, ao analisar o gráfico 7, que o valor médio das diferenças entre as contagens seja positivo, demonstrando que o método automático de contagem de reticulócitos produz, tendencialmente, resultados superiores ao da contagem manual.

Num estudo realizado por Goldmann et al. (2014) a correlação entre a contagem automática do analisador hematológico ProCyte e a contagem manual foi considerada apenas razoável ao contrário da correlação obtida no presente estudo que foi considerada forte (R:0,92).

Segundo Viana et al. (2014), a contagem manual de reticulócitos apresenta alguns inconvenientes e certas limitações como imprecisão, baixa reprodutibilidade e elevado tempo despendido na rotina do laboratório. A acuidade visual e experiência do observador são também fatores importantes que afetam a precisão da contagem manual de reticulócitos. No entanto, no presente estudo, à semelhança de Simionatto et al. (2010), a variação entre os dois métodos foi baixa. Deste modo, podemos afirmar que, quer no método automático, quer no método manual, as contagens de reticulócitos são precisas se o protocolo for rigorosamente seguido.

5. Conclusão

O presente estudo permitiu confirmar que a observação e avaliação do esfregaço de sangue é essencial para a classificação da anemia, e pode dar informações valiosas para o diagnóstico diferencial da anemia.

A observação da anisocitose no esfregaço de sangue foi mais frequente em anemias regenerativas, como era espectável, não tendo sido observada uma anisocitose moderada em anemias não regenerativas.

A avaliação da anisocitose por observação do esfregaço ao microscópio é um método semi-quantitativo e moroso. Por outro lado, o RDW obtido pelo analisador hematológico ProCyte é um método quantitativo, automático, que ao contrário do primeiro não está sujeito a erros entre operadores, mas que, de acordo com o fabricante, apenas permite concluir com fiabilidade a ocorrência de anisocitose para valores de RDW superiores a 21,7%. Assim, de acordo com este estudo, concluímos que a observação de anisocitose ao microscópio é mais fiável e precisa que o RDW, pelo menos o obtido por este analisador. Para além disto, segundo Hodges and Christopher (2011), o RDW também é menos específico para a avaliação da resposta regenerativa da anemia, uma vez que aumenta com populações mistas de eritrócitos microcíticos e normocíticos.

Ao estudarmos os índices eritrocitários, nos cães com anemia não regenerativa a maioria foi normocítica normocrómica, como seria de esperar. Nos cães com anemia regenerativa estes índices também foram observados em metade dos cães (n=8/16). No entanto, na observação microscópica, apenas num cão não foi observada anisocitose, demonstrando, mais uma vez, a importância da avaliação do esfregaço de sangue. De facto, uma resposta regenerativa ligeira pode não ser suficiente para afetar os índices eritrocitários e assim esta não ser detetada, caso não sejam utilizados outros métodos para avaliar a regeneração (Hodges and Christopher 2011).

O teste rápido de fragilidade osmótica (ROFT) foi realizado para aferir o seu valor diagnóstico na anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) canina. Este já é utilizado na prática clínica para diagnóstico de AHIM na Bélgica e na Holanda. Contudo, na amostra em estudo apenas dois animais tinham suspeita de AHIM, o que tornou impossível a concretização deste objetivo.

Ao estudarmos os resultados obtidos na contagem manual e automática de reticulócitos, demonstrou-se que os métodos apresentavam uma forte correlação e que a variação entre ambos foi baixa. Assim, concluímos que ambos os métodos obtêm contagens de reticulócitos precisas. De acordo com a literatura estudada, a contagem de reticulócitos automática tem um coeficiente de variação menor, é mais facilmente reproduzível que a manual (Hohenhaus and Winzelberg 2017) e as variações entre operadores são evitadas. No

entanto, a contagem manual de reticulócitos é utilizada na maioria dos laboratórios clínicos, uma vez que apresenta um melhor custo-benefício. O presente estudo demonstrou que os resultados do método manual são precisos e fidedignos, apoiando a utilização da contagem manual de reticulócitos em clínicas onde o método automático não é possível.

No entanto, existem outras formas mais inovadoras de aferir precocemente a resposta regenerativa da anemia. O recetor da transferrina (CD71) é uma proteína integral de membrana das células da linhagem eritroide envolvida na absorção de ferro (Marsee et al. 2010). A redução nos níveis de CD71 tem sido utilizada na citometria de fluxo como marcador da maturação eritróide (McGrath et al. 2017), uma vez que o CD71 diminui ao longo da maturação dos reticulócitos (Piva et al. 2015), tornando-o um potencial marcador precoce de anemia regenerativa, à semelhança da contagem de reticulócitos. Apesar da realização da citometria de fluxo ser um método mais dispendioso, seria interessante compará-la com a contagem de reticulócitos.

Em suma, achamos que seria interessante a realização de estudos sobre uma maior amostra de animais, para comparar o grau de anisocitose observada ao microscópio com o valor do RDW dado pelo analisador hematológico, de modo a ajustar, se necessário, o intervalo de referência facultado pelo analisador ProCyte Dx. Seria ainda vantajosa a realização de mais estudos sobre o valor diagnóstico do ROFT, uma vez que a sua demonstração seria benéfica não só para os clínicos, como para os titulares devido ao custo reduzido do teste e à sua simples e rápida execução.

IV. Bibliografia

- Barcellini W, Fattizzo B. 2015. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. 2015.
- Belay E, Endrias A, Alem B, Endris K. 2018. Hematological responses to iron-folate supplementation and its determinants in pregnant women attending antenatal cares in Mekelle City, Ethiopia. *PLoS One*. 13(10):1–12.
- Bland JM, Altman DG. 2010. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud*. 47(8):931–936.
- Bonfanti U, Comazzi S, Paltrinieri S, Bertazzolo W. 2004. Stomatocytosis in 7 related Standard Schnauzers. *Vet Clin Pathol*. 33(4):234–239.
- Bradbury CA. 2017. Jaundice. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 715–718.
- Buttarelo M. 2016. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol*. 38:123–132.
- Cascio MJ, DeLoughery TG. 2017. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Med Clin North Am*. 101(2):263–284.
- Chasis JA, Mohandas N. 2008. ASH 50th anniversary review Erythroblastic islands : niches for erythropoiesis. 112(3):470–478.
- Chervier C, Cadoré JL, Rodriguez-Piñeiro MI, Deputte BL, Chabanne L. 2012. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. *J Small Anim Pract*. 53(4):223–227.
- Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Zgodzińska A, Łazowska M, Kotuła I. 2018. Flow cytometric osmotic fragility test: Increased assay sensitivity for clinical application in pediatric hematology. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 94(1):189–195.
- Comazzi S, Pieralisi C, Bertazzolo W. 2004. Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: Frequency and associations in 1022 samples. *J Small Anim Pract*. 45(7):343–349.
- Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, Fenneteau O, Mohandas N. 2016. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Mol Dis*. 56(1):9–22.
- Foote K, Gilroy C, Burton S, Horney B, Lopez A, Savidge C, Goff T. 2020. Case Report Rapport de cas Zinc toxicosis-Associated hemolytic anemia and pancreatic disease in 2 dogs.
- Goggs R, Dennis SG, Di Bella A, Humm KR, Mclauchlan G, Mooney C, Ridyard A, Tappin S, Walker D, Warman S, et al. 2015. Predicting Outcome in dogs with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Results of a Multicenter Case Registry. *J Vet Intern Med*. 29(6):1603–1610.
- Goldmann F, Bauer N, Moritz A. 2014. Evaluation of the IDEXX ProCyte Dx analyzer for dogs and cats compared to the Siemens ADVIA 2120 and manual differential. *Comp Clin Path*. 23(2):283–296.

- Grimes CN, Fry MM. 2015. Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. *Vet Pathol.* 52(2):298–311.
- Harvey JW. 2012a. Hematopoiesis. In: Harvey JW, editor. *Veterinary Haematology, A Diagnostic Guide and Colour Atlas*. 1st ed. Missouri: Elsevier. p. 33–48.
- Harvey JW. 2012b. Evaluation of Erythrocytes. In: Harvey JW, editor. *Veterinary Haematology, A Diagnostic Guide and Colour Atlas*. 1st ed. Missouri: Elsevier. p. 49–121.
- Harvey JW. 2012c. Hematology Procedures. In: Harvey JW, editor. *Veterinary Haematology, A Diagnostic Guide and Colour Atlas*. 1st ed. Missouri: Elsevier. p. 11–32.
- Hodges J, Christopher MM. 2011. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 238(11):1452–1458.
- Hohenhaus AE, Winzelberg SE. 2017. Nonregenerative Anemia. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 2100–2112.
- IDEXX Laboratories. 2016. IDEXX ProCyt Dx* Hematology Analyzer Operator's Guide. :pp.A1-A2.
- Jelkmann W. 2011. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 589(6):1251–1258.
- Kafka M, Yermiahu T. 1998. The effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clin Lab Haematol.* 20(4):213–216.
- Kamesaki T, Oyamada T, Omine M, Ozawa K, Kajii E. 2009. Cut-off value of red-blood-cell-bound IgG for the diagnosis of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 84(2):98–101.
- Kundrapu S, Noguez J. 2018. *Laboratory Assessment of Anemia*. 1st ed. Elsevier Inc.
- Marchetti V, Benetti C, Citi S, Taccini V. 2005. Paraneoplastic hypereosinophilia in a dog with intestinal T-cell lymphoma. *Vet Clin Pathol.* 34(3):259–263.
- Marsee DK, Pinkus GS, Yu H. 2010. CD71 (transferrin receptor): An effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 134(3):429–435.
- McCullough S. 2003. Immune-mediated hemolytic anemia: Understanding the nemesis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 33(6):1295–1315.
- McGrath KE, Catherman SC, Palis J. 2017. Delineating stages of erythropoiesis using imaging flow cytometry. *Methods.* 112:68–74.
- Mills J. 2012. Anaemia. In: Michael J. Day, Mackin A, Littlewood JD, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Vol. 53. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). p. 29–41.
- Murador P, Deffune E. 2007. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 29(2):168–178.
- Narla J, Mohandas N. 2017. Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* 39(Suppl. 1):47–52.

- Ogunyemi AD, Olayemi FO. 2016. Comparative assessment of erythrocyte osmotic fragility in two breeds of dog: Nigerian indigenous breed and the German shepherd. *Comp Clin Path.* 25(1):79–83.
- Olson SW, Hohenhaus AE. 2019. Feline non-regenerative anemia: Diagnostic and treatment recommendations. *J Feline Med Surg.* 21(7):615–631.
- Olver CS. 2010. Erythropoiesis. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Iowa: Wiley-Blackwell. p. 36–42.
- Paes G, Paepe D, Meyer E, Kristensen, Annemarie T.; Duchateau L, Campos M, Daminet S. 2013. The use of the rapid osmotic fragility test as an additional test to diagnose canine immune-mediated haemolytic anaemia. *Acta Vet Scand.* 55(1):74.
- Paleari R, Mosca A. 2008. Controversies on the osmotic fragility test. *Enerca News.*:3–5.
- Paltrinieri S. 2014. The diagnostic approach to anaemia in the dog and cat. *J Hell Vet Med Soc.* 65(3):149–164.
- Piek C. 2017. Immune-Mediated Hemolytic Anemias and Other Regenerative Anemias. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 2078–2099.
- Piek CJ, Junius G, Dekker A, Schrauwen E, Slappendel RJ, Teske E. 2008. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: Treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. *J Vet Intern Med.* 22(2):366–373.
- Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. 2015. Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. *Clin Lab Med.* 35(1):133–163.
- Radakovich LB, Pannone SC, Truelove MP, Olver CS, Santangelo KS. 2017. Hematology and biochemistry of aging—evidence of “anemia of the elderly” in old dogs. *Vet Clin Pathol.* 46(1):34–45.
- Sarkar S, Bose D, Giri RP. 2018. Status of Membrane Asymmetry in Erythrocytes: Role of Spectrin. *Adv Exp Med Biol.* 1112:3–11.
- Sim YE, Wee HE, Ang AL, Ranjakunalan N, Ong BC, Abdullah HR. 2017. Prevalence of preoperative anemia, abnormal mean corpuscular volume and red cell distribution width among surgical patients in Singapore, and their influence on one year mortality. *PLoS One.* 12(8):1–19.
- Simionatto M, De Paula JP, Chaves MAF, Bortoloso M, Cicchetti D, Leonart MSS, Do Nascimento AJ. 2010. Manual and automated reticulocyte counts. *Hematology.* 15(6):406–409.
- Slappendel RJ. 1998. Abnormal osmotic fragility of erythrocytes in dogs and cats. *Vet Q.* 20(December):S38–S39.
- Stanley E, Appleman E, Schlag A, Siegel A. 2019. Relationship between cobalamin and folate deficiencies and anemia in dogs. *J Vet Intern Med.* 33(1):106–113.
- Stokol T. 2017. Anemia, Erythrocytosis. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 740–749.

Tvedten H. 2010. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. p. 152–161.

Tvedten H, Moritz A. 2010. Reticulocyte and Heinz Body Staining. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, editors. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. p. 1067–1073.

Viana KA, Filho OAM, Dusse LMSTA, Avelar RS, Avelar DMV, Carvalho B, Ribeiro CMF, Do Valle Antonelli LR, Teixeira A, Carvalho MDG. 2014. Reticulocyte count: Comparison among methods. J Bras Patol e Med Lab. 50(5):339–345.

Villiers E. 2016a. Disorders of erythrocytes. In: Villiers Elizabet, Ristić J, editors. BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology. 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. p. 38–66.

Villiers E. 2016b. Introduction to haematology. In: Villiers Elizabet, Ristić J, editors. BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology. 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. p. 27–37.

Winzeler EA. 2017. Glycophorin alleles link to malaria protection. Science (80-). 356(6343):1122–1123.

Yilmaz G, Shaikh H. 2020. Normochromic Normocytic Anemia. StatPearls.(December).

Zivot A, Lipton JM, Narla A, Blanc L. 2018. Erythropoiesis : insights into pathophysiology and treatments in 2017. Mol Med. 24(11):1–15.

V. ANEXOS

Anexo 1| Número e percentagem de animais segundo os seus índices eritrocitários.

Índices Eritrocitários	Frequência Relativa (%)
Macrocítica Hipocrómica	2,9% (n=1)
Microcítica Hipocrómica	2,9% (n=1)
Normocítica Hipocrómica	5,7% (n=2)
Macrocítica Normocrómica	5,7% (n=2)
Microcítica Hiperocrómica	2,9% (n=1)
Microcítica Normocrómica	5,7% (n=2)
Normocítica Hiperocrómica	5,7% (n=2)
Normocítica Normocrómica	68,5% (n=24)
Total	100% (N=35)

Anexo 2 | Número e percentagem de cães segundo o tipo de resposta regenerativa da anemia e os seus índices eritrocitários.

Índices Eritrocitários	Tipo de Anemia	
	Não Regenerativa	Regenerativa
Macrocítica Hipocrómica	0% (n=0)	6,20% (n=1)
Macrocítica Normocrómica	0% (n=0)	12,5% (n=2)
Microcítica Hiperocrómica	5,3% (n=1)	0% (n=0)
Microcítica Hipocrómica	0% (n=0)	6,2% (n=1)
Microcítica Normocrómica	0% (n=0)	12,5% (n=2)
Normocítica Hiperocrómica	5,3% (n=1)	6,2% (n=1)
Normocítica Hipocrómica	5,3% (n=0)	6,2% (n=1)
Normocítica Normocrómica	84,2% (n=16)	50,0% (n=8)
Total	100% (n=19)	100% (n=16)

Anexo 3 | Caracterização dos animais com anemia regenerativa: índices eritrocitários, causa, doença e/ou sinais clínicos.

ID	Índices Eritrocitários	Anisocitose	Causa	Doença ou Sinais Clínicos
1	Microcítica, Normocrômica	–	Hemolítica Extravascular	Síndrome de fragmentação eritrocitária por cirrose hepática
4	Normocítica, Hipocrômica	+	Hemolítica Extravascular	Tumor hepático
8	Normocítica, Normocrômica	++	Hemorrágica Externa	Enterite linfoplasmocítica; Melena
9	Normocítica, Normocrômica	–	Hemorrágica Interna	Atropelamento
10	Microcítica, Normocrômica	+	Hemorrágica Externa	Hematúria intermitente, enteropatia oculta
13	Macrocítica, Hipocrômica	++	Hemolítica Intravascular	Suspeita de AHIM; Mucosas subictéricas
17	Normocítica, Normocrômica	++	Hemorrágica Interna	Hemoperitoneu por torção hepática
20	Microcítica, Hipocrômica	–	Hemorrágica Externa	Infestação por pulgas
22	Normocítica, Normocrômica	+	Hemorrágica e Hemolítica	Possível hemangiossarcoma
25	Macrocítica, Normocrômica	+	Hemorrágica Interna	Massa esplênica
26	Normocítica, Normocrômica	+	Hemolítica Extravascular	CID por pancreatite
27	Macrocítica, Normocrômica	+	Hemolítica Extravascular	Suspeita de AHIM
28	Normocítica, Normocrômica	+	Hemorrágica Externa	Gastrite linfoplasmocítica moderada
29	Normocítica, Hiperocrômica	–	Hemolítica Extravascular	Suspeita de Síndrome de Evans
32	Normocítica, Normocrômica	++	Hemorrágica Externa	Trombo; Melena
35	Normocítica, Normocrômica	++	Hemorrágica Externa	Tumor ulcerado

Legenda: ID – identificação; AHIM – anemia hemolítica imuno-mediada; CID – coagulação intravascular disseminada.

Anexo 4 | Caracterização dos animais com anemia não regenerativa: índices eritrocitários, causa, doença e/ou sinais clínicos.

ID	Índices Eritrocitários	Anisocitose	Causa	Doença ou Sinais Clínicos
2	Normocítica, Normocrômica	+	Medular 1 ^a	Mieloma múltiplo
3	Normocítica, Normocrômica	+	Medular 1 ^a	Hipoplasia medular
5	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	DRC
6	Normocítica, Hipocrômica	–	Extramedular	Meningo-encefalite supurada
7	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	DRC
11	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	Neoplasia intracraniana
12	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	DRC
14	Normocítica, Hiperocrômica	+	Medular 2 ^a	Erliquiose crônica
15	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	Carcinoma espinocelular oral
16	Normocítica, Normocrômica	+	Medular 2 ^a	Hipoplasia medular e infiltração da MO por neoplasia indiferenciada
18	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	DRC
19	Normocítica, Normocrômica	–	Medular 2 ^a	Administração prolongada de pílula anticoncepcional
21	Normocítica, Normocrômica	–	Medular 1 ^a	Neutropenia imuno-mediada
23	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	Hipoadrenocorticismo por administração trilostano
24	Normocítica, Normocrômica	+	Extramedular	Massa retroperitoneal com metastização pulmonar
30	Normocítica, Normocrômica	+	Extramedular	Leishmaniose
31	Microcítica, Hiperocrômica	+	Extramedular	Piometra
33	Normocítica, Normocrômica	+	Extramedular	Anemia em cães geriátricos* (Radakovich et al. 2017)
34	Normocítica, Normocrômica	–	Extramedular	Hipotiroidismo

Legenda: 1^a – primária; 2^a – secundária; DRC – Doença Renal Crônica; ID – identificação; MO – Medula óssea;

*: Eritropoiese com restrição de Ferro (IRE: *iron-restricted erythropoiesis*), inflamação e possível hemorragia gastrointestinal.