

**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. 9:5 (2016)

November 2016

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=288&path%5B%5D=pdf>*Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.***Anemia hemolítica imunomediada em cães****Hemolytic anemia immune-mediated in dogs**R. C. Castilho<sup>1</sup>, M. O. Lima<sup>2</sup>, M. F. R. Cruz<sup>1</sup>, E. S. Marquez<sup>1</sup>, C. Calderón<sup>1+</sup><sup>1</sup> Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Luiz Meneguel<sup>2</sup> Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop**+ Author for correspondence:** [celmiracalderon@uenp.edu.br](mailto:celmiracalderon@uenp.edu.br)

**Resumo.** Decorrente da diminuição de quantidade de hemácias, pelo próprio sistema imune, a anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é a causa mais comum dentre as anemias hemolíticas e ocorre com maior frequência em cães (NELSON; COUTO, 2010), sendo as raças mais acometidas o Cocker Spaniel, Poodle, Doberman e Collie (ETTINGER; FELDMAN 2004; THRALL et al. 2007). Não há sinal patognomônico para o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada, embora nos achados laboratoriais estejam presentes anemia regenerativa, esferocitose, teste de Coombs positivo e raramente nota-se monócitos com hemossiderina ou com hemácias fagocitadas, entretanto mesmo com estes achados não se pode diferenciar a AHIM primária da secundária. A diferenciação só pode ser alcançada quando há uma profunda investigação por busca da causa da anemia. O tratamento da AHIM é iniciado pelo tratamento suporte seguido pela terapia imunossupressora. As taxas de mortalidade variam de 25% a 50% (THRALL, 2007), ou acima de 70% (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

**Palavras-chave:** AHIM, sistema imune, cães.

**Abstract.** Due to the reduction in the number of red blood cells, caused by the immune system, the immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most common disease among the hemolytic anemias and occurs more frequently in dogs (Nelson & Couto, 2010), wherein the most affected breeds are Cocker Spaniel, Poodle, Doberman and Collie (ETTINGER; FELDMAN 2004; THRALL et al 2007.). There is no pathognomonic sign for the diagnosis of the immune-mediated hemolytic anemia; however, laboratory findings show regenerative anemia, spherocytosis, positive results in Coombs' test and rarely, monocytes with hemosiderin or erythrocytes phagocytosis, but even with these findings, the primary and secondary IMHA can not be differentiate from each other. Differentiation can only be achieved when there is a deep investigation into the cause of the anemia. The IMHA therapeutics starts with the support treatment and follows with an immunosuppressive therapy. In relation to IMHA Mortality rates, the numbers range from 25% to 50% (Thrall, 2007), or above 70% (CARR; Panciera; Kidd, 2002).

**Keywords:** IMHA, immune system, dogs.

**Introdução**

As hemácias têm como principal função conduzir hemoglobina, que é responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, onde sua membrana permeável e flexível é composta por lipídeos, proteínas e carboidratos. As moléculas de superfície da membrana celular das hemácias que em sua maioria são de glicoproteínas ou glicolipídeos, formam o citoesqueleto da mesma, mantendo a forma e a integridade celular e podem agir como antígenos (THRALL et al., 2007; TIZARD, 2002).

Em caso de anemia, ocorre a diminuição da quantidade de hemácias, resultando em menor oxigenação dos tecidos e assim, podendo causar a morte do animal. A massa de hemácias é determinada pela medição do volume globular, teor de hemoglobina no sangue ou da contagem de hemácias (ETTINGER; FELDMAN, 2004; THRALL et al., 2007).

O quadro anêmico pode ser decorrente de causas circulatórias como hemorragia ou hemólise, e também decorrente de alterações na produção das hemácias como na aplasia medular. Na anemia

hemolítica a etiologia pode ser multifatorial, causada por doenças infecciosas, agentes oxidantes, anemias hemolíticas microangiopáticas, defeitos metabólicos hereditários e de causas imunomediadas (FIGHERA, 2007).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM), é a causa mais comum dentre as anemias hemolíticas e ocorre com maior frequência em cães (NELSON; COUTO, 2010), sendo as raças mais acometidas o Cocker Spaniel, Poodle, Doberman e Collie (ETTINGER; FELDMAN 2004; THRALL et al. 2007).

A AHIM pode ser caracterizada pela destruição direta ou pela fagocitose de hemácias opsonizadas por imunoglobulinas (Ig) das classes IgG ou IgM, ou ainda secundária à ativação do sistema complemento. Geralmente a AHIM exibe regeneração marcante com alto grau de policromasia (reticulocitose), mas em alguns casos a anemia é arregenerativa devido a formação de anticorpos contra precursores das hemácias (THRALL et al., 2007).

A AHIM pode ser classificada como primária (idiopática), onde anticorpos são direcionados a hemácias normais, ou secundária quando ocorre uma alteração antigênica nas hemácias, visto que pode estar relacionada a outras enfermidades ou outros eventos e a vários medicamentos (THRALL, 2007; TIZARD, 2002).

O presente estudo tem como objetivo revisar a anemia hemolítica imunomediada em cães, dando ênfase aos aspectos etiológicos, manifestações clínicas, métodos de diagnóstico, achados laboratoriais e tratamento, de acordo com a literatura consultada.

### **Etiopatogenia**

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM), ocorre devido ao aumento da destruição de hemácias pelo próprio sistema imune em decorrência da ação de anticorpos ou da adesão de complexos imunes a elas (ETTINGER; FELDMAN, 2004; FIGHERA, 2007; THRALL et al., 2007). Tal processo advém de uma reação de hipersensibilidade do tipo II (citotoxicidade dependente de anticorpos), (CORATO, 1997; MILLER, 2000 apud BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Os mecanismos de hemólise podem ser extravascular ou intravascular, sendo a principal forma a extravascular, onde as hemácias serão lisadas pelo baço e fígado (FIGHERA, 2007; SANCHEZ; FERRARIAS; MOREIRA, 2009).

A hemólise extravascular é mediada pela imunoglobulina G (IgG), denominado anticorpo incompleto, pois não ocasiona hemólise intravascular. A IgG primeiro se adere aos eritrócitos e em seguida ao receptor Fc dos macrófagos e monócitos resultando na fagocitose das hemácias, sendo removidas pelos macrófagos em vários órgãos, inclusive baço, medula óssea e fígado. Os macrófagos realizam uma eritrofagocitose parcial

nas hemácias, resultando na formação de esferócitos, que possuem uma aparência menor, sem a palidez central característica das hemácias, parecendo mais densos e tendo sua meia vida menor do que a meia vida eritrocitária (GOOD, 2002; THRALL et al., 2007).

A hemólise intravascular tem o envolvimento da imunoglobulina M (IgM), onde a ativação do complemento leva a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC) resultando em lise da hemácia. (GOOD, 2002; THRALL et al., 2007).

No entanto essa caracterização da doença (intra ou extravascular) é de pouca utilidade uma vez que os processos hemolíticos, em sua grande maioria, são mistos e não apresentam sítio preferencial para ocorrência da hemólise (DAY, 1999).

Segundo Duval, Elliot e Lee et al.,(1996, 1997, 2000 apud BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003), dentre os mecanismos envolvidos na gênese do processo hemolítico, pode-se destacar: a anemia hemolítica imunomediada primária (idiopática) e anemia hemolítica imunomediada secundária.

Na anemia hemolítica imunomediada primária (idiopática) ou anemia hemolítica auto-imune, ocorre a ligação de auto-anticorpos a componentes estruturais da membrana eritrocitária com ausência de doenças primárias (DUVAL, 1996; ELLIOT, 1997; LEE, 2000 apud BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003). Cerca de um terço dos casos de AHIM primária estão associados a outras alterações imunológicas (TIZARD, 2002).

A AHIM primária (idiopática) é um clássico exemplo de desordem auto-imune sem a identificação de uma causa subjacente, sendo uma predominante forma de AHIM. Auto-anticorpos são produzidos contra antígenos de membrana dos eritrócitos dos próprios animais, sendo a glicoforina, uma glicoproteína que atravessa a membrana plasmática, um dos mais comuns antígenos de membrana dos eritrócitos alvos de anticorpos. Normalmente os auto-anticorpos são impedidos de reagir com os tecidos do hospedeiro por células T supressoras, acredita-se que os animais afetados por AHIM primária apresentam uma deficiência na regulação das células T supressoras ou super estimulação do sistema imune que permite que auto-anticorpos se liguem a células normais ocasionando a destruição dos eritrócitos (BARKER, 1995; COTTER, 2001; JAIN, 1986; STEWAT, 1995 apud BALCH; MACKIN, 2007).

A anemia hemolítica imunomediada primária também pode estar associada com o lúpus eritematoso sistêmico, entretanto, a patogenia do lúpus eritematoso sistêmico ainda é desconhecida, embora existam algumas teorias, como a hiperatividade do sistema imune dos linfócitos B resultando em uma anormalidade dos linfócitos T reguladores, na diminuição da atividade dos linfócitos T supressores, na alteração no sistema

complemento, entre outras, ocasionando uma presença excessiva de anticorpos dirigidos para auto-antígenos (BARENT; CERUNDULO, 2005). O comprometimento hematológico pode estar associado com a produção de auto-anticorpos (anticorpos anti-hemácias, antiplaquetas e antifosfolípidos), (CAMPOS, 2003; MIYAKIS, 2006; STICHWEH, 2004 apud KIM, 2007).

Na maioria das vezes, classifica-se precipitadamente a anemia hemolítica como sendo auto-imune (primário), onde tal definição deve ser utilizada com cautela, pois há uma série de fatores que podem levar a um quadro hemolítico imunomediado secundário decorrente de outros fatores (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Na anemia hemolítica imunomediada secundária ocorre uma ligação de anticorpos contra componentes da membrana eritrocitária, decorrente de neoplasias, agentes infecciosos, modificações antigênicas induzidas por medicamentos, transfusões sanguíneas e isoeritrolise neonatal (DUVAL, 1996; ELLIOT, 1997; LEE, 2000 apud BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Nas neoplasias, o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. A associação de neoplasias com AHIM pode ser uma simples e infeliz coincidência (THOMAS, 1999). Outra teoria é que o antígeno tumoral estimula a produção de um auto-anticorpo que reagem de forma cruzada com os eritrócitos (GORDON et al., 1996).

Dentre as anemias hemolíticas de origem infecciosa podemos citar a babesiose, leptospirose e erliquiose (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Na babesiose, os mecanismos imunes dos hospedeiros são direcionados contra os eritrócitos infectados com *Babesia* spp. A degeneração dos parasitas parece ser causada mais pela resposta imune celular do que pela imune humoral, sendo descrita como imunomediada secundária devido a ação de anticorpos IgG e/ou IgM que se ligam a membrana dos eritrócitos ativando o sistema complemento (LOBETTI, 2004 apud SAFAR; AZAB, 2008).

Em quadros de leptospirose, a hemólise intravascular ocorre devido a injúrias nas hemácias ocasionadas pela fosfolipase produzida pelo agente (MULLER et al., 2006).

A AHIM em cães também pode ser secundária a uma erliquiose, a etiologia da anemia neste caso ainda não está bem esclarecida, no entanto acredita-se que ocorre devido a destruição das hemácias pelo sistema monocítico fagocitário e/ou lise destas células por ação de complemento e uma reação de hipersensibilidade do tipo II, ou ainda pela supressão da eritropoiese (MENDONÇA, et al., 2005; SANCHES, 2008).

O quadro hemolítico dessa anemia pode ainda ser relacionado a toxinas ou ao uso de medicamentos (WRIGHT, 1999).

Medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, como o naproxeno, alteram o antígeno de membrana das hemácias e estimulam a produção de imunoglobulinas, principalmente IgG, que realiza reação cruzada com o antígeno (WRIGHT, 1999). Quinidinas e fenacetinas unem-se a anticorpos formando imunocomplexos que podem se aderir à membrana das hemácias causando sua hemólise intravascular (GARRATY, 1975 apud PETROIANU, 2011).

Com o uso de penicilinas e cefalosporinas, pode ocorrer a união desses antibióticos com a membrana eritrocitária consequentemente gerando uma resposta imune, com a formação de IgG e anticorpos contra as hemácias (WRIGHT, 1999; ARNDT; GARRATTY, 2005).

A miletidina é um composto do veneno da abelha que penetra dentro das duas camadas de fosfolípidos constituintes da membrana celular, causando alterações nos eritrócitos que irão ser atacados pelo sistema imune, também resultando em hemólise (NOBLE; ARMSTRONG, 1999).

Também acredita-se que a vacinação pode ser um gatilho não específico que ativa macrófagos, induz resposta inflamatória ou desregula o equilíbrio do sistema imune possivelmente resultando em quadro hemolítico (BALCH; MACKIN, 2007).

A ligação de aloanticorpos de um grupo sanguíneo após a transfusão de sangue não compatível caracteriza a reação transfusional, e a transferência colostrar de aloanticorpos a isoeritrolise neonatal, que também podem ser causas de AHIM secundárias (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Na hemólise aguda transfusional ocorre a formação de complexo antígeno-anticorpo entre as hemácias transfundidas e os anticorpos do receptor, estimulando vários sistemas. Além do sistema complemento, o antígeno-anticorpo ativa o fator XII, que ativa o sistema de coagulação intrínseco, contribuindo para que substâncias trombóticas sejam liberadas de leucócitos e plaquetas (BRECHER; TASWELL, 1991).

A reação de hemólise tardia ocorre devido a opsonização das hemácias transfundidas por anticorpos IgG presentes no doador, ocasionando a destruição eritrocitária pelo sistema monocítico fagocitário no fígado e baço (GOMES, 2008).

A isoeritrolise neonatal ocorre devido a sensibilização das fêmeas prenhes aos antígenos presentes na membrana eritrocitária dos filhotes, quando possuem grupos sanguíneos incompatíveis com as mães. As fêmeas desenvolvem anticorpos contra os antígenos eritrocitários do grupo sanguíneo dos filhotes. Desta forma, uma segunda geração nascidos com o mesmo grupo sanguíneo dos filhotes do nascimento anterior, poderão adquirir anticorpos contra esse grupo sanguíneo devido a ingestão do colostro. Estes anticorpos podem causar hemólise severa nos filhotes (HARREL; KRISTENSEN, 1995).

Segundo Tizard (2002), a anemia hemolítica imunomediada também pode ser classificada de acordo com a classe de imunoglobulinas envolvidas, a temperatura ideal na qual as mesmas reagem, e a natureza do processo hemolítico, subdivididas em classes I, II, III, IV e V.

A classe I é causada por auto-anticorpos que aglutinam os eritrócitos à temperatura corpórea. As classes IgM e a IgG estão envolvidas nesta forma da doença, e os eritrócitos são destruídos principalmente pela fagocitose no baço (TIZARD, 2002).

Quadros de hemoglobinemia, hemoglobinúria, icterícia e anemia grave podem ser observados quando os anticorpos da classe IgM ativam o sistema complemento e destroem os eritrócitos por hemólise intravascular em anemias da classe II (TIZARD, 2002).

A maioria dos casos de anemia hemolítica imunomediada em cães, são classe III, sendo assim mediada por anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4, que se ligam aos eritrócitos a 37°C. Porém sem ativar o sistema complemento ou aglutinar as células. Nesses casos os anticorpos IgG podem formar apenas pontes curtas entre os eritrócitos, em decorrência desta ligação frágil os anticorpos não causam a aglutinação direta. Os eritrócitos acometidos são opsonizados e removidos pelos macrófagos esplênicos, sendo assim a esplenomegalia é um achado comum na anemia hemolítica da classe III (TIZARD, 2002).

A maioria dos anticorpos nas anemias hemolíticas classe IV, não conseguem aglutinar os eritrócitos na temperatura corpórea. No entanto, quando o sangue é resfriado, pode ocorrer a aglutinação, sendo esses anticorpos denominados de aglutininas frias. Estas aglutininas podem ser detectadas somente pelo resfriamento do sangue entre 10°C e 4°C, sendo esse fenômeno de aglutinação revertido pelo aquecimento. O sangue que circula pelas extremidades do organismo dos animais acometidos pode ficar frio a ponto de permitir a ocorrência de hemaglutinação nos capilares, podendo levar a estase vascular, à isquemia tecidual e, em seguida necrose. A anemia pode não ser um achado significativo e esta forma de anemia hemolítica é mais grave no período do inverno (TIZARD, 2002).

A classe V é mediada por anticorpos IgM, que se ligam aos eritrócitos quando são resfriados a 4°C, mas não induzem aglutinação, sendo que somente no teste de antiglobulina realizado em baixa temperatura esses anticorpos poderão ser identificados. Tais imunoglobulinas não induzem necrose nas extremidades, mas podem ativar o sistema complemento e, assim, causar hemólise intravascular (TIZARD, 2002).

## Diagnósticos e Sinais clínicos

Clinicamente os sinais da anemia são apatia, anorexia, letargia, vômito, diarreia, icterícia (figura 5), esplenomegalia e hepatomegalia (devido à ativação do sistema monocítico fagocitário decorrente da destruição das hemácias), palidez das membranas mucosas, alterações na coloração da urina, febre, sopro cardíaco sistólico, taquicardias e/ou taquipneia (ANDRADE et al., 2010; LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011). Petéquias, equimoses e melena podem estar presentes caso o animal apresente uma grave trombocitopenia associada à AHIM (BALCH; MACKIN, 2007).

Os animais com anemia aguda podem apresentar colapso, e animais com quadros anêmicos de início mais gradativo podem se adaptar à anemia, manifestando sinais clínicos menos graves (THRALL, 2007).

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

Infelizmente não há um sinal patognomônico para o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada, mas os achados laboratoriais que podem nos direcionar são: anemia regenerativa, evidência de hemólise caracterizada por hemoglobinemia ou hemoglobinúria; evidência de anticorpos direcionados contra eritrócitos, com autoaglutinação (figura 6), esferocitose (figura 7), teste de Coombs positivo e raramente podemos notar monócitos com hemossiderina ou com hemácias fagocitadas (figura 8), entretanto mesmo com estes achados não se pode diferenciar a AHIM primária da secundária (DUVAL; GIGER, 1996; BALCH; MACKIN, 2007).

A exclusão de uma doença que desencadeia a AHIM secundária só pode ser alcançada quando há uma profunda investigação por busca da causa da anemia, este tipo de investigação é recomendada em pacientes que não respondem a terapia imunossupressora ou que os sinais não condizem com alguma doença subjacente a anemia (DUVAL; GIGER, 1996; BALCH; MACKIN, 2007).

Figura 5. Mucosa oral pálida e icterica de uma cadela Cocker Spaniel Americana com AHIM. Fonte: (LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011).



Figura 6. Sangue de cão com AHIM com intensa aglutinação (setas). Fonte: (THRALL et al., 2007).

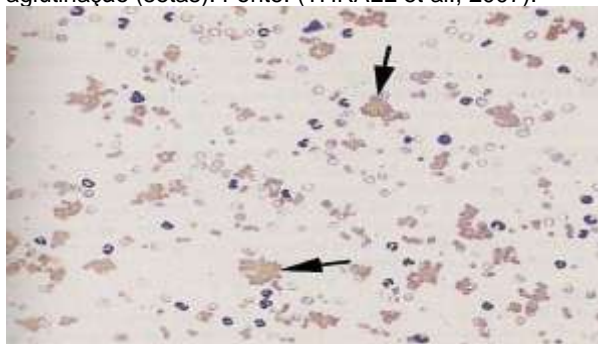


Figura 7. Esfregaço sanguíneo de cão com AHIM. As hemácias policromatofílicas (cabeça da seta), há vários esferócitos (setas) como na aglutinação. Fonte: (THRALL et a., 2007).

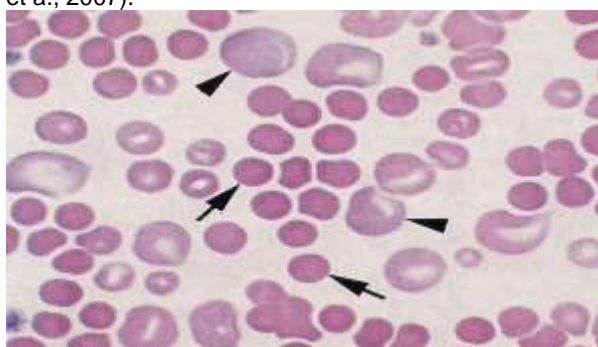
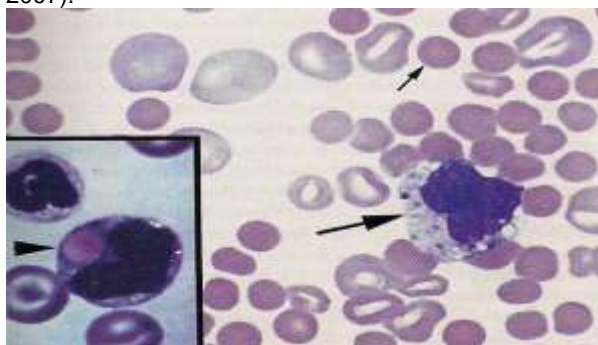


Figura 8. Esfregaço sanguíneo de cão com AHIM. Há vários esferócitos (seta menor). Monócitos com hemossiderina (seta maior) ou com hemácias fagocitadas (no destaque, cabeça de seta). Fonte: (THRALL et a., 2007).



### Achados Laboratoriais

O diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada será dado pela realização de exames hematológicos, contudo devido as diversas etiologias dessa afecção poderemos observar alterações nos demais exames complementares, como os exames bioquímicos, urinálise, teste de coombs direto, entre outros que auxiliem na elucidação da etiologia da afecção em questão (ANDRADE et al., 2010; LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011; THRALL, 2007).

No hemograma os achados são variáveis porém incluem diminuição do volume globular, da contagem de hemácias e da concentração de

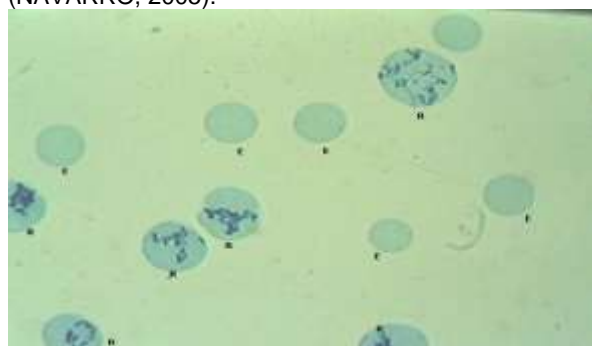
hemoglobina (ANDRADE et al., 2010; LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011; THRALL, 2007).

Quando a hemólise é intravascular pode haver hemoglobinemia e hiperbilirrubinemia.

Com isso, o teor de hemoglobina pode estar falsamente aumentado em relação ao volume globular, com falso aumento do CHCM. Podemos encontrar intensa anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, presença de esferócitos, reticulocitose (figura 9), volume globular inferior a 15% (ANDRADE et al., 2010; LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011; THRALL, 2007).

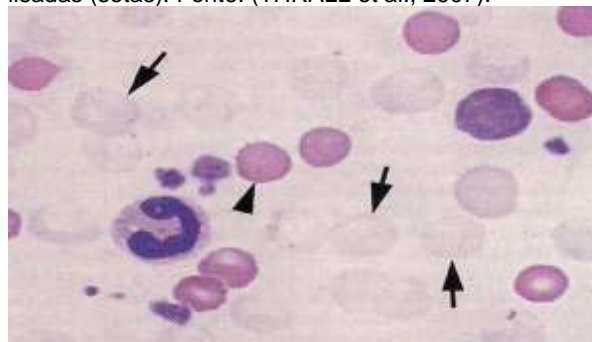
Na hemólise intravascular que ocorre devido a fixação do complemento, resultando em danos à membrana eritrocitária pelos complexos formados, podendo ser observado no esfregaço sanguíneo a presença de hemácias “fantasmas” (figura 10) que são formadas após a hemólise intravascular (THRALL et al., 2007).

Figura 9. Presença de reticulócitos (R), que são eritrócitos jovens que, ao serem corados pelo azul de metileno, mostram um retículo azul escuro em sua superfície. A foto também mostra vários eritrócitos normais (E). Fonte: (NAVARRO, 2005).



A AHIM não regenerativa tem sido descrita em cães, onde o mecanismo parece ser decorrente da destruição de precursores eritróides na medula óssea por imunoglobulinas (BRANDÃO et al., 2004).

Figura 10. Esfregaço sanguíneo de cão com AHIM. Há vários esferócitos (cabeça de seta) e hemácias fantasmas lisadas (setas). Fonte: (THRALL et al., 2007).



Quadros hemolíticos arregenerativos foram observados em cães com crise aguda devido ao

tempo insuficiente para a liberação de hemácias jovens na circulação, pois este processo pode levar até 3 dias. Estes casos podem ser observados na doença medular primária e em deficiências nutricionais que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, onde se observa o comprometimento medular utilizando a punção aspirativa ou biópsia medular (STOKOL; BLUE; FRENCH, 2000; WEISS, 2008).

Na AHIM aregenerativa, com o resultado do eritograma, a anemia pode ser classificada como normocítica normocrômica, com contagem de reticulócitos baixa e presença ou ausência de esferocitose como observado por Brandão et al., (2004).

No leucograma, o cão pode apresentar desde uma leucopenia a uma intensa leucocitose (BRANDÃO et al., 2004). A leucocitose pode ser decorrente da combinação de outros mecanismos imunes. Nos casos de anemias hemolíticas, ocorre devido a liberação de citocinas que estimulam a hiperplasia mielóide, somada a maior liberação medular, demarginação de neutrófilos e diminuição da migração destas células inflamatórias para tecidos com baixa perfusão e com lesões necróticas (MCMANUS; CRAIG, 2001), enquanto a leucopenia é encontrada devido a processos imunomediados direcionados contra leucócitos, depressão medular ou septicemia (BRANDÃO et al., 2003).

Em alguns casos, outro achado associado a AHIM canina é a trombocitopenia imunomediada, conhecido também como Síndrome de Evans, mas essa redução pode ser potencializada devido a uma vasculite, neoplasia e coagulação intravascular disseminada (GIGER, 2006).

Cerca de 40% a 89% dos animais com AHIM apresentam autoaglutinação que pode ser observada nos tubos de coleta (figura 11) ou na lâmina de vidro (BALCH; MACKIN, 2007; MCMANUS; CRAIG, 2001).

Figura 11. Presença de auto-aglutinação em tubo de coleta sanguínea. Observa-se também o plasma intensamente amarelado indicando bilirrubinemia. Fonte: (LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011).

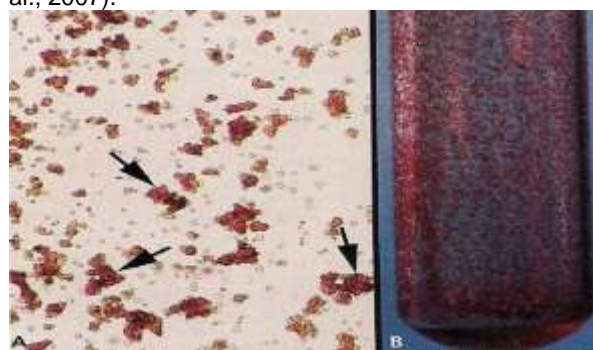


A aglutinação das hemácias e o rouleaux (empilhamento espontâneo das hemácias, assemelhando-se a uma pilha de moedas) podem ser idênticos quando observados no microscópio, portanto deve-se diferenciar esses dois casos. O

rouleaux pode aparecer em casos de desidratação e hiperproteinemia, então para ter certeza que a aglutinação é verdadeira, coloca-se uma gota de sangue coletado em tubo com EDTA em uma lâmina e em seguida uma gota de solução salina (NaCl 0,9%) na mesma, e observa com o auxílio de um microscópio. Após a adição da solução salina, se a aglutinação persistir pode ser indicativo de AHIM (figura 12) associada a altas taxas de mortalidade (BENNETT; FINNETT; NASH, 1981; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; THRALL et al., 2007).

Sendo assim o teste em solução salina positiva é altamente sugestivo de AHIM na forma aguda da doença. A aglutinação negativa, somente é capaz de afirmar que o animal não possui anticorpos aglutinantes, não podendo descartar o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada. Geralmente a auto-aglutinação está relacionada a presença de IgM ou grandes quantidades de IgG (STEWART; FELDMAN, 1993; KLAG; GIGER; SHOFER, 1993).

Figura 12. Sangue de cão com AHIM. (A) Aglutinação persiste (setas). (B) A aglutinação é tão intensa que pode ser visualizada macroscopicamente na parede do tubo de coleta de sangue que contém EDTA. Fonte: (THRALL et al., 2007).



Nos exames bioquímicos, não há alterações específicas que auxiliem no diagnóstico da AHIM, tais alterações ocorrem devido aos danos promovidos pela hemólise, desidratação e hipóxia dos órgãos ou pela deposição de imuno-complexos, e além desses fatores, a hipóxia e a nefrotoxicidade causada pela hemoglobinemia acarretam em aumento das enzimas hepáticas e azotemia, sendo assim, os exames bioquímicos de grande auxílio na estimativa da gravidade da lesão tecidual (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; MCCULLOUGH, 2003; PEREIRA, 2006;).

As alterações bioquímicas mais comuns são a hiperbilirrubinemia e os níveis elevados das enzimas hepáticas, principalmente alanina aminotransferase (ALT) (ANDRADE et al., 2010). Em pacientes com AHIM os níveis de bilirrubina elevados são comuns e podem ser resultante tanto de uma causa hemolítica como de uma causa hepatobiliar. Uma hemólise aguda pode levar a uma hiperbilirrubinemia pré-hepática, que devido a grande taxa de hemólise pode resultar na produção

de uma maior quantidade de bilirrubina não-conjugada, que irá exceder a capacidade de metabolização dos hepatócitos aumentando a concentração sérica de bilirrubina. Em casos crônicos de AHIM a hiperbilirrubinemia pode não estar presente caso a bilirrubina resultante da hemólise não superar a capacidade de metabolização pelos hepatócitos. Dano hepatocelular secundário à hipóxia, tromboembolismo e isquemia em pacientes com AHIM também podem contribuir para a hiperbilirrubinemia e uma elevação de leve a acentuada da ALT (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; MONCRIEFF, 2001 apud BALCH; MACKIN, 2007; THRALL et al., 2007).

Outro achado é a hiperglobulinemia e a hipoalbuminemia, onde a primeira ocorre devido a resposta inflamatória e consequente produção de imunoglobulinas, e a segunda devido as lesões hepáticas das reações de fase aguda (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; CARR; PANCIERA; KIDD, 2002).

Pode haver azotemia pré-renal, caso tenha hemólise intravascular grave a azotemia é renal. A insuficiência renal aguda ocorre devido a deposição de complexos antígeno-anticorpo na membrana eritrocitária ou pelo efeito tóxico direto da hemoglobina livre nas células dos túbulos renais (THRALL et al., 2007).

Em um caso de AHIM, quando há hemólise intravascular, pode-se encontrar, hemoglobinúria e bilirrubinúria (THRALL et al., 2007). O mecanismo auto-imune resulta em depósito de imunocomplexos nos glomérulos, gerando uma glomerulonefrite, podendo causar sinais como proteinúria (CAMACHO et al., 2005).

O teste da antiglobulina direta (Teste de Coombs Direto) auxilia no diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada, apresentando uma sensibilidade de aproximadamente 60% e detecta imunoglobulinas e/ou complemento ligados à superfície das hemácias (JONES et al., 1990; OVERMANN et al., 2007). A especificidade desse exame é considerada alta, em torno de 100% quando se observa macroscopicamente a aglutinação e a interação entre o anti-soro e a imunoglobulina ligada à hemácias (QUIGLEY et al., 2001).

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

Resultados negativos não descartam a doença, pois pode ocorrer falso negativo em mais de um terço dos cães com AHIM, devido a uma quantidade de imunoglobulinas ou moléculas de complemento ligadas à membrana eritrocitária que induz a fagocitose pelo Sistema Monocítico Fagocitário, mas que não são suficientes para resultar em teste de Coombs positivo. Animais

previamente tratados com drogas imunossupressoras e preparo inadequado da técnica são algumas causas de falso negativo (BALCH; MACKIN, 2007; BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; COUTO; NELSON, 2005).

Isoladamente o resultado positivo não confirma o resultado da doença, sendo necessário avaliá-lo criteriosamente em conjunto com alterações clínicas e laboratoriais, porém falso-positivos são menos frequentes porque se faz o teste apenas quando há suspeita da doença (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; THRALL et al., 2007).

Outro exame utilizado é a detecção de imunoglobulinas e complemento na superfície eritrocitária por citometria de fluxo que apesar do alto custo e da necessidade de técnicos especializados, é muito eficiente por permitir uma análise rápida, eficiente e quantitativa de células em suspensão, podendo estimar seu tamanho, complexidade interna e a quantidade de fluorescência. Neste método, imunoglobulinas ligadas a membrana são marcadas com anti-soro conjugado a fluoresceína (QUIGLEY et al., 2001; NAKAGE, 2005).

Realiza-se o tratamento das células com marcadores fluorescentes, onde as hemácias com os marcadores são colocadas em uma câmara de fluxo contínuo onde fluem em meio líquido, alinhadas em fila única por corrente de pressão passando uma a uma por uma fonte de excitação luminosa. Os raios de luz são emitidos pelos marcadores presentes nas hemácias em todas as direções, sendo cada célula analisada individualmente e as medidas da luz fluorescente emitidas pelos marcadores permitem a quantificação de características antigênicas, bioquímicas e biofísicas (LORENZI, 2003 apud MARTINS; GAGLIANI, 2008; TIZARD, 2002).

Pequenas quantidades de anticorpos nas hemácias de cães saudáveis resultam em teste de antiglobulina direta negativo, mas é na citometria de fluxo que eles são identificados, mostrando a maior eficácia desse teste (QUIGLEY et al. 2001).

O mielograma é um teste fundamental para avaliar as alterações medulares, sendo a biópsia medular uma forma mais acurada para avaliação da celularidade, contudo a punção aspirativa de medula óssea é realizada com maior frequência (MORAES; TAKAHIRA, 2010).

O mielograma é útil no momento do diagnóstico de AHIM, pois mostrará se há uma regeneração medular ou se a anemia é pouco regenerativa ou arregenerativa. A eritropoiese insuficiente ocorre devido a uma destruição das hemácias em decorrência de um processo imunomediado ainda dentro da medula óssea, impedindo a liberação de eritrócitos para a circulação. Em casos de AHIM arregenerativa podemos observar no mielograma a presença de hiperplasia da série eritróide e figuras de

eritrofagocitose intramedular (STOKOL; BLUE; FRENCH, 2000).

Hiperplasia da série eritróide é típico em cães com AHIM, contudo, o mielograma de um animal em que a resposta imune afeta diretamente a série eritróide na medula óssea pode revelar eritropoiese diminuída ou bloqueio da maturação eritróide. A AHIM crônica progride para lesão medular e mielofibrose secundária (WEISS; AIRD, 2001; WEISS; SMITH, 2002).

A ocorrência de casos de anemia hemolítica arregenerativa deve servir de alerta tanto para a ocorrência desta condição, quanto para a importância da utilização do mielograma como meio de auxílio no diagnóstico de anemias arregenerativas (BRANDÃO et al., 2004).

Muitas doenças precursoras ou que mimetizam a AHIM podem ser diagnosticadas pelos exames radiográficos e ultrassonográficos. Dentre elas podemos citar como exemplo as radiografias abdominais, onde em casos de intoxicação por zinco, o objeto metálico pode ser observado no trato gastrointestinal, resultando em hepatomegalia e esplenomegalia, ou exames ultrassonográficos em animais idosos que desenvolvem processos neoplásicos como linfomas e mielomas (BALCH; MACKIN, 2007).

Devido a diversidade de doenças causadoras de quadros de anemia hemolítica imunomediada, e partindo do princípio que o tratamento será direcionado em combate a doença base causadora do quadro hemolítico, fez-se necessário realizar exames laboratoriais complementares (BALCH; MACKIN, 2007).

Podem, portanto, serem requisitados testes sorológicos e moleculares para identificar agentes infecciosos como *Erichia*, *Bartonella*, *Babesia*, *Leptospira*, *Mycoplasma haemocanis* e *Anaplasma phagocytophilum* (BALCH; MACKIN, 2007).

Os animais com AHIM estão predispostos a hipercoagulação e desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (CID) podendo apresentar complicações como tromboembolismo pulmonar. O diagnóstico da CID baseia-se em alterações hematológicas e hemostáticas como a diminuição do número de plaquetas, aumento do tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada, diminuição da concentração de fibrinogênio e aumento do número de esquizócitos (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; FELDMAN; MADEWELL; O'NEILL, 1999). Sendo assim, o tempo de coagulação deve ser avaliado em todos os animais com AHIM (MONCRIEFF; TREADWELL; MCCULLOUGH, 2001).

Como diagnóstico diferencial, Nem todas as causas das anemias hemolíticas são imunomediadas, por isso deve-se diferenciar a imunomediada da não imunomediada. Causas relativamente comuns de anemia hemolítica que não são imunomediadas incluem defeitos hereditários, que podem ser observados em animais jovens. Entre esses podemos citar a deficiência de

piruvato quinase, deficiências de fosfofrutoquinase, fragilidade osmótica eritrocitária hereditária (BALCH; MACKIN, 2007).

Outras causas comuns de anemias são exposição a agentes oxidantes (zinco, cebola e alho) (THRALL et al., 2007), que ocorrem devido a quebra do metabolismo antioxidativo do eritrócito alterando sua morfologia e levando à formação de corpúsculo de Heinz (FIGHERA, 2007).

Anemia hemolítica microangiopática é decorrente da destruição dos eritrócitos devido a alterações da microvasculatura levando a formação de microtrombos no interior dos vasos que fazem com que as células se rompam no momento da aderência aos filamentos de fibrina (FIGHERA, 2007).

Também há relato de hemólise intravascular em pequenos animais devido a hipofosfatemia relacionada a diabetes e alimentação enteral (THRALL, 2007). Nesses casos a hemólise ocorre devido a inibição da glicólise eritrocitária provocando uma diminuição na concentração de ATP nas hemácias (THRALL, 2007).

## Tratamento

O tratamento da AHIM inicia-se pelo tratamento suporte seguido pela terapia imunossupressora, que impede a destruição dos eritrócitos impedindo a progressão do quadro anêmico, porém é importante a identificação e o tratamento da doença desencadeante dos distúrbios hemolíticos (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

É preconizada como uma das primeiras opções no tratamento de AHIM o uso de glicocorticóides como agentes imunossupressores, podendo ser administrados sozinhos ou associados a outros medicamentos com a mesma finalidade (MILLER, 1997). O efeito principal do glicocorticóide para o tratamento da AHIM é suprimir o complemento e a fagocitose de hemácias opsonizadas com imunoglobulinas por interferir na função dos macrófagos reduzindo receptores dos anticorpos ligados aos eritrócitos para a porção Fc dos macrófagos, suprimindo a atividade fagocitária do baço evitando a hemólise extravascular (RUIZ et al., 1991; MILLER, 1997; MILLER, 2000).

Para a terapia da AHIM os fármacos imunossupressores mais utilizados são a prednisona e a dexametazona, podendo ser associada ou não a outros imunossupressores como a azatioprina, ciclofosfamida e ciclosporina (MASON et al., 2003; PIEK et al., 2008; MURRAY; GASSER; HESS, 2009). A prednisona é administrada por via oral nas doses de 1 a 2 mg/Kg a cada 12 horas. Em animais que não podem receber a medicação por via oral, a dexametazona pode ser utilizada. A dexametazona é de sete a oito vezes mais potente que a prednisona, por isso deve ser administrada em doses equipotentes (PLUMB, 2002 apud LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011).



Glicocorticóides em doses imunossupressoras podem apresentar efeitos colaterais que podem limitar seu uso, dentre eles podemos citar a poliúria, polidipsia, polifagia e incontinência urinária. Tais efeitos são observados com maior frequência em cães de grande porte, porém caso ocorram complicações mais sérias, podem ser observados infecções secundárias, miopatia esteroideal e ulceração gástrica (PLUMB, 2002 apud LEITE; CARVALHO; PEREIRA, 2011).

Recomenda-se que a dose de glicocorticóide não deve ser reduzida até que o hematócrito do animal esteja acima de 35% ou próximo da normalidade, sugere-se que a dose só deve ser reduzida nos casos onde os efeitos colaterais sejam graves (MCCULLOUGH, 2003).

Quando houver uma remissão dos sinais da AHIM a dose ainda deve ser mantida por uma ou duas semanas e então reduzida de 25% a 50% a cada duas a quatro semanas, nos casos onde o fármaco utilizado é a prednisona, quando a dose for reduzida para 0,25 a 0,5 mg/Kg a cada 48 horas, o tratamento poderá ser interrompido (MCCULLOUGH, 2003).

Uma outra situação que deve ser levada em conta são os casos de animais que apresentam efeitos colaterais devido aos glicocorticóides e que não respondem adequadamente a uma terapia única, nesses casos associa-se o uso de drogas citotóxicas juntamente com a terapia imunossupressora (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Drogas citotóxicas são aquelas que têm a capacidade de causar a morte de células auto-replicante (MILLER, 1997b), as mais utilizadas na associação com a terapia imunossupressora são azatioprina, ciclofosfamida e ciclosporina (MASON et al., 2003; PIEK et al., 2008; MURRAY et al., 2009).

A azatioprina causa uma linfopenia de células T e células B, e pode inibir tanto a imunidade celular quanto a humoral, também parece bloquear as respostas imunológicas primárias com maior eficácia do que as respostas secundárias (MILLER, 2000). Porém pode melhorar o prognóstico do animal e apresentar um excelente resultado no tratamento da AHIM (KLAG; GIGER; SHOFER, 1993).

No início do tratamento, a azatioprina não deve ser utilizada isoladamente, devido ao seu início de tempo de ação ser lento (sete a quatorze dias). Efeitos colaterais apesar de não frequentes podem ser encontrados, nesse caso são anorexia, vômitos, diarreia, mielossupressão, hepatopatias e pancreatite, (MCCULLOUGH, 2003).

Leite; Carvalho e Pereira, (2011) recomendam essa utilização associado a um glicocorticóide em cães com auto-aglutinação, falha no tratamento imunossupressor isoladamente com glicocorticóide e animais que necessitam de múltiplas transfusões.

A ciclofosfamida é um agente alcalóide com um potente efeito mielossupressor, mas ao contrário da azatioprina, a ciclofosfamida não tem mostrado melhoras clínicas quando usada em pacientes com AHIM (MASON et al., 2003), devido aos seus efeitos colaterais como anorexia, vômito, diarreia, mielossupressão e cistite hemorrágica, e por existirem outros fármacos de melhores resultados, a ciclofosfamida não é mais recomendada para o tratamento da AHIM (ADAMO; O' BRIEN, 2004).

Inicialmente utilizada para diminuir o risco de rejeições em transplantes, a ciclosporina é um imunomodulador que agora tem sido usada como agente imunossupressor para uma variedade de condições, mas sua eficácia em pequenos animais ainda não é bem esclarecida (ADAMO; O' BRIEN, 2004; O'NEILL, 2004).

Outra alternativa seria o uso do danazol, que é um composto andrógeno sintético utilizado na medicina humana, esse atua reduzindo a adesão de auto-anticorpos e complemento às plaquetas e eritrócitos, aumentando suas resistências osmóticas (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

Recomenda-se o tratamento com imunoglobulina humana em caso de distúrbios imunomediados contra plaquetas e hemácias e tem como objetivo saturar os receptores Fc dos macrófagos (MONCRIEFF, 1997; DAY; MACKIN, 2008). Não é frequente animais apresentarem efeitos colaterais, mas há a possibilidade de desenvolvimento de quadro tromboembólico (MILLER, 2000).

Apesar da descrição da literatura recomendando o uso de imunoglobulina humana, os estudos obtidos por Whelan et al., (2012), mostraram que para o tratamento de cães com AHIM associando imunoglobulina humana com glicocorticóides, não melhorou a resposta ou a taxa de sobrevivência e nem diminuiu o período de hospitalização ou a necessidade de transfusão sanguínea dos animais.

Outra possibilidade de tratamento é a plasmaferese que possibilita o tratamento para animais com distúrbios imunomediados e consiste na remoção do plasma do animal doente e reposição com plasma de animais saudáveis onde o objetivo é a remoção de auto-anticorpos circulantes, que é benéfico quando utilizado isoladamente, pois são os auto-anticorpos ligados as hemácias que causam a hemólise (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; DAY; MACKIN, 2008).

Há relatos da realização da esplenectomia como tratamento, pois o animal perderia a capacidade de remoção das hemácias e de produzir auto-anticorpos (DAY; MACKIN, 2008). Horgan; Roberts e Schermerhorn, (2009), demonstraram que a esplenectomia não tem um efeito prejudicial na sobrevivência dos animais, e seus resultados sugerem que a esplenectomia pode reduzir o número e transfusões sanguíneas, sem aumentar o risco de vida dos animais, desde que realizado no início da doença. Sendo assim, a esplenectomia

pode ser útil em casos de animais que mostram pouca resposta ao tratamento e têm a necessidade de múltiplas transfusões.

Assim como tratamento suporte, que é de fundamental importância para pacientes que apresentam quadros de anemia hemolítica (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003; BURGESS et al., 2000).

De acordo com a necessidade deve-se realizar transfusão sanguínea, fluidoterapia, antibioticoterapia e uso de drogas imunossupressoras (PIEK et al., 2008).

Deve-se ter cuidado em manter a diurese adequada (1 a 3 ml de urina/Kg de peso vivo/hora), para prevenir lesões renais devido a hemoglobinúria, e cautelosa administração de fluidoterapia por via subcutânea em pacientes com trombocitopenia para evitar sangramentos (MILLER, 2000).

Outra via que deve ser utilizada com cuidado é a intravenosa, e a cateterização da veia jugular, pois estas têm sido relacionadas com risco de tromboembolismo pulmonar, há ainda a possibilidade desses pacientes desenvolverem coagulopatias hemorrágicas ou relacionadas a hipercoagulabilidade (MONCRIEFF, 2001).

O catéter deve ser colocado após uma limpeza com soluções antisépticas e com o uso de luvas estéreis para diminuir o risco de infecções secundárias em animais que recebem o tratamento imunossupressor (BRANDÃO; HAGIWARA; FRANCHINI, 2003).

A transfusão sanguínea é indicada quando o animal apresenta sinais como: taquipnéia, dispnéia e taquicardia intensos. Cerca de 70 a 90% dos animais com AHIM necessitam de transfusão sanguínea (BURGESS et al., 2000).

Animais com o hematócrito acima de 15% não necessitam de transfusão, mas devem ser monitorados até chegar a 25% (STONE, 2008 apud ANDRADE, 2010).

Concentrados de células vermelhas podem ser administrados em pacientes com AHIM, uma vez que não precisam dos componentes protéicos do plasma (SELLON, 2008).

Deve ser realizado o teste da reação cruzada em animais que irão receber a transfusão para analisar a compatibilidade sanguínea, porém esse teste pode ser prejudicado devido a auto-coagulação dos animais com AHIM podendo dificultar ou impossibilitar a realização desse exame devido a dificuldade de diferenciar auto-aglutinação de reação cruzada positiva (MELZER; WARDROP; HALE, 2003).

A transfusão sanguínea aumenta o risco de tromboembolismo pulmonar, mas sua realização é um procedimento seguro se o animal estiver sendo submetido a terapia imunossupressora (MILLER, 2000).

Para prevenir a CID e o tromboembolismo pulmonar recomenda-se o uso de heparina não fracionada, heparina de baixo peso molecular ou

doses baixas de aspirina. A heparina não fracionada pode ser administrada na dose de 250 U/Kg intravenoso ou subcutâneo a cada 6 horas, com a monitoração do tempo da tromboplastina parcial (THOMPSON, 2004).

### Prognóstico

As taxas de mortalidade variam de 25% a 50% (THRALL, 2007), ou acima de 70% (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002). Casos associados a tromboembolismo, como anemia intensa, ausência de regeneração, auto-aglutinação, trombocitopenia intensa, icterícia, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia, leucocitose intensa, alterações hemostáticas e hemólise intravascular têm na maioria dos casos o prognóstico reservado (CARR; PANCIERA; KIDD, 2002; PIEK et al., 2008).

A resposta completa ao tratamento pode levar de semana a meses, sendo que alguns animais necessitam de tratamento pelo resto da vida (LEITE, 2011). Por outro lado, animais que respondem rapidamente ao tratamento com glicocorticóides, e apresentam um hematócrito entre 25 e 30% podem ter o prognóstico favorável (NELSON; COUTO, 2010).

### Considerações Finais

A anemia hemolítica imunomediada tem grande importância na medicina veterinária devido a sua alta taxa de mortalidade e deve ser considerada no diagnóstico diferencial em animais que apresentam quadros anêmicos graves, com ou sem sinais de regeneração.

A associação de sinais clínicos e achados laboratoriais auxiliam no diagnóstico da doença, porém, é necessário realizar uma investigação mais aprofundada na procura do agente desencadeador da anemia hemolítica imunomediada.

Deve ser considerada uma emergência médica, onde o diagnóstico precoce e a intervenção terapêutica imediata são de extrema importância para um bom prognóstico.

Para o sucesso do tratamento imunossupressor, deve-se tratar a doença primária desencadeante do processo hemolítico imunomediado.

### Referências

- AL-GHAZLAT, S. Immunosuppressive therapy for canine immune-mediated hemolytic anemia. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v. 31, n. 1. p. 33 – 44, 2009.
- ADAMO, F. P.; O' BRIEN, R. T. Use of cyclosporine to treat granulomatous meningoencephalitis in three dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 8. p. 1211-1216, 2004.
- ANDRADE, S. F.; SILVA, M. C.; SILVA D. A.; BIN, L. L. Anemia hemolítica em cães: Relato de caso. **Colloquium Agrariae**, v. 6, n. 1. p. 50 – 58, 2010.
- ARNDT, P.A. GARRATTY, G. The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic

- anemia. **Seminars in Hematology**, v. 42. p. 137-144, 2005.
- BALCH, A.; MACKIN, A. Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia: Pathophysiology. Clinical Signs, and Diagnosis; **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v. 29, n. 4. p. 217 – 225, 2007.
- BARENT, A; CERUNDOLO, R. Systemic Lupus Erythematosus. **Standards of Care**, v. 7, n. 4. p. 7 – 12, 2005.
- BARKER R. N. Anemia associated with immune responses. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Veterinary Hematology**, 5 ed. Lippincott: Williams e Wilkins, 2000. p. 169-177.
- BENNETT, D. FINNETT, S.L., NASH, A.S., et al: Primary autoimmune hemolytic anemia in the dog. **Veterinary Record**, v. 109, n. 8. p.150–153, 1981.
- BRANDÃO, L. P.; HAGIWARA, M. K.; FRANCHINI, L. M.; Anemia Hemolítica Imunomediada em Cão – diagnostico e tratamento. **Revista Clínica Veterinária**, n. 44. p. 46 – 54, 2003.
- BRECHER, M. E; TASWELL, H. F. Hemolytic transfusion reactions. In: Rossi CE, Simon TL, Moss GS, editors. **Principles of Transfusion Medicine**, Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 619 – 635.
- BURGESS, K.; MOORE, A.; RAND, W.; COTTER, S. M. Treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs with cyclophosphamide. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 4. p. 456-462, 2000.
- CAMACHO A.T.; GUITIAN F.J.; PALLAS E.; GESTALT J.J.; OLMEDA S.; GOERTHERT H.; TELFORD III S.; SPILEMAN A. Serum Protein Response and renal Failure in Canine *Babesia annae* Infection. **Veterinary Research**, v. 36. p. 713-722, 2005.
- CARR, A. P.; PANCIERA, D. L.; KIDD, L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: A retrospective study of 72 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 5. p. 504-509, 2002.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1325.
- DAY, M. J.; Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2. p. 215 – 224, 1999.
- DAY, M. J.; MACKIN, A. J. Immune-mediated haematological disease. In: DAY, M. J. **Clinical Immunology of the Dog and Cat**. 2. ed. London: Manson Publishing, 2008. p. 94 – 121.
- DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Hemolytic anemia . **American Family Physician**, v. 69, n. 11. p. 2599 – 2606, 2004.
- DUVAL, D.; GIGER, U. Vaccine- associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 5. p. 290 – 295, 1996.
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doença do cão e do gato**, 5 ed. Vol. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1064, 2004.
- FELDMAN, B. F.; MADEWELL, B. R.; O'NEILL, S. Disseminated intravascular coagulation: Antithrombin, plasminogen and coagulation abnormalities in 41 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 2. p. 151-154, 1999.
- FIGHERA R.A.; Anemia hemolítica em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35. p. 264-266, 2007.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; **Manual de Hematologia Veterinária**, 2 ed. São Paulo: Livraria Varela. p. 44 – 45, 80, 2005.
- GIGER, U. Thrombocytopenia. In: WORLD CONGRESS WSAVA/FECAVA /CSAVA, 2006. Prague. **Notes of World Congress Wsava/Fecava/Csava**, Prague: Czech Small Animal Veterinary Association, 2006. p. 105 – 104.
- GOMES, S. G. R.; Transfusão Sanguínea. In: SANTOS, M. M.; FRAGATA, F. S. **Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais**, 1ª edição. São Paulo: Roca, 2008. cap. 15. p. 172 – 190.
- GOOD, J. Canine Immune Mediated Hemolytic Anemia: Presentation and Treatment. **Cornell College of Veterinary Medicine**, p. 12, 2002.
- GORDON, P. A., BAYLIS, P. H. & BIRD, G. W. G. Tumour-induced autoimmune haemolytic anaemia. **British Medical Journal**, v. 1. p. 1569-1570, 1976.
- HARREL, K. A.; KRISTENSEN, A. T. Canine transfusion reactions and their management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25. p. 1333 – 1364, 199.
- HORGAN, J. E.; ROBERTS, B. K.; SCHERMERHORN, T. Splenectomy as an adjunctive treatment for dogs with immune-mediated hemolytic anemia: ten cases (2003-2006). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 3. p. 254 – 261, 2009.
- JONES D.R.; GRUFFYDD-JONES T.J.; STOKES C.R.; BOURNE F.J. Investigation into factors influencing performance of the canine antiglobulin test. **Research in Veterinary Science**, v. 48. p. 53-58, 1990.
- KIM, J. K.; FACÓ, M. M. M.; LOTITO, A. P. N.; LIPHAUS, B. L.; CARNEIRO, J. D. A.; SILVA, C. A. A. Púrpura trombocitopênica e anemia hemolítica auto-imune em pacientes internados com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 47, n. 1. p. 10 – 15, 2007.
- KLAG, A.R.; GIGER, U.; SHOFER, F.S. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986- 1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.5. p. 783- 788, 1993.
- LEITE, J. H. A. C.; CARVALHO, L. C. N.; PEREIRA, P. M. Anemia hemolítica imunomediada em cães – relato de três casos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1. p. 319 – 326, 2011.
- MARTINS, D. M.; GAGLIANI, L. H. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das

- leucemias. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 5, n. 8. p. 5 – 23, 2008.
- MASON, N.; DUVAL, D.; SHOFER, F. S.; GIGER, U. Cyclophosphamide exerts no beneficial effect over prednisone alone in the initial treatment of acute immune-mediated hemolytic anemia in dogs: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 2. p. 206-212, 2003.
- MCCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.33, n. 6. p.1295- 1315, 2003.
- MCMANUS P.M.; CRAIG L.E. Correlation between leucocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994 -1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 8. p.1308 - 1313, 2001.
- MELVIN, J. D.; WATTS, R. G. Severe hypophosphatemia: a rare cause of intravascular hemolysis. **American Journal of Hematology**, v. 69, n. 3. p. 223 – 224, 2002.
- MELZER, K. J.; WARDROP, K. J.; HALE, A. S. A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 6. p. 931-933, 2003.
- MENDONÇA, C. S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MORO, T. V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 1. p. 167 – 174, 2005.
- MILLER, E. CVT Update: Diagnosis and treatment of immune-mediated hemolytic anemia. In BONAGURA, J. D. **Kirk's Current Veterinary Therapy XIII – Small Animal Practice**. Saunders, 2000. p. 427 – 434.
- MILLER, E. Imunosuppression – an overview. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery – Small animal**, v. 12, n. 3. p. 144 – 149, 1997.
- MILLER, E. The use of cytotoxic agents in the treatment of immune-mediated diseases of dog and cats. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery – Small animals**, v. 12, n 3. p. 157 – 160, 1997b.
- MONCRIEFF, J. C. S; REAGAN, W. J. Human intravenous immunoglobulin therapy. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery – Small Animal**, v. 12, n.3. p. 178 – 185, 1997.
- MONCRIEFF, J. C. S.; TREADWELL, N. G.; MCCULLOUGH, S. M. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 3. p.220–227, 2001.
- MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Aplasia medular em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 1. p. 99 – 108, 2010.
- MULLER, C.S.; FILHO, A. R.; TITTON, D. C.; PAIVA, E. S. Manifestações clínicas e laboratoriais de polimiosite em um caso de leptospirose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 6. p. 424 – 427, 2006.
- MURRAY, S. C.; GASSER, A.; HESS, R. S. Transient hyperglycaemia in a prediabetic dog treated with prednisone and cyclosporin A. **Australian Veterinary Journal**, v. 87, n. 9. p. 352-355, 2009.
- NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4. p. 966 – 973, 2005.
- NELSON, R.W., COUTO, C.G., **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1468 .
- NOBLE, S.J.; ARMSTRONG, P.J. Bee sting envenomation resulting in secondary immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, n.7. p.1021, 1999.
- O'NEILL, T.; EDWARDS, G. A.; HOLLOWAY, S. Efficacy of combined cyclosporine A and ketoconazole treatment of anal furunculosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 5. p. 238-243, 2004.
- OVERMANN J.A.; SHARKEY L.C.; WEISS D.J.; BORJESSON D.L. Performance of 2 microtiter canine Coombs' tests. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, n.2. p.179- 183, 2007.
- PEREIRA, P.M. **Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esferócitos) e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em cães**. 2006. 92 p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- PETROIANU, A., Esplenomegalia induzida por drogas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 4. p. 977-982, 2011.
- PIEK, C.J. JUNIUS G.; DEKKER, A.; SCHRAUWEN, E.; SLAPPENDEL R. J. TESKE, E. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. **Journal of Veterinary of Internal Medicine**, v. 22, n. 2. p. 366-373, 2008.
- QUIGLEY, K. A.; BRIAN, J. C.; HAINES, D. M.; JACKSON, M. L.; Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13. p. 297 – 300, 2001.
- RUIZ, P.; GOMEZ, F.; KING, M.; LOPEZ, R.; DARBY, C.; SCHREIBER, A. D. . In vivo glucocorticoid modulation of guinea-pig splenic macrophage Fc-receptors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88. p. 149 – 157, 1991.
- SAFAR, E. H. ; AZAB, M. E. Anemia and Parasitosis Part: I Erythrocytic Parasites. **Parasitologists United Journal**, v. 1, n. 2. p. 61 – 76, 2008.
- SANCHES, M. P. **Anemia hemolítica Imunomediada secundaria a Erliquiose canina:**

Um caso de sucesso. Disponível em: <[www.portalanhemi.br](http://www.portalanhemi.br)>. Acesso em: 29 out. 2012.

SANCHEZ, M. P.; FERRARIAS, T. M.; MOREIRA, M. A. B.; Anemia Hemolítica Imunomediada em cães: Estudo Retrospectivo de 32 casos. **Revista Clínica Veterinária**, n. 82. p. 64 – 68, 2009.

SELLON, R. K. Canine immune-mediated hemolytic anemia and thrombocytopenia. In: PROCEEDINGS OF THE EUROPEAN VETERINARY CONFERENCE, 2008. Amsterdam. **Scientific Proceedings: Companion Animals Programme**. Amsterdam: Voorjaarsdagen, p. 136 – 137, 2008.

STEWART, A.F.; FELDMAN, B.F. Immune-mediated hemolytic anemia. Part I. An overview. **Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian**, v.15, n.3. p.372- 381, 1993.

STOKOL, T.; BLUE, J. T.; FRENCH, T.W. Idiopathic pure red cell aplasia and nonregenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1988-1999). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 216, n.9. p. 1429 – 36, 2000.

THOMPSON, M. F.; MONCRIEFF, J. C. S.; BROOKS, M. B. Effect of single plasma transfusion on thromboembolism in 13 dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 6. p. 446-454, 2004.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 1. ed. São Paulo: Rocca. 2007. p. 92 – 109.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002. p. 405 – 478.

WEISS D.J. Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. **Journal of Comparative Pathology**, v.138, n.1. p.46- 53, 2008.

WEISS, D. J.; AIRD, B. Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 2. p. 67–75, 2001.

WEISS, D. J.; SMITH, S. A. A retrospective study of 19 cases of canine myelofibrosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 16, n. 2. p. 174–178, 2002.

WRIGHT MS: Drug-induced hemolytic anemias. **Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology**, v. 12. p. 8 - 115, 1999.

WHELAN M. F.; O' TOOLE, T. E.; CHAN, D. L.; ROZANSK, E. A.; DELAFORCADE, A. M.; CRAWFORD, S. L.; COTTER, S. M. Use of human immunoglobulin in addition to glucocorticoids for the initial treatment of dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 2. p. 158 – 164, 2009.