



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
AMAZONAS**

**CAMPUS MANAUS ZONA LESTE
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

TAYANNE LIRA SANTOS

**DIAGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM CÃES: REVISÃO
DE LITERATURA**

MANAUS-AM

2022

TAYANNE LIRA SANTOS

**DIAGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM CÃES: REVISÃO
DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito para obtenção do diploma de Bacharel em Medicina Veterinária.

Matrícula n. 2016004167

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Volpato
Vieira

MANAUS- AM

2022



A Catalogação na Publicação (CIP) segue a Descrição Bibliográfica Internacional Normalizada (ISBD)

S237d

Santos, Tayanne Lira

Diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada em cães:
revisão de literatura / Tayanne Lira Santos . 2022.

35 f.: il.; 31 cm.

Inclui CD-ROM

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2022.

Orientadora: Prof^a Flávia Volpato Vieira

1. Cão. 2. Hemólise. 3. Icterícia 4. Diagnóstico. I. Vieira, Flávia Volpato. II. Título.

CDD – 616.7089

Elaborada por Valéria Ribeiro de Lima – CRB 11/960

TAYANNE LIRA SANTOS

DIAGNÓSTICO DA ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM CÃES: REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito para obtenção do diploma de Bacharel em Medicina Veterinária.

Matrícula n. 2016004167

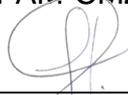
Orientadora: Profa. Dra. Flávia Volpato Vieira

Manaus, ____ de _____ de 20__.

BANCA EXAMINADORA

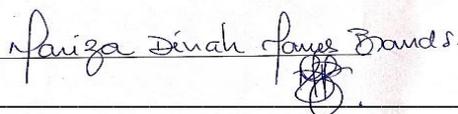


Orientador
Identificação de titulação
IFAM-CMZL



Daniel José Hoffmann
Patologista Clínico Veterinário
CRMV-AM 1081

Membro I
Identificação de titulação
Identificação IES



Membro II
Identificação de titulação

*Dedico este trabalho a minha mãe
e irmã que sempre estiveram ao meu lado
e em meus pensamentos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir viver tudo isso, ter me guiado e guardado. Por traçar o caminho de acordo com a Sua vontade e não a minha, hoje sou ciente e agradecida por saber que Seus planos são maiores e melhores que os meus.

Agradeço a minha mãe Francisca, por toda a força que me deu horas difíceis, de desânimo e cansaço. A minha irmã Thainá que sempre acreditou em mim, sempre esteve ao meu lado sorrindo ou chorando e que sempre me acolheu nos momentos mais delicados. Agradeço a vocês que são as grandes mulheres da minha vida por me apoiarem nas minhas escolhas, e por todas as vibrações positivas. Ao meu pai César, pela força e carinho que me deu. Assim como não poderia esquecer de agradecer a todos os meus familiares que sempre torceram por mim, em especial a minha avó Maria José e meu avô Bragança.

Agradeço ao Instituto Federal de Ciências e Tecnologia do Amazonas (IFAM), por proporcionar aos alunos grandes profissionais grandes profissionais da educação, pois são inspirações para muitos de nós.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Flávia Volpato Vieira, pela orientação e apoio não somente na graduação, mas na vida. Aos professores do curso de Medicina Veterinária que tenho grande admiração, vocês foram muito importantes nessa jornada. Aos meus supervisores de estágio que compartilharam comigo tempo e conhecimento e me instigaram a buscar respostas e estudar cada vez mais.

Meus agradecimentos aos colegas de graduação, que tornaram o curso mais leve, em especial ao meu grupo de estudo, que permaneceu firme desde que nos juntamos, obrigada Emília, Jéssica e Matheus, por compartilhar comigo todos os sentimentos que a graduação possa nos trazer.

*"Nunca deixe que lhe digam que não vale
à pena acreditar no sonho que se tem."*

Renato Russo

RESUMO

Os distúrbios imunológicos são mais comumente diagnosticados em cães do que em gatos, em ambas as espécies estão associados a alta morbidade e mortalidade. A anemia hemolítica imunomediada é uma das doenças autoimunes mais comuns em cães. É resultante da produção de autoanticorpos contra a membrana do eritrócito, que pode ocorrer de maneira primária ou secundária. É um distúrbio autoimune em que a resposta é direcionada de forma errada, indo contra os antígenos das células hospedeiras, que causa a destruição dos eritrócitos tendo como resultado hemólise extravascular ou hemólise intravascular. A etiologia da maioria dos casos em cães é desconhecida. A AHIM pode ser dividida em primária (idiopática ou autoimune) ou secundária a outras causas, podendo ser infecciosas (bacterianas, virais, fúngicas), parasitárias, neoplásicas, associadas ao uso de fármacos, vacinas ou alimentos. Os sinais clínicos são inespecíficos e podem variar dependendo do tempo de aparecimento do quadro, podendo ser agudo ou crônico. As manifestações clínicas mais comuns são, fraqueza, letargia, intolerância ao exercício, palidez de mucosas, dispneia, taquicardia, febre e icterícia. Dentre as alterações laboratoriais podemos observar, a ocorrência de anemia moderada a intensa podendo ser regenerativa, porém quadros sem regeneração também são observados. Não existe um teste padrão ouro para diagnóstico da AHIM, porém conhecendo as características e limitações dos diferentes testes diagnósticos e correlacionando-os com a clínica do paciente pode-se chegar a um diagnóstico conclusivo.

Palavras chaves: Cão, hemólise, icterícia.

ABSTRACT

Immune disorders are more commonly diagnosed in dogs than in cats, in both species they are associated with high morbidity and mortality. Immune-mediated hemolytic anemia is one of the most common autoimmune diseases in dogs. It results from the production of autoantibodies against the erythrocyte membrane, which can occur in a primary or secondary way. It is an autoimmune disorder in which the response is misdirected, going against host cell antigens, causing erythrocyte destruction resulting in extravascular hemolysis or intravascular hemolysis. The etiology of most cases in dogs is unknown. AHIM can be divided into primary (idiopathic or autoimmune) or secondary to other causes, which can be infectious (bacterial, viral, fungal), parasitic, neoplastic, associated with the use of drugs, vaccines or food. Clinical signs are nonspecific and may vary depending on the time of onset of the condition, and may be acute or chronic. The most common clinical manifestations are weakness, lethargy, exercise intolerance, pale mucous membranes, dyspnea, tachycardia, fever and jaundice. Among the laboratory alterations, we can observe the occurrence of moderate to severe anemia, which can be regenerative, but cases without regeneration are also observed. There is no gold standard test for diagnosing AHIM, however, knowing the characteristics and limitations of different diagnostic tests and correlating them with the patient's clinic, a conclusive diagnosis can be reached.

Key words: Dog, hemolysis, jaundice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo Hemólise extravascular.....	17
Figura 2 – Esferócitos (ponta de seta) e eritrócitos “fantasmas” lisados (setas).....	18
Figura 3 – Mecanismo Hemólise intravascular.....	19
Figura 4 – Cão com mucosa icterícia.....	21
Figura 5 – Cão mostrando icterícia em região abdominal.....	21
Figura 6 – Reticulócito, utilizando a coloração do novo azul de metileno.....	23
Figura 7 – Células policromatófilicas, corado com a coloração de Wright-Giemsa.....	23
Figura 8 – Esferócitos em esfregaço sanguíneo, Coloração panótico (400X).....	24
Figura 9 – Teste positivo de aglutinação em solução salina, amostra não corada, ampliação de 200X.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AHIM – Anemia hemolítica imunomediada

Ig – Imunoglobulina

Fc – Fragmento cristalizável

TAD – Teste de autoaglutinação direta

VG – Volume globular

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

LDH – Lactato desidrogenase sérico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA (AHIM)	14
2.2 FISIOPATOGENIA	16
2.2.1 HEMÓLISE EXTRAVASCULAR	16
2.2.2 HEMÓLISE INTRAVASCULAR.....	17
2.3 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA PRIMÁRIA	20
2.4 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA SECUNDÁRIA	20
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	21
2.6 DIAGNÓSTICO	22
2.6.1 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	22
2.6.2 BIOQUÍMICA SÉRICA	25
2.6.3 TESTE DE AGLUTINAÇÃO SALINA	27
2.6.4 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA	28
2.6.5 TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO “TESTE DE COOMBS”	29
2.6.6 CITOMETRIA DE FLUXO	30
3. CONCLUSÃO	30
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios imunológicos são mais comumente diagnosticados em cães do que em gatos, em ambas as espécies estão associados a alta morbidade e mortalidade (GARDEN et al., 2018).

Em um distúrbio autoimune a resposta é direcionada de forma errada, indo contra os antígenos das células hospedeiras (MCGAVIN; ZACHARY, 2013), caracterizado pela perda de autotolerância, desregulação imunológica e produção de autoanticorpos (GOGGES, 2020), que causa a destruição dos eritrócitos tendo como resultado hemólise extravascular ou hemólise intravascular (PEREIRA, 2015).

A hemólise intravascular ocorre quando há ruptura dos eritrócitos dentro dos vasos sanguíneos, enquanto a hemólise extravascular se trata da retirada excessiva dos eritrócitos pelo sistema fagocítico mononuclear (FIGHERA, 2007). A hemólise extravascular é o principal mecanismo patogênico incriminado no desenvolvimento de anemia hemolítica em cães e gatos, e várias são as anormalidades que podem levar à retirada prematura dos eritrócitos da circulação sanguínea (CARDOSO et al., 2009).

A etiologia da maioria dos casos em cães é desconhecida. É possível que a produção de anticorpos contra as próprias células se desenvolva em consequência de alterações de proteínas de membranas de eritrócitos por agentes infecciosos ou substâncias estranhas (fármacos, toxinas, vacinas) (SEARCY, 1998). Assim os imunocomplexos circulantes envolvendo esses antígenos podem ser adsorvidos por membranas de eritrócitos (SEARCY, 1998), ao se fixarem causam opsonização e levam à retirada desses eritrócitos da circulação (FIGHERA, 2010).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) pode ser dividida em primária (idiopática ou autoimune) ou secundária a outras causas, podendo ser infecciosas (bacterianas, virais, fúngicas), parasitárias, neoplásicas, associadas ao uso de fármacos, vacinas ou alimentos (PEREIRA, 2015).

Os sinais clínicos são inespecíficos e podem variar dependendo do tempo de aparecimento do quadro, podendo ser agudo ou crônico (THRALL, 2015). As manifestações clínicas mais comuns são, fraqueza, letargia, intolerância ao exercício, palidez de mucosas, dispneia, taquicardia, febre e icterícia (THRALL, 2015). Dentre as alterações laboratoriais podemos observar, a ocorrência de anemia

moderada a intensa podendo ser regenerativa, porém quadros sem regeneração também são observados (BRANDÃO et al., 2003).

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo revisar os métodos de diagnóstico para AHIM em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA (AHIM)

A AHIM é uma das doenças autoimunes mais comuns em cães (BONVES, 2017). É resultante da produção de autoanticorpos contra a membrana do eritrócito, que pode ocorrer de maneira primária ou secundária (FIGHERA, 2007).

Pode gerar uma anemia grave que se desenvolve de forma aguda e é causada pela própria produção de anticorpos que têm como alvo os eritrócitos (BOVENS, 2017). Em geral, exibe regeneração marcante, com alto grau de policromasia (reticulocitose). No entanto, em alguns casos, a anemia é arregenerativa devido à formação de anticorpos contra precursores de eritrócitos, com destruição de eritrócitos policromatófilicos ou de precursores de células imaturas (THRALL, 2015). Os anticorpos produzidos causam a ativação do sistema complemento, o que resulta na lise intravascular dos eritrócitos ou sua opsonização e com isso ocorre a fagocitose dessas células pelo sistema monocítico fagocitário no fígado e baço (BONVES, 2017).

A maioria das imunoglobulinas implicadas na AHIM é reativa à temperatura corporal, chamadas de hemoaglutininas quentes (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Anticorpos quentes (geralmente IgG), possuem atividade de ligação a 37^o – 39^oC, são mais comuns do que os anticorpos frios (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Podem se ligar a eritrócitos em temperatura ambiente e, desse modo, podem causar autoaglutinação em amostras em temperatura de manipulação de rotina (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Uma porção menor, normalmente de IgM, é mais reativa em temperaturas mais baixas e pode levar a uma condição conhecida como doença das hemoaglutininas frias (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Anticorpos frios, possuem atividade máxima de ligação a 4^o – 20^oC, podem ser capazes de se ligar *in vivo* enquanto passam por extremidades frias podendo ativar o complemento e iniciar hemólise imune. Eles tipicamente irão provocar autoaglutinação à medida que os

eritrócitos esfriam durante ou após colheita. Nem todos os anticorpos frios são patológicos *in vivo*, mesmo que causem autoaglutinação *in vitro* (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A doença de aglutinina fria pode resultar em aglutinação de eritrócitos nas extremidades distais, como as pinas, ponta da cauda, nariz e dígitos, com posterior obstrução de pequenos vasos e necrose (THRALL, 2015). Em outra forma, o tempo frio causa hemólise intravascular, resultando em anemia e hemoglobinúria (BALCH; MACKIN, 2007).

A AHIM resulta em destruição prematura dos eritrócitos de todas as idades que apresentam em suas membranas imunoglobulinas (Ig), principalmente IgG, IgM, IgA (sendo esta a menos comum) e complemento (C3) (PEREIRA, 2015; NELSON; COUTO, 2015). Esse processo ocorre quando se forma uma resposta imune direta ou indiretamente tendo essas células como alvo, caracterizando assim uma reação imunológica de hipersensibilidade tipo II que causa destruição dos eritrócitos (BALCH; MACKIN, 2007).

A hipersensibilidade do Tipo II (citotóxica) envolve a ligação do anticorpo (IgG ou IgM) a moléculas específicas na superfície de uma célula. Essa ligação ocasiona a destruição da célula ou dos receptores da célula, resultando em hemólise extravascular (80 a 90% dos casos) e, ocasionalmente, hemólise intravascular (PEREIRA, 2015).

Na maioria dos casos o anticorpo reativo é a IgG e a hemólise é extravascular, em alguns casos, a IgM e/ou as proteínas do complemento também podem contribuir, no entanto a IgM sozinha raramente é encontrado (SWITZER; JAIN, 1981; MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

O complemento normalmente age como uma opsonina (C3b) que promove a fagocitose. Entretanto, a formação do complexo de ataque à membrana do complemento, resulta em hemólise intravascular (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Como o IgM é melhor do que o IgG na fixação do complemento, é mais provável que ocorra hemólise intravascular com doença mediada por IgM (BALCH; MACKIN, 2007).

Muitas alterações podem dar início a essa destruição, como mudanças morfofuncionais dos eritrócitos ou controle imunológico, alteração na estrutura da membrana do eritrócito, fármacos induzindo mudanças e expondo antígenos previamente sequestrados, agentes infecciosos produzindo complexos imunes ou

alterando antígenos de membrana, alterações genéticas que provocam falhas na tolerância imunológica, falha na autorregulação adquirida, proliferação de clones celulares primários ou secundários (processos neoplásicos), eritropoese alterada ou inefetiva (PEREIRA, 2015).

2.2 FISIOPATOGENIA

2.2.1 HEMÓLISE EXTRAVASCULAR

Em casos de hemólise extravascular, mais frequente, os eritrócitos apresentam anormalidades de superfície causadas por parasitas ou alterações de origem imunológica (GARCIA-NAVARRO, 2005). Geralmente é um processo menos agudo, e é comumente acompanhada pela esferocitose e hiperbilirrubinemia (NELSON; COUTO, 2015).

A redução da sobrevivência de eritrócitos é, na maior parte, devido ao fato de que os macrófagos, principalmente os do baço, mas também os do fígado e medula óssea, possuem receptores da região Fc da molécula de IgG (SEARCY, 1998). Ocorre então a fixação de anticorpos (principalmente IgG) causando a remoção dos eritrócitos afetados pelo sistema monocítico fagocitário, os fragmentos receptores dos macrófagos que se encontram no baço e fígado se ligam ao fragmento do anticorpo que reveste a membrana do eritrócito resultando em fagocitose de eritrócitos e destruição (BALCH; MACKIN, 2007). A fagocitose parcial, provavelmente devido a remoção de porções da membrana de eritrócitos com maiores concentrações de moléculas de anticorpos, resulta em esferocitose (SEARCY, 1998).

Durante este processo pode-se observar a presença de icterícia, pois há uma produção excessiva ou redução na excreção de bilirrubina, que se acumula no plasma (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Após a eritrofagocitose, as enzimas dos macrófagos dissolvem os eritrócitos, e a hemoglobina é degradada, liberando a bilirrubina e o ferro da porção porfirina da molécula, o ferro volta para medula óssea para sua utilização em eritrócitos em desenvolvimento (SEARCY, 1998).

Essa produção excessiva de bilirrubina na sua forma não conjugada ocorre nas doenças hemolíticas, ocasionando altas concentrações desta no plasma e excedendo a capacidade de captação dos hepatócitos, devido a degradação excessiva dos eritrócitos (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). A hiperbilirrubinemia é uma

característica comum da AHIM, porém não ocorre em todos os casos, e a falta dela não exclui a AHIM (SÁ, 2014).

A proporção da hemólise e a função hepática estão dentre os fatores que determinam a presença e gravidade da hiperbilirrubinemia, a função hepática pode estar comprometida pela hipoxia e necrose hepática (SÁ, 2014). Em um estudo com 34 cães que morreram de AHIM, 53% tinham necrose hepática centrolobular de moderado a grave na necropsia (MCMANUS et al., 2001).

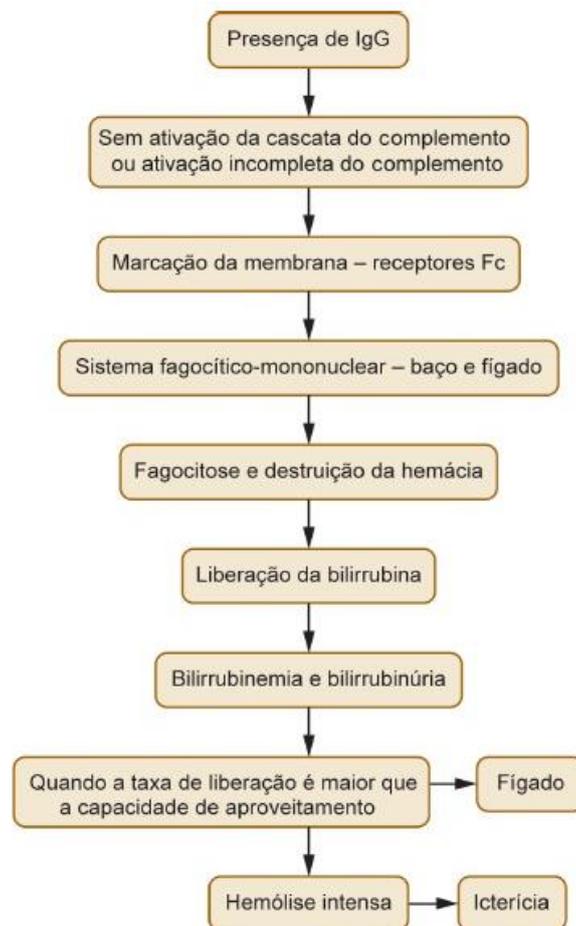


Figura 1. Mecanismo Hemólise extravascular.
Fonte. Pereira, 2015.

2.2.2 HEMÓLISE INTRAVASCULAR

Na hemólise intravascular dos eritrócitos há liberação de hemoglobina livre no plasma (SOLATO et al., 2008). O complexo de ataque à membrana produzido pela ativação da cascata do complemento causa danos diretos à membrana celular, causando um influxo de fluido extracelular para dentro do eritrócito, que culmina com sua ruptura enquanto ainda está circulante (BALCH; MACKIN, 2007). Quando há

fixação de complemento, resultando em dano à membrana pelos complexos formados, ocorre lise intravascular. Nesse caso, podem ser constatados eritrócitos “fantasma” (Figura. 2) no esfregaço sanguíneo (THRALL, 2015).

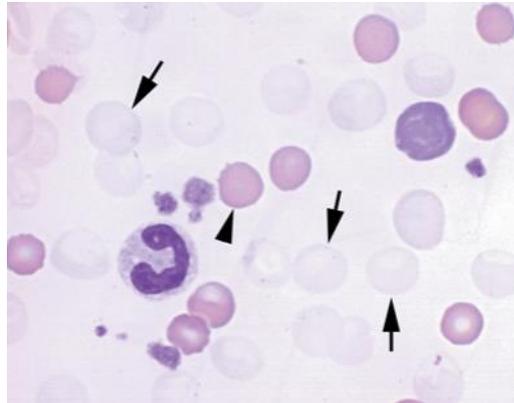


Figura 2. Esferócitos (ponta de seta) e eritrócitos “fantasmas” lisados (setas). (Coloração de Wright.)
Fonte. THRALL, 2015.

Este tipo de hemólise é mediada pela IgM, pois tem maior facilidade na fixação e ativação do complemento, devido ter alta afinidade pelos componentes da via clássica de ativação do complemento, enquanto são necessárias várias moléculas de IgG para a completa ativação desse mesmo sistema (BALCH; MACKIN, 2007; PEREIRA, 2015).

Hemoglobinemia e hemoglobinúria indicadores importantes de hemólise intravascular, são detectáveis apenas quando a capacidade de ligação da haptoglobina é sobrepassada (SEARCY, 1998).

A hemoglobinemia é evidente macroscopicamente, os eritrócitos lisados coram o plasma rosado (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). E esta resultará em hemoglobinúria quando o limiar renal de reabsorção é excedido. A hemoglobina se liga à haptoglobina sua proteína de transporte principal (SEARCY, 1998). Dentre as funções da haptoglobina está a prevenção da perda de ferro pela formação de complexo estáveis com a hemoglobina livre circulante na corrente sanguínea. Em cães, a avaliação dos níveis séricos da haptoglobina pode ser útil quando existem suspeitas de anemia hemolítica, seja ela infecciosa, autoimune ou por causas tóxicas, pois nesses casos ocorre uma diminuição na concentração (SANTOS; ALBERTO, 2014). A haptoglobina é grande para passar através dos glomérulos, logo, qualquer hemoglobina livre remanescente terá peso molecular baixo para

passar através do filtro renal glomerular e pigmentar a urina (hemoglobinúria) (MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

A meia-vida da haptoglobina é diminuída quando ligada à hemoglobina, quando é formado grande quantidade do complexo hemoglobina-haptoglobina, a concentração de haptoglobina no sangue diminui e a hemoglobina pode passar pelo glomérulo até mesmo em concentrações mais baixas, sendo este um fator contribuinte para a necrose tubular renal (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). A lesão renal se deve primeiramente ao fluxo sanguíneo renal alterado associado ao estroma eritrocitário e não a hemoglobina. O fluxo sanguíneo renal alterado pode decorrer de liberação de substâncias vasoativas ou coagulação por consumo iniciada pelo estroma dos eritrócitos (STOCKHAM; SCOTT, 2011). 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, 2015).

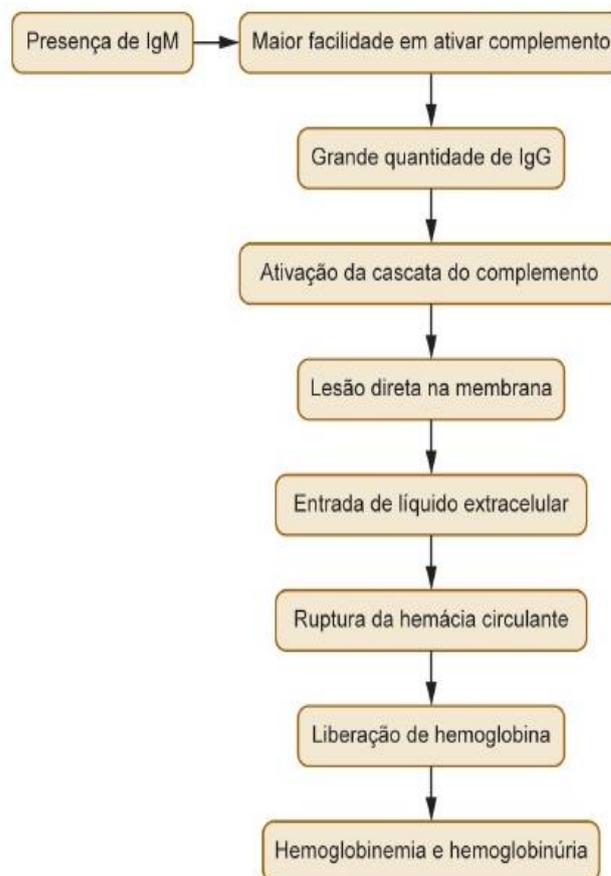


Figura 3. Mecanismo Hemólise intravascular.
Fonte. PEREIRA, 2015.

2.3 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA PRIMÁRIA

As AHIM resultam da diminuição da sobrevivência dos eritrócitos mediada por imunoglobulinas e/ou pelo complemento podendo ser autoimunes ou isoimunes (FIGHERA, 2007).

O termo doença autoimune primária é reservado para doenças nas quais nenhuma causa subjacente pode ser identificada e acredita-se que a causa da doença autoimune se relaciona ao desequilíbrio ou a uma disfunção do sistema imunológico (NELSON; COUTO, 2015).

A AHIM é normalmente idiopática, e o gatilho específico para a reação autoimune não é conhecido (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). Em casos primários, os anticorpos são produzidos, liberados e direcionados contra antígenos de membrana dos eritrócitos normais (RAMOS, 2017).

O distúrbio hemolítico isoimune ocorre pela incompatibilidade sanguínea, oriunda da passagem de anticorpos via colostros. Essa doença é bem descrita em equinos e humanos, mas ocorre muito raramente em cães e gatos (FIGHERA, 2010).

2.4 ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA SECUNDÁRIA

O termo doença autoimune secundária é usado para descrever doenças imunomediadas nas quais uma razão subjacente para a doença pode ser identificada. Fatores envolvidos na AHIM secundária de autoimunidade incluem infecção, exposição a certos fármacos ou toxinas, vacinação e neoplasia (NELSON; COUTO, 2015; MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

A AHIM secundária é causada por uma resposta imunológica a antígenos que se modificaram ou são associados a membranas normais dos eritrócitos, pode ser causado por uma série de fatores subjacentes ao processo (BALCH; MACKIN, 2007).

Os eritrócitos afetados podem ser infectados por agentes patogênicos produzindo complexos imunes ou alterando antígenos de membrana, podem ter alteração na estrutura da membrana devido exposição a fármacos, vacinas, neoplasias, alterações genéticas que provocam falhas na tolerância imunológica, fatores estes que funcionarão como precipitadores de hemólise (BALCH; MACKIN, 2017; PEREIRA, 2015)

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

No exame físico geralmente podemos observar mucosas pálidas, taquipneia, esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia (Figura. 4 e 5), febre e linfadenopatia, sendo a icterícia uma alteração comum de ser observada nesta avaliação (BALCH; MACKIN, 2007).



Figura 4. Cão com mucosa icterica.
Fonte. Pereira, 2015.



Figura 5. Cão mostrando icterícia em região abdominal.
Fonte. Ramos, 2017.

A apresentação dos sintomas clínicos é tipicamente insidiosa, mas alguns pacientes apresentam sintomas agudos e graves (PARK, 2016). No entanto, a doença pode ocorrer de forma subclínica (SEARCY, 1998). As manifestações clínicas dependem do tempo de aparecimento (agudo ou crônico) e da intensidade da anemia, dos mecanismos compensatórios, como aumento das frequências cardíaca e respiratória, da gravidade da hipoxia tecidual e da causa de base da AHIM secundário (PEREIRA, 2015).

Animais com desenvolvimento crônico apresentam mecanismos compensatórios mais bem estabelecidos, manifestando com menor intensidade taquicardia e taquipneia. Manifestações agudas apresentam mais frequentemente síncope e intolerância a exercícios, além de taquicardia e taquipneia (BALCH; MACKIN, 2007).

Se ocorre hemoglobinúria, esse é um sinal grave, pois indica hemólise aguda e acentuada (SEARCY, 1998). Sintomas inespecíficos como apatia, anorexia, vômito e diarreia são comuns a ambas manifestações (BALCH; MACKIN, 2007).

2.6 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico são necessários a realização de exames complementares como o hemograma, dosagens de proteína total e componentes bioquímico-séricos, urinálise, contagem de reticulócitos, exame do esfregaço sanguíneo e procura de esferócitos, testes de autoaglutinação macroscópica e microscópica, teste de fragilidade osmótica, teste da antiglobulina direta – TAD (teste de Coombs), além de exames específicos para determinação da causa de base da anemia (PEREIRA, 2015).

Vários testes têm sido usados para auxiliar no diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada, nenhum dos quais é 100% sensível e específico (MACNEILL et al., 2019).

2.6.1 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

O teste mais simples e benéfico no diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada é o hemograma, incluindo uma contagem de reticulócitos. O paciente clássico com anemia hemolítica imunomediada tem anemia moderada a grave, altamente regenerativa, hematócrito inferior que 25-35%, evidências de hemólise (hemoglobiemia, hemoglobinúria, hiperbilirrubinemia), presença de anticorpos nos eritrócitos, caracterizado a partir da esferocitose e ocasionalmente, são constatados eritrócitos “fantasma” no esfregaço sanguíneo. (BALCH; MACKIN, 2007; THRALL, 2015; GORENSTEIN et al., 2019).

Alguns dos indicativos de que a anemia é regenerativa são o aumento de células policromatófilicas no esfregaço sanguíneo (Figura. 7) e o aumento da concentração de reticulócitos (Figura. 6) (THRALL, 2015). Um dos aspectos mais notáveis observável em pequeno aumento, é anisocitose acentuada, essa variação é causada pela presença de eritrócitos macrocíticos imaturos somados aos esferócitos. A policromasia também pode ser observada, pois metarrubrócitos e rubrócitos podem estar presentes (SEARCY, 1998).

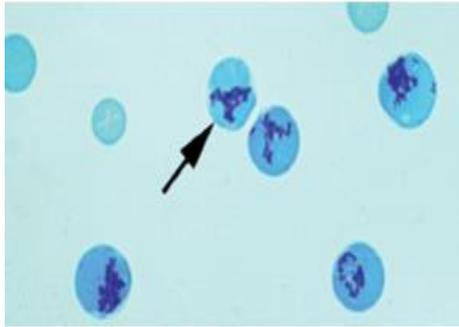


Figura 6. Reticulócito (seta), utilizando a coloração do novo azul de metileno.
Fonte. THRALL, 2015.

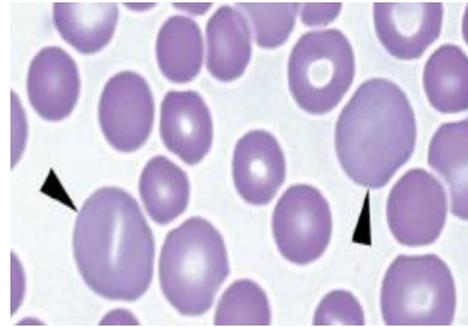


Figura 7. Células policromatófilicas (cabeça de seta), corado com a coloração de Wright-Giemsa.
Fonte. THRALL, 2015.

Quadros de anemia hemolítica imunomediada sem sinais de eritrorregeneração são frequentes, em 50% dos casos (BRANDÃO et al., 2004). Podem ocorrer devido à detecção do quadro antes que uma resposta regenerativa da medula óssea se desenvolva (isso normalmente leva de três a cinco dias) e ocasionalmente alguns cães permanecem reticulocitopênicos além do tempo necessário para que a eritropoiese compensatória seja evidenciável no sangue periférico (BOVENS, 2017; SEARCY, 1998). Ainda, podem ocorrer relacionadas à doença imunomediada dirigida contra os precursores de eritrócitos na medula óssea, neste caso reticulócitos são destruídos antes de entrar na circulação periférica (BOVENS, 2017; NELSON; COUTO, 2015).

A avaliação de uma resposta reticulocitária adequada é essencial para no auxílio do diagnóstico da anemia hemolítica imunomediada. Seu número aumenta no sangue periférico em resposta à hemorragias, doenças hemolíticas ou remissão de outros tipos de anemia (SWITZER; JAIN, 1981; BALCH; MACKIN, 2007).

Uma resposta reticulocitária inadequada indica supressão da medula óssea da eritropoiese. Por outro lado, uma elevação contínua da contagem de reticulócitos é indicativa de destruição contínua de eritrócitos (SWITZER; JAIN, 1981).

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos que expeliram seus núcleos, mas ainda contêm polirribossomos, ribossomos e mitocôndrias. Podem ser visualizados usando a coloração vital, novo azul de metileno, que induz os ribossomos e outras organelas a se aglomerarem em grânulos visíveis (BALCH; MACKIN, 2007). Reticulócito absoluto acima de $60 \times 10^9/L$ a $80 \times 10^9/L$ constata uma anemia regenerativa. Deve-se excluir perda externa de sangue (sangramento externo, incluindo hematêmese, melena, hematoquezia e hematúria com base em

história; infestação grave por ectoparasitas e ancilostomídeos), perda de sangue interna (ausência de efusões em imagens torácicas e abdominais) e de outras causas de hemólise (infecções bacterianas, virais ou fúngicas, neoplasias, fármacos) (BOVENS, 2017).

A presença de esferócitos no esfregaço de sangue (Figura. 8) é típica da anemia hemolítica imunomediada, embora eles também possam raramente ocorrer em outras condições (BOVENS, 2017). Os esferócitos são formados quando porções da membrana dos eritrócitos ligadas a autoanticorpos são fagocitadas por macrófagos, os quais têm receptores para anticorpos e para complemento (MCGAVIN; ZACHARY, 2013). A remoção dos eritrócitos pelos macrófagos ocorre em vários órgãos, incluindo o baço, a medula óssea e o fígado. A eritrofagocitose parcial resulta na formação de esferócitos, os quais são facilmente detectáveis em cães, embora esferócitos imperfeitos, que apresentam pequeno grau de palidez central, às vezes não sejam percebidos (THRALL, 2015).

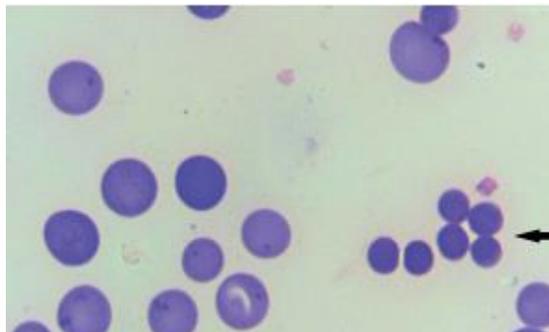


Figura 8. Esferócitos em esfregaço sanguíneo (seta), Coloração panótico (400x).
Fonte. Gorenstein et al., 2019.

O número de plaquetas também pode estar reduzido (SEARCY, 1998). Aproximadamente 50% a 70% dos cães com AHIM apresentam trombocitopenia concomitante conhecida como Síndrome de Evans (BALCH; MACKIN, 2007).

Os mecanismos propostos para a trombocitopenia incluem a presença de anticorpos direcionados contra plaquetas, ocasionando a remoção prematura de plaquetas na corrente sanguínea por macrófagos, além da coagulação intravascular disseminada e sequestro esplênico. (NELSON; COUTO, 2015; SILVA et al., 2015). Casos mais graves são acompanhados de coagulação intravascular disseminada, causando trombocitopenia por aumento de consumo plaquetário, agravando ainda mais o quadro da AHIM e piorando o prognóstico (PEREIRA, 2015). Petéquias,

equimoses e melena podem estar presentes se a trombocitopenia for grave (BALCH; MACKIN, 2007).

Anormalidades leucocitárias são comumente observadas em pacientes com AHIM (MACNEILL et al., 2019). A neutrofilia é comum, e pode aparecer acompanhando a resposta de reticulócitos (SEARCY, 1998). Pacientes com AHIM com leucogramas inflamatórios geralmente apresentam padrões inflamatórios agudos, como neutrofilia com desvio à esquerda (observados em até 16 de 20 (80%) dos casos de AHIM), linfopenia, eosinopenia e monocitose (MACNEILL et al., 2019). Alguns poucos cães apresentam contagem de leucócitos maiores que $50 \times 10^9 /L$ em razão de neutrofilia e monocitose. A monocitose é um reflexo do tráfego entre a medula e o baço, onde os monócitos se tornam macrófagos ativados, com capacidade para eritrofagocitose (SEARCY, 1998).

Acredita-se que a leucocitose seja causada por uma combinação de liberação aumentada da medula durante a forte resposta eritroide regenerativa, hiperplasia mieloide estimulada por citocinas, desmarginação de neutrófilos e diminuição da migração para tecidos necróticos mal perfundidos (MCMANUS, 2001). Em condições inflamatórias graves e de regeneração eritroide, um padrão leucoeritroblástico pode ser observado com um leucograma inflamatório altamente agudo e uma alta porcentagem de eritrócitos nucleados em diferentes estágios de maturação. A rubricitose causa um falso aumento na concentração de leucócitos em contadores automatizadas que deve ser corrigida após a contagem de eritrócitos nucleados no exame de esfregaço de sangue (MACNEILL et al., 2019).

2.6.2 BIOQUÍMICA SÉRICA

O perfil bioquímico pode revelar alterações significativas para o diagnóstico primário da anemia ou a gravidade da lesão tecidual (PEREIRA, 2015; MUCCULLOUGH, 2003). Tais alterações ocorrem devido aos danos promovidos pela hemólise, desidratação e hipóxia dos órgãos ou pela deposição de imunocomplexos, além desses fatores, a hipóxia e a nefrotoxicidade causada pela hemoglobinemia acarretam o aumento das enzimas hepáticas e azotemia (MUCCULLOUGH, 2003; CASTILHO et al., 2016).

A hipóxia tecidual aumenta o risco de lesão progressiva em coração, fígado e rins, em razão da queda aguda do VG (abaixo de 22%), acarretando arritmias ventriculares, necrose centrolobular hepática e necrose tubular renal, ao passo que

a deposição de imunocomplexos, principalmente no rim, pode causar lesão renal, agravando mais o quadro clínico do animal (PEREIRA, 2015).

As alterações bioquímicas mais comuns são a hiperbilirrubinemia e os níveis elevados das enzimas hepáticas (ANDRADE et. al, 2010). O aumento das enzimas hepáticas é comum devido a hipóxia hepática, as alterações incluem: aumento da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) pela necrose hepática secundária à hipóxia centrolobular decorrente da anemia (BOVENS, 2017; FIGHERA, 2007). Dano hepatocelular secundário a dano hipoxêmico, tromboembolismo e isquemia também podem contribuir para hiperbilirrubinemia e elevações leves a acentuadas nos níveis de ALT, aumento da AST e da lactato desidrogenase e diminuição da haptoglobina pela ruptura dos eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos (BALCH; MACKIN, 2007; FIGHERA, 2007).

Os níveis de bilirrubina estão sempre aumentados em decorrência da hemólise extravascular (FIGHERA, 2007). Uma hemólise aguda pode levar a uma hiperbilirrubinemia pré-hepática, devido a maior produção de bilirrubina não conjugada, que irá exceder a capacidade de metabolização dos hepatócitos. 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 (CASTILHO et al., 2016). Um nível elevado de bilirrubina é comum em pacientes com AHIM ou pode resultar de qualquer processo hemolítico ou causas hepato-biliares (BALCH; MACKIN, 2007).

Quanto as alterações renais podem-se observar leve aumento da ureia e da creatinina decorrente da má perfusão renal (azotemia pré-renal) em casos de hemólise extravascular (FIGHERA, 2007), e caso tenha hemólise intravascular grave há um acentuado aumento nesses parâmetros e a azotemia é renal devido à necrose tubular aguda induzida pela hemoglobina (uremia renal) (CASTILHO et al., 2016; FIGHERA, 2007).

Outro achado é a hiperglobulinemia devido a resposta inflamatória e consequente produção de imunoglobulinas, e a hipoalbuminemia, devido as lesões hepáticas das reações de fase aguda (CASTILHO et al., 2016).

A bioquímica sérica de rotina e os tempos de coagulação são úteis na avaliação da presença de hemólise, coagulação intravascular disseminada e doenças subjacentes. Assim, é importante o estudo do perfil bioquímico-sérico como complemento da real situação do estado clínico do paciente e para verificação de

lesões teciduais no momento da decisão entre a transfusão sanguínea ou não (PEREIRA, 2015).

Achados laboratoriais que apoiam a hemólise, como aumento da lactato desidrogenase sérica (LDH) e esferocitose em esfregaços de sangue periférico devem ser considerados. Para diagnósticos mais sensíveis, os usos de anti-soros anti-IgA mono-específicos / baixo soluções de força iônica (LISS) e aplicação de mais técnicas sensíveis, como teste de aglutinação de coluna ou a citometria de fluxo pode ser considerada (PARK, 2016).

2.6.3 TESTE DE AGLUTINAÇÃO SALINA

Outro teste que pode auxiliar no diagnóstico é o teste de aglutinação salina, sendo relatada sua positividade em aproximadamente 40% a 89% dos cães com o quadro clínico (BALCH; MACKIN, 2007). Acredita-se que a autoaglutinação dos eritrócitos seja induzida por IgM, mas que pode também possa ser causada por grandes quantidades de IgG associada a membrana celular (BALCH; MACKIN, 2007). O teste de aglutinação em lâmina pode ser realizado através da mistura de uma gota de sangue anticoagulado, e uma gota de soro fisiológico, sendo depositado após a homogeneização em uma lâmina. Se moléculas de anticorpo suficientes estiverem presentes nos eritrócitos, a aglutinação pode ser visualizada tanto macroscopicamente quanto microscopicamente (BALCH; MACKIN, 2007).

A aglutinação persistente deve ser diferenciada da aglutinação não específica ou *rouleaux* ("empilhamento" de eritrócito não imune) por dispersão das células com solução salina, uma vez que a aglutinação persistente não dispersa com a solução salina. Esse processo deve ser realizado lavando os eritrócitos com solução fisiológica para garantir a persistência da aglutinação. Constatada a sua persistência a anemia hemolítica imunomediada é considerada grave e pode estar associada a altas taxas de mortalidade. O teste de Coombs é frequentemente considerado desnecessário em pacientes com aglutinação persistente após lavagem com solução salina (BALCH; MACKIN, 2007; MACNEILL et al., 2019).

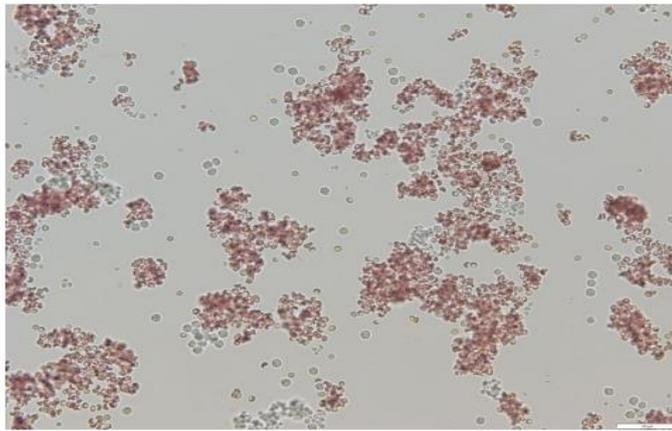


Figura 9. Teste positivo de aglutinação em solução salina, amostra não corada, ampliação de 200X.

Fonte. MACNEIL et al., 2019.

2.6.4 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA

A esferocitose é frequentemente usada como um critério de inclusão para estudos de cães com anemia hemolítica imunomediada. No entanto, esta também pode ser não esferocítica, uma vez que a ocorrência de esferocitose em cães com anemia hemolítica imunomediada varia de 61% a 95%. Esferocitose e algumas outras anormalidades da membrana dos eritrócitos podem causar aumento da fragilidade eritrocitária (MACNEILL et al., 2019).

O teste de fragilidade osmótica consiste em testar a resistência da membrana eritrocitária a diferentes graus de osmolaridade (diferentes concentrações de NaCl em soluções aquosas), usando como fator mensurável a hemólise (PEREIRA, 2015). Após a incubação, os tubos passam por uma centrifugação e a concentração de hemoglobina é mensurada no sobrenadante. Um tubo com água destilada serve como controle, representando 100% de hemólise (THRALL, 2015).

A hemólise ocorre devido a uma perda de regulação osmótica e controle de volume, que é exacerbado em vários distúrbios dos eritrócitos (MACNEILL et al., 2019). O aumento da hemólise durante o teste de fragilidade osmótica é comumente relatado em condições de esferocitose, mas pode ser visto em estomatocitose hereditária, em casos de infecções por parasitas intestinais, microcitose associada a infecção por *Babesia canis*, por exemplo. Um estudo observou aumento da fragilidade eritrocitária em todos os 15 (100%) testes diretos de antiglobulina (TAD) positivos e 4 de 12 (33%) em cães anêmicos TAD-negativos (MACNEILL et al., 2019).

Esse teste não é utilizado rotineiramente devido à sua complexidade e trabalho intensivo. No entanto, ele permanece como um auxiliar diagnóstico útil em casos esporádicos de anemia hemolítica imunomediada. Esses testes não devem ser utilizados ou interpretados isoladamente e sim em conjunto com a análise dos dados hematológicos e com a avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo (THRALL, 2015).

2.6.5 TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO “TESTE DE COOMBS”

Fazendo parte dos exames complementares do diagnóstico laboratorial temos o teste de antiglobulina direto “Teste de Coombs” (TAD), sendo este utilizado como um auxiliar no estabelecimento do diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada pela detecção de imunoglobulinas espécie específicas adsorvidas ou ligadas à superfície dos eritrócitos. O teste utiliza o reagente de Coombs, um soro policlonal (geralmente preparado em coelhos) para as imunoglobulinas das espécies de interesse (THRALL, 2015). Para este teste deve-se levar em consideração propriedades físicas associadas às interações anticorpo-antígeno, a reação de ligação do anticorpo depende da temperatura, portanto, é recomendado que o teste seja realizado a 37°C e 4°C (MACNEILL et al., 2019).

Existem dois tipos de Teste de Coombs: os testes diretos e indiretos de antiglobulina. O teste de Coombs indireto detecta anticorpos para eritrócitos no soro, enquanto o teste de Coombs direto detecta anticorpos ligados aos eritrócitos. Pacientes com AHIM devem ser testados através do teste de Coombs direto porque os anticorpos mais preocupantes estão ligados aos eritrócitos (BALCH; MACKIN, 2007). O procedimento envolve lavar os eritrócitos em solução salina para remover as proteínas plasmáticas e as imunoglobulinas não específicas associadas aos eritrócitos. Uma alíquota dessas células lavadas é incubada com o soro Coombs. Se a imunoglobulina do paciente estiver ligada ao eritrócito, o soro de Coombs induz à aglutinação eritrocitária. Por meio de dois locais de ligação por molécula, a imunoglobulina reagente ao Coombs liga-se à imunoglobulina do paciente que está aderida aos eritrócitos. Os dois locais de ligação resultam em uma progressiva formação de pontes entre os eritrócitos, as quais são visualizadas como aglutinação (THRALL, 2015).

A sensibilidade do teste de Coombs direto varia de 60% à 89%, com isso é importante entender que nem todos os casos mostram resultados positivos, o teste

também pode produzir resultados falsos negativos devido a IgG de baixa afinidade ou IgG ligadas aos eritrócitos abaixo do limite de detecção do teste, ou provavelmente pelo fato da eluição de imunoglobulinas ou complexos imunes adsorvidos patologicamente durante a lavagem dos eritrócitos na preparação para o teste. (BOVENS, 2017; PARK, 2016; THRALL, 2015).

2.6.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Outro exame complementar que pode ser utilizado para o auxílio diagnóstico é a citometria de fluxo que realiza a detecção de imunoglobulinas e complemento na superfície eritrocitária. Apesar de ter um alto custo, permite uma análise rápida, eficiente e quantitativa de células em suspensão, podendo estimar seu tamanho, complexidade interna e a quantidade de fluorescência (NAKAGE, 2005). A citometria de fluxo também permite detecção de baixos níveis de imunoglobulinas quando comparado ao método Coombs (PEREIRA, 2015), apresentando maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico de AHIM (GORENSTEIN et al., 2019).

Neste método, imunoglobulinas ligadas a membrana são marcadas com anti-soro conjugado a fluoresceína (QUIGLEY et al., 2001). É realizado o tratamento das células com marcadores fluorescentes para detecção de moléculas de superfície, 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 (NAKAGE, 2005; CASTILHO et al., 2016). 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 (CASTILHO et al., 2016). Pequenas quantidades de anticorpos nas hemácias de cães saudáveis resultam em teste da antiglobulina direta negativo, mas na citometria de fluxo eles são identificados, mostrando a maior eficácia desse teste (QUIGLEY et al., 2001).

3. CONCLUSÃO

A anemia hemolítica imunomediada é uma doença comum entre cães, podendo causar grave anemia e hipóxia, com repercussões sistêmicas que podem levar o animal à óbito. Fazer o diagnóstico definitivo de AHIM pode ser difícil devido

à inespecificidade dos sintomas e alterações laboratoriais, todavia conhecendo-se as características e limitações dos diferentes testes diagnósticos e correlacionando-os com a clínica do paciente pode-se chegar a um diagnóstico conclusivo, inclusive diferenciando suas causas e podendo classificá-la como primária ou secundária.

Não existe um teste padrão ouro para diagnóstico da AHIM, porém, o teste de Coombs direto, associado a reticulocitose e visualização de esferócitos em esfregaços de sangue periférico, juntamente com teste de aglutinação em salina positivo são boas ferramentas para concluir a suspeita clínica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

BOVENS, C. IMHA disease in canines-diagnosis and treatment. **Vet Times - The website for the veterinary profession**, p. 10, 2017. Disponível em: <<https://www.vettimes.co.uk>>.

BRANDÃO, L. P. et al. Anemia hemolítica imunomediada não regenerativa em um cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 557–561, 2004.

CASTILHO, R.C.; LIMA, M.O.; CRUZ, M.F.R.; MARQUEZ, E.S.; CALDERÓN, C. Anemia hemolítica imunomediada em cães. **Scientific Electronic Archives**, v.9, n.5, p.72-85, 2016.

CARDOSO, T.; FURIAN, M.; MENEGHETTI, M. Anemia hemolítica autoimune: relato de caso. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353**. Ano VII – Número 13 – Julho de 2009.

FIGHERA, R. A. Anemia hemolítica em cães e gatos Hemolytic anemia in dogs and cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 264–266, 2007. Disponível em: <www.ufrgs.br/favet/revista>.

FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Sistema Hematopoiético. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**, São Paulo: ROCA, 2010.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, p.41-45, 2005.

GARDEN, O. A. et al. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 313–334, 2019.

GOGGS, R. Therapeutic Strategies for Treatment of Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, n. 6, p. 1327–1349, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.010>>.

GORENSTEIN, T. G. et al. Anemia Hemolítica Imunomediada Primária Em Cães - Revisão De Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 2, p. 71–75, 2019.

GORMAN, N. T.; WERNER, L. L. Immune-mediated diseases of the dog and cat. I. Basic concepts and the systemic immune-mediated diseases. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 5, p. 395–402, 1986.

KLEIN, M. K.; DOW, S.; ROSYCHUK, R. **Pulmonary thromboembolism associated with immun-mediated hemolytic anemia in dogs: Ten cases (1982-1987)**. JAVMA 195 (2): 246-250, 1989.

MCCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: Understanding the nemesis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1295–1315, 2003.

MCMANUS, P. M.; CRAIG, L. E. Correlation between leukocytosis 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.

MACNEILL, A. L. et al. The utility of diagnostic tests for immune-mediated hemolytic anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 48, n. S1, p. 7–16, 2019.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NAKAGE, A. P. M. et al. 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**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

PARK, S. H. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia: Classic approach and recent advances. **Blood Research**, v. 51, n. 2, p. 69–71, 2016.

PEREIRA, M. P. Anemia hemolítica imuno-mediada. In: JERICÓ M. M.; DE ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca. 2015.

QUIGLEY, K. A. et al. 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, n. 4, p. 297–300, 2001.

RAMOS, L. T.; LEITE, A. K. R. de M. Alterações Clínicas E Laboratoriais Em Um Cão Com Anemia Hemolítica Imunomediada: Relato De Caso. **Revista Científica De Medicina Veterinária** -, n. 28, p. 10, 2017. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/nMlj2RQEBEf2X6L_2017-3-2-21-39-47.pdf>.

SÁ, F. F. **Anemia hemolítica imunomediada canina abordagem terapêutica**. Escola Universitária Vasco Da Gama Mestrado Integrado em Medicina Veterinária Coimbra, Junho de 2014.

SANTOS, I. F. C. dos; ALBERTO, D. S. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2014.

SOLATO, P.; BRUNO, K. V.; PEREIRA, L.; TORRES, F. S.; LORETO, A. C.; SCARAMUCCI, C. P. Anemia hemolítica em cães e gatos - revisão de literatura.

Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353. Ano VI – Número 11 – Julho de 2008.

SEARCY, G. P. Distúrbios do eritrócitos. In: CARLTON, W.W.; Mc GAVIN, M.C. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Porto Alegre: Artmed, 2ed, 1998.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011.

SWITZER, J. W.; JAIN, N. C. Autoimmune hemolytic anemia in dogs and cats. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 11, n. 2, p. 405–420, 1981. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(81\)50036-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(81)50036-2)>.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2a ed., São Paulo: Roca, 2015.