

ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA EM PEQUENOS ANIMAIS: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Immune-mediated hemolytic anemia in small animals: clinical and laboratorial aspects

CASTRO, JULIANA

Faculdade de Jaguariúna

RISSETO, ERIKA NONAKA

Docente Faculdade de Jaguariúna

Resumo: A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é uma doença imunológica na qual o organismo produz anticorpos que reconhecem os eritrócitos como antígenos, destruindo-os. O mecanismo da hemólise depende do tipo de imunoglobulina envolvida no processo e na temperatura a qual reage. Este trabalho tem por objetivo analisar as classes de AHIM existentes, correlacionando-as aos aspectos clínicos e laboratoriais da doença, acelerando o diagnóstico e minimizando prognósticos menos favoráveis aos pacientes.

Palavras-chave: anemia, hemólise, animais.

Abstract: Immune-mediated hemolytic anemia is an immune disease in which the body produces antibodies that recognize erythrocytes as antigens, destroying them. The mechanism of hemolysis depends on the type of immunoglobulin involved in the process and the temperature at which it reacts. The purpose of this study is to analyze the existing AHIM classes, correlating them with the clinical and laboratory aspects of the disease, accelerating the diagnosis and minimizing prognostics less favorable to patients.

Key words: Anemia, hemolysis, animals.

INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) define-se como uma doença do sistema imunológico que causa destruição de eritrócitos (GARCIA-NAVARRO, 2005). É classificada como primária quando idiopática. Sem causa reconhecida, a membrana dos eritrócitos sofre adesão de complexos imunes e anticorpos (IgA, IgM ou IgE) que, reconhecem a célula como um antígeno, destruindo-a. A AHIM pode ocorrer também secundária a quadros infecciosos, inflamatórios, alérgicos, neoplásicos e pelo uso de medicamentos (BALCH e MACKIN, 2007). Mais comum em cães, a forma predominante de apresentação

da AHIM é primária, constituindo-se em um diagnóstico desafiador ao clínico, já que é necessário fazer a exclusão de todas as hipóteses diagnósticas secundárias. A forma secundária revela-se mais constante em gatos, especialmente associada à infecção por *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) e pelo vírus da leucemia felina e com doença linfoproliferativa e mieloproliferativa (JERICÓ, et al., 2015; THRALL, 2007).

A meia-vida dos eritrócitos varia de 100 a 120 dias em cães e de 70 a 78 dias em gatos (JERICÓ, et al., 2015). A hemólise fisiológica, denominada hemocaterese, constitui-se no processo natural de destruição dos eritrócitos velhos pelas células do sistema monocítico-fagocitário (SMF). Em animais com AHIM a destruição dos eritrócitos ocorre precocemente (SOLATO, et al., 2008).

Alguns estudos correlacionam predisposições raciais a incidência de AHIM idiopática. Miller et al. (2004) salientam que um terço desse tipo de manifestação ocorre em cães da raça Cocker Spaniel. Outras raças destacadas no estudo, cujas incidências de AHIM despertaram o interesse dos autores, foram: Old English Sheepdog, Pinscher miniatura, Dobberman, Collie e Setter Irlandês. O estudo aponta ainda que fêmeas inteiras adultas-jovens são consideradas de maior risco para a doença.

Na AHIM secundária em cães há correlações do distúrbio imunomediado com doenças infecciosas, tais como leptospirose, babesiose e erlichiose (STOCKHAM & SCOTT, 2011). São destacados ainda eventos relacionados à AHIM, tais como picadas de abelhas e intoxicação por zinco (THRALL, 2007). Já a publicação dos autores Duval e Giger (1996) sugere que a AHIM pode ser desencadeada pela vacina polivalente, já que 26% dos animais estudados no trabalho, desenvolveram o distúrbio imunomediado no intervalo de quatro semanas após a aplicação da vacina.

Alguns medicamentos também têm sido associados à ocorrência da AHIM. Entre eles incluem-se penicilina, cefalosporinas, trimetoprim-sulfametoxazol, levamisol e amiodarone. A hemólise imunomediada decorreria da ligação direta da droga com a hemácia ou da formação de complexos imunes droga-anticorpo, que também podem se ligar às hemácias (THRALL, 2007).

Este trabalho tem por objetivo analisar as classes de AHIM existentes, correlacionando-as aos aspectos clínicos e laboratoriais da doença. A finalidade é que se crie mecanismos para estabelecer um diagnóstico precoce do distúrbio, minimizando prognósticos menos favoráveis aos pacientes.

MECANISMOS DE HEMÓLISE

A hemólise pode ser intra ou extravascular. Em casos mais raros, ela ocorre dentro e fora dos vasos sanguíneos simultaneamente. Hemólise extravascular ocorre quando eritrócitos recobertos por imunoglobulinas são fagocitados por macrófagos. Se as imunoglobulinas fixarem o complemento, o complexo de ataque da membrana pode formar-se e provocar hemólise intravascular (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Embora alguns autores salientem que as imunoglobulinas envolvidas na AHIM possam ser das classes IgG, IgM e IgA, é consenso que o envolvimento da IgG é o mais constante (THRALL, 2007).

Tizard (2008) classifica a AHIM em cinco classes, de acordo com os tipos de anticorpos envolvidos, temperatura ideal em que eles reagem e natureza do processo hemolítico. A classe I tem envolvimento de IgG e IgM e é causada por auto-anticorpos que aglutinam os eritrócitos em temperatura corpórea. A IgG não ativa o sistema complemento de forma eficiente, portanto os eritrócitos sofrem aglutinação intravascular e são fagocitados no baço. A classe II tem ação da IgM, que ativa o sistema complemento causando hemólise intravascular. Na classe III anticorpos IgG se ligam aos eritrócitos sem ativar o sistema complemento ou aglutinar as células. Eles são opsonizados e removidos pelos macrófagos esplênicos. A classe IV da AHIM envolve anticorpos IgM, que provocam aglutinação de eritrócitos quando ocorre resfriamento do sangue em temperatura entre 10°C e 4°C. O sangue que circula em cauda, dedos e pavilhões auriculares dos animais acometidos pode esfriar causando hemaglutinação dos capilares. A classe V ocorre por ação de IgM, que reage em temperatura média de 4°C, sem causar aglutinação. Estes anticorpos ativam o sistema complemento, provocando hemólise intravascular.

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os sinais clínicos da AHIM e a progressão da doença dependem do mecanismo de hemólise envolvido. Frequentemente os animais acometidos apresentam letargia, intolerância ao exercício, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, icterícia, palidez de mucosas, dispneia, taquicardia e sopro sistólico, em casos de anemias graves (JERICÓ, et al., 2015; THRALL, 2007).

A avaliação hematológica mais tipicamente apresenta anemia moderada a intensa com sinais de regeneração medular (macrocitose, anisocitose, policromasia, reticulocitose e eritroblastose), pois a destruição eritrocitária não atacaria diretamente a medula óssea e, portanto, não afetaria a produção sanguínea (GIGER, 2005). Porém, aproximadamente um terço das ocorrências de AHIM estão associadas a anticorpos que podem atacar precursores medulares eritróides, levando a um quadro de anemia arregenerativa (STOKOL et al., 2000). Em mielogramas de pacientes com AHIM arregenerativa é possível observar evidente interrupção na maturação da série eritróide, mais frequente no estágio de rubricito, devido à destruição de hemácias mais maduras. Pode-se observar ainda diminuição da população de metarrubricitos e de hemácias policromatófilicas. Ocasionalmente pode-se verificar aumento da eritrofagocitose e da fagocitose de hemácias nucleadas (THRALL, 2007).

Quando a hemólise ocorre dentro dos vasos sanguíneos (geralmente envolvendo anticorpos IgM), além da anemia, podem ocorrer sinais de hemoglobinemia, hemoglobinúria, hiperbilirrubinemia e hiperbilirrubinúria (THRALL, 2007). Este quadro é típico na classe II da AHIM, conforme a classificação de Tizard (2008). Os cães acometidos apresentam anemia, fraqueza e icterícia severa. Os macrófagos do fígado ou dos linfonodos fagocitam os eritrócitos recobertos por componentes do sistema complemento, causando quadros de hepatomegalia e linfadenopatia.

A classe IV, descrita por Tizard (2008), envolve a hemoaglutinação de capilares em extremidades corpóreas dos animais, devido ao resfriamento sanguíneo. Nesses casos, os sinais clínicos incluem isquemia tecidual, que pode resultar em lesões necróticas. A cianose de extremidades é observada durante o curso clínico dessa apresentação de hemólise imunomediada.

Policromasia com autoaglutinação e esferocitose em cães doentes com anemias agudas são consideradas patognomônicas de AHIM (JERICÓ, et al., 2015). A aglutinação pode ser diferenciada da formação de *rouleaux* mediante mistura de pequena quantidade de sangue com uma gota de solução salina isotônica. A aglutinação persiste na solução salina, enquanto que o *rouleaux* se dispersa (THRALL, 2007; COWELL et al., 2009). É comum a visualização macroscópica da aglutinação em esfregaço sanguíneo ou em tubos com EDTA (Fig. 1).



Figura 1. Presença de auto-aglutinação em amostra sanguínea de cão com AHIM. Observa-se também o plasma intensamente icterico, indicando bilirrubinemia. Fonte: Arquivo pessoal.

A formação de esferócitos, por sua vez, resulta da opsonização imune e remoção de fragmentos da membrana da hemácia por células fagocíticas do sistema vascular. A membrana fica fragilizada pela ação de neutrófilos, monócitos ou macrófagos e perde sua palidez central, perdendo sua função (Fig.2). Essa alteração ocorre em casos de hemólise exclusivamente extravascular ou ainda em casos em que a hemólise extravascular ocorra simultaneamente à destruição de esferócitos no interior dos vasos sanguíneos (COWELL et al., 2009).

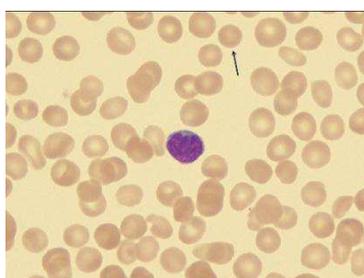


Figura 2. Esferócitos em esfregaço sanguíneo. Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação leucocitária típica de pacientes com AHIM inclui leucocitose por neutrofilia com aumento da presença de bastonetes e monocitose. Essa resposta inflamatória decorre da liberação de fatores estimulantes de colônias pelos macrófagos ativados (THRALL,2007). Em alguns casos, é possível detectar monócitos fagocitando eritrócitos em esfregaços sanguíneos (Fig.3). De acordo com Mcmanus & Craig (2001), outros fatores podem desencadear quadros de leucocitose, tais como lesões teciduais decorrentes da hipóxia causada pela hemoglobinemia. Alterações tóxicas podem ser observadas em neutrófilos na avaliação do esfregaço sanguíneo.

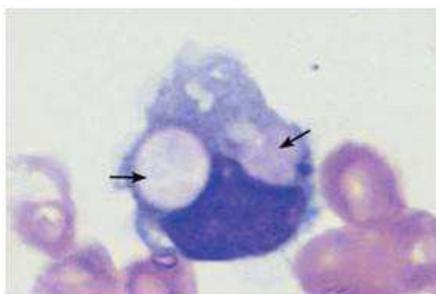


Figura 3. Monócito fagocitando hemácia. Fonte: Arquivo pessoal.

Os baixos índices de hemoglobina circulante, além da hipóxia, podem causar nefrotoxicidade, causando azotemia pré-renal ou, no caso de anemia intravascular grave, azotemia renal (MCCULLOUGH, 2003). Quadros de insuficiência renal podem resultar da deposição de complexos antígeno-anticorpo na membrana eritrocitária ou pelo efeito tóxico direto da hemoglobina livre nas células dos túbulos renais (THRALL, 2007).

Petéquias e equimoses podem ocorrer em casos em que o animal apresentar trombocitopenia imunomediada (Síndrome de Evans) secundária à AHIM, nos quais junto à anemia ocorrem quadros de queda na contagem plaquetária (JERICÓ, et al., 2015). A trombocitopenia em cães com AHIM pode estar relacionada à concomitante destruição imunomediada das plaquetas, aumento do consumo devido à vasculite, processos inflamatórios generalizados, Coagulação Intravascular Disseminada (CID) ou seqüestro (ScottMoncrieff et al., 2001).

Os distúrbios hemostáticos são frequentes na AHIM e, portanto, estes pacientes oferecem risco de eventos trombóticos, que podem levá-los à óbito. No momento do diagnóstico, cerca de 50% dos cães com AHIM se encontram em estado de hipercoagulabilidade (ScottMoncrieff et al., 2001). A hemólise é uma importante condição pró-coagulante. Durante a hemólise ocorre a liberação do estroma das hemácias que pode desencadear a CID. Lesão vascular pode desenvolver-se secundariamente a liberação de citocinas inflamatórias dos eritrócitos destruídos, bem como pela hipóxia tecidual (MCMANUS; CRAIG, 2001).

Como a ocorrência de CID subclínica ou clínica está geralmente associada à AHIM, outros testes laboratoriais possivelmente anormais são aqueles utilizados no diagnóstico de CID. Estes pacientes apresentam prolongamento no tempo de tromboplastina parcial ativada e no tempo de protrombina. Menor atividade antitrombina, aumento dos produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio e aumento da concentração do dímero D também são observados (THRALL, 2007). Para Kusi et al. (2010), a menor atividade de antitrombina oferece risco tromboembólico e prognóstico desfavorável aos pacientes com AHIM.

METODOLOGIA DIAGNÓSTICA

O diagnóstico da AHIM deve ser realizado a partir da pesquisa de elementos que apontem a destruição eritrocitária na presença de auto-anticorpos, tais como esferocitose e autoaglutinação. Sinais de anemia associados à hemólise como icterícia, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobinemia e hemoglobinúria sugerem a triagem para AHIM (Carr et al., 2002). Técnicas diagnósticas empregadas na rotina clínica incluem o teste de antiglobulina direta (TAD), também conhecido como teste de Coombs, e citometria de fluxo (THRALL, 2007).

A detecção de anticorpos anti-eritrocitários é realizada pelo TAD. Uma antiglobulina espécie-específica (soro de Coombs) é adicionada a uma suspensão de hemácias do paciente lavada com soro fisiológico. Ocorrerá aglutinação se as hemácias estiverem recobertas com auto-anticorpos. Assim,

nota-se a limitação do teste no sentido de não poder ser utilizado em casos em que a aglutinação já esteja presente. É método diagnóstico para as classes II, III e V da AHIM, nas quais há presença de anticorpos não aglutinantes ou incompletos (THRALL, 2007; TIZARD, 2008).

A sensibilidade do TAD é de aproximadamente 60% (OVERMANN, 2007). Resultados falso-negativos decorrem da pequena quantidade de anticorpos ligados às hemácias (THRALL, 2007). O teste de Coombs direto pode somente detectar hemácias com mais de 200 a 300 moléculas de Ig em sua superfície (Nelson & Couto, 2010). Outros fatores para resultados falso-negativos incluem a inadequada proporção antiglobulina:anticorpo, temperatura inapropriada e tratamento prévio com glicocorticóides (THRALL, 2007).

Resultados falso-positivos também são relatados com frequência, especialmente em testes realizados em pacientes felinos. Resultados falso-positivos podem ocorrer pois vários tipos de doenças induzem a formação de complexos imunes ou de complementos que se ligam às hemácias sem causar anemia. Transfusões sanguíneas prévias também podem ocasionar resultados falso-positivos (HONECKMAN et al., 1996).

Mais sensível que o TAD, o teste imunoenzimático (ELISA) tem a finalidade de detectar imunoglobulinas ligadas às hemácias. Porém, resultados falso-positivos também podem ocorrer e o teste é considerado trabalhoso, além de ser pouco encontrado nos laboratórios (THRALL, 2007).

Em estudo comparativo entre a metodologia diagnóstica da AHIM, QUIGLEY et al. (2001) considerou a citometria de fluxo como a técnica mais sensível empregada. Neste instrumento, uma suspensão de células é bombeada através de um tubo estreito, de forma que as células caminhem como uma fila indiana. Um feixe de laser é direcionado para o fluxo de células, e os efeitos do feixe de luz sobre cada célula são observados (TIZARD, 2008). Essa técnica permite classificar as células de acordo com seu tamanho, complexidade interna e intensidade de fluorescência. Imunoglobulinas ligadas à membrana das hemácias podem ser marcadas com um anti-soro conjugado à fluoresceína (QUIGLEY et al., 2001).

A terapia imunossupressora também pode ser uma ferramenta diagnóstica, visto que uma alta porcentagem de cães tratados com

corticosteróides apresentam uma melhora clínica acentuada no prazo de 24 a 96 horas (Nelson & Couto, 2010). A administração de altas doses de corticosteróides reduz a fagocitose dos eritrócitos pelas células mononucleares e, assim, este tratamento é mais eficaz para a doença mediada pela IgG. Os corticóides são muito menos eficazes no tratamento da hemólise intravascular mediada pela IgM e pelo sistema complemento, não induzindo imunossupressão nesses indivíduos (TIZARD, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mecanismo de hemólise desencadeado pela AHIM depende do tipo de imunoglobulina envolvida no processo e na temperatura a qual reage. Por esse motivo, os sinais clínicos são considerados inespecíficos, sendo necessária uma ampla investigação por parte do clínico para o diagnóstico. Para tanto, é necessária uma minuciosa anamnese, visando encontrar causas que possam desencadear a reação do sistema imunológico.

Na medida em que o médico veterinário se familiariza com as diferentes classes de apresentação da AHIM e suas características clínicas e laboratoriais, é possível acelerar o processo diagnóstico, instituindo protocolos terapêuticos para controle do distúrbio, bem como protocolos profiláticos para evitar complicações secundárias, tais como eventos tromboembólicos e CID. Diagnósticos precoces minimizam prognósticos menos favoráveis aos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALCH, A.; MACKIN, A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet*, v. 29, n. 4, p. 217-25, Apr 2007.

CARR, A.P.; PANCIERA, D.L.; KIDD, L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.16, n.5, p.504-509, 2002.

Duval D., Giger, U. Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. *J Vet Intern Med.* 1996;10(5):290-5.

Figuera R.A. 2001. Anemia em medicina veterinária. Santa Maria: Figuera, 214p.

Garcia-Navarro, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária.** 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, p.41-45, 2005.

Giger U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of veterinary internal medicine.* 6 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2005. p.1886-907.

HONECKMAN, A.L.; KNAPP, D.W.; REAGAN, W.J. Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian.* v.18, n.2, p.113-124, 1996.

Jericó, M.M; Andrade Neto, J.P; Kogika, M.M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015. p.1816-1825.

Kuzi, S.; Segev, G.; Haruvi, E.; Aroch, I. Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. *J Vet Intern Med.* 2010;24(3):587-96.

Luz, M. J.; Phelippe, C. P.; Rezende, R. S.; Oliveira, P. C. L. Anemia Hemolítica Imunomediada e trombocitopenia em cão – Relato de caso. *Ver. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida. Seropédica, RJ, EDUR, v. 27, suplemento, 2007.*

Mccullough S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the namesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33(6):1295-315.

Mcmanus P. M., Craig L. E. Correlation between leucocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). *J Am Vet Assoc.* 2001; 218(8):1208-13.

Miller, S. A., Hohenhaus, A. E., Hale, A. S. Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(2):232-5.

Nelson R.W. & Couto C.G. **Medicina interna de pequenos animais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010. 1084p.

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.

REBAR, A.H.; MacWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, B.F.; POLLOCK, R.V.H.; ROCHE, J. **Guia de Hematologia para cães e gatos.** 1 ed. São Paulo: Roca, p. 54-67, 2003.

Solato, P.; Bruno, K. V.; Pereira, L.; Torres, F. S.; Loreto, A. C.; Scaramucci, C. P.; Sacco, Soraya Regina. Anemia Hemolítica em cães e gatos – revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça FAMED/FAEF, ano VI, número 11, Julho de 2008. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/images_arquivos/arquivos_destaque/192w9nE9SMPMoVW_2013-6-14-14-54-59.pdf. Acesso em: 09 de jun. 2016.

SCOTT-MONCRIEFF, J.C.; TREADWELL, N.G.; MCCULLOUGH, S.M.; BROOKS, M.B.

Hemostatic abnormalities in dogs with primary immunemediated hemolytic anemia. Journal of the American Animal Hospital Association. v.37, n.3, p.220-227, 2001.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729 p.

TIZARD, Ian R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

THRALL, Mary Anna. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo:, 2007. 582 p. ISBN.