

HELENA ISABEL SOARES BORGES E SILVA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO
HEMOGRAMA DO CAVALO PURO SANGUE
LUSITANO**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
Curso de Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador: Dr. Paolo Bona Soares
Orientador: Dra. Lara Armengou Ruiz
Co-orientador: Dr. Manuel Pequito

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2011

Resumo

Este trabalho centrou-se na caracterização do hemograma de Puro-Sangue Lusitanos, PSL e respectiva comparação com outras raças.

A população estudada incluiu 61 cavalos PSL. Foram analisados: eritrócitos totais, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, VCM, hemoglobina corpuscular média, HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM, leucócitos totais e respectiva contagem diferencial e plaquetas totais. Os resultados obtidos foram comparados com dados previamente publicados, relativos ao Puro-Sangue Inglês, PSI, e aos 'Warm-blood', WB.

O valor médio de eritrócitos e concentração de hemoglobina dos PSL foi inferior à dos PSI, enquanto o valor médio do hematócrito e VCM dos PSL foi superior ao dos PSI e WB. O valor médio da HCM dos PSL foi superior ao dos PSI, no entanto o valor médio da CHCM dos PSL foi inferior ao dos PSI e WB. O valor médio de leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos dos PSL foi superior ao dos PSI e WB. A média dos neutrófilos foi superior nos PSL, relativamente aos dos WB, e dos monócitos inferior aos PSI. O valor médio de plaquetas dos PSL foi inferior ao dos PSI e WB.

Os parâmetros do hemograma no PSL apresentam diferenças significativas relativamente às populações utilizadas para comparação, interessantes a ter em conta na interpretação do hemograma de PSL.

Palavras-chave: Hemograma, Puro-Sangue Lusitano, caracterização.

Abstract

This academic dissertation was based on the characterization of the complete blood count of Puro-Sangue Lusitanos, PSL and respective comparison with other breeds.

The population studied included 61 PSL horses. Total erythrocytes, packed cell volume, PCV, hemoglobin, mean corpuscular volume, MCV, mean corpuscular hemoglobin, MCH, mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC, total white blood cells, WBC, and respective differentials and platelet counts were analyzed. The results were compared with previous published data, for Thoroughbreds, TB, and Warm-bloods, WB.

The mean value of erythrocytes count and hemoglobin concentration of PSL was inferior to TB, whereas the mean value of PCV and MCV of PSL was superior to TB and WB. The mean value of MCH of PSL was superior to TB, whereas the mean value of MCHC of PSL was inferior to TB and WB. The mean value of WBC, lymphocytes and eosinophils of PSL was superior to TB and WB. The mean value of neutrophils was superior to PSL, when compared with WB and monocytes were inferior to TB. The mean value of platelets of PSL was inferior to TB and WB.

The parameters obtained on PSL show significant differences relatively to the populations utilized for comparison, interesting to keep in mind in the interpretation of CBC from PSL.

Keywords: Complete blood count, Puro Sangue Lusitano, characterization.

Abreviaturas e Símbolos

°C - Graus Celsius

% - Percentagem

µm- Micrometro

µL - Microlitro

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ATP - Adenosina trifosfato

BAS - Basófilos

CBC - 'Complete blood count'

CCPM - Concentração de componentes plaquetários médios

CEHP - Células estaminais hematopoiéticas pluripotentes

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID - Coagulação intravascular disseminada

CMH - Complexo maior de histocompatibilidade

CPGM - Células progenitoras dos granulócitos e monócitos

CPMCD - Células progenitoras dos macrófagos e células dendríticas

CPME - Células progenitoras dos megacariócitos e eritrócitos

dL - Decilitro

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO - Eritropoetina

ERT - Eritrócitos

EOS - Eosinófilos

fL - Fentolitro

G - Gauge

g/dL - Grama por decilitro

Hb - Hemoglobina

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HTC - Hematócrito

I-CAM - Moléculas de adesão intracelular

K3 - Tri-potássico

K/µL - 10³ Células por microlitro

LEUC - Leucócitos

LINF - Linfócitos

LINF Th - Linfócitos T ‘helper’

LLP- Linhagem linfóide pluripotente

LMP- Linhagem mielóide pluripotente

MEC - Matriz extracelular

mL - Mililitro

MON - Monócitos

NEU - Neutrófilos

NK - ‘Natural killers’

pg - Picograma

PLQ - Plaquetas

PSI - Puro Sangue Inglês

PSL - Puro Sangue Lusitano

RNA - Ácido ribonucleico

TBC - Trombócrito

TLR - ‘Toll-like receptor’

TPO - Trombopoetina

UFC - Unidades de formação de colónias

UFC-E - Unidades de formação de colónias eritróides

UFC-GM - Unidades de formação de colónias dos granulócitos e monócitos

UFC-Meg - Unidades de formação de colónias dos megacariócitos

VCM - Volume corpuscular médio

VDCCP - Variabilidade de distribuição da concentração dos componentes plaquetários

VDE - Variação de distribuição dos eritrócitos

VDP - Variação da distribuição das plaquetas

VPM - Volume plaquetário médio

x - Vezes

WB - ‘Warm-blood’

Índice Geral

Introdução	9
1.Hemograma	9
1.1 Colheita de amostras e acondicionamento apropriado.....	9
1.2 Processamento de amostras.....	11
2.Interpretação do Hemograma	14
2.1 Interpretação de Parâmetros quantitativos.....	14
3.Introdução aos Elementos Celulares	16
3.1 Hematopoiese.....	16
3.2 Eritrócitos.....	21
3.3 Leucócitos.....	27
3.3.1 Neutrófilos.....	27
3.3.2 Monócitos.....	31
3.3.3 Eosinófilos.....	32
3.3.4 Basófilos.....	34
3.3.5 Linfócitos.....	36
3.4 Plaquetas.....	38
4.Indicações do Hemograma	41
5.Limites do Hemograma	42
6.Particularidades dos cavalos de desporto	46
7.Objectivo	48
8.Justificação	48
9.Materiais e Métodos	49
10.Resultados	52
11.Discussão	59
Conclusão	63
Bibliografia	64

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema de elaboração de um esfregaço sanguíneo pelo método ‘wedge’..	12
Figura 2 - Esquema da técnica de contagem de células pelo método de ‘battlement’..	14
Figura 3 – Esquematização da Hematopoiese (Adaptado de Weiss & Wardrop, 2010).....	18
Figura 4 – Esquematização dos diferentes leucócitos e comparação em tamanho com um eritrócito.....	27
Figura 5 – Neutrófilo segmentado de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).....	28
Figura 6 – Monócito de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).....	31
Figura 7 – Eosinófilo de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).....	33
Figura 8 – Linfócito de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).....	36
Figura 9 – Plaquetas de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).....	39

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Contagem total de ERT dos PSL comparada aos PSI e WB.....	52
Gráfico 2 - Cálculo do HTC dos PSL comparada aos PSI e WB.....	53
Gráfico 3 - Mensuração da concentração de Hb dos PSL comparada aos PSI e WB...	53
Gráfico 4 - Medição do VCM dos PSL comparada aos PSI e WB.....	54
Gráfico 5 - Cálculo do HCM dos PSL comparada aos PSI e WB.....	54
Gráfico 6 - Cálculo do CHCM dos PSL comparada aos PSI e WB.....	55
Gráfico 7 - Contagem total de LEUC dos PSL comparada aos PSI e WB.....	55
Gráfico 8 - Contagem de NEU dos PSL comparada aos PSI e WB.....	56
Gráfico 9 - Contagem de LINF dos PSL comparada aos PSI e WB.....	56
Gráfico 10 - Contagem de MON dos PSL comparada aos PSI e WB.....	57
Gráfico 11 - Contagem de EOS dos PSL comparada aos PSI e WB.....	57
Gráfico 12 - Contagem total de PLQ dos PSL comparada aos PSI e WB.....	58

Introdução

1. Hemograma

O hemograma é o exame complementar de diagnóstico mais realizado em prática equina. Está generalizado em medicina veterinária devido à sua elevada fiabilidade, redução do custo dos equipamentos, rapidez de execução e obtenção de resultados. Este procedimento estuda os três elementos celulares presentes no sangue, nomeadamente, os eritrócitos, ERT, os leucócitos, LEUC, e as plaquetas, PLQ (Kerr, 2002). Para além da análise quantitativa dos elementos celulares, também faz parte do seu estudo a análise qualitativa, através da observação de um esfregaço sanguíneo (Cowel & Tyler, 2002).

Os diferentes elementos celulares possuem funções características. Os ERT realizam o transporte de oxigénio dos pulmões a todos os restantes tecidos do organismo. Os LEUC possuem uma função imunitária contra agentes patogénicos. As PLQ reparam continuamente a parede dos vasos sanguíneos, contribuindo para o controle das hemorragias (Jackson, 1987; Kerr, 2002; Reed, Bayly & Sellon, 2004; Weiss & Wardrop, 2010). Cada uma destas linhagens celulares irá ser aprofundada em capítulos posteriores.

1.1 Colheita de Amostras e Acondicionamento apropriado

Antes da colheita das amostras deve-se proceder à escolha dos tubos de acondicionamento, mediante o procedimento de diagnóstico a realizar. Os tubos contêm anticoagulantes diferentes, sendo que, de forma uniformizada, cada anticoagulante corresponde a uma determinada cor da tampa do tubo (Duncan & Prasse, 1977). Um tubo com a tampa de cor vermelha não possui anticoagulante. A amostra de sangue colectada para este tipo de tubo irá coagular, sendo o soro obtido para provas sorológicas, bioquímicas e endocrinológicas. Os tubos de tampa com cor violeta possuem o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético, EDTA, este actua por remoção do cálcio presente no sangue e o EDTA mais comercializado é o tri-potássico. A sua utilização está indicada na realização de provas hematológicas, dado que consistentemente resulta numa maior preservação de volume e morfologia celular. A cor verde representa um tubo com heparina, este por sua vez, promove a separação do plasma, por neutralização da trombina. O tubo com heparina está indicado na realização de provas imunológicas, provas bioquímicas e mensuração de chumbo. A cor azul representa um tubo com citrato de sódio, que promove a separação do plasma por

ser quelante do cálcio e está indicado para provas de coagulação ou com fins terapêuticos. O tubo com tampa cinza possui fluoreto de sódio, este por sua vez não é um anticoagulante, no entanto, é um inibidor enzimático de processos glicolíticos, evitando que os ERT metabolizem a glicose para posterior mensuração da glicemia (Thrall et al., 2004).

É necessário ter em conta algumas vantagens e desvantagens, em relação a cada anticoagulante, quando o objectivo da recolha da amostra é o estudo de um esfregaço sanguíneo. Generalizando, a heparina e o citrato estão menos indicados em relação ao EDTA. Quando se utiliza a heparina, como anticoagulante, os LEUC não coram correctamente, devido à sua ligação com o corante (Rebar, Lewis, DeNicola, Halliwell & Boon, 1981). Está descrita a ocorrência de agregação plaquetária associada ao armazenamento da amostra em tubos com EDTA ou heparina, sendo então aconselhado o uso de citrato de sódio como anticoagulante para comprovar uma trombocitopenia (Hinchcliff, Kociba & Mitten, 1993; Harvey, 2001; Kingston, Bayly, Sellon, Meyers & Wardrop, 2001).

Após a escolha do tubo, procede-se à colheita das amostras. Na espécie equina, a venopunção é comumente realizada na veia jugular esquerda, dado ser este o lado em que os cavalos estão mais habituados à manipulação. Podem ser utilizados dois tipos de material de recolha, o sistema tradicional com agulha e seringa ou o sistema ‘Vacutainer’. Este último permite a passagem de sangue, por vácuo, para o interior do tubo de colheita, apresentando a vantagem de implicar pouca manipulação e permitir uma colheita rápida. A desvantagem deste sistema é a possibilidade de ocorrer hemólise devido à pressão exercida pelo vácuo e à velocidade com que as células entram no tubo, embatendo contra as paredes do mesmo (Duncan & Prasse, 1977).

Outro aspecto a ter em conta no momento de colheita é o tamanho da agulha ou gauge, G. Agulhas com ‘gauge’ pequeno podem causar danos aos diferentes elementos celulares ou pelo contrário, agulhas com ‘gauge’ grande causam danos aos vasos.

Com a utilização de meios de contenção simples, adequados à espécie, não causando stress, sem movimentos bruscos e sempre com calma, procede-se então à venopunção. Primeiro deve ser realizado um garrote caudalmente ao local de punção, para ingurgitação da veia e estase sanguínea, facilitando a introdução da agulha. O garrote não deve ser exagerado nem prolongado, evitando alterações hematológicas (Kerr, 2002). A punção de pele deve ser realizada com um ângulo mínimo entre a agulha e a superfície cutânea, em local desinfectado e de preferência após tricotomia. De seguida deve-se aumentar o ângulo, redirigindo-se a agulha profundamente em direcção à veia. No final da recolha deve-se retirar a agulha e

comprimir a veia sobre o local da punção, com gaze ou algodão limpo por cerca de meio minuto.

Se a colheita não foi realizada com o sistema ‘Vacutainer’, a transferência da amostra deve ser feita o mais rápido possível.

O tempo ideal para preparação de esfregaços sanguíneos é até 2 horas após a colheita, sendo que o processamento da amostra, após a colheita, minimiza a agregação leucocitária e plaquetária (Harvey, 2001). A temperatura óptima para armazenamento das amostras é de 4° C, embora que mesmo à temperatura ideal, estas deterioram-se em 36 horas e aos 3 dias após colheita, já não são passíveis de serem utilizadas (Kerr, 2002).

1.2 Processamento de amostras

Desde os anos 1930, as analisadoras hematológicas tem vindo a sofrer actualizações em relação às suas técnicas de execução, sendo algumas delas a impedância eléctrica, o feixe de luz e a análise centrífuga. O princípio implicado na impedância eléctrica é o da alteração da condutibilidade eléctrica aquando da passagem de células por dois eléctrodos, dado que as células são pobres condutoras eléctricas. A passagem de células por um feixe de luz provoca a difracção, reflexão e refração da mesma, sendo esse feixe de luz disperso detectado posteriormente por fotodetectores. Este método é frequentemente posto em prática pelo uso do laser. A análise centrífuga não se trata de um método de quantificação propriamente dito, no entanto, ele assenta no princípio em que os elementos celulares possuem diferentes densidades e quando expostos a uma força centrífuga formam camadas individualizadas, sendo posteriormente aplicado um corante específico à camada ‘buffy-coat’ e a mensuração é obtida (Dotson, 1998; Thrall et al., 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

Embora várias doenças sejam diagnosticadas apenas pela quantificação dos elementos celulares, outras implicam a observação de um esfregaço sanguíneo, dado que podem apresentar contagens celulares normais mas morfologias alteradas. Situações de anisocitose, alteração do tamanho, poiquilocitose, alteração da forma e anisocromia, alteração de cor, só podem ser realmente avaliadas e referenciadas, com precisão, se for observado um esfregaço sanguíneo (Weiss & Wardrop, 2010).

Um esfregaço sanguíneo permite a identificação e estudo morfológico dos elementos celulares quando observados ao microscópio óptico. O objectivo de um bom esfregaço é obter uma monocamada de células, numa densidade em que estejam ocasionalmente aderidas. Esfregaços sanguíneos considerados óptimos e consistentes são obtidos pela colocação do

volume adequado de sangue na lâmina, por boa técnica de espalhamento e por obtenção de uma camada fina. Para a realização de um esfregaço sanguíneo é utilizado equipamento apropriado, nomeadamente lâminas, lamelas e corantes específicos. Em condições ideais, um esfregaço sanguíneo deve-se estender até metade ou dois terços da lâmina, para que a monocamada fique localizada numa área passível de ser corada e estudada (Latimer & Rakich, 2002; Willard & Tvedten, 2004).

A técnica mais utilizada na prática laboratorial para a realização de um esfregaço sanguíneo é a ‘wedge’. Neste procedimento são utilizadas duas lâminas sendo colocada uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina. O volume de sangue que se coloca na lâmina por vezes é errado, na tentativa de colocar o volume correcto pode ser utilizado um tubo capilar de microhematócrito ou pipetas especializadas. De seguida, a extremidade de uma segunda lâmina é encostada à superfície da lâmina com a gota de sangue e realizando um ângulo de 30°, entre ambas as lâminas, a segunda lâmina é recuada até permitir o contacto desta com a gota. Por capilaridade a gota percorre toda a superfície de contacto entre ambas as lâminas e com movimento preciso e rápido, a lâmina espalhadora é avançada no sentido contrário da gota, levando-a consigo (Cowel & Tyler, 2002; Kerr, 2002; Thelm, Diem & Haferlach 2004). Após secagem ao ar livre, os esfregaços são identificados apropriadamente. A figura 1 esquematiza a realização de um esfregaço sanguíneo pelo método de ‘wedge’.

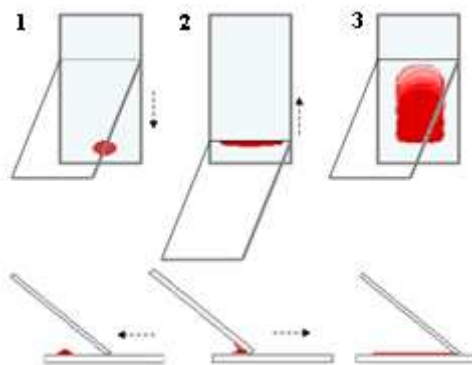


Figura 1 - Esquema de elaboração de um esfregaço sanguíneo pelo método ‘wedge’.

A coloração pelo método de ‘Romanowsky’, dos quais ‘Wright-Giemsa’, ‘Leishman’ e ‘Diff-Quick’, é frequentemente utilizada para a realização de esfregaços sanguíneos, sendo composta por uma mistura de corantes de eosina, que coram as bases de vermelho e corantes de azul metileno, que por sua vez coram os ácidos de azul (Harvey, 2001). Trata-se de uma coloração policromática onde se produzem três cores diferentes, vermelho, azul e violeta. As técnicas baseadas neste método são executadas de forma muito semelhante, sendo a principal

diferença as propriedades da coloração. Na coloração de ‘Wright-Giemsa’ emerge-se a lâmina num pequeno contentor contendo metanol, durante 5 minutos, permitindo assim a fixação adequada das diferentes células. Posteriormente é preparada uma solução de coloração, com diluição de 1:5, em que se coloca num contentor 1 mL de ‘Giemsa’ e 5 mL de solução tampão e as soluções são homogeneizadas por agitação. Coloca-se a lâmina no contentor, com solução preparada, por 6 minutos. Nesta etapa da coloração desenvolve-se uma película amarelo-esverdeada sobre o esfregaço. Por fim, remove-se o excesso de coloração por lavagem do esfregaço em água tépida e deixa-se secar ao ar livre. Na coloração ‘Diff-Quick’ são colocadas três soluções, azul claro, vermelho-alaranjado e azul violeta, em três contentores diferentes. A técnica consiste em mergulhar o esfregaço cinco vezes em cada contentor, primeiro no contentor com solução azul clara, de seguida na solução vermelho-alaranjado e por fim na solução azul violeta. É removido o excesso de corante com água tépida e o esfregaço é seco ao ar. Este método apresenta a vantagem da sua duração total ser de apenas 15 segundos. (Cowel & Tyler, 2002).

Em determinadas condições é necessário proceder à estimacão manual de LEUC totais e diferenciais, bem como à estimacão manual de PLQ totais. Para a estimacão de LEUC totais, é observado ao microscópio óptico, a zona de monocamada de um esfregaço sanguíneo, sob ampliacão de 100x e são enumerados os LEUC presentes. De modo prático, a contagem é realizada em 10 campos de visualizacão distintos, através do método ‘battlement’. Calcula-se a estimativa do valor total de LEUC pela média aritmética e o resultado é multiplicado por 100. Quando se pretende estimar o intervalo de LEUC totais, multiplica-se a média obtida por 100 e 150. O resultado é expresso em número de células por μL (Duncan & Prasse, 1977; Harvey, 2001). Na contagem diferencial de LEUC, igualmente por observacão ao microscópio óptico da zona de monocamada de um esfregaço sanguíneo, sob ampliacão de 400x, são contados 100 LEUC, sendo cada tipo de LEUC identificado individualmente. O número total de cada subtipo de LEUC é somado, sendo este valor correspondente à percentagem de cada subtipo de LEUC presente na amostra. Dado que a informacão em percentagem pode induzir erros, deve ser sempre estimado o valor absoluto de cada subpopulacão de LEUC. Para tal, cada percentagem é multiplicada pelo valor total de LEUC estimado, obtendo-se resultados expressos em número de célula por μL . A soma de todos os valores em percentagem deve ser igual a 100 e a soma de todos os valores absolutos de cada subtipo de LEUC deve ser igual ao valor total de LEUC estimado (Brockus & Andreasen,

2003; Willard & Tvedten, 2004). A figura 2 esquematiza a técnica de contagem pelo método de ‘battlement’.

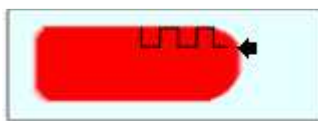


Figura 2 - Esquema da técnica de contagem de células pelo método de ‘battlement’.

De modo a assegurar que a contagem total de PLQ se torna um resultado fiável, primeiro é necessário observar toda a zona de monocamada do esfregaço sanguíneo, para a inexistência de agregados plaquetários. A contagem total de PLQ é realizada por observação ao microscópio óptico da zona de monocamada do esfregaço sanguíneo a estudar, sob a ampliação de 1000x, sendo contadas as PLQ presentes em 10 campos de visualização distintos. A soma da contagem de PLQ presentes nos 10 campos distintos é multiplicada por 15000 e o resultado expresso em número de PLQ por μL . Quando se pretende estimar o intervalo de PLQ totais, multiplica-se a soma obtida por 15000 e 20000 (Cowel & Tyler, 2002; Brockus & Andreasen, 2003; Willard & Tvedten, 2004).

2. Interpretação do Hemograma

2.1 Interpretação de parâmetros quantitativos

O hemograma fornece parâmetros qualitativos e quantitativos, relativamente aos diferentes elementos celulares. Enquanto as analisadoras automáticas dão informação essencialmente quantitativa, os dados obtidos através da leitura de um esfregaço sanguíneo são prioritariamente qualitativos, sendo que o estudo de um hemograma não é completo sem a análise de um esfregaço sanguíneo (Reed et al., 2004).

Através das analisadoras automáticas modernas, utilizadas na prática veterinária, pode-se obter a contagem numérica dos ERT, a concentração da hemoglobina, Hb, o valor do hematócrito, HTC, o volume corpuscular médio, VCM, a hemoglobina corpuscular média, HCM e a concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM. Sendo que, directamente, os equipamentos contam os ERT, medem a concentração de Hb e medem o VCM, e através destes parâmetros, as analisadoras realizam cálculos, dos quais se obtém o valor do HTC, do HCM e do CHCM. Para a realização dos cálculos, as analisadoras utilizam as seguintes fórmulas (Reed et al., 2004; Lording, 2008):

$$\text{HTC (L/L)} = \text{Contagem dos ERT (x10}^{12}/\text{L)} \times \text{VCM (fL)} / 1000$$

$$\text{HCM (pg)} = \text{Hb (g/L)} / \text{Contagem dos ERT (x10}^{12}/\text{L)}$$

$$\text{CHCM (g/L)} = \text{Hb (g/L)} / \text{HTC (L/L)}$$

As analisadoras hematológicas são ainda capazes de calcular a variação de distribuição dos ERT, VDE e a taxa de sedimentação dos ERT (Kerr, 2002; Reed et al., 2004; Brooks, 2008).

Quando se estudam os LEUC, o hemograma fornece a contagem total dos LEUC, a contagem de neutrófilos, NEU, totais, a contagem de NEU segmentados, a contagem de NEU em banda, a contagem de monócitos, MON, a contagem de eosinófilos, EOS, a contagem de basófilos, BAS, e a contagem de linfócitos, LINF (Weiss & Wardrop, 2010).

As analisadoras hematológicas automáticas modernas fornecem uma variedade de parâmetros relativos às PLQ. O estudo completo das PLQ inclui a contagem de PLQ, a medição do volume plaquetário médio, VPM, a medição da variabilidade de distribuição das plaquetas, VDP, o cálculo do trombócrito, TBC, a medição da concentração dos componentes plaquetários médios, CCPM e a medição da variabilidade de distribuição da concentração dos componentes plaquetários, VDCCP (Weiss & Wardrop, 2010).

A contagem dos ERT possibilita o diagnóstico de diminuições ou aumentos do seu número, respectivamente anemia ou policitemia. O valor do HTC traduz a fracção de volume sanguíneo que é ocupado pelos ERT, sendo expresso em percentagem ou fracção decimal. A concentração de Hg estimada pelas analisadoras é expressa em g/dl e é um parâmetro importante na avaliação de determinadas doenças, como a anemia. O VCM, volume corpuscular médio, é o índice do tamanho médio dos ERT, utilizado para classificá-los em normocíticos, macrocíticos ou microcíticos. O HCM, hemoglobina corpuscular média, traduz o conteúdo médio de Hg por ERT, sendo expresso em picograma, pg. A CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média, refere a concentração de Hg corpuscular numa determinada população de ERT. Este parâmetro classifica a cromia dos ERT, sendo que uma diminuição deste designa-se hipocromia, um aumento uma hipercromia ou em situação normal uma normocromia. A hipercromia não revela uma situação patológica mas sim um erro na preparação da amostra ou da analisadora (Willard & Tvedten, 2004). A variação de distribuição dos ERT, VDE, é o coeficiente de variação da distribuição do tamanho de uma população de ERT, que por sua vez relata o índice de anisocitose. Um valor de VDE elevado refere a uma população de ERT com tamanho aumentado, presenciada em respostas

regenerativas ou pelo contrário um valor de VDE diminuído refere uma população de ERT com tamanho diminuído, como no caso de uma deficiência em ferro (Lording, 2008).

Relativamente aos LEUC, as analisadoras fornecem a sua quantificação total e diferencial, no entanto, as alterações morfológicas não são avaliadas, sendo necessário recorrer à observação de um esfregaço sanguíneo. As analisadoras referem aumentos, leucocitose e diminuições, leucopenia, do número dos LEUC, bem como contam os LEUC diferenciadamente.

A contagem de PLQ informa sobre a presença ou ausência de trombocitopenia ou trombocitose (Weiss & Wardrop, 2010). O VPM indica o tamanho das PLQ, sendo que está aumentado na trombocitopenia e reportado ainda em algumas doenças imunoproliferativas ou hipertiroidismo (Small & Bettigole, 1981; Ford, Toomath, Carter, Delahunt & Fagerstrom, 1988). O VDP é um índice da variação do tamanho das PLQ, útil na diferenciação de trombocitopenias destrutivas e trombocitopenias hipoprodutivas (Kaito, 2005). O TBC representa a percentagem de volume sanguíneo composto por plaquetas, é calculado através do número de PLQ e VPM e é utilizado para avaliação da função plaquetária (Kutter, 1996). A CCPM estima a densidade média das PLQ e é utilizada para detectar activação plaquetária (Chapman, Hetherington & Zelmanovic, 1996). Um estudo realizado em poldros com septicemia, em poldros com CID, adultos com cólicas isquémicas e obstrutivas, enterites e trombocitopenia demonstrou uma redução na CCPM de ambos casos (Segura, 2007). O VDCCP é o índice de variabilidade da densidade das PLQ e está citado como parâmetro importante no reconhecimento de trombocitopenia secundária à activação plaquetária (Lim & Hyun, 2002).

3. Introdução aos elementos celulares

3.1 Hematopoiese

A produção dos diferentes elementos celulares, constituintes do sistema circulatório, ocorre continuamente no espaço extravascular da medula óssea (Quesenberry, 1995). O microambiente da medula óssea é formado por diferentes nichos de células do estroma, células acessórias, factores de crescimento glicoproteicos e componentes da matriz extracelular, MEC (Harvey, 2001). As células do estroma correspondem às células endoteliais, fibroblastos, adipócitos e macrófagos, sendo capazes de produzir componentes da MEC, enquanto as células acessórias são nichos de LINF T e 'Natural Killers', NK (Gordon,

1994). A proliferação e diferenciação dos diferentes elementos celulares são levadas a cabo por processos de interacção inter-células e entre células e MEC, envolvendo integrinas e receptores, sendo estes regulados por factores de crescimento, citoquinas e factores de transcrição (Campbell, 1992; Pantel & Nakeff, 1993; Yoder & Williams, 1995; Chasis & Mohandas, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Também participam neste processo, a eritropoetina, EPO, a trombopoetina, TPO, factores estimulantes de colónias e interleucinas (Metcalf, 1993; Quesenberry, 1995). Um conjunto de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes, CEHP, diferenciam-se na linhagem linfóide pluripotente, LLP, ou na linhagem mielóide pluripotente, LMP (Harvey, 2001). A LMP dá origem a células progenitoras que sustentam a produção de todas as células sanguíneas, à excepção dos linfócitos (Akashi, Traver, Miyamoto & Weissman, 2000). Mediante sinalizações do microambiente, a LMP origina células progenitoras dos granulócitos-monócitos, CPGM, células progenitoras dos macrófagos-células dendríticas, CPMCD e células progenitoras dos megacariócitos-eritrócitos, CPME (Weiss & Wardrop, 2010). As células estaminais e progenitoras não são passíveis de ser diferenciadas ao microscópio óptico, no entanto após cultura 'in vitro' as células progenitoras formam múltiplas sub-colónias, sendo denominadas unidades de formação de colónias, UFC (Quesenberry, 1995; Waller, 1995). As CEHP também produzem células precursoras dos osteoclastos, mastócitos, células dendríticas e células de Langerhans (Herbst et al., 1996; Rosenzweig, Canque & Gluckman, 1996; Hayase, Muguruma & Lee, 1997; Herbst, Kohler, Mackensen, Veelken & Lindemann, 1998; Kirshenbaum, 1999; Mbalaviele, 1999). A figura 3 esquematiza o processo da hematopoiese (Adaptado de Weiss & Wardrop, 2010).

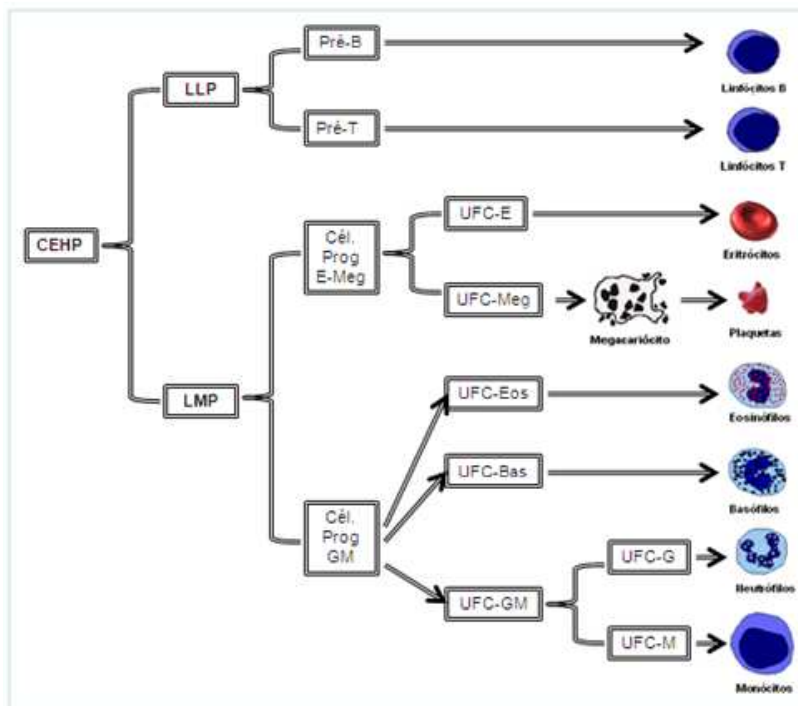


Figura 3 – Processo da Hematopoiese (Adaptado de Weiss & Wardrop, 2010). As siglas utilizadas na figura estão referenciadas no texto.

Eritropoiese

As células progenitoras, que formam as unidades de formação de colónias eritróides, UFC-E, diferenciam-se em células precursoras e estas por sua vez sofrem diferenciação até à formação dos ERT. As primeiras células precursoras dos ERT são os rubriblastos, estes sofrem diferenciação resultando na redução do seu tamanho, aumento da concentração de Hb citoplasmática e condensação gradual de cromatina nuclear. As células resultantes da maturação dos rubriblastos são os prorubricitos, sendo que as etapas seguintes formam, sequencialmente, os rubricitos basofílicos, os rubricitos policromatofílicos e os metarubricitos (Weiss & Wardrop, 2010). A divisão de cada rubriblasto origina cerca de 16 metarubricitos e a duração de todo o processo é de cerca de 3 a 4 dias (Erslev & Beutler, 1995). No momento em que as células se tornam metarubricitos, o seu núcleo é extrudido do citoplasma e geram-se os reticulócitos. Posteriormente, o seu citoesqueleto é reorganizado por filamentos intermédios e microtúbulos (Lazarides, 1987; Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010). Nos cavalos e ruminantes, os reticulócitos sofrem maturação ainda na medula óssea e no caso dos cavalos, os reticulócitos não são libertados na circulação periférica (Jain, 1993; Harvey, 2001). Quando na circulação periférica, o tempo de semi-vida médio dos ERT é de aproximadamente 140 a 150 dias (Carter, 1974).

Leucopoiese

A leucopoiese é um termo ambíguo à poiese dos granulócitos, MON e LINF, no entanto a origem e o processamento é diferente. A leucopoiese é regulada pela interação das células precursoras hematopoiéticas com a MEC em resposta a factores de transcrição produzidos pelo microambiente e factores provenientes da circulação periférica, como as citocinas (Weiss & Wardrop, 2010).

A granulopoiese ocorre maioritariamente na medula óssea, podendo expandir-se a locais extramedulares e é estimulada por citocinas, principalmente pela G-CSF, mas também por IL-3, IL-6 e GM-CSF. O mieloblasto é primeira célula da linhagem granulocítica, inicialmente é desprovido de grânulos, mieloblasto tipo I, no entanto após a sua maturação apresentam grânulos azurofílicos primários, mieloblasto tipo II. As segundas células da linhagem são os promielócitos, estes possuem maior quantidade de grânulos primários e menor basofilia citoplasmática. Com os processos de maturação os grânulos primários desaparecem e formam-se grânulos secundários. Na última etapa de divisão celular, os promielócitos diferenciam-se em mielócitos, sendo que as etapas posteriores apenas sofrem maturação nuclear, como é o caso dos metamielócitos e granulócitos em banda, que apenas sofrem condensação da cromatina e segmentação progressiva (Weiss & Wardrop, 2010). O processo de desenvolvimento dos mieloblastos em neutrófilos segmentados está associado com a expressão de moléculas na superfície celular (Elghetany, 2002). Nos EOS, os processos de diferenciação e maturação são regulados por factores de transcrição e citocinas, nomeadamente a IL-5, no entanto, dado que os EOS e os BAS partilham a mesma origem, a estimulação para a sua diferenciação e proliferação é ambígua (Leary & Oagwa, 1984; Denburg, 1985; Galli & Dvorak, 1995; Arock, Schneider, Boissan, Tricottet & Dy, 2002; Xavier & Gaspar, 2007; Hogan, 2008). A diferenciação dos BAS dá-se sob controlo da IL-3. A granulopoiese tem a duração de cerca de 2 a 6 dias (Schalm, 1984; Carrick & Begg, 2008).

A monocitopoiese é estimulada por vários factores de colónias e interleucinas, sendo que a sua produção inicia-se com a diferenciação das UFC dos granulócitos e monócitos, UFC-GM, em monoblastos, que por sua vez originam os promonócitos e finalmente, estes formam os MON (Bienzle, Reggeti, Clark & Chow, 2003; Weiss & Wardrop, 2010).

Como descrito anteriormente neste capítulo, as CEHP diferenciam-se numa LMP ou LLP, sendo esta última linhagem responsável pela produção dos LINF. A diferenciação da LLP origina células progenitoras distintas, as células progenitoras dos LINF B e as células progenitoras dos LINF T-NK. A diferenciação da linhagem de LINF T-NK resulta na

formação de células progenitoras dos LINF T e células progenitoras de NK (Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010). A linfopoiese dos LINF B tem início no fígado fetal transitando para a medula óssea após o nascimento. As células progenitoras dos LINF B diferenciam-se em LINF pró-B, LINF pré-B e finalmente em LINF B imaturos. A maturação final dos LINF B ocorre após a sua migração para linfonodos, folículos das Placas de Peyer no jejuno e folículos esplénicos (Lebien, 2005; Weiss & Wardrop, 2010). A diferenciação de células progenitoras de LINF T-NK é mediada pelo 'Notch 1' e pelo factor de transcrição 'Ets-1' (Tydell et al., 2007). A linfopoiese dos LINF T tem origem na medula óssea, onde são produzidas células progenitoras dos LINF T, no entanto a sua diferenciação e maturação ocorre no timo. Após maturados, os LINF T acumulam-se nas zonas paracorticais dos linfonodos, nos folhetos periarteriolares do baço e nas áreas interfoliculares das placas de Peyer do jejuno. Um factor necessário para a sua diferenciação é a IL-7 (Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010). As células NK são integrantes do sistema imune inato e possuem a habilidade de matar células que não exprimem complexo maior de histocompatibilidade I, CHM, à sua superfície. A diferenciação e maturação de células NK ocorrem no fígado fetal e na medula óssea após o nascimento, podendo ser encontradas também no timo (Spits, Lanier & Phillips, 1995). São conhecidas 3 etapas da formação de células NK, a primeira descrita como uma linhagem concomitante com LINF T, seguida pela selecção de receptores NK e finalmente a maturação funcional. Um factor necessário para a sua diferenciação é a IL-15 (Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010).

Trombopoiese

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, originam-se a partir da diferenciação dos megacariócitos originados na medula óssea (Weiss & Wardrop, 2010). Como descrito anteriormente, as CEHP originam 2 linhagens, a LMP e a LLP. A megacariocitopoiese inicia-se com a diferenciação da LMP em CPME, e esta por sua vez, em unidades de formação de colónias dos megacariócitos, UFC-Meg (McDonald & Sullivan, 1993; Hunt, 1995; Debili, Coulmobel & Croiselle, 1996; Italiano & Hartwig, 2007; Cantor, 2009). As primeiras células da linhagem megacariocítica, reconhecidas ao microscópio óptico, são os promegacarioblastos. Com a aquisição de marcadores de superfície específicos, os promegacarioblastos entram em endomitose, processo no qual existe divisão de ADN sem divisão celular, sob influência de uma fosfoproteína chamada 'stathmin' (Vitrat, 1998, Schulze, 2006). Terminado o processo de endomitose, os níveis de 'stathmin' diminuem e os

megacariócitos maduros irão produzir proplaquetas, através de um processo complexo de fragmentação citoplasmática, que engloba um sistema de demarcação de membrana, associação deste com microtúbulos e complexos actina-miosina (Radley & Haller, 1982; Patel, 2005). As proplaquetas são então libertadas na circulação periférica e aí finalizam a sua diferenciação (Tavassoli & Aoki, 1981; Chang, Bluteau, Debili & Vaincheker, 2007). O facto da trombopoiese não se completar na medula óssea é devida à possibilidade das plaquetas ficarem aprisionadas na medula óssea, explicando assim o facto de serem encontrados com frequência megacariócitos na circulação pulmonar (Trowbridge, Martin & Slater, 1982). Todo o processo de trombopoiese tem a duração de cerca de 4 a 5 dias (Jandl, 1996).

3.2 Eritrócitos

Os ERT são células com formato discóide bicôncavo, com uma zona central pálida e medem cerca de 5.7 μ m de diâmetro (Reed et al., 2004; Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Embora os ERT tenham a tendência para se agregarem, formando 'rouleaux', os dos equinos e gatos são particularmente propensos a este fenómeno (Jain, 1986; Brockus & Andreasen, 2003; Lording, 2008). Estão presentes na circulação periférica cerca de 6,8 a 12,9x10⁶ ERT/ μ L.

Alterações morfológicas dos ERT podem ocorrer em resposta a doenças sistémicas, intoxicações, alterações vasculares, parasitas ou por má técnica de processamento da amostra (Reed et al., 2004). A anisocitose é definida como a variação do tamanho dos ERT, dado que os ERT dos cavalos são pequenos, estes possuem um grau moderado de anisocitose fisiológica (Lording, 2008). Em cavalos com anemias regenerativas severas, pode ocorrer anisocitose, sem policromasia. A hipocromasia é uma diminuição da tonalidade da cor dos ERT associada à redução da concentração de Hb nos mesmos e está descrita em anemias por deficiência em ferro. A poiquilocitose corresponde a uma alteração atípica da forma dos ERT, sendo o termo reservado a morfologias raramente observadas e pode estar associada à fragmentação dos ERT (Harvey, 2001; Reed et al., 2004). Os equinócitos são ERT espiculados, cujas espículas, projecções citoplasmáticas, são curtas e estão espassadas. A sua morfologia varia de discoequinócitos ligeiramente espiculados a esferoequinócitos altamente espiculados. Estas células podem ser artefactos devidos a má técnica de processamento, nomeadamente por excesso de EDTA, má preparação de esfregaços sanguíneos ou por tempo de armazenamento prolongado até ao processamento da amostra. Também se podem formar em situações de desidratação, aumento do pH intraeritrocitário, depleção de ATP no caso de

hipofosfatemia e aumento do cálcio intracelular (Harvey, 1997; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004; Weiss & Wardrop, 2010). Foi descrito na literatura, a observação de equinócitos, em casos clínicos de cavalos que apresentaram depleção total de catiões, por realização de provas de endurance, após tratamento com furosemida e também na presença de doenças sistémicas (Geor, Lund & Weiss, 1993; Weiss & Geor, 1993). Os acantócitos são ERT cujas espículas estão dispostas irregularmente e estão associados a doença hepática ou má absorção gastrointestinal. Os queratócitos são ERT que apresentam apenas uma ou duas espículas e são indicativos de fragmentação. Os esferócitos são ERT redondos, com tamanho reduzido, zona central pálida e formam-se quando os macrófagos eliminam anticorpos unidos à sua membrana celular (Harvey, 2001; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004; Weiss & Wardrop, 2010). À parte da espécie canina, os esferócitos são difíceis de identificar, dado que os ERT apresentam uma palidez central típica da sua morfologia (Reagan, Sanders & DeNicofa, 1998). Os xistócitos são ERT com extremidades pontiagudas, difíceis de observar em equinos e formam-se por fragmentação dos ERT, em anomalias vasculares ou de fluxo sanguíneo turbulento. Os leptócitos são células finas de aparência fendida, associados nos equinos a doenças hepáticas e a deficiências em ferro. Os codócitos são ERT em forma de lágrima, com uma zona central densa e uma área ao redor pálida, por vezes denominada ‘bull’s eye’, podendo estar associados a doença hepática e anemia hipocrómica (Harvey, 2001; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004). Os eccentricócitos são ERT cuja Hb se encontra em posição descentrada na célula, deixando uma área pálida sem Hb (Weiss & Wardrop, 2010). Estão reportados em cavalos que ingeriram folhas de bordo vermelho, *Acer rubrum* (Reagen, Carter & Turek, 1994). Também foram observados num cavalo com deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (Stockham, Harvey & Kinden, 1994) e noutro com deficiência de glutatona-redutase (Harvey et al., 2003).

Os Corpos de ‘Howell-Jolly’ são inclusões citoplasmáticas, de remanescentes nucleares, com coloração roxa, que não saíram dos ERT antes de estes saírem da medula óssea. Aparecem frequentemente em anemias severas, no entanto uma pequena percentagem, 0.1%, aparece nos esfregaços sanguíneos de equinos e gatos saudáveis. Os corpos de ‘Heinz’ são pequenos agregados de hemoglobina oxidada, descritos em cavalos após ingestão de folhas de bordo vermelho, *Acer rubrum* e num paciente com anemia hemolítica associada à administração de fenotiazinas (Harvey, 1997; Harvey, 2001; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004).

Podemos também, observar num esfregaço sanguíneo a presença de hemoprotozoários intra-eritrocitários, como a *Theileria equi* e a *Babesia caballi*. A *Theileria equi* anteriormente pertencia à família das Babesias, no entanto observou-se que sofre etapas de diferenciação nos LINF e não é transmitida transovaricamente como os organismos pertencentes à família das Babesias (Reed et al., 2004). As *Theileria equi* possuem pequena dimensão, 1 a 2 μm e são redondas ou ovais. A *Babesia caballi* tem forma piriforme de grande dimensão e geralmente encontra-se unida a outro organismo da mesma espécie, formando um ângulo agudo entre os dois (Weiss & Wardrop, 2010).

Rouleaux

A formação de ‘rouleaux’ está intimamente relacionada com o número de ERT na circulação periférica e pela sua tendência em se agregar (Geor, Weiss & Smith, 1994). A existência de cargas negativas à superfície dos ERT confere a estes a capacidade de se repelirem, potencial zeta, no entanto a quantidade de carga eléctrica nos ERT varia consoante a espécie. Nos equinos, a tendência elevada para formar ‘rouleaux’ deve-se ao facto de serem fracamente carregados de potenciais negativos à superfície dos seus ERT. A formação de ‘rouleaux’ é responsável pela alta taxa de sedimentação dos ERT (Kerr, 2002; Brockus & Andreasen, 2003; Lording, 2008). Outra hipótese citada na literatura relaciona a tendência para a formação de ‘rouleaux’ com o HCT, em que certas doenças alteram a viscosidade do plasma, nomeadamente, as que implicam a ocorrência de hiperproteineimias, quer por aumento das imunoglobulinas, quer pelo aumento do fibrinogénio (Jain, 1986; Kerr, 2002). No entanto outros revogam essa hipótese, comentando que esse mesmo aumento das proteínas plasmáticas provoca uma diminuição das cargas na superfície da membrana dos ERT (Cotter, 2001; Brockus & Andreasen, 2003).

Aglutinação

A aglutinação é um fenómeno decorrente da ligação de anticorpos ou moléculas do complemento, C3, à membrana celular dos ERT, promovendo a aderência entre os mesmos. Devido à sua natureza pentavalente, as imunoglobulinas M são mais propensas à produção de aglutinação eritrocitária (Meyer & Harvey, 1998). Estão descritos ao exame microscópico como aglomerados de ERT em cacho de uva, podendo ser resultado de terapia intravenosa com heparina ou consequência da anemia hemolítica imunomediada (Moore, Mahaffey &

Zboran, 1987; Monreal et al., 1995). A observação de um aglomerado de ERT desta origem deve ser diferenciada do fenómeno de rouleaux, nomeadamente pela adição de partes iguais de sangue com EDTA e solução salina a uma lâmina e posterior avaliação ao microscópio óptico (Willard & Tvedten, 2004; Weiss & Wardrop, 2010). O teste diagnóstico ‘gold-standard’ de aglutinação dos ERT é o teste de ‘Coomb’s’, no qual um determinado volume de ERT lavados é incubado num reagente com antiglobulinas polivalentes e posteriormente avaliado ao microscópio. Uma desvantagem deste teste é que não diferencia uma anemia hemolítica autoimune de uma anemia hemolítica imunomediada (Weiss & Wardrop, 2010).

A função primária dos ERT é a oxigenação dos tecidos, como tal são transportadores de oxigénio e dióxido de carbono, entre os tecidos e os pulmões, através de um transportador específico, a Hb (Kerr, 2002; Reed et al., 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

O controlo da eritropoiese é mediado por um vasto número de moléculas, de entre as quais, a EPO, IL-3, factores estimulantes de colónias, nomeadamente GM-CSF e G-CSF, androgénios e hormonas tiroideias e hiposifárias (Brockus & Andreasen, 2003; Weiss & Wardrop, 2010). A EPO é a principal hormona reguladora da eritropoiese, é uma glicoproteína produzida principalmente nos fibroblastos peritubulares intersticiais do rim e responde à hipoxia dos tecidos (Duncan & Prasse, 1977; Brockus & Andreasen, 2003; Weiss & Wardrop, 2010). Secundariamente, em situações de anemia a EPO pode ser produzida nos hepatócitos e células Ito do fígado (Koury, Bondurant, Koury & Semenza, 1991; Brockus & Andreasen, 2003). A sua acção assenta na inibição da apoptose das células progenitoras e precursores recentemente formados, permitindo a sua diferenciação em ERT maduros e estimulação da síntese de Hb nos ERT em divisão (Brockus & Andreasen, 2003). Esta hormona é altamente conservada entre espécies, sendo que a EPO recombinante humana induz respostas em cavalos (Weiss & Wardrop, 2010). A IL-3, produzida pelos macrófagos, juntamente com os factores estimulantes de colónia, incrementa a multiplicação das CEHP e UFC-E e potencializa a acção da EPO nas CPME (Aglietta et al., 1993; Brockus & Andreasen, 2003; Weiss & Wardrop, 2010). Outros autores comentam a acção da TPO como agente co-estimulante no desenvolvimento das UFC-E ‘in vitro’ e de suporte à proliferação e manutenção de células progenitoras ‘in vivo’ (Alexander, Roberts, Nicola, Li & Metcalf, 1996; Kaushansky et al., 1996; Spring, 2001; Wu, Liu, Jaenisch & Lodish, 1995; Yoshida, 1997).

Anemia

A anemia é uma diminuição do número de ERT circulantes e é resultante de um desequilíbrio entre a perda ou destruição dos ERT e a sua produção na medula óssea (Reed et al., 2004). A anemia relativa é um artefacto resultante do aumento do volume plasmático, associado à gestação ou fluidoterapia intravenosa excessiva (Carrick & Begg, 2008). A anemia absoluta deve-se a uma redução do número dos ERT, por perda ou destruição (Reed et al., 2004). O correcto diagnóstico da anemia requer o conhecimento da história clínica, realização de um exame clínico e interpretação de achados laboratoriais. Para o seu estudo, deve ser realizado um hemograma completo, incluindo a mensuração dos valores e índices eritrocitários, a mensuração do VDE, contagem total e diferencial dos LEUC, a mensuração da concentração plasmática de proteína e a observação de um esfregaço sanguíneo (Carrick & Begg, 2008). Podemos classificar uma anemia em, regenerativa ou não regenerativa, consoante a resposta da medula óssea seja efectiva ou inefectiva, respectivamente (Reed et al., 2004). A classificação da anemia, nos cavalos, está comprometida, pelo facto destes não libertarem reticulócitos na circulação periférica (Lording, 2008). Nesta espécie a classificação de uma anemia geralmente requer a avaliação da resposta da medula óssea, por observação de um esfregaço da mesma (Carrick & Begg, 2008). A contagem de reticulócitos medulares foi descrita como um parâmetro altamente fiável, sendo que num equino saudável a sua proporção é de 3% e num equino com anemia regenerativa é de 66% (Schalm, 1980; Tablin & Weiss, 1985). A anemia regenerativa é resultante da perda de ERT intactos da circulação periférica, por hemorragia ou pelo aumento da sua destruição, hemólise, estando associada a uma resposta apropriada da medula óssea na restauração do número de ERT (Reed et al., 2004). O diagnóstico, através do hemograma, deste tipo de anemia, nos equinos, pode ser difícil pois apenas se baseia na leitura do VCM (Radin, Eubank & Weiser, 1986). Na presença de uma anemia regenerativa, a avaliação regular do hemograma apresenta um aumento progressivo da contagem dos ERT e aumento do VCM e VDE (Carrick & Begg, 2008). Este último parâmetro, VDE, revela a presença de uma anisocitose ligeira (Shull, 1981; Weiser, Kohn & Vachon, 1983). A anemia pode ainda ser classificada consoante o VCM e CHCM. Uma anemia normocítica e normocrómica é caracterizada por ter VCM e CHCM normais, estando associada a doenças crónicas, como por exemplo, insuficiência hepática, insuficiência renal, doenças endócrinas, condições neoplásicas ou inflamação crónica. Uma anemia microcítica e hipocrómica apresenta níveis baixos do VCM e CHCM e está associada com deficiência em ferro ou à anemia megaloblástica. Uma anemia macrocítica, com aumento do

VCM, ocorre após crises hemorrágicas ou hemolíticas severas (Reed et al., 2004). A anemia não regenerativa pode ocorrer por uma variedade de factores intrínsecos, intramedulares ou extrínsecos, extramedulares e é consequência de uma resposta inadequada da medula óssea (Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008). A anemia não regenerativa está comumente associada a deficiências em ferro, inflamação crónica, doenças endócrinas, como o hipotiroidismo, neoplasias ou à falência da medula óssea (Waldron-Mease, 1979; Reed et al., 2004).

Policitemia

A policitemia ou eritrocitose é um aumento, do número dos ERT circulantes, podendo ser classificada como relativa, por redução do volume plasmático, ou absoluta, por aumento do número de ERT (Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008). A policitemia relativa é resultante da hemoconcentração, por desidratação ou contracção esplénica. A policitemia absoluta está associada a um aumento da eritropoiese, com aumento do HTC, contagem dos ERT e concentração de Hb (Reed et al., 2004). A policitemia absoluta pode ser primária, ‘policitemia vera’, ou secundária. A policitemia primária ocorre por doenças mieloproliferativas, enquanto a secundária ocorre por aumento da concentração da EPO (McFarlane, Sellon & Gibbs, 1998). Esta última pode ser ainda agrupada em apropriada e inapropriada, consoante a existência ou não de hipóxia tecidual, sendo que a apropriada está associada a um aumento da circulação de EPO, secundariamente a um shunt cardíaco da direita para a esquerda ou por doença pulmonar crónica e a policitemia inapropriada ocorre na presença de patologias renais ou de neoplasmas produtores de EPO, como em situações de carcinomas hepatocelulares, carcinomas metastáticos ou neoplasmas hepáticos (Roby, Beech, Bloom & Black, 1990; Cook, Divers & Rowland, 1995; Lennox, 2000; Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008).

3.3 Leucócitos

Fazem parte integrante dos LEUC diferentes elementos celulares, com diferentes morfologias e funções. Todos eles são originados na medula óssea, todavia são produzidos por populações celulares diferentes e percorrem caminhos distintos após a sua libertação. Algumas destas células, após a sua libertação na circulação periférica, são ainda consideradas proliferativas, dando origem a outros elementos celulares. As células que constituem o grupo

dos LEUC são os NEU, os MON, os EOS, os BAS e os LINF. Todos eles realizam um importante papel na defesa imunitária do organismo, sendo que alguns possuem funções paralelas (Carrick & Begg, 2008). A figura 4 ilustra o aspecto morfológico de cada LEUC e compara em tamanho com os ERT.

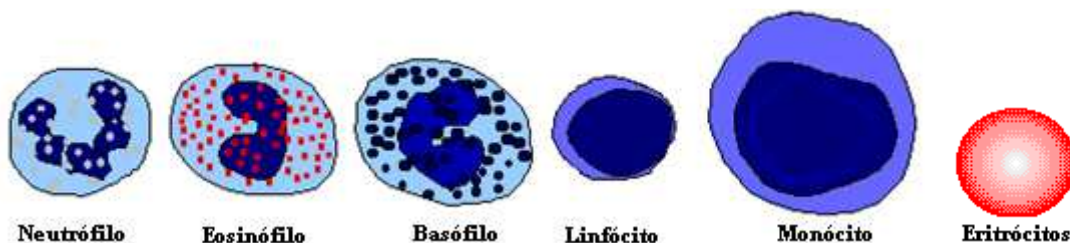


Figura 4 – Ilustração dos diferentes LEUC e comparação em tamanho com um ERT.

3.3.1 Neutrófilos

Os NEU são células do sistema imunitário, que consoante o seu estado de maturação apresentam diferentes morfologias. No estado imunoproliferativo imaturo, os NEU estão aumentados de tamanho e possuem grânulos azurofílicos proeminentes. Quando estes se tornam metamielócitos, o seu núcleo é segmentado, com formações bulbosas (Carrick & Begg, 2008).

Mediante o seu estado de maturação, os NEU podem adquirir duas morfologias distintas, NEU em banda ou NEU segmentados. Os NEU em banda estão em reduzidas quantidades no sangue periférico, 0 a 1000/ μ L ou 0 a 8% dos LEUC totais, e são o estado proliferativo antecedente aos NEU segmentados. Adquiriram este nome, pois os seus núcleos, em forma de U ou S, não apresentam segmentos, sendo que possuem ainda cromatina agregada e contornos citoplasmáticos uniformes (Reagen et al., 1998; Cowel & Tyler, 2002; Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Os NEU segmentados têm um diâmetro de cerca de 10 a 12 μ m, núcleo com 3 a 5 lobos distintos, cromatina densamente agregada, citoplasma de cor rosa pálida e com leves granulações (Reagen et al., 1998; Carrick & Begg, 2008). Estão presentes em circulação cerca de 2260 a 8580/ μ L NEU segmentados, constituindo 22 a 72% dos LEUC totais (Weiss & Wardrop, 2010). Cerca de metade dos NEU segmentados circulantes permanecem no pool marginal, dos vasos ou do baço e outra metade na circulação periférica (Snow, 1983; Carlson, 1987). A figura 5 ilustra um NEU segmentado obtido de um esfregaço sanguíneo de equino.



Figura 5 – Neutrófilo segmentado de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).

São esperadas alterações tóxicas, como a basofilia citoplasmática, vacuolação ou granulação citoplasmática e corpos de ‘Dohle’ nos NEU, quando estes estão activos, nomeadamente em resposta a mediadores de inflamação, à infecção, à endotoxémia e à presença de certas moléculas. A basofilia citoplasmática deve-se a uma maior quantidade de RNA ribossomal, sendo que a cor do citoplasma assume um tom azul. Este fenómeno está associado a infecções bacterianas severas e a toxémia. As vacuolações ou granulações citoplasmáticas são nada mais que lisossomas proeminentes e estão citadas na toxémia severa. Foi associada também à doença de armazenamento lisossomal. Os corpos de ‘Dohle’ são inclusões citoplasmáticas de cor azul a cinza, resultantes da retenção e agregação laminar do retículo endoplasmático rugoso. Estes últimos são frequentes nos equinos durante processos inflamatórios ou tóxicos. Em caso de toxémias severas, pode ser observado por vezes um fenómeno denominado de granulação tóxica, que corresponde à coloração dos grânulos citoplasmáticos dos NEU de cor magenta (Jolly & Walkley, 1998; Reagen et al., 1998; Harvey, 2001; Carrick & Begg, 2008; Min, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Por vezes são observados, nos esfregaços sanguíneos de cavalos, NEU hipersegmentados, cujos núcleos possuem 5 ou mais segmentos distintos, ou seja um desvio à direita. Correspondem a NEU com idade avançada, que por alguma razão permaneceram em circulação por mais tempo e estão associados à inflamação crónica, stress crónico ou a doenças mieloproliferativas (Eichacker & Lawrence, 1985; Harvey, 2001; Reed et al., 2004). Está reportado na literatura um cavalo ‘Quarter-horse’ de 6 anos de idade, aparentemente saudável com hipersegmentação idiopática (Prasse, George & Whitlock, 1981). A hipersegmentação dos NEU associada com um aumento de glucocorticóides, endógeno ou exógeno, é devida a uma diminuição da emigração de NEU para os tecidos por ‘down-regulation’ das moléculas de adesão (Stockham & Scott, 2002).

Os NEU são as primeiras células fagocíticas a iniciar processos imunitários (Kerr, 2002). Os NEU ingerem, matam microrganismos e excretam factores proinflatórios no

local da injúria. Estes LEUC são capazes de dar resposta à inflamação causada quer por infecção, trauma ou agressões químicas ou físicas (Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008).

Os NEU periféricos, circulantes e marginais, encontram-se em números equivalentes, na circulação sanguínea. Os NEU marginais são libertados, na circulação periférica, em resposta ao stress, transporte ou exercício, mediante libertação de epinefrina (Reed et al., 2004) ou pela administração de corticoesteróides ou catecolaminas (Snow, 1983; Carlson, 1987). Na medula óssea existe um pool de armazenamento dos NEU, sendo a sua libertação mediada por G-CSF, GM-CSF, citocinas TNF, quimoquinas IL-8, MIP-2, leucotrienos, produtos bacterianos e factores do complemento (Carrick & Begg, 2008).

O Tempo de semi-vida dos NEU circulantes é sensivelmente de 10 horas, no entanto, nos tecidos podem permanecer por vários dias ou morrer por apoptose regulada, sendo fagocitados pelos macrófagos (Carakostas, 1981; Brown et al., 2006; Christopher & Link, 2007; Serhan & Savill, 2007).

A quimiotáxia é o processo de chamada e migração de LEU até a um local com altas concentrações de determinados quimioatractivos. Para que tal ocorra, quimioquinas conectam-se aos receptores presentes na superfície dos NEU, activando processos de marginação e migração (Weiss & Wardrop, 2010).

Para que os NEU possam migrar para os tecidos, primeiro têm que marginalizar pelo endotélio dos vasos e fixarem-se firmemente às células endoteliais. Este processo é co-ajudado por mediadores proinflamatórios e expressão de seletinas-L nos NEU, seletinas-P e seletinas E nas células endoteliais e plaquetas. As integrinas $\beta 2$ expressas pelos NEU e moléculas de adesão intracelular, I-CAM, nas células endoteliais, permitem uma forte adesão pelas duas células. A migração transendotelial pode ocorrer, quer paracelularmente, ou seja, entre as células ou através das próprias células endoteliais. Todo este processo tem a duração de cerca de dois minutos (Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

Uma vez nos tecidos, os NEU fagocitam agentes patogénicos. Esta acção é optimizada por processos de opsonização e consiste em envolver os microrganismos com imunoglobulinas, na presença de factores do complemento (Peyron, Maridonneaus-Parini & Stegmann, 2001). O processo de fagocitose despoleta a respiração oxidativa e a fusão dos fagossomas com grânulos citoplasmáticos (Urban, Lourido & Zychlinsky, 2006). O resultado deste processo origina a libertação de radicais livres, que por sua vez, através do factor nuclear, NF-KB, estimulam a produção de mediadores proinflamatórios para atracção de mais NEU e MON (Carrick & Begg, 2008).

Neutropenia

O termo neutropenia refere-se a uma diminuição do número de NEU circulantes, podendo esta ser por uma situação aguda, com duração de 24 a 48 horas, ou crónica, com duração de dias a meses. A neutropenia aguda resulta de um desvio de NEU circulantes para o pool marginal (Reed et al., 2004). Foi demonstrado que as endotoxinas promovem um estímulo potente para a marginação de NEU circulantes dos capilares pulmonares. Um estudo refere que a administração de endotoxinas a cavalos resultou numa neutropenia durante 90 minutos (Ward, Fessler, Bottoms & Turek, 1987). Deduziu-se que as endotoxinas são provavelmente co-factores da neutropenia durante processos associados a patologia gastrointestinal, tal como em peritonite, enterite e salmonelose (Carrick & Begg, 2008). A neutropenia, em cavalos septicémicos, é um achado laboratorial comum e considerado um parâmetro de diagnóstico nos neonatos. A neutropenia crónica pode estar associada a um aumento do uso dos NEU circulantes ou a uma diminuição da produção na medula óssea. Frequentemente, acompanha situações de infecção ou inflamação decorrentes de pleurite, pneumonia, peritonite, abscessos, enterites, queimaduras, vasculites ou doenças imunomediadas (Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004). Quando ocorrem neutropenias por aumento do uso de NEU, observa-se um desvio à esquerda, quer isto dizer, um aumento de NEU em banda (Duncan & Prasse, 1977). A neutropenia associada a uma redução da poíese dos NEU é frequente em doenças mieloproliferativas, doenças imunomediadas, necrose da medula óssea por infecção bacteriana, mielofibrose ou na inflamação granulomatosa disseminada (Searcy & Orr, 1981; Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004). Na literatura foi descrito um trotador com síndrome de neutropenia associado a trombocitopenia (Gordon, 1994).

Neutrofilia

A neutrofilia reflecte um aumento do número de NEU circulantes na circulação periférica. Condições associadas à neutrofilia são causas fisiológicas, como o aumento de glucocorticóides, epinefrina, excitação, exercício ou stress, inflamatórias, infecciosas ou neoplásicas (Cowel & Tyler, 2002; Kerr, 2002; Reed et al., 2004). A neutrofilia pode estar associada a um proeminente desvio à esquerda, com a observação de metamielócitos e mielócitos na circulação periférica, indicando a presença de uma doença inflamatória severa, sendo este fenómeno denominado de resposta leuquemóide (Duncan & Prasse, 1977).

3.3.2 Monócitos

Os MON representam menos de dez por cento dos LEUC circulantes no sangue periférico, com cerca de 0 a 1000 MON/ μ L (Weiss & Wardrop, 2010). Estas células são as maiores em tamanho de todos os LEUC, com cerca de 15 a 20 μ m (Reagan et al., 1999). O seu núcleo pode adquirir vários formatos desde oval, bi-lobado, tri-lobado, forma de ferradura ou irregular, com cromatina dispersa e apenas algumas áreas de condensação. O citoplasma é abundante, de cor azul-acinzentado e contém grânulos azurofílicos pequenos, podendo ainda ter uma pequena porção de vacúolos. Ocasionalmente, podem ser observadas projecções citoplasmáticas, designadas pseudópodia (Cowel & Tyler, 2002; Carrick & Begg, 2008). A figura 6 ilustra um MON obtido de um esfregaço sanguíneo de equino.



Figura 6 – Monócito de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).

Os MON são as células precursoras dos macrófagos tecidulares. A função primordial dos MON é restringir a replicação intracelular de microrganismos (Stafford, Neumann & Belosevic, 2002). Outras funções dos MON incluem a activação de macrófagos, defesa contra microrganismos, processamento de antígenos, regulação do ferro nos fagossomas, remoção de células mortas e tecido danificado e a interacção com células neoplásicas (Weiss & Wardrop, 2010). Para a execução das suas funções, os MON possuem um sistema complexo de receptores à superfície das suas membranas celulares (Stafford et al., 2002; Gordon, 2007). Estes receptores podem ser agregados em categorias consoante as suas funções, incluindo receptores de adesão, de fagocitose, de crescimento, de diferenciação, de activação, de migração e funcionais (Weiss & Wardrop, 2010). No entanto, muitos destes podem realizar mais que uma função, sendo os receptores mais relevantes os Fc, do complemento, ‘Toll-like’, TLR, do CMH, ‘scavenger’, e para citocinas e quimiocinas (Stafford et al., 2002).

Os MON são chamados ao local da lesão, em resposta à inflamação. A sua marginação e migração é dependente da interacção de moléculas de adesão, seletinas e integrinas, dos receptores expressos no endotélio e quimioquinas libertadas no local de inflamação (Rose & Allen, 1983).

Monocitopenia

Quando a contagem de MON é inferior aos valores de referência temos uma monocitopenia. Como raramente se observa esta célula na circulação periférica, a sua ausência num esfregaço sanguíneo pode ser um achado normal, sendo apenas reportada na resposta aguda a esteróides (Kerr, 2002; Carrick & Begg, 2008).

Monocitose

A monocitose é um aumento do número de MON circulantes, estando associada à inflamação aguda e crónica, à infecção bacteriana crónica, à administração de corticoesteróides, a doenças autoimunes e à produção excessiva aquando neoplasias da medula óssea. Foi citada ainda na hemólise, hemorragia, na inflamação piogranulomatosa e neoplasia não hematopoiética (Cowel & Tyler, 2002; Carrick & Begg, 2008).

3.3.3 Eosinófilos

Os EOS são dos LEUC circulantes em menor proporção a circular no sangue periférico, correspondendo normalmente entre 0% a 3% da contagem total de LEUC e cerca de 0 a 1000 EOS/ μ L num equino saudável (Weiss & Wardrop, 2010).

Os EOS maduros possuem tamanho semelhante ao dos NEU, podendo também ser ligeiramente maiores. Possuem um núcleo grande e segmentado, semelhante ao dos NEU, no entanto os segmentos não estão tão definidos. O citoplasma possui cor azul pálida e os grânulos citoplasmáticos são característicos, rosa-alaranjados. Os grânulos, na espécie equina, são grandes e proeminentes, tornando o núcleo quase imperceptível (Cowel & Tyler, 2002; Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). A figura 7 ilustra um EOS obtido de um esfregaço sanguíneo de um equino.



Figura 7 – Eosinófilo de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).

Os EOS estão comumente associados às infecções parasitárias e a respostas a processos de hipersensibilidade (Weiss & Wardrop, 2010). Estão presentes em grande quantidade no tracto gastro-intestinal dos equinos, mas também na pele e outros órgãos (Collobert-Laugier, Hoste, Sevin, Chartier & Dorchies, 2002; Benafara, Collins, Hamblin & Cunningham, 2002; Huber, 2006; Weston, Cunningham & Collins, 2006). São responsáveis por orquestrar uma série de processos de defesa, nomeadamente contra helmintas. A maioria dos processos pelos quais os EOS realizam a sua função é por exocitose, desgranulação ou lise celular (Scepek & Lindau, 1993; Melo, Spencer, Dvorak & Weller, 2008). Os grânulos dos EOS contêm um arsenal químico diverso, actuando quer sobre parasitas, quer activando outros processos do sistema imunitário. Estes grânulos possuem proteínas básicas, peroxidase eosinofílica, proteínas catiónicas próprias dos eosinófilos e uma neurotoxina derivada dos EOS. Quando estas proteínas estão na MEC são citotóxicas aos parasitas e a outras células. Para além da função anteriormente descrita, modulam respostas inflamatórias, nomeadamente por reduzir o número de agentes infecciosos, estimular respostas patológicas imediatas, remodelar tecidos e suprimir reacções de hipersensibilidade (Kroegel, Virchow, Luttmann, Walker & Warner, 1994; Weiss & Wardrop, 2010). OS EOS juntamente com perforinas-derivadas dos LINF T ligam-se às larvas opsonizadas com IgG e IgE ou complemento e libertam o conteúdo dos grânulos. De seguida migram pelo local onde a larva ficou danificada (McEwen, 1992; Kroegel et al., 1994). As proteínas básicas libertadas pelos grânulos possuem também a capacidade de induzir a libertação de histamina dos basófilos e mastócitos. As peroxidases presentes nos grânulos eosinofílicos e nos grânulos neutrofilicos são distintas, nos EOS as peroxidases são tóxicas aos parasitas, enquanto as dos NEU são bactericidas. Outra função é a fagocitose de imunocomplexos, ERT envolvidos com anticorpos, grânulos dos mastócitos e fragmentos de bactérias e fungos. Os EOS promovem ainda a libertação de mediadores lipídicos, nomeadamente, o factor de libertação de PLQ, que por sua vez estimula ainda mais a actividade dos EOS. Outros mediadores libertados pelos EOS são os leucotrienos, tromboxano A2 e prostaglandinas (Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

Uma quimoquina potente dos EOS é ‘eotaxin’, presente em maior quantidade no tracto gastrointestinal dos equinos. Foi demonstrada a sua presença também em lesões cutâneas provocadas pela picada de uma mosca, a ‘sweet itch-queensland’ (Collobert-Laugier et al., 2002; Benafara et al., 2006).

Os EOS são libertados sob acção da IL-5, permanecendo poucos dias na circulação periférica, migrando posteriormente para os tecidos (Carrick & Begg, 2008).

Eosinopenia

O termo eosinopenia refere-se a uma diminuição no número de EOS circulantes. Pode resultar de infecções agudas, doenças associadas com alterações dos corticoesteróides, a administração exógena de corticoesteróides ou a stress. Como o intervalo de referência começa a 0%, a entidade eosinopenia é pouco significativa (Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008).

Eosinofilia

A eosinofilia resulta de um aumento do número de EOS circulantes. Está frequentemente associada a infecções parasitárias, como a habronemíase e estrongilose, e a respostas de hipersensibilidade tipo I, por reacções alérgicas (Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008). Está descrito num cavalo a presença de doença mieloproliferativa eosinofílica, e noutro a presença de eosinofilia associada a um linfossarcoma carcinoma celular transitório (Morris, Bloom, Roby, Woods & Tablin, 1984; Duckett & Matthews, 1997).

3.3.4 Basófilos

Os BAS são LEUC em menor proporção na circulação sanguínea de um equino saudável. Estão presentes cerca de 0 a 290 BAS/ μ L na circulação periférica, representando de 0 a 4% dos LEUC totais (Weiss & Wardrop, 2010). O seu tempo de semi-vida em circulação é de 6 horas, embora nos tecidos possam permanecer por cerca de 2 semanas (Hirai, Miyamasu, Takaishi & Morita, 1997). São caracterizados morfológicamente pela presença de grânulos citoplasmáticos proeminentes, de cor azul-escuro a violeta, que sobrepõe o núcleo tornando-o pouco visível (Latimer & Prasse, 2003; Stockham & Scott, 2002). Os BAS partilham muitas das suas funções com os mastócitos, tendo papel importante na fase tardia da reacção de hipersensibilidade tipo-1, ou imediata, bem como na fase aguda de resposta à hipersensibilidade mediada por células, tipo tardia (Costa, Weller & Galli, 1997; Knol, Mul & Lie, 1996; Weiss & Wardrop, 2010). São mediadores de respostas alérgicas, pela libertação de histamina (Ha & Reed, 1987; Carrick & Begg, 2008). Tem função fagocítica, na defesa contra

helmintas e no desenvolvimento da inflamação crónica mediada por IgE, importante na recruta de células inflamatórias como os NEU e EOS (Lunn & Horohov, 2004; Weiss & Wardrop, 2010). Realizam também o controlo da hemostasia, promovendo a libertação de heparina, inibindo a hemostase, ou pelo contrário, são fonte de kalicreína, que por sua vez promove a hemostase (Holgate, 2000).

Os BAS são chamados aos tecidos em situações imunológicas e inflamatórias, para tal, os BAS marginam através das paredes dos vasos (Weiss & Wardrop, 2010). Após estimulação, os BAS libertam citocinas, TNF e IL-4, que promovem a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, iniciando-se a primeira etapa da marginação. O fenómeno de rolamento é mediado por seletinas, expressas pelos BAS, que por sua vez, promovem a adesão através da ligação com moléculas de carboidratos. Este processo de adesão ao endotélio vascular envolve ainda moléculas ICAM-1, ELAM-1 e VCAM-1, expressas à superfície das células endoteliais e integrinas que funcionam como receptores para estas moléculas (Weiss & Wardrop, 2010).

Basopenia

Como o intervalo de referência começa a 0%, a entidade basopenia é pouco significativa.

Basofilia

O termo basofilia descreve um aumento do número de BAS circulante, estando reportada nas doenças alérgicas, inflamação e neoplasias, bem como na doença intestinal, incluindo o parasitismo (Cowel & Tyler, 2002; Reed et al., 2004).

3.3.5 Linfócitos

Os LINF são os LEUC circulantes em maior quantidade, a seguir aos NEU. Estão presentes na circulação sanguínea, em média, cerca de 1500 a 7700 LINF/ μ L, representando 17 a 68% dos LEUC totais (Weiss & Wardrop, 2010). Os LINF maduros são os LEUC com menor tamanho na circulação sanguínea e morfológicamente são caracterizados por possuírem um rácio núcleo:cromatina elevado (Harvey, 2001; Carrick & Begg, 2008). LINF não reactivos possuem citoplasma azul pálido, núcleo redondo, oval e ligeiramente segmentado (Harvey, 2001). Os LINF quando activados tornam-se reactivos, assumindo uma

morfologia distinta, sendo na maioria LINF T e associados a processos antigénicos prolongados. Possuem maior tamanho, com cromatina muito densa e citoplasma basofílico, em tom azul mais escuro, podendo apresentar ainda uma zona perinuclear pálida. Estas células assemelham-se aos MON, sendo por vezes difíceis de distinguir. Os plasmócitos, células resultantes da diferenciação dos LINF B, são raramente observados em circulação, dado que este processo ocorre com frequência no tecido linfático (Latimer & Prasse, 2003; Stockham & Scott, 2002). Possuem rácio núcleo:cromatina baixo, intensa basofilia citoplasmática e aparelho de Golgi proeminente que se observa por uma zona pálida perinuclear (Harvey, 2001).

Podem ser ainda observados LINF granulares, estes possuem tamanho médio a grande, tem rácio núcleo:cromatina baixo e o seus grânulos coram de vermelho a violeta. Estes LINF são predominantemente células NK ou LINF T citotóxicos (Harvey, 2001). Foi citado na literatura, um caso de um equino com leucemia linfocítica granular (Kaushansky et al., 1996). A figura 8 ilustra um LINF obtido de um esfregaço sanguíneo de um equino.

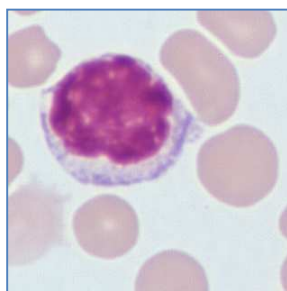


Figura 8 – Linfócito de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).

Os LINF são os primeiros mediadores a responder a processos celulares e humorais, pela produção de anticorpos (Kerr, 2002; Reed et al., 2004). Os LINF são produzidos na medula óssea e quando libertos na circulação tomam caminhos diversos. Existem duas sub-populações de LINF, os LINF T e os LINF B. Os LINF T adquirem o seu nome porque a finalização da sua maturação ocorre durante a sua migração pelo timo, enquanto os LINF B saem da medula óssea já maturados (Reed et al., 2004). Após os processos de maturação os LINF seguem para diversos órgãos, onde serão armazenados, por exemplo, linfonodos, tonsilas, baço e tecido linfóide associado a certos órgãos. Ambas as sub-populações acima referidas possuem funções distintas (Carrick & Begg, 2008).

Linfócitos B

Os LINF B circulantes, são predominantemente células inactivas, expressando imunoglobulinas à sua superfície, IgD e IgM (Stobo, 1998; Lunn & Horohov, 2004). A activação dos LINF B requer estimulação específica pelos LINF T ‘helper’, Th, que ocorre maioritariamente no tecido linfático. Após a activação, inicia-se o processo de diferenciação dos LINF B em plasmócitos, sendo que esta activação modifica a expressão de moléculas à sua superfície, passando estes a exprimir apenas um tipo de imunoglobulina (Carrick & Begg, 2008).

Os plasmócitos são produtores de grandes quantidades de anticorpos, estes por sua vez auxiliam o processo de opsonização de antigénios e promovem a fagocitose pelos NEU, MON e macrófagos. Encontram-se em grandes concentrações nos tecidos linfáticos onde se presencia a assistência por LINF T (Latimer & Prasse, 2003; Stockham & Scott, 2002).

Os LINF B são células efectoras do sistema imune humoral, no entanto também podem ser células reguladoras, capazes de produzir citocinas, tais como a IL-10, que ajuda a manter o equilíbrio entre Th 1 e Th2, inibindo a cascata de inflamação e o TGF- β , que induz a apoptose de LINF T efectores e a produção de anticorpos para conexão com factores inflamatórios. Através da conexão referida, estas células funcionam como células apresentadoras de antigénio (Mizoguchi & Bhan, 2006; Carrick & Begg, 2008).

Linfócitos T

À semelhança da distinção feita na sub-população de LINF B e T, os LINF T também são agrupados consoante os marcadores expressos à sua superfície, sendo estes responsáveis pela função que realizam. Aproximadamente 80% dos LINF circulantes são LINF T e expressam um complexo CD3. Na sua maioria, as células expressam moléculas CD4 ou CD8. Os LINF que expressam as moléculas CD4, CD4+, são capazes de reconhecer antigénios associados a CMH classe II, sendo que as células CD8+ reconhecem antigénios associados a CMH classe I. Os LINF T CD4+, denominados LINF Th, são células que auxiliam a diferenciação dos LINF B e estão envolvidas em respostas de hipersensibilidade atrasada. Os LINF Th, CD4+, estão ainda divididos em subclasses, Th1 e Th2, consoante as citocinas que expressam. As Th1 produzem dois tipos de citocinas, interferão gama e IL-2, estando envolvidas na imunidade celular. As Th2 produzem três tipos de citocinas, IL-4, IL-5 e IL-13, sendo células indutoras da produção de anticorpos, nomeadamente por activação de LINF

B. Os LINF T CD8⁺ são células predominantemente citotóxicas. Existe ainda outro subtipo de LINF T, as células NK, que não exprimem nem CD3 nem imunoglobulinas à sua superfície (Crisman & Scarratt, 2008; Carrick & Begg, 2008).

Os LINF circulantes podem permanecer na circulação sanguínea ou armazenados, sendo capazes de regressarem ao local inicial após a realização das suas funções. São células de vida longa, que ao contrário dos outros LEUC, replicam-se e transformam-se em mais células maduras. O desenvolvimento de respostas imunes adaptativas dá-se através de células apresentadoras de antigénio (Lunn & Horohov, 2004; Carrick & Begg, 2008).

Linfopenia

O termo linfopenia reporta a uma diminuição do número de LINF circulantes. Está citada no stress, após administração de corticoesteróides, infecções virais e na imunodeficiência combinada dos poldros árabes (Kerr, 2002; Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008). É de notar que, com o avanço da idade, o número dos LINF em circulação diminui (McFarlene et al., 1998; McFarlene et al., 2001).

Linfocitose

A linfocitose, aumento do número de LINF circulantes, está reportada após excitação, exercício, neoplasias linfóides, nomeadamente na leucemia linfocítica, estimulação imune crónica e na administração de epinefrina exógena (Kerr, 2002; Reed et al., 2004; Carrick & Begg, 2008).

3.4 Plaquetas

As PLQ, também conhecidas por trombócitos, são as segundas células em maior quantidade na circulação periférica, embora que em cavalos se apresentem em menor quantidade comparativamente aos restantes mamíferos. A contagem de PLQ dos cavalos, em condições normais, é de 100 a 250x10³ PLQ/ µL (Boudreaux & Ebbe, 1998; Brooks, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

As PLQ são células pequenas comparativamente a outras espécies, com apenas 2,5 a 4,5 µm de diâmetro. Geralmente possuem forma discóide, no entanto podem observar-se com forma oval ou alongada, são anucleadas, tem citoplasma de cor azul claro e múltiplos grânulos azurofílicos no seu citoplasma. Por vezes podem ser observadas projecções

citoplasmáticas, pseudopodia, resultante da sua activação. Os grânulos das PLQ reactivas estão agregados, sendo por vez confundidos com núcleos (Weiss, 1984; Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010). A figura 9 ilustra PLQ obtidas de um esfregaço sanguíneo de equino.

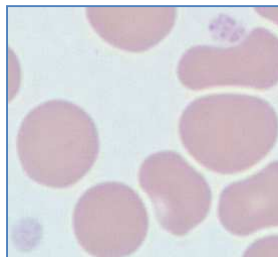


Figura 9 – Plaquetas de equino, coloração ‘Wright-Giemsa’, sob ampliação de 1000x (Fotografia original).

No esfregaço sanguíneo podem ser observadas PLQ com morfologias diferentes. As macroplaquetas ou PLQ gigantes são células que, quando comparadas com os ERT, possuem tamanho igual ou superior, cujo diâmetro é de cerca de 5 μ m (Harvey, 2001; Weiss & Wardrop, 2010). Esta morfologia é indicativa de um aumento da trombopoiese, em animais com trombocitopenia (Harvey et al., 2003). Também está descrita em animais com doenças mielodisplásicas ou mieloproliferativas. As PLQ hipogranulares podem resultar da activação e produção de PLQ inactivas, bem como associadas a doenças mieloproliferativas (Harvey, 2001).

Os agregados plaquetários são frequentemente observados em esfregaços sanguíneos e indicam má anticoagulação da amostra, resultando em pseudotrombocitopenia. Outra hipótese citada na literatura é a activação plaquetária por reacção ao EDTA (Hinchcliff et al., 1993).

As PLQ são a primeira linha de defesa contra hemorragias, contribuindo também na resposta inflamatória e contra neoplasias. São essenciais na manutenção da integridade dos endotélios, constantemente integrando-se nas paredes dos mesmos. Em caso de danos à parede do endotélio, o colagénio é exposto e uma camada única de PLQ fixa-se ao local. Estão presentes receptores na superfície da membrana celular, que funcionam como sinalizadores a um sistema ‘network’, comunicando-os com outras biomoléculas, como por exemplo, iões, proteínas, nucleótidos e fosfolípidos. Processos resultantes da interacção com este sistema são adesão, agregação, libertação de grânulos e expressão de moléculas pró-coagulantes. São ainda capazes de sintetizar proteínas (Carrick & Begg, 2008; Zimmerman & Weyrich, 2008; Weiss & Wardrop, 2010).

A TPO é a principal molécula reguladora humoral da trombopoiese, no entanto factores de crescimento e citoquinas são co-ajudantes na mesma função (Weiss & Wardrop,

2010). A TPO para além de controlar a trombopoiese tem papel importante na hematopoiese, dado que incrementa a expansão das CEHP (Alexander et al., 1996). Trata-se de uma glicoproteína produzida principalmente pelo fígado, mas também pelo rim, músculo-esquelético e medula óssea (Bartley et al., 1994; Lok et al., 1994; Beutler, 2005). A maturidade dos megacariócitos, durante episódios de trombocitopenia, determina a sua responsividade à TPO (Weiss & Wardrop, 2010). Processos inflamatórios, com envolvimento da IL-6 podem induzir um aumento de produção de TPO pelos hepatócitos, resultando em trombocitose reactiva (Lok et al., 1994). Em casos severos de trombocitopenia idiopática, os níveis de TPO podem não estar aumentados, como se esperaria, devido à sua ligação em receptores dos megacariócitos (Weiss & Wardrop, 2010).

Trombocitopenia

A trombocitopenia, redução do número de PLQ na circulação periférica, está presente quando a contagem de PLQ circulantes é inferior a $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Reed et al., 2004). A ocorrência de pseudotrombocitopenia é comum na prática clínica, sendo um artefacto ocasionado pela má técnica de colheita de amostras, pelo tipo de anticoagulante utilizado ou pela presença de agregação plaquetária associada a doenças (Hinchcliff et al., 1993; Sellon & Grindem, 1994). Está descrita a ocorrência de agregação plaquetária associada ao armazenamento da amostra em tubos com EDTA ou em tubos com heparina de baixo peso molecular (Hinchcliff et al., 1993, Kingston et al., 2001). Na tentativa de evitar estes artefactos, deve-se realizar uma técnica de colheita de amostras apropriada, optar por colocar a amostra em tubo com citrato sódico e proceder à contagem de plaquetas através de um esfregaço sanguíneo (Sellon & Grindem, 1994). A trombocitopenia pode ocorrer por diminuição da produção, aumento do consumo, sequestro ou por aumento da destruição de PLQ (Reed et al., 2004; Brooks, 2008). Os primeiros diagnósticos diferenciais de trombocitopenia são as causas decorrentes da diminuição da sua produção, sendo estes, deficiências hereditárias, como a síndrome neutropenia e trombocitopenia descrita nos trotadores, doenças mieloproliferativas, pancitopénia idiopática ou por drogas imunossupressoras, como a fenilbutazona, cloranfenicol e estrogénios (Henry et al., 1989; Kohn, Swardson, Provost, Gilbert & Couto, 1995; Reed et al., 2004; Brooks, 2008). As causas do aumento da utilização de PLQ são hemorragia, trombose ou a coagulação intravascular por CID, síndrome urémica hemolítica ou hemangiossarcoma (Valentine, Ross, Bump & Eng, 1986; Morris, Robertson, Mann, Clark & Divers, 1987; Sellon et al., 1996). Uma causa de

sequestro das PLQ, da circulação periférica, é a esplenomegália (Reed et al., 2004; Brooks, 2008). Os diagnósticos diferenciais de trombocitopenia, por aumento da destruição das PLQ, são doenças infecciosas, como a anemia infecciosa equina ou por *Ehrlichia equi*, doenças imunomediadas, como o lúpus eritematoso sistémico ou doença alloimmune neonatal, doenças secundárias a neoplasias, drogas ou toxinas (Duncan, Meyers & Reed, 1983; Court et al., 1987; Madigan & Gribble, 1987; Tornquist & Crawford, 1997; Ramirez, Gaunt, McClure & Oliver, 1999).

Trombocitose

A trombocitose é o termo utilizado para descrever o aumento do número de PLQ circulantes. São diagnósticos diferenciais, as doenças mieloproliferativas primárias, pela produção de megacariócitos na medula óssea, ou secundárias a neoplasias, condições inflamatórias agudas ou crónicas e após hemorragias. Pode ocorrer ainda trombocitose após exercício ou excitação devida à contracção esplénica (Sellon et al., 1997; Reed et al., 2004).

4. Indicações do Hemograma

Algumas das indicações para a realização de um hemograma são avaliar analiticamente o estado de saúde de um paciente, auxiliar o diagnóstico de patologias, nomeadamente por detecção de alterações quantitativas dos elementos celulares ou alterações nos índices eritrocitários, detectar e quantificar estados de desidratação e avaliar a evolução de eventuais patologias, quer sejam inflamatórias ou infecciosas. O estudo de um esfregaço sanguíneo fornece informação estimativa das contagens totais e diferenciais de LEUC e contagens totais de PLQ, possibilita a detecção de parasitas ou inclusões por Rickettsias. Através do mesmo podemos ainda caracterizar anemias, policitemias, leucocitoses, leucopenias, trombocitopenias, bem como verificar as características morfológicas dos ERT, LEUC e PLQ e maturação e modificação inflamatórias dos LEUC (Cowell & Tyler, 2002; Willard & Tvedten, 2004).

O seu papel pode ser importante no despiste precoce de eventuais disfunções orgânicas e funcionais, subtis ou sub-clínicas, que podem, a termo, limitar as performances do cavalo e no caso de excesso de treino (Rose & Hodgson, 1982; Rose & Allen, 1983; Bayly, 1987).

5. Limites do Hemograma

É importante ter em conta os limites potenciais do hemograma, para evitar erros de sobre interpretação, infelizmente frequentes na prática clínica (Amory, 2006).

A interpretação do hemograma deve ser feita sempre à luz dos dados clínicos individuais dos animais e nunca de forma independente. É também fundamental interpreta-lo considerando os diferentes factores de variação, tais como raça, idade, sexo, estado nutricional, tempo de repouso após último esforço físico, nível de treino, forma física, grau de excitação e hidratação do animal, eventuais tratamentos administrados, condições de colheita e transporte, equipamento utilizado e metodologia da análise das amostras. (Amory, 2006; Weiss & Wardrop, 2010)

Tendo em conta a morfologia de cada equino, na interpretação dos valores de referência os clínicos classificam os seus pacientes como pertencendo ao grupo de ‘hot-blood’ ou ‘cold-blood’. Na literatura foi ainda citado um terceiro grupo, intermédio, os cavalos ‘warm-blood’, WB. Os equinos classificados como ‘hot-blood’ correspondem àqueles descendentes do antigo cavalo árabe, conhecendo-se hoje em dia várias raças da qual descendem, entre elas, os Árabes, os Puro-Sangue Lusitanos, PSL e os Puro-Sangue Inglês, PSI. Os cavalos ‘cold-blood’ correspondem aos cavalos de tiro, pôneis e burros. A última categoria, WB inclui os Trotadores e ‘Quarter-horse’ (Lording, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Na literatura estão documentadas diferenças no hemograma destes três grupos. Comparando os cavalos ‘hot-blood’ com os ‘cold-blood’, a literatura referencia valores superiores relativamente ao número ERT, concentração de Hb, HTC e volume sanguíneo e valores inferiores de VCM relativos aos primeiros (Jain, 1986). Estão documentadas ainda características hematológicas dos cavalos de raça ‘American Miniature’, apresentando estes HTC, concentração de Hb e contagem de ERT mais baixas (Harvey, Hambright & Rowe, 1984). No grupo de cavalos ‘cold-blood’ alguns estudos foram realizados, nomeadamente entre várias raças de burros e comparação com pôneis, constatando-se um VCM bastante mais elevado nos burros (Zinkl, Mãe, Guzman, Farver & Humble, 1990; French & Patrick, 1995; Folch, Jordana & Cuenca, 1997; Mori et al., 2004; Caldin et al., 2005). Em relação aos valores leucocitários, cavalos WB apresentaram contagens totais de LEUC mais elevadas em comparação aos cavalos ‘cold-blood’ (Jain, 1986). Foi documentado o rácio neutrófilo/linfócito consoante os diferentes grupos, sendo que nos ‘hot-blood’, o valor referenciado foi 1.0, para os cavalos de WB foi 1.7 e para os pôneis o valor 0.67 (Harvey et al., 1984).

A idade também compreende um factor de variabilidade importante, traduzindo-se em diferentes valores de referência dos parâmetros hematológicos consoante sejam animais adultos, jovens ou neonatos. Estudando os valores eritrocitários constata-se que, desde o nascimento até ao primeiro ano de vida, ocorrem variações no hemograma. Nas primeiras 12 horas, os poldros, apresentam números de ERT, valores de Hb e HTC elevados, de seguida, até às 24 horas observa-se uma redução brusca nos mesmos valores, tornando-se gradual nas primeiras 2 semanas de vida. A elevação dos valores à nascença está explicada pela transferência de sangue da placenta ao feto. Pensa-se que, a diminuição brusca decorrente nas primeiras vinte e quatro horas, esteja relacionada com a secreção de catecolaminas e com o ajustamento de fluidos corporais, devido á ingestão de imunoglobulinas presentes no colostro. A diminuição gradual observada nas primeiras 2 semanas poderá estar relacionada com o tempo de semi-vida reduzido dos ERT, com a diminuição de ferro associada ao crescimento, por redução do estímulo para produção de EPO, pela elevação do conteúdo sanguíneo de oxigénio e pelo aumento da sua distribuição. Quando se estudam os valores do VCM dos poldros observa-se que, á nascença, estes apresentam-se elevados mas vão reduzindo drasticamente até aos 3 a 5 meses, não voltando a serem restabelecidos (Jain, 1986; Harvey, 1999). O valor do VCM nos burros é maior comparativamente aos cavalos (Mori et al., 2004). Os cavalos geriátricos, ou seja com mais de 20 anos de idade, possuem ERT aumentados de tamanho e valores de VCM normais (Ralston, Nockels & Squires, 1988). Em referência aos valores leucocitários, observa-se um número reduzido de LEUC nos fetos com 300 dias de gestação, aumentando após o nascimento e voltando a diminuir, com cerca de 4 a 6 meses, até valores normais equiparados com os adultos (Allen, Myers, Seacry & Fretz, 1998; Harvey, 1999). A concentração de NEU em poldros nascidos a termo é elevada comparativamente aos prematuros. Já a contagem de LINF é baixa à nascença, aumentando até aos 3 meses e normalizando ao primeiro ano de vida (Weiss & Wardrop, 2010). O rácio NEU/LINF é reduzido desde o nascimento até ao primeiro ano de vida. Não se observam alterações nos restantes LEUC (Jain, 1986; Harvey, 1999). Os burros, por sua vez, possuem valores de NEU reduzidos até aos 10 meses de idade, voltando a atingir valores normais aos 18 meses de idade. Para além dos valores de NEU alterados, os burros possuem valores de EOS elevados até aos 2 anos de idade (Brown & Cross, 1969). Relativamente às PLQ, foi reportado um número superior em equinos até 3 anos (Finocchio, Coffman & Osbaldiston, 1960).

Na literatura estão documentadas diferenças ligeiras no hemograma de machos e fêmeas. Nos machos adultos foram referenciadas contagens de ERT, concentração de Hb e

valores de HTC ligeiramente superiores às fêmeas. Por outro lado, as fêmeas adultas apresentaram valores de HCM, CHCM e LEUC superiores (Jain, 1986). Asininos fêmeas gestantes demonstraram hemogramas com aumento dos valores do VCM, contagem de LEUC e NEU relativamente aos machos (Zinkl et al., 1990). Em relação às contagens das PLQ, foi reportado um número superior em equinos machos (Finocchio, 1960).

O hemograma de éguas em final de gestação e éguas durante as primeiras semanas de lactação demonstra valores de HTC, Hb e contagem de ERT ligeiramente inferiores aos valores referenciados na literatura. Este fenómeno está explicado pelo aumento do volume plasmático (Jain, 1986).

Diferentes variáveis condicionam o factor exercício, nomeadamente a raça, idade, quantidade de exercício recebida, intensidade e modalidade a exercer. Alterações nos valores eritrocitários são observadas em cavalos que realizam exercício intenso, como o aumento da contagem de ERT, valores de Hb e HTC. Estas alterações são atribuídas à libertação de epinefrina, ao aumento do tónus simpático e à contracção esplénica. As alterações leucocitárias induzidas pelo exercício em resposta ao cortisol e à epinefrina, são variáveis, sendo documentada leucocitose por neutrofilia com linfocitose ou linfopenia. Todavia não foi demonstrada uma relação directa entre performance e o hemograma dos cavalos (Rose & Hodgson, 1982; Rose & Allen, 1983; Bayly, 1987).

O factor stress condiciona a leitura de um hemograma num cavalo, mediante indução de respostas fisiológicas que alteram os parâmetros hematológicos. Em situações de excitação ou stress, os números de ERT totais em circulação aumentam, este facto é explicado pela resposta adrenérgica e libertação de epinefrina, que por sua vez leva à contracção esplénica. Dado que o baço armazena uma grande quantidade de ERT circulantes, a sua contracção ocasiona uma policitemia relativa, com aumento do HTC (Reed et al., 2004; Lording, 2008). No que refere ao leucograma, podem ser distinguidos dois tipos de resposta, o leucograma fisiológico, associado frequentemente a leucocitoses e o leucograma de stress, caracterizado por leucopenias, no entanto estas alterações não são consistentes, sendo que os LEUC respondem a estímulos de modos diferentes. Um leucograma denominado fisiológico é caracterizado por um aumento transiente de LEUC totais, podendo atingir os 12000 a 25000 LEUC/ μ L. A libertação de catecolaminas, induzida por condições dolorosas ou excitação devido ao meio ambiente ou à manipulação, provoca um aumento do 'output' cardíaco, aumento da pressão hidrostática sanguínea, activação muscular e contracção esplénica. Esta última, por sua vez, resulta num aumento do número de NEU e LINF circulantes, sendo este

aumento explicado porque o baço armazena cerca de 50% dos NEU circulantes. No entanto, autores reportam que o ‘pool’ marginal esplênico de LINF é maior que o dos NEU, esperando-se assim uma linfocitose marcada, chegando aos 6000 a 14000 LINF/ μ L e uma redução no rácio NEU:LINF (Carrick & Begg, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). Outro aspecto importante é que o mesmo tipo de estímulo induz a libertação de NEU marginais dos vasos para a circulação periférica e que o ‘pool’ marginal dos NEU armazena quantidades semelhantes aos presentes no ‘pool’ circulante (Snow, 1983). Um leucograma de stress, como nome indica, está associado a situações de stress crónico, como por exemplo, a estabulação em determinados animais ou o transporte prolongado. Este leucograma é resultado da libertação de cortisol ou corticoesteróides e é caracterizado por neutrofilia moderada, linfopenia e eosinopenia. A neutrofilia presente é causada pela libertação de formas imaturas pela medula óssea e também pela diminuição da marginação dos NEU e emigração para os tecidos, obrigando-os a circular por mais tempo. Podem ainda ser observado um desvio à direita. A linfopenia é causada pelo sequestro temporário de LINF nos tecidos linfáticos (Snow, 1983; Reed et al., 2004; Weiss & Wardrop, 2010).

Inúmeros erros de prática, como técnicas de amostragem ou laboratoriais, resultam na alteração morfológica ou quantitativa dos elementos celulares pertencentes ao sangue periférico, mascarando situações patológicas ou pelo contrário, fornecendo informação errada em animais saudáveis. Alguns dos erros mais comuns que resultam na hemólise da amostra são colheitas realizadas demasiadas rápidas, utilização de agulhas com calibre inadequado, utilização de ‘vacuteiners’, aplicação de pressão negativa quando a agulha não se encontra na veia e já existe sangue na seringa, colocação da amostra no tubo de acondicionamento através da agulha acoplada na seringa, agitação violenta dos tubos com o fim de homogeneizar a amostra, amostras lipémicas e refrigeração inadequada das amostras (Kerr, 2002). Na literatura está documentado que o fluoreto de sódio, contido em determinados tubos de acondicionamento, é tóxico para os ERT, interferindo com o seu metabolismo. O tempo de processamento da amostra prolongado, outro factor que pode ocasionar hemólise, também causa alteração da morfologia e quantificação de parâmetros hematológicos, entre eles a edemaciação dos ERT, aumento do HTC e VCM e diminuição do CHCM, no caso da linhagem vermelha e fragilidade e alteração da morfologia dos LEUC, no caso da linhagem branca (Kerr, 2002). O volume excessivo de amostra colocado num tubo de acondicionamento resulta na formação de coágulos sanguíneos, ou pelo contrário, um volume reduzido da amostra em relação ao volume necessário específico de cada tubo de

acondicionamento resulta em encolhimento dos ERT e diminuição do HTC (Willard & Tvedten, 2004). Está também demonstrado que a utilização de tubos de acondicionamento com EDTA ou heparina de baixo peso molecular induzem a formação de agregados plaquetários (Hinchcliff et al., 1993, Sellon & Grindem, 1994; Kingston et al., 2001). Está desaconselhada a utilização de heparina, como anticoagulante, quando se pretende avaliar um esfregaço sanguíneo, dado que os LEUC não coram devidamente pela suposta ligação entres os mesmos e o corante (Rebar et al., 1981). Os equinócitos são ERT com morfologia alterada, resultantes de má técnica de processamento por excesso de EDTA, má preparação do esfregaço sanguíneo ou tempo prolongado até processamento da amostra (Cowel & Tyler, 2002; Weiss & Wardrop, 2010).

6. Particularidades dos cavalos de desporto

O estudo das particularidades nos cavalos de desporto deve ter em conta vários factores que influenciam a leitura de um hemograma. Este capítulo especifica individualmente, para os índices eritrocitários e para o leucograma, os indicadores de variabilidade mais importantes, como a influência do baço, excitação ou stress, idade, raça, nível de treino e desvio de fluidos corporais (Snow, 1983; McGowan, 2008).

No estudo dos índices eritrocitários, os parâmetros principais a ter em conta num hemograma de um cavalo de desporto são a contagem de ERT, a concentração de Hb e o HTC. No entanto, a sua correlação com o nível de performance deve ser cuidadosa, dado à existência de factores de variabilidade (Snow, 1983; McGowan, 2008). É necessário ter atenção especial às condições da colheita do sangue dado que a contracção esplénica devida à excitação, promove a libertação de catecolaminas, mobilizando ERT para a circulação e aumentando a sua contagem no hemograma. Os processos pelos quais o factor exercício está implicado na alteração do hemograma são semelhantes aos referidos anteriormente. A elevação do número de ERT resulta num aumento do HTC, em cerca de 0.20 a 0.25 L/L. No entanto, após a realização de exercício, o aumento do HTC deve-se em parte a um desvio de fluidos corporais, com um aumento em cerca de 15% da concentração de proteína plasmática. O volume de ERT aumenta com a idade e treino e está correlacionada com a performance em cavalos de corrida (Stewart, Riddle & Salmon, 1977; Persson, 1983; Snow, Ricketts & Mason, 1983; Revington, 1983). Cavalos desportistas, na idade compreendida entre 2 a 9 anos, apresentam ao longo do tempo, uma diminuição do número de ERT e um aumento do

VCM e CHCM (Allen & Snow, 1986; Allen, 1989). Persson em 1968 demonstrou uma maior massa eritrocitária em PSI relativamente a trotadores. Estudos longitudinais citam um aumento no VCM em cavalos de desporto durante as primeiras 7 semanas de treino (Tyler-McGowan, Golland, Evans, Hodgson & Rose, 1999). A mobilização de fluidos corporais por sudorese, durante condições climáticas adversas, como as altas temperaturas e humidade, por desidratação, por exercício ou pelo tipo de alimentação pode estar associada a alterações no hemograma de cavalos em repouso. Estudos comprovam uma redução do VCM e HTC, em cavalos a realizar excesso de treino sobre uma passadeira rolante comparativamente a grupos de controlo (Hamlin, Shearman & Hopkins, 2002; Golland, Evans, McGowan, Hodgson & Rose, 2003). A realização de exercício intenso provoca fragilidade dos ERT, por aumento da concentração de Hb e bilirrubina séricas, estando associada à observação de equinócitos nos esfregaços sanguíneos (Poso, Soveri & Oksanen, 1983). Esta teoria está suportada pela ocorrência da diminuição do pH sanguíneo e aumento da temperatura (Hanzawa, Kai, Hiraga & Watanabe, 1999).

No estudo dos parâmetros leucocitários em cavalos de desporto, o rácio NEU/LINF é o índice mais reportado, embora que ainda não exista evidência científica que correlacione o estudo do leucograma com o nível de performance. O papel do baço é importante na circulação de NEU periféricos, e está estimado que cerca de 50% dos NEU circulantes estejam armazenados no ‘pool’ marginal do baço. Por esta razão condições de stress, excitação, exercício, transporte ou administração exógena de corticoesteróides ou catecolaminas podem alterar o leucograma (Snow, 1983; Carlson, 1987; McGowan, 2008; Weiss & Wardrop, 2010). No entanto o aumento do número de ERT e volume sanguíneo pode mascarar situações de contracção esplénica. A alteração decorrente da realização de exercício ou de stress, no leucograma, é a redução do rácio NEU/LINF, como descrito anteriormente, o número de LINF libertados do ‘pool’ marginal no baço é relativamente maior que o dos NEU (Revington, 1983; Snow et al., 1983). Exercícios de baixa intensidade produzem alterações no leucograma, como leucocitose por neutrofilia marcada, linfopenia, eosinopenia e um aumento no rácio NEU/LINF (Rose & Allen, 1983; Wong, Smith, Thong, Opdebeeck & Thornton, 1992). Este fenómeno está explicado pela libertação de cortisol, que por sua vez, diminui a marginação de NEU, aumenta a sua libertação pela medula óssea e diminui o número de LINF e EOS circulantes. Por outro lado, a eosinopenia está reportada em cavalos que realizam exercício intenso (Snow, 1983; Tyler-McGowan, 1999).

7. Objectivo

O presente estudo teve como objectivos contribuir para o estudo do hemograma dos equinos de raça PSL e comparar os resultados obtidos com valores de referência de parâmetros hematológicos publicados de outra raça de equinos, como os PSI e outra população de equinos, como os WB.

8. Justificação

A interpretação do hemograma é influenciada pelos dados clínicos individuais e por factores de variabilidade, tais como a raça, idade, sexo, estado reprodutivo, nível de treino, grau de excitação, colheita, acondicionamento e metodologia de análise das amostras, bem como o estado nutricional, tempo de repouso após o último período de esforço, estado de hidratação do animal e tratamentos administrados. Tendo conhecimento dos vastos factores de variabilidade implicados na leitura do hemograma, o conhecimento dos mesmos e dos intervalos de referência específicos é essencial para a interpretação correcta do hemograma.

Um aspecto importante em ter em mente é o de que os cavalos são dos mamíferos que apresentam uma maior influência do hemograma, relativamente ao factor raça.

Outra justificação é a escassez de dados específicos objectivos relativos ao hemograma do PSL.

9. Materiais e Métodos

Na elaboração deste estudo foram incluídos 61 equinos de raça PSL, dos quais 42 machos inteiros, 3 machos castrados e 16 fêmeas. As idades dos animais estão compreendidas num intervalo entre os 4 e os 16 anos (9.54 ± 3.4 ; média e desvio-padrão). Os animais amostrados habitavam nas regiões da Beira Litoral, Estremadura e Ribatejo e Lisboa e Setúbal do país, nomeadamente em centros hípicas, coudelarias ou propriedades privadas.

Os critérios de inclusão dos equinos neste estudo, para além da raça, foram a idade, compreendida entre 4 e 18 anos, confinamento a estábulo, realização de exercício físico regular, que se compreende como mínimo de 1 hora por dia ao longo de 6 dias por semana, alimentação baseada em concentrado e feno ou palha, distribuídos no mínimo por 3 tomas diárias e água *ad libitum*, exame físico geral de parâmetros normais, condição corporal entre 2.5 a 3.5 sobre 5, no caso de éguas não se apresentarem gestantes e, segundo o proprietário, desparasitados e vacinados contra a gripe equina. As colheitas das amostras foram realizadas no mínimo 2 horas após a primeira refeição e sem que os animais tenham realizado exercício físico no próprio dia. Dado que a indução de stress no momento de colheita, devido ao maneo ou à venopunção, resulta na contracção esplénica, foi realizado um maneo o mais calmo possível, com o animal permanecendo no seu estábulo e restringido pelo tratador ao qual habituado.

A colheita das amostras de sangue periférico foi realizada através de venopunção do terço médio da veia jugular esquerda, com utilização de agulha com 18G e seringa de 2 mL, mediante garrote caudal por pressão digital da mesma. Imediatamente após a remoção do volume de sangue necessário, a agulha foi desacoplada da seringa, sendo a amostra transferida para um tubo de anticoagulante com EDTA K3 de 1mL ‘IDEXX Vet Collect 1mL Veterinary Blood Collection Tube K3EDTA’ e os tubos foram invertidos levemente 20 vezes de forma a homogeneizar a amostra, posteriormente os tubos foram transferidos para um contentor apropriadamente refrigerado.

Após um período compreendido entre 2 a 6 horas após a colheita, as amostras foram processadas na analisadora hematológica automática ‘IDEXX Lasercyte Hematology Analyser®’ e realizados os esfregaço sanguíneos. Os parâmetros hematológicos foram obtidos directamente após a leitura da analisadora hematológica, indirectamente através de cálculo automático da analisadora e por estimação da contagem total e diferencial de LEUC e estimação da contagem total PLQ, pela observação dos esfregaços preparados ao microscópio óptico ‘Olympus CX31®’.

Os esfregaços sanguíneos foram preparados pela técnica de ‘wedge’, em que uma gota da amostra foi colocada sobre a extremidade de uma lâmina e de seguida uma segunda lâmina foi aposta, formando um ângulo entre 30° a 45° e retraída até esta de modo a permitir que a gota de sangue corra por capilaridade sobre a superfície de contacto entre as duas lâminas. De seguida, com movimento rápido e preciso a lâmina espalhadora foi avançada no sentido contrário da gota, levando a amostra consigo. Após a secagem dos esfregaços ao ar livre, todas as amostras foram identificadas. As lâminas foram coradas pelo método de ‘Wright-Giemsa’, em que se fez emergir o esfregaço num pequeno contentor contendo metanol, durante 5 minutos. Posteriormente foi preparada uma solução de coloração, com diluição de 1:5, em que se colocou num contentor 1 mL de ‘Giemsa’ e 5 mL de solução tampão e as soluções foram homogeneizadas por agitação. Colocou-se a lâmina previamente fixada no contentor, com solução preparada, por 6 minutos. Por fim, removeu-se o excesso de coloração por lavagem do esfregaço em água tépida e deixou-se secar ao ar livre.

Após a realização dos esfregaços sanguíneos e coloração dos mesmos, procedeu-se à contagem estimativa manual, total e diferencial de LEUC e à contagem estimativa total de PLQ. Antes de se proceder à contagem de LEUC, toda a extensão da lâmina foi explorada para a presença de agregados leucocitários. Para a contagem total de LEUC, a zona de monocamada dos esfregaços sanguíneos foi observada ao microscópio óptico, sob ampliação de 100x. Em cada lâmina preparada, os LEUC foram contados pelo método de ‘battlement’, em 10 campos de visualização distintos. A média aritmética de LEUC presentes nos 10 campos visualizados foi multiplicada por 100 e o resultado obtido expresso em número de LEUC por μL . Para a contagem estimativa diferencial de LEUC, a zona de monocamada dos esfregaços sanguíneos foi observada ao microscópio óptico, sob ampliação de 400x. Em cada lâmina de esfregaço sanguíneo amostrada, foram contados 100 LEUC, identificando individualmente cada subtipo de LEUC enumerado. A soma das células obtidas por cada subtipo de LEUC enumerado corresponde à percentagem de cada subtipo de LEUC presentes na amostra. O valor absoluto correspondente a cada subtipo de LEUC foi obtido por multiplicação de cada percentagem ao valor total de LEUC estimado. Cada valor absoluto estimado foi expresso em número de células por μL . Para a contagem estimativa total de PLQ, toda a extensão da lâmina foi explorada para a presença de agregados plaquetários. Procedeu-se à contagem estimativa do número total de PLQ por observação ao microscópio óptico da zona de monocamada dos esfregaços sanguíneos, sob a ampliação de 1000x, ou seja na objectiva de imersão, sendo contadas as PLQ presentes em 10 campos de visualização

distintos. A soma das PLQ presentes nos 10 campos explorados foi multiplicada por 15000 e o resultado obtido em número de PLQ por μL .

Os resultados obtidos foram processados e comparados com valores de referência publicados no 'The Beaufort Cottage Laboratories Guide to Equine Clinical Pathology', com a utilização do programa estatístico 'SPSS 16.0 IBM Corporation®'. Para a análise estatística de cada parâmetro, foram realizados o teste de normalidade de 'Kolmogorov-Smirnov' e o teste 't-student'. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando 'P value' < 0,05 e foram apresentados no texto como médias e desvio padrão.

As citações e referências bibliográficas presentes nesta dissertação foram realizadas mediante as normas da 'American Psychological Association', APA.

10. Resultados

O valor médio da contagem total de ERT da população de PSL estudada foi de $8.04 \times 10^6/\mu\text{L}$, com desvio-padrão de $1.04 \times 10^6/\mu\text{L}$ e intervalos de confiança a 95% de $7.77 \times 10^6/\mu\text{L}$ a $8.36 \times 10^6/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de ERT referenciada na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de $9.7 \times 10^6/\mu\text{L}$ e no caso de WB de $8.2 \times 10^6/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de ERT da população de PSL foi significativamente inferior aos PSI. O gráfico 1 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de ERT.

Gráfico 1 - Contagem total de ERT dos PSL comparada aos PSI e WB.

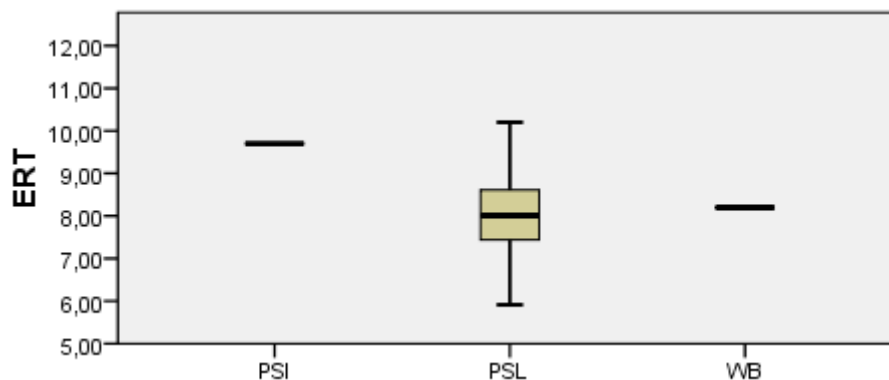


Gráfico comparativo expresso em ERT x $10^6/\mu\text{L}$ entre valores absolutos referentes aos ERT no PSL, PSI e WB.

O valor médio de HTC da população de PSL estudada foi de 43.6%, com desvio-padrão 5.76% e intervalos de confiança a 95% de 41.9% a 45.2%. O valor médio de HTC referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 40% e no caso de WB de 37%. O valor médio de HTC da população de PSL foi significativamente superior aos PSI, bem como dos WB. O gráfico 2 ilustra, comparativamente, os resultados do HTC.

Gráfico 2 - Cálculo do HTC dos PSL comparada aos PSI e WB.

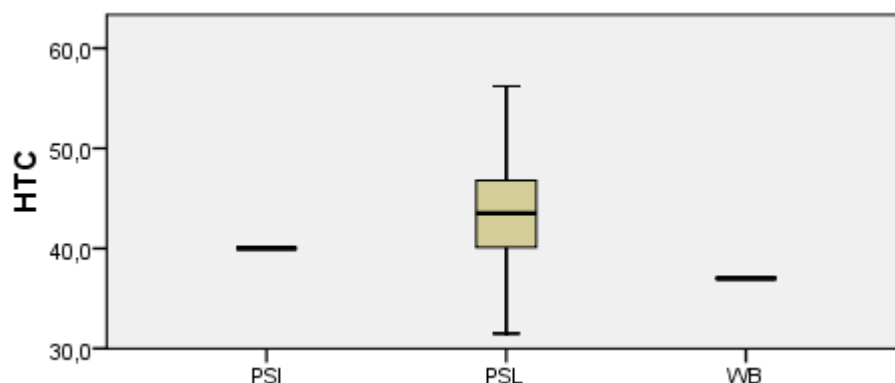


Gráfico comparativo expresso em % entre valores absolutos referentes ao HTC no PSL, PSI e WB.

O valor médio da concentração total de Hb da população de PSL estudada foi de 13.21 g/dL com desvio-padrão 1.37 g/dL e intervalos de confiança a 95% de 12.8 g/dL a 13.6 g/dL. O valor médio da concentração total de Hb referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 14.9 g/dL e no caso de WB de 13.5 g/dL. O valor médio da concentração total de Hb da população de PSL foi significativamente inferior aos PSI. O gráfico 3 ilustra, comparativamente os resultados da concentração total de Hb.

Gráfico 3 - Mensuração da concentração de Hb dos PSL comparada aos PSI e WB.

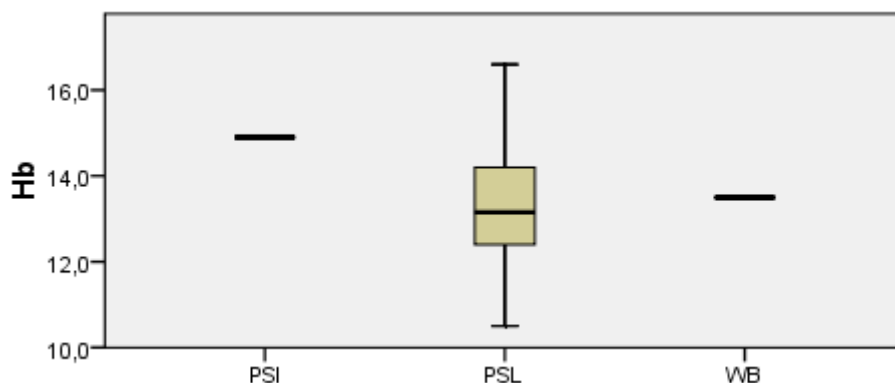


Gráfico comparativo expresso em g/dL entre valores absolutos referentes à concentração de Hb no PSL, PSI e WB.

O valor médio de VCM da população de PSL estudada foi de 54.05 fL com desvio-padrão 1.99 fL e intervalos de confiança a 95% de 53.5 fL a 54.6 fL. O valor médio de VCM referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 40.7 fL e no caso de WB de 46 fL. O valor médio de VCM da população de PSL foi significativamente superior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 4 ilustra, comparativamente, os resultados do valor médio de VCM.

Gráfico 4 -Medição do VCM dos PSL comparada aos PSI e WB.

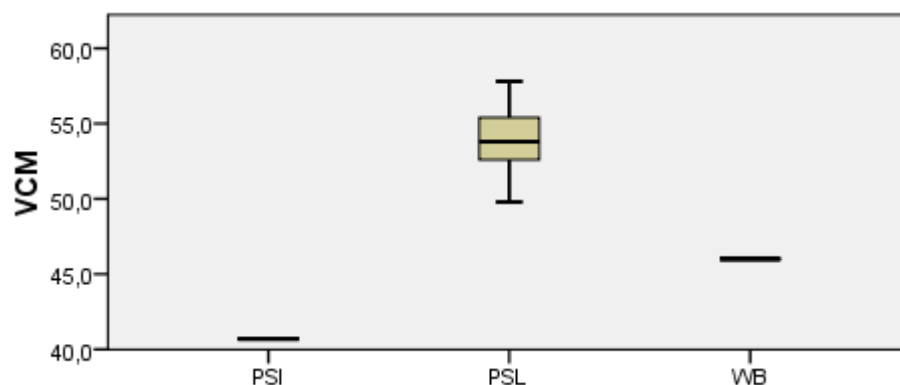


Gráfico comparativo expresso em fL entre valores absolutos referentes ao VCM no PSL, PSI e WB.

O valor médio de HCM da população de PSL estudada foi de 16.48 pg com desvio-padrão 1.26 pg e intervalos de confiança a 95% de 16.13 pg a 16.83 pg. O valor médio de HCM referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 15.4 pg e no caso de WB de 16.6 pg. O valor médio de HCM da população de PSL foi significativamente superior aos PSI. O gráfico 5 ilustra, comparativamente, os resultados do valor médio de HCM.

Gráfico 5 - Cálculo do HCM dos PSL comparada aos PSI e WB.

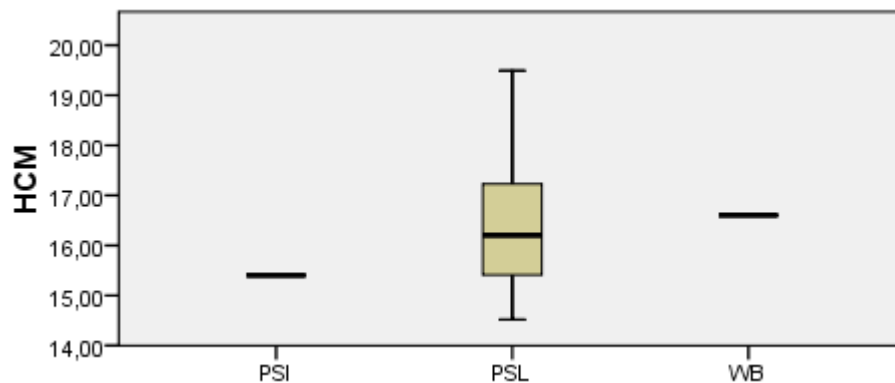


Gráfico comparativo expresso em pg entre valores absolutos referentes ao HCM no PSL, PSI e WB.

O valor médio de CHCM da população de PSL estudada foi de 30.50 g/dL com desvio-padrão 2.18 g/dL e intervalos de confiança a 95% de 29.9 g/dL a 31.1 g/dL. O valor médio de CHCM referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 37.8 g/dL e no caso de WB de 36.1 g/dL. O valor médio de CHCM da população de PSL foi significativamente inferior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 6 ilustra, comparativamente, os resultados do valor médio de CHCM.

Gráfico 6 - Cálculo do CHCM dos PSL comparada aos PSI e WB.

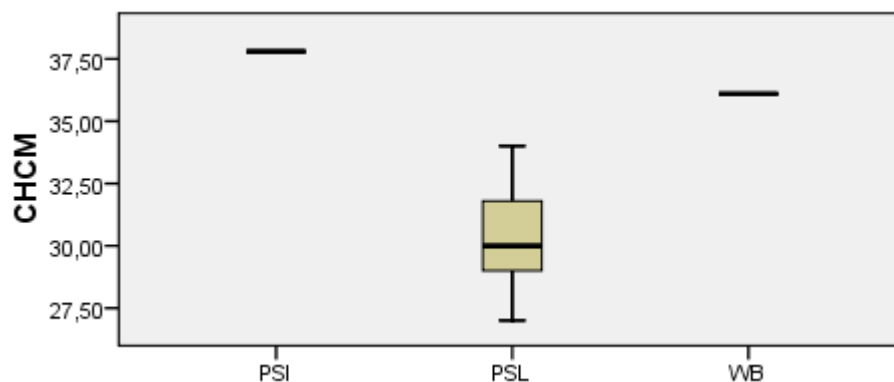


Gráfico comparativo expresso em g/dL entre valores absolutos referentes ao CHCM no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de LEUC da população de PSL estudada foi de $9.06 \times 10^3/\mu\text{L}$ com desvio-padrão $1.75 \times 10^3/\mu\text{L}$ e intervalos de confiança a 95% de $8.57 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $9.55 \times 10^3/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de LEUC referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de $8.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ e no caso de WB de $7.5 \times 10^3/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de LEUC da população de PSL foi significativamente superior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 7 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de LEUC.

Gráfico 7 - Contagem total de LEUC dos PSL comparada aos PSI e WB.

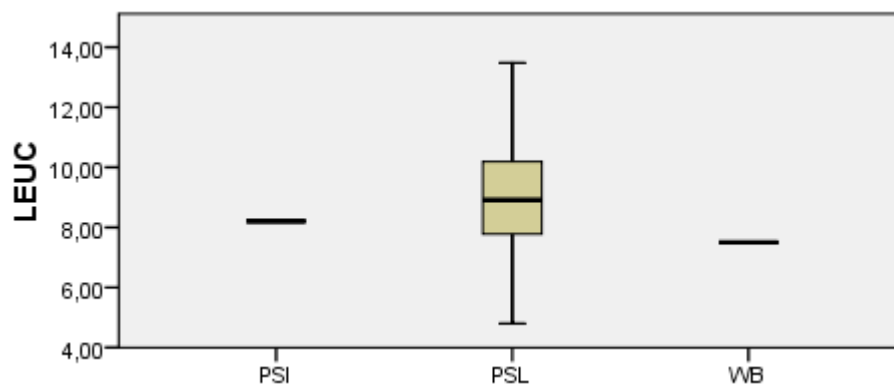


Gráfico comparativo expresso em $K \times 10^3/\mu\text{L}$ entre valores absolutos referentes aos LEUC no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de NEU da população de PSL estudada foi de $4.67 \times 10^3/\mu\text{L}$ com desvio-padrão $0.97 \times 10^3/\mu\text{L}$ e intervalos de confiança a 95% de $4.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $4.9 \times 10^3/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de NEU referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de $4.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ e no caso de WB de $4.4 \times 10^3/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de NEU da população de PSL foi significativamente superior aos WB. O gráfico 8 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de NEU.

Gráfico 8 - Contagem de NEU dos PSL comparada aos PSI e WB.

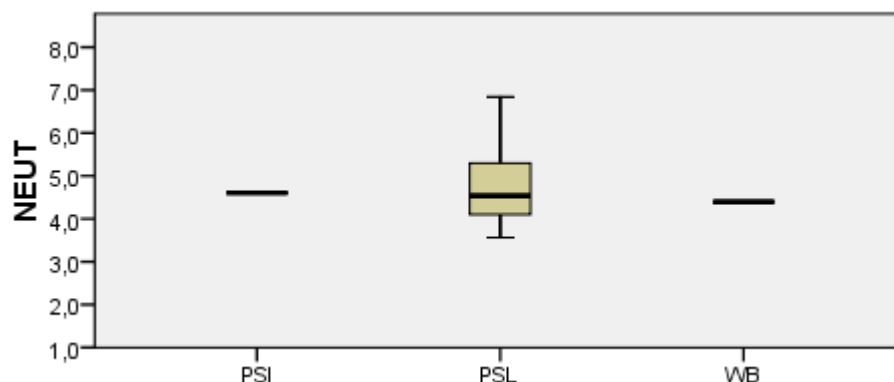


Gráfico comparativo expresso em K x10³/μL entre valores absolutos referentes aos NEU no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de LINF da população de PSL estudada foi de 3.63 x10³/μL com desvio-padrão 1.13 x10³/μL e intervalos de confiança a 95% de 3.32 x10³/μL a 3.94 x10³/μL. O valor médio da contagem total de LINF referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 2.8 x10³/μL e no caso de WB de 2.6 x10³/μL. O valor médio da contagem total de LINF da população de PSL foi significativamente superior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 9 ilustra, comparativamente, os resultados do valor médio da contagem total de LINF.

Gráfico 9 - Contagem LINF dos PSL comparada aos PSI e WB.

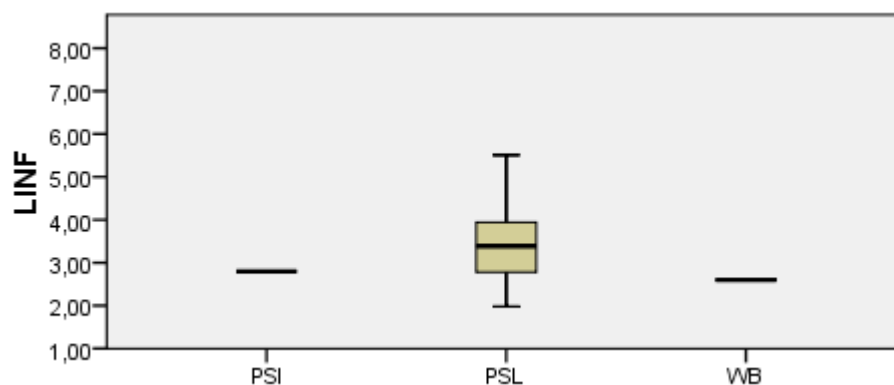


Gráfico comparativo expresso em K x10³/μL entre valores absolutos referentes aos LINF no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de MON da população de PSL estudada foi de 0.29 x10³/μL com desvio-padrão 0.12 x10³/μL e intervalos de confiança a 95% de 0.26 x10³/μL a 0.32 x10³/μL. O valor médio da contagem total de MON referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de 0.36 x10³/μL e no caso de WB de 0.3 x10³/μL. O valor médio da contagem total de MON da população de PSL foi

significativamente inferior aos PSI. O gráfico 10 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de MON.

Gráfico 10 - Contagem total de MON dos PSL comparada aos PSI e WB.

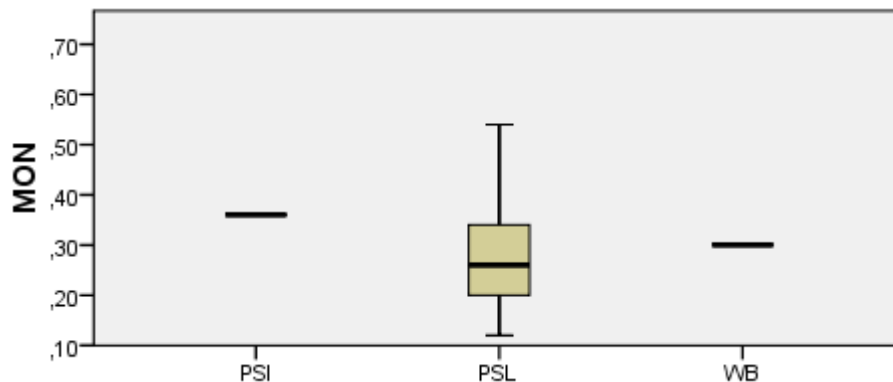


Gráfico comparativo expresso em $K \times 10^3/\mu L$ entre valores absolutos referentes aos MON no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de EOS da população de PSL estudada foi de $0,45 \times 10^3/\mu L$ com desvio-padrão $0,22 \times 10^3/\mu L$ e intervalos de confiança a 95% de $0,39 \times 10^3/\mu L$ a $0,51 \times 10^3/\mu L$. O valor médio da contagem total de EOS referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de $0,1 \times 10^3/\mu L$ e no caso de WB de $0,2 \times 10^3/\mu L$. O valor médio da contagem total de EOS da população de PSL foi significativamente superior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 11 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de EOS.

Gráfico 11 - Contagem de EOS dos PSL comparada aos PSI e WB.

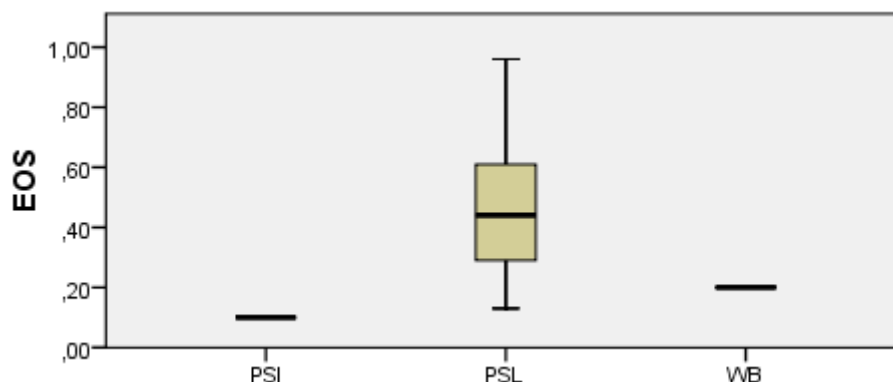


Gráfico comparativo expresso em $K \times 10^3/\mu L$ entre valores absolutos referentes aos EOS no PSL, PSI e WB.

O valor médio da contagem total de PLQ da população de PSL estudada foi de $82,58 \times 10^3/\mu L$ com desvio-padrão $31,99 \times 10^3/\mu L$ e intervalos de confiança a 95% de $74 \times 10^3/\mu L$ a $91 \times 10^3/\mu L$. O valor médio da contagem total de PLQ referenciado na literatura utilizada como base de dados comparativa neste estudo, no caso de PSI, é de $170 \times 10^3/\mu L$ e no caso de

WB de $156 \times 10^3/\mu\text{L}$. O valor médio da contagem total de PLQ da população de PSL foi significativamente inferior aos PSI, bem como aos WB. O gráfico 12 ilustra, comparativamente, os resultados da contagem total de PLQ.

Gráfico 12 - Contagem total de PLQ dos PSL comparada aos PSI e WB.

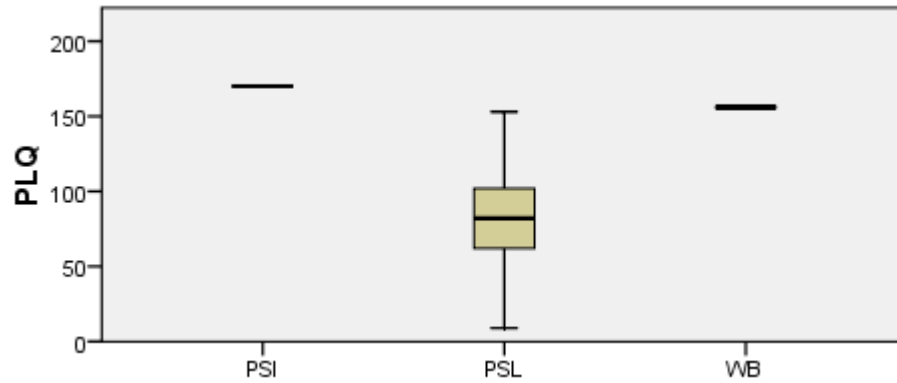


Gráfico comparativo expresso em $\text{K} \times 10^3/\mu\text{L}$ entre valores absolutos referentes às PLQ no PSL, PSI e WB.

11. Discussão

Actualmente, no conhecimento da autora, não existe nenhum estudo publicado, com vista a contribuir para a caracterização do hemograma do cavalo Puro Sangue Lusitano. Por outro lado, os intervalos de referência actualmente utilizados para a interpretação do hemograma em cavalos são bastante largos, pois, entre outras razões, para a sua determinação foram incluídos valores obtidos em diferentes raças, podendo, por isso, ser pouco representativos dos valores dos PSL (Latimer & Prasse, 2003).

Neste estudo, os PSL apresentaram um valor médio de contagem de ERT significativamente inferior ao dos PSI e semelhantes ao dos WB. Também num estudo em Lipizzanos, os valores de ERT foram inferiores aos dos PSI. Esta semelhança baseia-se provavelmente tanto numa similaridade genética entre os PSL e os Lipizzanos, ambos originários dos cavalos Andaluzes (Cebulj-Kadunc, Bozic, Kosec, & Cestnik, 2002), como no facto de os PSI terem sido, ao longo do tempo, seleccionados com vista à obtenção de performances desportivas excelentes. Apesar dos valores baixos de ERT, a média do valor de HTC e VCM nos PSL foi significativamente superior aos PSI e WB. Também os Lipizzanos possuem valores de HTC e VCM superiores aos dos WB (Cebulj-Kadunc et al., 2002). O facto de o VCM ser superior nos PSL pode justificar que o HTC seja também superior nesta raça, dado que ambos os valores estão relacionados de forma directamente proporcional. Por outro lado, o analisador automático utilizado neste trabalho não mede directamente o HTC, mas calcula o seu valor, através da multiplicação do VCM pelo número total de ERT. Este facto pode levar a resultados de HTC alterados, se o valor obtido for por algum motivo impreciso. Para confirmar a acuidade do cálculo do HTC teria sido interessante medi-lo de forma manual, por microcentrifugação. Poderia também ser interessante, medir as proteínas totais séricas e relacionar o valor obtido com o HTC e com a medida da EPO, tendo assim mais uma forma de afinação de exactitude do HTC. A policitemia relativa é uma causa frequente de aumento do HTC, que pode ter origem na hemoconcentração, devido à desidratação ou à contracção esplénica, induzida por stress durante a colheita (Reed et al., 2004). Dado que os cavalos utilizados para este estudo estavam todos aparentemente saudáveis e que o exame clínico foi normal, nada leva os autores a crer que estariam desidratados, por outro lado a colheita foi feita num ambiente ao qual o animal estava habituado, o que pode afastar também a hipótese de contracção esplénica, por stress. Alguns autores descreveram um aumento de HTC e VCM associado ao processamento tardio das

amostras (Kerr, 2002). Neste estudo, todos os hemogramas foram realizados até, no máximo, 6 horas após a colheita do sangue. O valor médio da concentração de Hb nos PSL foi significativamente inferior comparativamente ao dos PSI, no entanto o valor médio do HCM foi superior. Segundo Cebulj-Kadunc e colegas, 2002, o valor elevado do HCM nos PSL pode ser explicado pelo valor reduzido dos ERT. O valor médio de CHCM nos PSL foi significativamente inferior comparativamente aos PSI e WB, à semelhança do que se verifica nos Lipizzanos (Cebulj-Kadunc et al., 2002), podendo este facto ser explicado pelo valor de Hb obtido, relativamente reduzido.

A contagem média de LEUC é significativamente superior na população estudada, tanto comparativamente aos PSI, como aos WB. Relativamente à contagem diferencial de LEUC, a média dos NEU, LINF e EOS, são significativamente superiores nos PSL, comparativamente aos WB, ao contrário dos MON, que são significativamente inferiores na população estudada, tanto relativamente aos PSI, como aos WB. Todos os resultados dos valores leucocitários foram confirmados por leitura de esfregaço de sangue. Foi reportado por alguns autores que os machos apresentam valores de LEUC superiores aos das fêmeas, embora o mesmo não tenha sido observado num estudo em Lipizzanos (Cebuli-Kadunc et al, 2003; Weiss & Wardrop, 2010). No presente estudo 74% da população correspondeu a machos e 26% a fêmeas. Se também em PSL os machos tiverem mais LEUC do que as fêmeas, o desequilíbrio proporcional entre sexos pode ter contribuído para a obtenção de valores relativamente elevados de LEUC totais, assim como de NEU, LINF e EOS. Existem diversas causas para aumento dos LEUC, como a excitação, medo ou exercício, que induz uma leucocitose fisiológica, transiente, tipicamente caracterizada por uma ligeira neutrofilia, em ausência de desvio à esquerda ou alterações tóxicas (Schalm, 1962; Welles, 2010). O valor médio relativamente elevado dos LEUC observado no nosso estudo não parece corresponder a uma leucocitose fisiológica, pois as amostras foram colhidas em ambiente calmo, sem que nenhum dos indivíduos apresentasse sinais de excitação ou medo e a colheita foi realizada antes do exercício físico diário. Outras causas de aumento de LEUC são o stress ou corticoterapia, que originam um leucograma de stress, caracterizado por neutrofilia moderada sem desvio à esquerda, linfopenia e eosinopenia (Osbaldiston & Johnson, 1972). Nos resultados deste trabalho não foram verificados diminuição dos LINF nem dos EOS, para além de que os indivíduos não estavam sob o efeito de nenhum tipo de stress, nem de corticoterapia, logo o valor de LEUC elevado não se pode justificar por um leucograma de stress. Ainda outro factor responsável pelo aumento do número de LEUC é a presença de uma

inflamação (Welles, 2010), o que não parece ser o caso na população estudada, pois todos os cavalos apresentavam um exame clínico normal, não apresentavam sinais de doença clínica nem subclínica e não tinham história de doença recente. Para confirmar de forma absoluta a ausência de inflamação, poder-se-iam ter realizados outros testes para despiste de inflamação, tais como a electroforése das proteínas totais séricas, ou a medida de proteínas inflamatórias séricas, como o fibrinogénio ou a haptoglobina. O aumento relativo de EOS observado pode ser correlacionado com parasitismo ou exposição a alergenicos (McGraw & Slocombe 1982). Foi critério de inclusão no nosso estudo que os cavalos tivessem sido submetidos a uma desparasitação recente, o que, aparentemente, reduz as hipóteses de que este aumento de EOS tenha origem parasitária, no entanto este facto não pode ser comprovado objectivamente. Seria interessante realizar uma pesquisa de parasitas à população estudada. Por outro lado, este aumento relativo de EOS pode ter origem no contacto dos cavalos com alergenicos ambientais, aos quais estão normalmente expostos. Finalmente este aumento relativo pode também ser real, característico da raça, como é o caso nos cães de raça Pastor Alemão (Day, Mackin & Littlewood, 2000). Dados os factores supracitados, o aumento relativo de LEUC observado na nossa população é, aparentemente, real e característico dos PSL. A diminuição relativa dos MON observada é de difícil interpretação, dado que em cavalos saudáveis pode-se verificar uma monocitopenia (Carrick et al, 2008).

O valor médio da contagem de plaquetas foi inferior na população estudada, tanto relativamente aos PSI, como WB. A trombocitopenia, se real, é geralmente acompanhada de uma doença subjacente (Sellon et al, 1996). A trombocitopenia pode também ser consequência de administração de fármacos, tais como a fenilbutazona, o trimetopim ou a penicilina (Lavergne & Trepanier, 2007). Como exposto no presente capítulo, a população estudada estava isenta de doença e não foi sujeita a nenhum tratamento médico, o que advoga o facto de estarmos perante uma pseudotrombocitopenia. Vários aspectos podem justificar a obtenção destes valores, nomeadamente a agregação plaquetária observada nos esfregaços de sangue, devida à utilização de EDTA como anticoagulante ou erro de leitura pela analisadora hematológica automática.

De acordo com os critérios de inclusão foi possível integrar 61 cavalos, dos quais 42 machos inteiros, 3 machos castrados e 16 fêmeas, compatíveis com as características necessárias para fazer cumprir o objectivo geral. Estes cavalos foram obtidos sob processo aleatório, em coudelarias e centros hípicas, distribuídos em diversas áreas geográficas da região centro do país, sendo estas instituições em epígrafe representativas da região. Para

fazer cumprir os pressupostos de avaliação e inferência estatística, efectuou-se o teste de normalidade de ‘Kolmogorov-Smirnov’, verificando-se que os diversos parâmetros avaliados estão normalmente distribuídos, preconizando-se desta forma uma abordagem paramétrica. Assim, no plano estatístico definiu-se que iria ser efectuado o teste t para uma amostra para comparação com valor de referência. Estes valores e análise estatística embora limitados pelo tamanho amostral, cumprem as exigências estatísticas e do desenho do estudo e apresentam validade interna e externa, sendo os resultados passíveis de interpretação pela comunidade científica e com valores sugestivos dignos de apreciação.

Conclusão

A média dos valores do hemograma da nossa população de PSL apresenta diferenças estatísticas quando comparado com valores previamente publicados em PSI e WB, o que contribui positivamente para a caracterização do hemograma do PSL e para a determinação dos valores de referência próprios da raça.

A maioria dos variados factores susceptíveis de afectar os valores do hemograma, tais como exercício prévio à colheita de sangue, técnica de transporte e análise, stress, entre outros, foram ponderados e evitados ou estandardizados, de forma a não serem criados, pelos próprios investigadores, factores de erro e potenciais artefactos capazes de adulterar os resultados.

Os valores obtidos, presumivelmente resultado de selecção, podem constituir uma ajuda ao médico veterinário, se forem tomados em consideração aquando da interpretação de hemogramas de PSL.

Bibliografia

Aglietta, M., Sanavio, F., Stacchini, A., Morelli, S., Fubini, L., Severino, A., et al. (1993). Interleukin - 3 in vivo: kinetic of response of target cells. *Blood*, 82, 2054–2061.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404, 193–197.

Alexander, W. S., Roberts, A. W., Nicola, N. A., Li, R. & Metcalf, D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c - Mpl. *Blood*, 87, 2162–2170.

Allen, A. L., Myers, S. L., Searcy, G. P. & Fretz, P. B. (1998). Hematology of equine fetuses with comparison to their dams. *Vet Clin Pathol*, 27(3), 93–100.

Allen, B. V. (1989). Age differences in the haemogram of the National Hunt trained racehorse. *Equine Vet J*, 21(4), 309–10.

Allen, B. V. & Snow, D. H. (1986). Haematology of the racehorse. In: Hickman, J. *Equine surgery and medicine* (p. 225-82). London: Academic Press Inc.

Amory, H. (2006). *Analyse de sang : interprétation de l'hématologie et de la biochimie de routine*. Comunicação apresentada no XXIIIème Journée d'étude de la BEPS, França.

Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V. & Dy, M. (2002). Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leuk Biol*, 71(4), 557–564.

Bartley, T. D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y. S., Lu, H. S., Martin, F., et al. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*, 77, 1117–1124.

Bayly, W. M. (1987). The interpretation of clinicopathologic data from the equine athlete. *Vet Clin N Am Eq Pract*, 3(3), 631–647.

Benarafa, C., Collins, M. E., Hamblin, A. S. & Cunningham, F. M. (2002). Role of the chemokine eotaxin in the pathogenesis of equine sweet itch. *Vet Rec*, 151(23), 691-3.

Beutler, E. (2005). Production and destruction of erythrocytes. In: Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S., Seligsohn, U. *Williams' Hematology* (p. 355-368). New York: McGraw Hill.

Bienzle, D., Reggeti, F., Clark, M. E., & Chow, C. (2003). Immunophenotype and functional properties of feline dendritic cells derived from blood and bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol*, 96(1-2), 19–30.

Boudreaux, M. K. & Ebbe, S. (1998). Comparison of platelet number, mean platelet volume and platelet mass in five mammalian species. *Comp Haematol Intl*, 8(1), 16–20.

Brockus, C. W. & Andreasen, C. B. (2003). Erythrocytes. In: Latimer, K. S., Mahaffey, E. A. & Prasse, K. W. *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology* (4th ed., p. 3-45). Ames: Iowa State Press.

Brooks, M. B. (2008). Equine Coagulopathies. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 24(2), 335-55.

Brown, D. G. & Cross, F. H. (1969). Hematologic values of burros from birth to maturity: Cellular elements of peripheral blood. *Am J Vet Res*, 30(11), 1921–1927.

Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M. & Treacher, D. F. (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, 368, 157-69.

Caldin, M., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., Lorenzi, D., Carli, E., Tasca, et al. (2005). Reference ranges for haematology, biochemical profile and electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). *Compend Clin Pathol*, 14(1), 5–12.

Campbell, A. D. (1992). The role of hemonectin in the cell adhesion mechanisms of bone marrow. *Hematol Pathol*, 6(2), 51-60.

Cantor, A. (2009). Thrombopoiesis. In: Hoffman, R., Benz, E. J., Shattil, S. J., Furie, B. & Cohen, H. J. *Hematology: Basic Principles and Practice* (p. 305-318). Philadelphia: Churchill Livingstone.

Carakostas, M. C., Moore, W. E. & Smith, J. E. (1981). Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *Am J Vet Res*, 42(4), 623-5.

Carlson, G. P. (1987). Haematology and body fluids in the equine athlete: a review. In: Gillespie, J. R. & Robinson, N. E. *Equine exercise physiology 2* (p. 393-425). Davis (CA): ICEPP Publications.

Carrick, J. B. & Begg, A. P. (2008). Peripheral Blood Leukocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 24(2), 239-259.

Carter, E. I., Valli, V. E., McSherry, B. J., Milne, F. J., Robinson, G. A. & Lumsden, J. H. (1974). The kinetics of hematopoiesis in the light horse. I: The lifespan of peripheral blood cells into the normal horse. *Can J Comp Med*, 38(3), 303-13.

Cebulj-Kadunc, N., Bozic, M., Kosec, M. & Cestnik, V. (2002) The influence of age and gender on haematological parameters in Lipizzan horses. *J Vet Med*, 49, 217-222.

Cebulj-Kadunc, N., Bozic, M., Kosec, M. & Cestnik, V. (2003) The variations of white blood cell count in Lipizzan horses. *J Vet Med*, 50, 251-253.

Chang, Y., Bluteau, D., Debili, N. & Vainchenker, W. (2007). From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost*, 5 (Suppl 1), 318–27.

Chapman, E. S., Hetherington, E. J. & Zelmanovic, D. (1996). A simple automated method for determining ex - vivo platelet activation state. *Blood*, 88 (Suppl 2), 50 b.

Chasis, J. A. & Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112(3), 470–478.

Christopher, M. J. & Link, D. C. (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Curr Opin Hematol*, 14(1), 3-8.

Coelho, P. (2006). *Influência do tempo, temperatura e recipiente de estocagem nas características do hemograma de cães adultos hígidos*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista.

Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Chartier, C. & Dorchies, P. (2002). Mast cell and eosinophil mucosal responses in the large intestine of horses naturally infected with cyathostomes. *Vet Parasitol*, 107(3), 251-64.

Cook, T., Divers, T. J. & Rowland, P. H. (1995). Hypercalcemia and erythrocytosis in a mare associated with a metastatic carcinoma. *Equine Vet J*, 27(4), 316-8.

Costa, J. J., Weller, P. F. & Galli, S. J. (1997). The cells of the allergic response – mast cells, basophils, and eosinophils. *J Am Med Assoc*, 278(22), 1815–1822.

Cotter, S. M. (2001). *Hematology* (p. 112-3). Jackson: Teton NewMedia.

Court, W. S., Bozeman, J. M., Soong, S. J., Saleh, M. N., Shaw, D. R. & LoBuglio, A. F. (1987). Platelet surface-bound IgG in patients with immune and nonimmune thrombocytopenia. *Blood*, 69(1), 278-83.

Cowell, R. L. & Tyler, R. D. (2002). *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. (2nd ed.). Missouri: Mosby.

Crisman, M. V. & Scarratt, W. K. (2008). Immunodeficiency disorders in Horses. *Vet Clin Equine*, 24(2), 299-310.

Day, M., Mackin, A. & Littlewood, J. (2000). *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Gloucester: BSAVA.

Debili, N., Coulmotel, L. & Croiselle, L. (1996). Characterization of a bipotent erythro - megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*, 88, 1284–1296.

Denburg, J. A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N., Ackerman, S. J., et al. (1985). Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood*, 66(2), 312–318.

Dotson, M. A. (1998). Multiparameter Hematology Instruments. In: Stiene–Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A., Koepke, J. A. *Clinical Hematolog* (5th ed., p. 519-551). Philadelphia: Lippincott.

Duckett, W. M. & Matthews, H. K. (1997). Hypereosinophilia in a horse with intestinal lymphosarcoma. *Can Vet J*, 38(11), 719-20.

Duncan, J. & Prasse, K. (1977). *Veterinary laboratory medicine*. Ames: Iowa State University Press.

Duncan, S. G., Meyers, K. M. & Reed, S. M. (1983). Reduction of the red blood cell mass of horses: toxic effect of heparin anticoagulant therapy. *Am J Vet Res*, 44(12), 2271-6.

Eichacker, P. & Lawrence, C. (1985). Steroid-induced hypersegmentation in neutrophils. *Am J Hemato*, 18(1), 41-45.

Elghetany, M. T. (2002). Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cell Mol Dis*, 28(2), 260–274.

Erslev, A. J. & Beutler, E. (1995). Production and destruction of erythrocytes. In: Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S. & Kipps, T. J. *Williams Hematology* (5th ed., p. 425-441). New York: McGrawHill.

Finocchio, E., Coffman, J. & Osbaldiston, G. (1960). Platelet counts in horses. *Cornell Vet*, 60(3), 518-27.

Folch, P., Jordana, J. & Cuenca, R. (1997). Reference ranges and the influence of age and sex on haematological values of the endangered Catalanian donkey. *Vet J*, 154(2), 163–168.

Ford, H. C., Toomath, R. J., Carter, J. M., Delahunt, J. W. & Fagerstrom, J. N. (1988). Mean platelet volume is increased in hyperthyroidism. *Am J Hematol*, 27(3), 190–193.

French, J. M. & Patrick, V. H. (1995). Reference values for physiologic, haematological and biochemical parameters in domestic donkeys (*Equus asinus*). *Equine Vet Educ*, 7(1), 33–35.

Galli, S. J. & Dvorak, A. M. (1995). Production, biochemistry and function of basophils and mast cells. In: Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S. & Kipps, T. J. *Williams Hematology* (5th ed., p. 805-810). New York: McGraw-Hill.

Geor, R. J., Lund, E. M. & Weiss, D. J. (1993). Echinocytosis in horses: 54 cases (1990). *J Am Vet Med Assoc*, 202(6), 976-980.

Geor, R. J., Weiss, D. J. & Smith, C. M. (1994). Hemorheologic alterations induced by incremental treadmill exercise in thoroughbreds. *Am J Vet Res*, 55(6), 854-61.

Golland, L. C., Evans, D. L., McGowan, C. M., Hodgson, D. R. & Rose, R. J. (2003). The effects of overtraining on blood volumes in standardbred racehorses. *Vet J*, 165(3), 228-33.

Gordon, M. Y. (1994). Physiology and function of the haemopoietic microenvironment. *Br J Haematol*, 86(2), 241-243.

Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present, and future. *Eur J Immunol*, 37 (Suppl 1), 9-17.

Hamlin, M. J., Shearman, J. P. & Hopkins, W. G. (2002). Changes in physiological parameters in overtrained Standardbred racehorses. *Equine Vet J*, 34(4), 383-8.

Hanzawa, K., Kai, M., Hiraga, A. & Watanabe, S. (1999). Fragility of red cells during exercise is affected by blood pH and temperature. *Equine Vet J*, 30, 610-1.

Harvey, J. W. (1997). The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (5th ed., p. 157-203). San Diego: Academic Press.

Harvey, J. W. (1999). Normal Hematologic Values. In: Koterba, A. M., Drummond, W. H. & Kosch, P. C. *Equine Clinical Neonatology* (p.561-570). Philadelphia: Lea & Febiger.

Harvey, J. W. (2001). *Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals*. Philadelphia: Saunders.

Harvey, J. W., Stockham, S. L., Scott, M. A., Johnson, P. I., Scott, M. A. & Donald, J. J. (2003). Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. *Vet Pathol*, 40(6), 632-42.

Harvey, R. B., Hambright, M. B. & Rowe, L. D. (1984). Clinical biochemical and hematologic values of the American Miniature Horse: reference values. *Am J Vet Res*, 45(5), 987-990.

Ha, T. Y. & Reed, N. D. (1987). Systemic anaphylaxis in mast cell deficient mice of w/wv and sl/sld genotypes. *Exp Cell Biol*, 55(2), 63-68.

Hayase, Y., Muguruma, Y. & Lee, M. Y. (1997). Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Exp Hematol*, 25(1), 19-25.

Henry, M., Prasse, K. & White, S. (1989). Hemorrhagic diathesis caused by multiple myeloma in a three-month-old foal. *J Am Vet Med Assoc*, 194(3), 392-4.

Herbst, B., Kohler, G., Mackensen, A., Veelken, H. & Lindemann, A. (1998). GM-CSF promotes differentiation of a precursor cell of monocytes and Langerhans-type dendritic cells from CD34+ haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*, 101(2), 231-241.

Herbst, B., Köhler, G., Mackensen, A., Veelken, H., Kulmburg, P., Rosenthal, F. M. et al., (1996). In vitro differentiation of CD34(+) hematopoietic progenitor cells toward distinct dendritic cell subsets of the Birbeck granule and MHC-positive Langerhans cell and the interdigitating dendritic cell type. *Blood*, 88(7), 2541-8.

Hinchcliff, K. W., Kociba, G. J. & Mitten, L. (1993). Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 203(12), 1715-6.

Hirai, K., Miyamasu, M., Takaishi, T. & Morita, Y. (1997). Regulation of the function of eosinophils and basophils. *Crit Rev Immunol*, 17(3-4), 325-352.

Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P. S., Lacy, P., et al. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*, 38(5), 709-750.

Holgate, S. T. (2000). The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*, 30(Suppl 1), 28-32.

Hunt, P. (1995). A bipotential megakaryocytic/erythrocyte progenitor cell: The link between erythropoiesis and megakaryopoiesis becomes stronger. *J Lab Clin Med*, 125, 303-304.

Jackson, M. (1987). Platelet physiology and platelet function: inhibition by aspirin. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 9, 627.

Jain, N. C. (1986). The horse: normal hematology of the horse. In: Feldman, B. F., Zinkl, J. G. & Jain, N. C. *Schalm's veterinary hematology* (4th ed., p. 140-77). Philadelphia: Lea & Febiger.

Jain, N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

Jandl, J. H. (1996). *Blood: Textbook of Hematology* (p. 1301-1360). Boston: Little Brown.

Jolly, R. D. & Walkley, S. U. (1998). Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. *Vet Pathol*, 34(6), 527-548.

Kaito, K., Otsubo, H., Usui, N., Yoshida, M., Tanno, J., Kurihara, E., et al. (2005). Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 128(5), 698–702.

Kaushansky, K., Lin, N., Grossman, A., Humes, J., Sprugel, K. H. & Broudy, V. C. (1996). Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. *Exp Hematol*, 24, 265–269.

Kerr, M. G. (2002). *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Hematology*. (2nd ed.). West Sussex: Blackwell Science.

Kingston, J. K., Bayly, W. M., Sellon, D. C., Meyers, K. M. & Wardrop, K. J. (2001). Effects of sodium citrate, low molecular weight heparin and prostaglandin E1 on aggregation, fibrinogen binding and enumeration of equine platelets. *Am J Vet Res*, 62(4), 547-54.

Kirshenbaum, A. S., Goff, J. P., Semere, T., Foster, B., Scott, L. M. & Metcalfe, D. D. (1999). Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, 94(7), 2333-42.

Knol, E. F., Mul, F. P. J., Lie, W. J., Verhoeven, A. J. & Roos, D. (1996). The role of basophils in allergic disease. *Eur Respir J Suppl*, 22, 126-131.

Kohn, C., Swardson, S., Provost, P., Gilbert, R. O. & Couto, G. (1995). Myeloid hypoplasia in related Standardbreds. *J Vet Intern Med*, 9(5), 315-323.

Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J. & Semenza, G. L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, 77, 2497–2503.

Kroegel, C., Virchow, J. C. Jr., Luttmann, W., Walker, C. & Warner, J. A. (1994). Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J*, 7(3), 519–543.

Kuter, D. J. (1996). The physiology of platelet production. *Stem Cell*, 14 (Suppl 1), 88–101.

Latimer, K. S. & Prasse, K. W. (2003). Leukocytes. In: Latimer, K. S., Mahaffey, E. A. & Prasse, K. W. *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine clinical pathology* (4th ed., p.46-79). Ames: Iowa State Press.

Latimer, K. S. & Rakich, P. (2002). Peripheral blood smears. In: Cowell, R. L. & Tylers, R. D. *Diagnostic cytology and hematology of the horse* (2nd ed.). St Louis (MO): Mosby Inc.

Lavergne, S. N. & Trepanier, L. A. (2007). Anti-platelet antibodies in a natural animal model of sulphonamide - associated thrombocytopaenia. *Platelets*, 18(8), 595-604.

Lazarides, E. (1987). From genes to structural morphogenesis: the genesis and epigenesis of a red blood cell. *Cell*, 51, 345–356.

Leary, A. G. & Ogawa, M. (1984). Identification of pure and mixed basophil colonies in culture of human peripheral blood and marrow cells. *Blood*, 64(1), 78–83.

Lebien, T. W. (1995). Lymphocyte otogeny and homing receptors. In Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S. & Kipps, T. J. *Williams Hematology* (5th ed., p. 921-929). New York: McGraw-Hill.

Lennox, T. J., Wilson, J. H., Hayden, D. W., Bouljihad, M., Sage, A. M., Walser, M. M., et al. (2000). Hepatoblastoma with erythrocytosis in a young female horse. *J Am Vet Med Assoc*, 216(5), 718-721.

Lim, Y. A. & Hyun, B. H. (2002). Evaluation of platelet parameters on the ADVIA 120 as the quality indicator for stored platelets. *Clin Lab Haematol*, 24, 377-384.

Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R. D., Kuijper, J. L., Lofton-Day, C. E., Oort, P.J., et al. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*, 369, 565–568.

Lording, P. (2008). Erythrocytes. *Vet Clin Equine*, 225:235.

Lunn, D. P. & Horohov, D. W. (2004). Equine immunology. In: Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C. *Equine Internal Medicine*. (2nd ed., p. 1-28). St Louis (MO): Saunders.

Madigan, J. E. & Gribble, D. (1987). Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J Am Vet Med Assoc*, 190, 445.

Mbalaviele, G., Iaiswal, N., Meng, A., Cheng, L., Van den Bos, C. & Thiede, M. (1999). Human mesenchymal stem cells promote osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*, 140, 3736-43.

McDonald, T. P. & Sullivan, P. S. (1993). Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. *Exp Hematol*, 21, 1316–1320.

McEwen, B. J. (1992). Eosinophils: a review. *Vet Res Commun*, 16, 11–44.

McFarlane, D., Sellon, D. C., Gaffney, D., Hedgepeth, V., Papich, M. & Gibbs, S. (1998). Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotrophin concentration in healthy aged horses. *Am J Vet Res*, 59(10), 1247-51.

McFarlane, D., Sellon, D. C. & Gibbs, S. A. (2001). Age-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *Am J Vet Res*, 62, 1413.

McFarlane, D., Sellon, D. C. & Parker, B. (1998). Primary erythrocytosis in a 2-year-old Arabian gelding. *J Vet Intern Med*, 12, 384.

McGowan, C. (2008). Clinical pathology in the racing horse: The role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. *Vet Clin Equine*, 24(8), 405-421.

McCraw, B. M. & Slocombe, J. O. (1985). *Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host. *Can J Comp Med*, 49, 372–383.

Melo, R. C., Spencer, L. A., Dvorak, A. M. & Weller, P. F. (2008). Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule - derived cytokines and other proteins. *J Leuk Biol*, 83(2), 229–236.

Meyer, D. J. & Harvey, J. W. (1998). *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis* (2nd ed.). Philadelphia: WB Saunders Co.

Metcalf, D. (1993). Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety. *Blood*, 82, 3515-3523.

Min, B. (2008). Basophils: what they ‘can do’ versus what they ‘actually do’. *Nat Immunol*, 9, 1333–1339.

Mizoguchi, A. & Bhan, A. K. (2006). A case for regulatory B cells. *J Immunol*, 176, 705-10.

Monreal, L., Villatoro, A. J., Monreal, M., Espada, Y., Angles, A. M. & Ruiz-Gopegui, R. (1995). Comparison of the effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin in horses. *Am J Vet Res*, 56, 1281-1285.

Moore, J. N., Mahaffey, E. A. & Zboran, M. (1987). Heparin-induced agglutination of erythrocytes in horses. *Am J Vet Res*, 48, 68–71.

Mori, E., Mirandola, R. M. S., Ferreira, R. R., Oliveira, J. V., Gacek, F. & Fernandes, W. (2004). Reference values on hematologic parameters of the Brazilian donkey (*Equus asinus*) breed. *J Equine Vet Sci*, 24, 271–276.

Morris, C. F., Robertson, J. L., Mann, P. C., Clark, S. & Divers, T. J. (1987). Hemolytic uremic-like syndrome in two horses. *J Am Vet Med Assoc*, 191(11), 1453-4.

Morris, D. D., Bloom, J. C., Roby, K. A., Woods, K. & Tablin, F. (1984). Eosinophilic myeloproliferative disorder in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 185(9), 993-6.

Osbaldiston, G. W. & Johnson, J. H. (1972). Effect of ACTH and selected glucocorticoids on circulating blood cells in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 161, 53-56.

Pantel, K. & Nakeff, A. (1993). The role of lymphoid cells in hematopoietic regulation. *Exp Hematol*, 21(6), 738-742.

Patel, S. R., Richardson, J. L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K. et al. (2005). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*, 106, 4076-4085.

Persson, S. G. B. (1983). The significance of haematological data in the evaluation of soundness and fitness in the horse. In: Snow, D. H., Persson, S. G. B. & Rose, R. J. *Equine exercise physiology*(p. 324-7). Cambridge (MA): Granata editions.

Peyron, P., Maridonneau-Parini, I. & Stegmann, T. (2001). Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria. *J Biol Chem*, 276(38), 35512-17.

Poso, A. R., Soveri, T. & Oksanen, H. E. (1983). The effect of exercise on blood parameters in standardbred and Finnish-bred horses. *Acta Vet Scand*, 24(2), 170-84.

Prasse, K. W., George, L. W. & Whitlock, R. H. (1981). Idiopathic hypersegmentation of neutrophils in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 178(3), 303-305.

Quesenberry, P. J. (1995). Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S. & Kipps, T. J. *Williams Hematology*. (5th ed., p. 211-228). New York: McGraw-Hill.

Radin, M., Eubank, M. & Weiser, M. (1986). Electronic measurement of erythrocyte volume and volume heterogeneity in horses during erythrocyte regeneration associated with experimental anemia. *Vet Pathol*, 23, 656.

Radley, J. M. & Haller, C. J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*, 60, 213-219.

Ralston, S. L., Nockels, C. F. & Squires, E. L. (1988). Differences in diagnostic test results and hematologic data between aged and young horses. *Am J Vet Res*, 49, 1387 - 1392.

Ramirez, S., Gaunt, S. D., McClure, J. J. & Oliver, J. (1999). Detection and effects on platelet function of antiplatelet antibody in mule foals with experimentally induced neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Vet IntMed*, 13(6), 534-39.

Reagan, W. J., Carter, C. & Turek, J. (1994). Eccentricity in equine red maple leaf toxicosis. *Vet Clin Pathol*, 23, 123-127.

Reagan, W. J., Sanders, T. G. & DeNicofa, T. (1998). *Veterinary hematology: atlas of common domestic species*. Ames: Iowa State University Press.

Rebar, A. H., Lewis, H. B., DeNicola, D. B., Halliwell, W. H. & Boon, G. D. (1981). Red cell fragmentation in the dog: an editorial review. *Vet Pathol*, 18, 415-426.

Reed, S. M., Bayly, W. M. & Sellon, D. C. (2004). *Equine Internal Medicine*. (2nd ed.). St Louis (MO): Saunders.

Revington, M. (1983). Haematology of the racing Thoroughbred in Australia 1: reference values and the effect of excitement. *Equine Vet J*, 15(2), 141-4.

Roby, K. A., Beech, J., Bloom, J. C. & Black, M. (1990). Hepatocellular carcinoma associated with erythrocytosis and hypoglycemia in a yearling filly. *J Am Vet Med Assoc*, 196(3), 465-7.

Rose, R. J. & Allen, J. R. (1983). Hematologic responses to exercise and training. *Vet Clin N Am Equine Pract*, 1(3), 461 – 477.

Rose, R. J. & Hodgson, D. R. (1982). Haematological and plasma biochemical parameters in endurance horses during training. *Equine Vet J*, 14, 144-148.

Rosenzweig, M., Canque, B. & Gluckman, J. C. (1996). Human dendritic cell differentiation pathway from CD34(+) hematopoietic precursor cells. *Blood*, 87, 535-544.

ROSSDALE & VETERINARY SURGEONS - The Beaufort Cottage Laboratories Guide to Equine Clinical Pathology. Newmarket, England, 2006.

Schalm, O. (1980). Equine hematology. IV. Erythroid marrow cytology in response to anemia. *Equine Pract*, 2, 35.

Schalm, O. W. (1962). Leukocyte responses to disease in various domestic animals. *J Am Vet Med Assoc*, 140, 557-589.

Schalm, O. W. (1984). *Manual of Equine Hematology*. Santa Barbara:Veterinary Practice Pub Co.

Schulze, H., Korpál, M., Hurov, J., Kim, S. W., Zhang, J., Cantley, L. C., et al. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 107, 3868-3875.

Searcy, G. & Orr, J. (1981). Chronic granulocytic leukemia in a horse. *Can Vet J*, 22, 148.

Segura, D., Monreal, L., Armengou, L., Tarancón, I., Brugués, R. & Escolar, G. (2007). Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J Vet Intern Med*, 21(5), 1076–1082.

Sellon, D. C. & Grindem, C. B. (1994). Quantitative platelet abnormalities in horses. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 16, 1335.

Sellon, D. C., Levine, J. F., Palmer, K., Millikin, E., Grindem, C. & Covington, P. (1997). Thrombocytosis in 24 horses (1989-1994). *J Vet Intern Med*, 11(1), 24-29.

Sellon, D. C., Levine, J., Millikin, E., Palmer, K., Grindem, C. & Covington, P. (1996). Thrombocytopenia in horses: 35 cases (1989-1994). *J Vet Intern Med*, 10(3), 127-32.

Serhan, C. N. & Savill, J. (2007). Resolution of neutrophil homeostasis. *Curr Opin Hematol*, 14, 3-8.

Shull, R. (1981). Biochemical changes in equine erythrocytes during experimental regenerative anemia. *Cornell Vet*, 71, 280.

Small, B. M. & Bettigole, R. E. (1981). Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of platelet volume distribution. *Am J Clin Pathol*, 76, 685–691.

Snow, D. H. (1983). Physiological factors affecting resting haematology. In: Snow, D. H., Persson, S. G. B. & Rose, R. J. *Equine exercise physiology* (p. 318-33). Cambridge (MA): Granata editions.

Snow, D. H., Ricketts, S. W. & Mason, D. K. (1983). Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response. *Equine Vet J*, 15(2), 149–54.

Spits, H., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. (1995). Development of human T and natural killer cells. *Blood*, 85(10), 2654-2670.

Spring, F. A., Parsons, S. F., Ortlepp, S., Olsson, M. L., Sessions, R., Brady, R. L., et al. (2001). Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1) and alpha(V) - family integrins through novel integrin - binding mechanisms. *Blood*, 98, 458–466.

Stafford, J. L., Neumann, N. F. & Belosevic, M. (2002). Macrophage - mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*, 28, 187–248.

Stewart, G. A., Riddle, C. A. & Salmon, P. W. (1977). Haematology of the racehorse. A recent study of thoroughbreds in Victoria. *Aust Vet J*, 53(8), 353–9.

Stobo, J. D. (1998). Lymphocytes: development and function. In: Gallin, J. L., Goldstein, I. M. & Snyderman, R. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press Ltd.

Stockham, S. L., Harvey, J. W. & Kinden, D. A. (1994). Equine glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Vet Pathol*, 31, 518-527.

Stockham, S. L. & Scott, M. A. (2002). *Leukocytes. Fundamentals of veterinary clinical pathology* (1st ed., p. 49-83). Ames (IA): Iowa State Press.

Tablin, F. & Weiss, L. (1985). Equine bone marrow: a quantitative analysis of erythroid maturation. *Anat Rec*, 213(2), 202.

Tavassoli, M. & Aoki, M. (1981). Migration of entire megakaryocytes through the marrow - blood barrier. *Br J Haematol*, 48, 25-29.

Thelm, H., Diem, H. & Haferlach, T. (2004). *Color atlas of hematology* (2nd ed.). New York: Thieme.

Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., DeNicola, D., Fettman, M. J., Lassen, E. D., et al., (2004). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.

Tornquist, S. J. & Crawford, T. B. (1997). Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood*, 90, 2357.

Trowbridge, E. A., Martin, J. F. & Slater, D. N. (1982). Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res*, 28, 461-475.

Tydell, C. C., David-Fung, E. S., Moore, J. E., Rowen, L., Taghon, T. & Rothenberg, E. V. (2007). Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway. *J Immunol*, 179(1), 421 - 438.

Tyler-McGowan, C. M., Golland, L. C., Evans, D. L., Hodgson, D. R. & Rose, R. J. (1999). Haematological and biochemical responses to training and overtraining. *Equine Vet J Suppl*, 30, 621-5.

Urban, C. F., Lourido, S. & Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing. *Cell Microbiol*, 8(11), 1687-96.

Valentine, B. A., Ross, C. E., Bump, J. L. & Eng, V. M. (1986). Intramuscular hemangiosarcoma with pulmonary metastasis in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 188(6), 628-9.

Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., LeCouedic, J. P., Norol, F., Larsen, A. K., et al. (1998). Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*, 91, 3711–3723.

Waldron-Mease, E. (1979). Hypothyroidism and myopathy in racing thoroughbreds and standardbreds. *J Equine Med Surg*, 3, 124.

Waller, E. K., Olweus, J., Lund-Johansen, F., Huang, S., Nguyen, M., Guo, G. R., et al. (1995). The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood*, 85(9), 2422-2435.

Ward, D. S., Fessler, J. F., Bottoms, G. D. & Turek, J. (1987). Equine endotoxemia: cardiovascular, eicosanoid, hematologic, blood chemical, and plasma enzyme alterations. *Am J Vet Res*, 48(7), 1150-6.

Weiser, G., Kohn, C. & Vachon, A. (1983). Erythrocyte volume distribution analysis and hematologic changes in two horses with immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Pathol*, 20, 424.

Weiss, D. J. (1984). Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol*, 13, 27-31.

Weiss, D. J. & Geor, R. J. (1993). Clinical and rheological implications of echinocytosis in the horse: a review. *Comp Haematolnt*, 3, 185-189.

Weiss, D. J. & Wardrop, K. J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology*. (6th ed.). Ames (IA): Blackwell Publishing.

Welles, E.G. (2010). Interpretation of Equine Leukocyte Responses. In: Weiss, D. L. & Wardrop, K. J. *Schalm's Veterinary Hematology*(6th ed., p. 314-320).Ames: Blackwell.

Willard, M. D. & Tvedten, H. (2004). *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (4th ed.). St Louis (MO): Saunders.

Wong, C. W., Smith, S. E., Thong, Y. H., Opdebeek, J. P. & Thornton, J. R. (1992). Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *Am J Vet Res*, 53(8), 1414–7.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 83, 59–67.

Xavier, E. P. & Gaspar, E. M. I. (2007). Eosinophilopoiesis at the cross – roads of research on development, immunity, and drug discovery. *Curr Med Chem*, 14, 1925-1939.

Yoder, M. C. & Williams, D. A. (1995). Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 23(9), 961-967.

Yoshida, M., Tsuji, K., Ebihara, Y., Muraoka, K., Tanaka, R., Miyazaki, H., et al. (1997). Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum - free culture. *Br J Haematol*, 98, 254–264.

Zimmerman, G. A. & Weyrich, A. S. (2008). Signal - dependent protein synthesis by activated platelets. New pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3),17–24.

Zinkl, J. G., Mae, D., Guzman, M. P., Farver, T. B. & Humble, J. A. (1990). Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *Am J Vet Res*, 51(3), 408–413.