

**UNISA
UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

APLASIA DE MEDULA ÓSSEA EM CÃES

Pamela Yuri Nagahachi

São Paulo

2012

Pamela Yuri Nagahachi

Aplasia de Medula Óssea em Cães

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, sob a orientação da Professora Doutora Simone Gonçalves Rodrigues Gomes.

São Paulo

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO
Pamela Yuri Nagahachi

Aplasia de Medula Óssea em Cães

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, sob a orientação da Professora Doutora Simone Gonçalves Rodrigues Gomes.

Aprovada em ___/___/2012

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação profissional e pessoal...

Á minha família, por terem feito possível tornar este sonho realidade, por serem os maiores responsáveis por esta conquista, pelo apoio, estrutura, aconchego, pelas palavras de incentivo, pela dedicação constante, pelo exemplo de pessoas como referências de tantas maneiras e a quem devo grande parte do que sou...

Á meus amigos, segunda família, pelos momentos felizes, pela disposição, carinho, companheirismo, por incentivarem minhas ideias e algumas maluquices, por transmitirem força, certezas e alegria...

Á minha Babaloo, pelos momentos de diversão, alegria e amor incondicional...

Á Deus, por guiar minhas escolhas sempre permitindo a conquista dos meus sonhos na formação universitária e na academia da vida, pelo refugio em tantas horas e por tudo que tem me concedido...

Dedico a vocês, 'gigantes', esta vitória... "Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes" (*Issac Newton*).

Com respeito e gratidão...

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Professora Simone Gonçalves, pela inspiração na profissão, pela gentileza de compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação às aulas ministradas e a empatia que me recebeu como sua orientada.

Aos professores, cada um com suas peculiaridades de sua maneira, pelo desfrute do conhecimento, pelas dúvidas esclarecidas, por ajudar a descobrir o que fazer de melhor e cada vez melhor.

Aos profissionais da área e funcionários que tive contato durante esta jornada, o meu sincero agradecimento pela paciência, disponibilidade, por compartilhar conhecimento, pelo exemplo de dedicação a profissão e não só por terem me ensinado, mas por terem-me feito aprender.

Meus sinceros agradecimentos a vocês profissionais da área por terem participado diretamente da minha formação.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis.

Resumo

A aplasia de medula óssea é caracterizada por uma pancitopenia em sangue periférico e uma hipoplasia das três linhagens celulares (eritróide, mieloide e megacariocítica) em medula óssea, resultando na substituição do tecido hematopoiético pelo tecido adiposo. É classificada como aguda ou crônica. Pode ser desencadeada por agentes infecciosos, induzida por drogas, radiação ou toxinas e, ainda, ser considerada idiopática quando não há a identificação do agente etiológico. O diagnóstico é baseado nas alterações do hemograma associado com a aspiração e biópsia de medula óssea. Além dos tratamentos direcionados às causas primárias, a terapia específica consiste na utilização de medicações imunossupressoras, estimulantes de colônia de granulócitos e eritropoetina, entretanto o prognóstico é reservado a ruim com escassas documentações literárias de recuperação da medula óssea em cães.

PALAVRAS CHAVE: pancitopenia, aplasia medular, hematopoiese, cães.

Abstract

Is characterized by a peripheral blood pancytopenia and by a hypoplasia of the marrow bone three cell lines (erythroid, myeloid and megakaryocytic), resulting in a substitution of the hematopoietic tissue for adipose tissue. It is classified as acute or chronic. It can be triggered by infectious agents, induced by drugs (medicine), radiation or toxins and, even be considered idiopathic when the etiologic agent isn't establish/identified. The diagnosis is based on blood cell count alterations associated with bone marrow biopsy and aspiration. In addition to treatments aimed for primary causes, the specific therapy consists in using immunosuppressant medications, erythropoietin and granulocytes colony stimulating, however this is a reserved to poor prognosis and there is a fell documentations of marrow bone recover in dogs.

KEY WORDS: Pancytopenia, Bone Marrow Aplastic, Hematopoiesis, Dogs.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Arquitetura da Medula óssea.....	15
Figura 2 – Resumo da hematopoiese.....	19
Figura 3- Estimulação da eritropoetina para produção de eritropoiese.....	20
Figura 4- Eritropoiese normal em cães.....	22
Figura 5- Resumo da granulopoiese.....	24
Figura 6- Resumo da trombocitopoiese.....	27
Figura 7- (A) Exemplo de agulha com estilete usada para aspiração de medula óssea. (B) Modo correto de introdução da agulha.....	38
Figura 8- Esfregaço sanguíneo da medula óssea (A) material aspirado depositado na lamina de vidro. (B) Lamina colocada na vertical. (C) Deslizar uma lamina sobre a outra para espalhar o conteúdo. (D) Voltar a lâmina para posição original para secar.....	40
Figura 9- Biopsia de medula óssea no íleo.....	42
Figura 10- Imagem do animal Bryan em consulta veterinária no Hospital Veterinário Anhembi Morumbi.....	47
Figura 11- Hematoma em região medial de membro pélvico direito.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1- Dias de avaliação do animal e valores estudados do Hemograma completo.....	51
Tabela 2- Dias de avaliação do animal e valores de Albumina e Proteína sérica total.....	51

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Sistema hematopoiético	14
2.1. Arquitetura da Medula Óssea.....	14
2.2. Desenvolvimento celular normal	16
2.3. Compartimentos Hematopoiéticos	17
2.4. Compartimento de Células Tronco.....	17
2.5. Compartimento de Células Progenitoras.....	17
2.6. Compartimento de Células Precursoras.....	17
3. Mielopoiese.....	19
3.1. Eritropoetina.....	20
3.2. Eritropoiese	21
3.3. Leucopoiese: Granulopoiese.....	22
3.4. Leucopoiese:Monocitopoiese	25
3.5. Leucopoiese: Linfopoiese.....	25
3.6. Trombocitopoiese.....	26
4. Aplasia de Medula Óssea	29
4.1. Fisiopatologia (Etiologia e mecanismos)	29
4.2. Induzida por agentes infecciosos	30
4.3. Induzida por medicamentos (iatrogênica)	31
4.4. Induzida por radiação.....	33
4.5. Idiopática.....	34
4.6. Manifestações clínicas	35

4.7. Diagnóstico diferencial	35
4.8. Diagnóstico específico	36
4.9. Hemograma completo	37
4.10. Aspirado da Medula Óssea	37
4.11. Biopsia da Medula Óssea	42
4.12. Tratamento	43
4.13. Prognóstico	45
5. Caso Clínico.....	47
6. Considerações Finais	52
7. Referências	53

1 Introdução

A aplasia de medula óssea em cães é relativamente rara, caracterizada por pancitopenia sanguínea e substituição dos locais responsáveis pela hematopoiese na medula óssea por tecido adiposo (WEISS, 2006).

Esta enfermidade pode ser classificada como aguda ou crônica de acordo com o hemograma e a sintomatologia clínica apresentada pelo animal (FARRIS et al. 1993).

Diversas causas podem induzir à doença como doenças infecciosas, iatrogênica, radiação e quando não é bem estabelecida, por exclusão, é classificada como idiopática (WEISS, 2006).

A avaliação da medula óssea é indicada em todos os casos para confirmação do diagnóstico. A punção aspirativa de medula óssea é mais utilizada no diagnóstico do que a biópsia da medula óssea devido a sua maior facilidade de colheita (MORAES E TAKAHIRA, 2010). Entretanto, a biópsia medular é uma forma mais acurada para avaliação de celularidade e metástases medulares (HARVEY, 2001), inclusive para a diferenciação entre aplasia medular e mielofibrose (WEISS, 2003).

Para a determinação do diagnóstico é necessária a exclusão de outras causas de pancitopenia como: mielofibrose, síndrome mielodisplásica, mielofibrose, osteoesclerose e osteopetrose. (COUTO; NELSON, 2010; BICHARD; SHERDING, 2008; WEISS, 2006).

Além de terapias específicas relacionadas às causas primárias, terapias com imunossupressores, estimulante de colônia de granulócitos e eritropoetina podem ser utilizados com o objetivo de recuperar a medula óssea cujo sucesso depende da precocidade com que é introduzida (YUKI et al, 2007)

Geralmente o prognóstico é grave, e pela gravidade do quadro alguns animais são eutanasiados antes mesmo da investigação do fator desencadeante. Apesar da

terapia em cães ser limitada, alguns animais apresentam sobrevida maior e recuperação, enquanto outros evoluem para óbito (BRAZZELL; WEISS, 2006).

O trabalho tem como objetivo primário descrever as causas de aplasia de medula óssea nos cães, meios diagnósticos além de tratamento e prognóstico.

Objetiva-se, também, descrever um caso clínico de aplasia medular em cão secundário à erliquiose.

2 Sistema Hematopoiético

2.1 Arquitetura da Medula Óssea

A medula óssea é um órgão ativo encontrado no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999), mede cerca de dois terços do tamanho do fígado. Em duas fêmeas de cães, segundo Fairman e Whipple (1933 apud Schalm, 2006), o volume produzido pela medula óssea era de 289ml e 319ml ou seja 2,4% e 1,9% do peso corporal das fêmeas respectivamente, sendo nesses animais 61% e 67% do peso do fígado.

Através da constante ação dos osteoblastos e reabsorção do tecido ósseo, há formação da medula óssea primária com característica esponjosa, que por diferenciação do tecido conjuntivo frouxo se diferencia em medula óssea secundária com câmaras responsáveis pela hematopoiese (medula vermelha).

A medula óssea é classificada inicialmente como vermelha e com a maturidade transforma-se em amarela passando sua produção das epífises para a região média dos ossos, e ainda com o avançar da idade ou devido a presença de doenças pode ser chamada também de medula óssea gelatinosa (KONIG; LIEBICH, 2002). A região denominada medula óssea vermelha tem a presença de eritrócitos em diferentes estágios de maturação e a amarela (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) apresenta três tipos de células: reticular, endotelial e adiposas (FELDMAN et al. 2006). A amarela pode transformar-se em medula vermelha produzindo então células sanguíneas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Essa transição de medula amarela para vermelha requer ação do hormônio chamado eritropoetina (FELDMAN et al. 2006).

A medula óssea, como outros órgãos, tem como função a hematopoiese (Figura 2) (FELDMAN et al. 2006); é responsável pelo equilíbrio dinâmico, e de acordo com as necessidades dos animais é continuamente e rapidamente ajustada (BIENZLE, 1960). Cada órgão exerce um tipo de função para formação do sangue que no caso é formar eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas. O suprimento

sanguíneo da medula é por um sistema arterial que se estende do eixo longitudinal dos ossos, sob a forma de sinusóides se ramificando para a periferia da medula, transportando o sangue até a região de veia central, onde a microcirculação sinusoidal é específica para a hematopoiese (FELDMAN et al. 2006)(Figura 1).

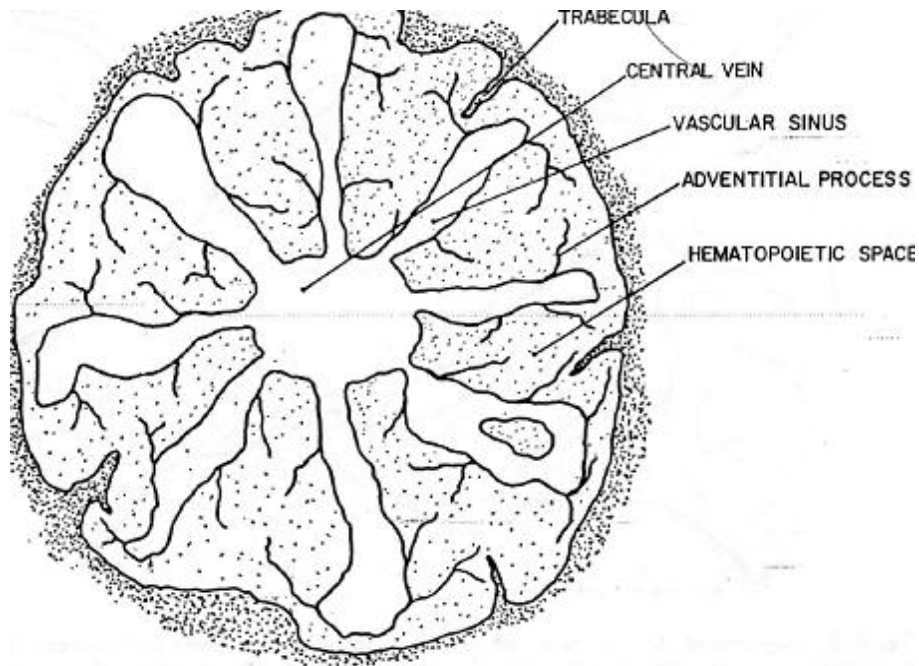


Figura 1 – Arquitetura da Medula óssea. In FELDMAN, Bernard F. et al. Schalm's veterinary hematology. 5ed. Ames: Blackwell Publising.2006.

Em estudo da gestação de um cão da raça Beagle, Anderson e Schalm(1970) avaliaram a hematopoiese pré e pós natal, durante o período de gestação de aproximadamente 60 a 65 dias. A eritropoiese foi vista pela medula óssea, aos 48 dias de gestação em diáfises médias do úmero, neste mesmo período foi caracterizado início de mielopoiese e uma pobre definição dos sinusóides que após 10 dias tornaram- se definidos (FELDMAN et al. 2006).

Após o nascimento, a medula óssea é a principal responsável pela eritropoiese, granulopoiese e megacariocitopoiese, que inicialmente é produzida ativamente por todas as medulas dos ossos e quando os animais atingem a maturidade a produção acontece nos ossos longos e na epífise dos mesmos. Por

toda vida, a parte vermelha da medula óssea é ativa em todos os ossos planos, esterno, costelas, pelve, vértebras e crânio (FELDMAN et al. 2006).

2.2 Desenvolvimento celular normal

Em animais normais, as células sanguíneas estão em constante reposição, apesar de terem vida finita. A medula óssea é a principal produtora, em seus diferentes sítios medulares, e quando a demanda é alta são ativados outros locais de produção denominados extramedulares como baço fígado e linfonodos (REAGAN et al. 2008).

Todas as células vermelhas produzidas têm como progenitora as células tronco que se diferenciam em eritrócito, granulócitos, megacariócitos, monócitos e linfócitos resultando na produção de células vermelhas, brancas e plaquetas (REAGAN et al. 2008).

A medula óssea é responsável pela produção das células sanguíneas por apresentar um microambiente adequado para seu desenvolvimento. Este ambiente é um complexo formado como uma malha e composto por células estromais, células acessórias, fatores de crescimento de glicoproteínas e componentes da matriz extracelular que afetam diretamente na diferenciação e proliferação hematopoiética. Assim, a hematopoiese não ocorre de maneira espontânea, existem uma série de fatores responsáveis pela produção local na medula óssea ou nos tecidos periféricos (HARVEY, 2001).

2.3 Compartimentos Hematopoiéticos

Os compartimentos hematopoiéticos são divididos em três: células tronco; células progenitoras e células precursoras, onde surgem e se diferenciam as células para que entrem na circulação (GASPER, 2000).

2.4 Compartimento das Células Tronco

São células raras com capacidade de autorrenovação, mantendo a hematopoiese, o sangue periférico e células imunes através da proliferação clonal. Morfologicamente são difíceis de serem distinguidas dos linfócitos, tem núcleo grande em relação ao citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico sem presença de grânulos (GASPER, 2000).

2.5 Compartimento de Células Progenitoras

São células que se formam a partir das células tronco hematopoiéticas, com capacidade de diferenciação e proliferação limitadas.

Raramente são células multipotentes, com capacidade de diferenciação e autorrenovação ao longo das linhagens, são geralmente bipotentes ou unipotentes (GASPER, 2000).

2.6 Compartimento de Células Precursoras

São células que incluem a linhagem de células blásticas e progenitoras, são células sem capacidade de se autorrenovar e classificadas como unipotentes. Morfologicamente, possuem núcleo e citoplasma sem diferenciação de acordo com suas funções (eritróides, plaquetas e mielóides) e o compartimento é formado por células precursoras eritróides, linfócitos, células plasmáticas e macrófagos. Este compartimento é composto por porcentagens equivalentes de precursores eritróides e mielóides, com aproximadamente 10% composto de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (GASPER, 2000).

3 Mielopoiese

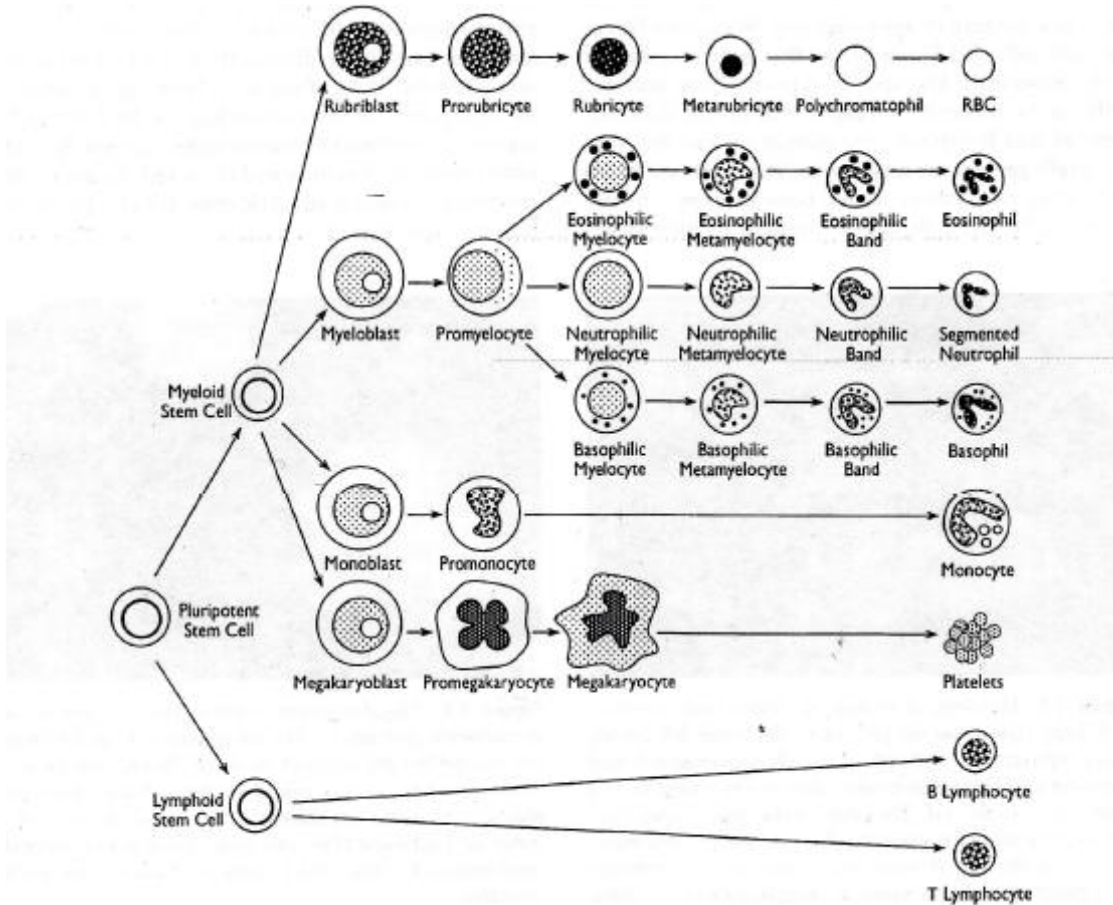


Figura 2 – Resumo da hematopoiese. In Reagan, William J; Irizarry Rovira, Armando R; Dencicola, Dennis B. Hematopoiesis. Veterinary hematology: atlas of common domestic and non- domestic species. 2008. Editora: Wiley Black Kwell; 2 ed. 3-12.

3.1 Eritropoetina

A eritropoetina ou fator estimulante de eritrócitos consiste em uma glicoproteína que contém em sua formação ácido siálico, peso molecular de 60 a 70, e meia vida em média de 7 a 10 horas. É fisiologicamente o primeiro meio de

regulação da eritropoiese que é induzida pela produção de eritropoetina sob presença de baixas tensões de oxigênio como quadros de hipóxia anêmica, e inibida quando há grandes produções do mesmo (FELDMAN et al. 2006).

Os rins participam da regulação da eritropoiese, mas não produzem este hormônio, e sim, sintetizam um fator denominado eritropoiético renal ou eritrogênio que ativará o eritropoietinogênio, uma globulina plasmática inativa produzida pelo fígado, em eritropoetina ativa. Esta conversão ocorre na circulação sanguínea (plasma) (FELDMAN et al. 2006)(Figura 3).

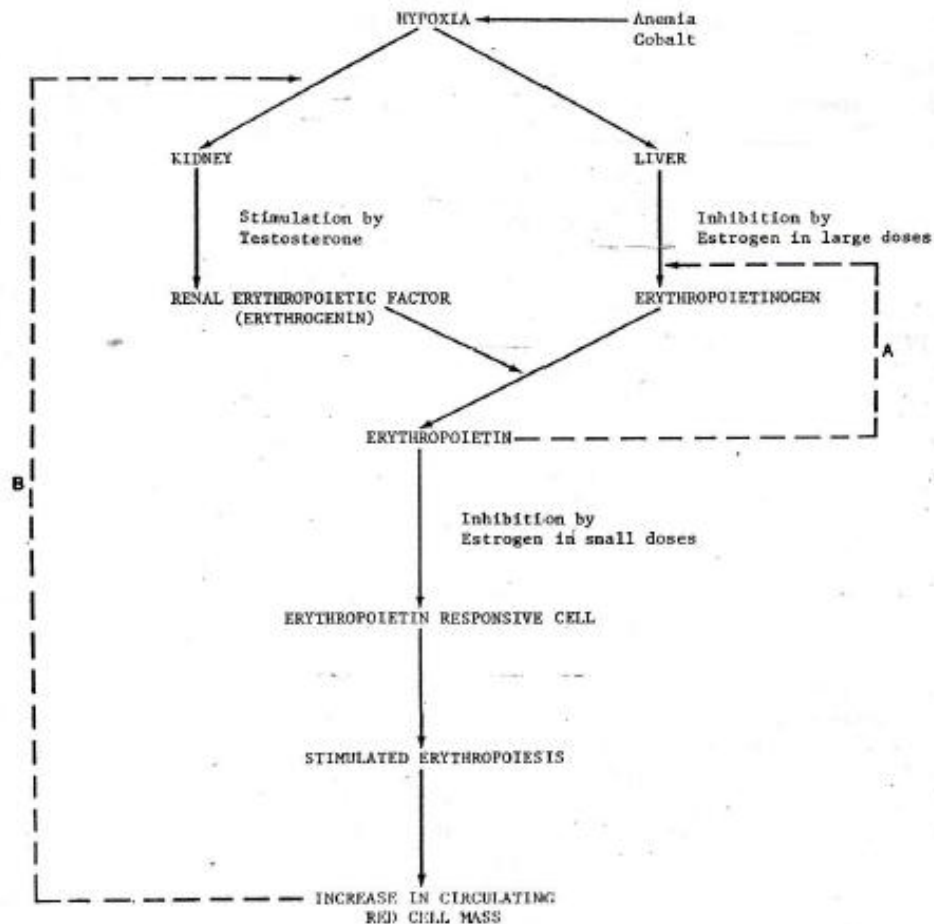


Figura 3- Estimulação da eritropoetina para produção de eritropoiese. In Feldman, Bernard F; Zinkl, Joseph G; Jain, Noemi C. The Erythrocytes: Their Production, function and destruction. Schalm's Veterinary Hematology. 2006. Editora: Blackwell Publishing; 5 ed; 358-404.

3.2 Eritropoiese

Os eritrócitos são produzidos passando por etapas de maturação e divisão mitótica sendo formados seguindo a sequência: rubriblastos, prorrubricito, rubricito basofílico, metarrubricito rubricito policromatofílico e eritrócito maduro (FELDMAN et al. 2006; THRALL et al 2007). O estímulo fundamental para o início da eritropoiese é a hipóxia tecidual mediada pela eritropoetina (HARVEY, 1984).

O primeiro local de ação da eritropoetina na medula óssea é nas células precursoras eritropoieticas (FELDMAN et al. 2006). Na presença da eritropoetina, essas células precursoras se diferenciam em rubriblastos que são os primeiros precursores eritróides reconhecidos morfologicamente. (HARVEY, 1984; FELDMAN et al. 2006 ;GRINDEM et al. 2002;THRALL,1984).

O rubriblasto se divide produzindo dois prorrubricitos (REAGAN et al. 2008) caracterizado por apresentar tamanho igual ou maior que o rubriblasto, núcleo central, geralmente nucléolo não visível e citoplasma intensamente basofílico (GRINDEM et al. 2002) que se divide em 2 rubricitos (REAGAN et al. 2008).

Rubricitos são células menores comparadas com prorrubricitos (REAGAN et al. 2008), com núcleo central redondo, citoplasma basofílico nas células menos maduras e policromatofílico(azul a róseo azulado) na maioria das células maduras (GRINDEM et al. 2002). Eles passam por duas divisões, rubricitos maduros e então se transformam em metarubricitos. Essas divisões e maturações diversas ocorrem no período de 3 a 4 semanas e resultam na produção de 8 a 16 células filhas denominadas metarubricitos sem capacidade de divisão (HARVEY, 1984), de tamanho pequeno, homogênea, e com citoplasma policromatofílico (GRINDEM et al. 2002). Essa célula com capacidade apenas de maturação tem seu núcleo picnotico altamente condensado expulso, se tornando policromatofilo, (REAGAN et al. 2008) chamadas também de reticulócitos. São morfologicamente redondas, anucleadas e citoplasma azulado, (GRINDEM et al. 2002) estes permanecem um dia ou mais na medula óssea antes de serem liberados para o sangue (HARVEY, 1984) onde sofrem maturação e tornam se avermelhadas até converterem se em eritrócitos

3.3 Leucopoiese: Granulopoiese

Os granulocitos são produzidos pela medula óssea e são compostos por três tipos de células: neutrófilos, eosinófilos e basófilos sendo a primeira presente em maior número (REAGAN et al. 2008).

Os neutrófilos sofrem aproximadamente quatro ou cinco divisões ao longo de vários dias (HARVEY, 2001) são formados a partir de mieloblastos, que são as primeiras células precursoras e reconhecíveis dos granulocitos, (REAGAN et al. 2008) estes apresentam-se como células grandes com núcleo oval, nucleolo pálido e proeminente e citoplasma moderadamente basofílico (GRINDEM et al. 2002). São classificados como tipo I e II porém são morfológicamente semelhantes, a única diferença é que o tipo II apresenta alguns pequenos granulos primários dispersos pelo citoplasma e núcleo central ou excêntrico (THRALL et al. 2007). São divididos formando dois promielocitos (REAGAN et al. 2008), células grandes ou semelhantes aos mieloblastos, com núcleo grande e redondo, citoplasma azul claro e sem granulos específicos mas primários de coloração vermelho-púrpura (GRINDEM et al. 2002).

Os mielocitos são produzidos através da divisão dos promielocitos (REAGAN et al. 2008), sendo grandes, com núcleo oval, sem nucléolo, com citoplasma e granulos específicos à maioria das células maduras (GRINDEM et al. 2002). Nesta etapa os granulos primários deixam de ser produzidos e os secundários começam a ser formados apresentando tamanho maior com coloração rosa claro. Por sua vez os mielocitos sofrem divisões formando dois metamielocitos e a partir daí não existem mais divisões (REAGAN et al 2008).

Os metamielocitos são células maiores em relação aos bastonetes, com núcleo em “forma de feijão”, sem nucléolo, e citoplasma com granulos específicos similares aos estágios de células maduras (GRINDEM et al.2002), estes se desenvolvem em neutrófilos bastonetes (REAGAN et al. 2008), um pouco maiores que as células maduras com núcleo curvado com os lados paralelos, citoplasma e granulos específicos e similares as células maduras (GRINDEM et al. 2002). Quando passam por maturação transformam-se nos denominados neutrofilos segmentados,

células pequenas com citoplasma azul a rosa e núcleo segmentado (REAGAN et al. 2008) e com grânulos específicos e sem manchas (GRINDEM et al.2002).

Após a maturação e a formação dos neutrófilos segmentados, as células são armazenadas e levam vários dias para migrarem até o endotélio vascular e adentrarem na circulação (HARVEY, 2001)(Figura 5).

Diferente dos neutrófilos, a maturação dos eosinófilos e basófilos é encontrada em baixa quantidade na medula óssea. O desenvolvimento dessas células é muito parecido com os neutrófilos e só difere por serem distinguidas pela coloração dos grânulos secundários, assim, os eosinófilos apresentam grânulos vermelho alaranjado enquanto os basófilos tem seus grânulos de cor roxa. Muitas vezes os eosinófilos são maiores quando comparados aos neutrófilos maduros e o núcleo não é firmemente segmentado (REAGAN et al. 2008) durante o tempo de trânsito na medula uma semana ou menos (HARVEY, 2001). Já os basófilos tem formato redondo e também são maiores que os neutrófilos maduros, com núcleo segmentado, cromatina condensada e o citoplasma pode conter grânulos (REAGAN et al. 2008).

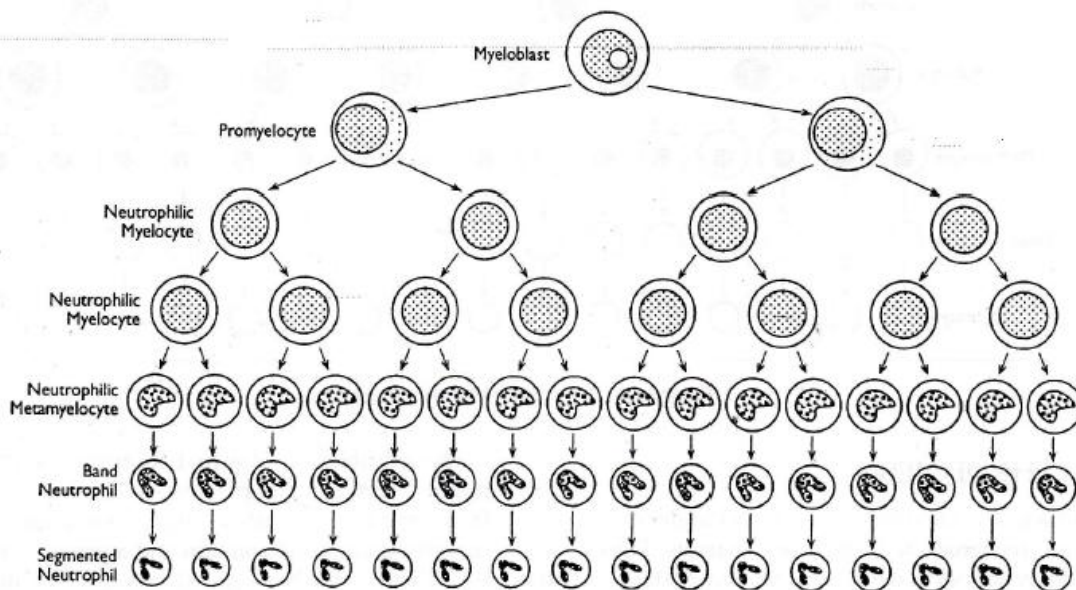


Figura 5- Resumo da granulopoiese. In Reagan, William J; Irizarry Rovira, Armando R; Denicola, Dennis B. Hematopoiesis. Veterinary hematology: atlas of common domestic and non- domestic species. 2008. Editora: Wiley Black Kwell; 2 ed. 3-12.

3.4 Leucopoiese: Monocitopoiese

Os monocitos em relação aos demais granulócitos precisam de menor tempo para serem produzidos, e apresentam uma pequena reserva na medula óssea, transformando-se em macrófagos, quando entram nos tecidos (HARVEY, 2001). Seus precursores são as células tronco, e os monoblastos são as primeiras células identificáveis, dando origem aos promonocitos, caracterizado como uma célula grande oval, às vezes de núcleo reticular, com citoplasma moderadamente azul, que quando transformado em monócitos apresenta núcleo e cromatina com áreas de condensação, citoplasma azul acizentado e discretos vacúolos (GRINDEM et al, 2002).

3.5 Leucopoiese: Linfopoiese

Os linfócitos apresentam núcleo arredondado, com núcleo visível e citoplasma escasso e azul claro, sendo de tamanho ligeiramente menor ao dos neutrófilos. Os plasmócitos têm tamanho semelhante aos neutrófilos com núcleo arredondado, nucleolos inaparentes e cromatina grossa com estruturas claras correspondentes a imunoglobulinas. Os linfoblastos são vistos apenas em casos de distúrbios e não em animais normais (THRALL et al. 2007).

Existem dois tipos de linfócitos, os denominados B e T que apresentam morfologia parecida havendo dificuldade de diferenciá-los quando sozinhos, mas com funções diferentes (REAGAN et al. 2008).

Os linfócitos são originados das células tronco produzidas pela medula óssea, porém algumas diferenciações que ocorrem na mesma não podem ser vistas microscopicamente (REAGAN et al. 2008). As células tronco produzem progenitoras denominados linfócitos B e T/NK (HARVEY, 2001).

Os progenitores dos linfócitos B produzidos na medula migram do córtex dos linfonodos para os folículos das placas de Peyer no jejuno e para os folículos do baço, enquanto os progenitores dos linfócitos T vão da medula ao timo, onde sofrem desenvolvimento e maturação. As células NK tem seus progenitores produzidos no timo, porém sofrem maturação na medula óssea, enquanto os linfócitos T já maturados permanecem na região paracortical dos linfonodos, periarteriares do baço e placa de Peyer (HARVEY, 2008).

O número de linfócitos encontrados na medula é dependente da espécie, havendo baixos números de linfócitos pequenos e raros grandes ou médios. Os pequenos são redondos com núcleo levemente arredondado, citoplasma azul claro e com cromatina clara e no restante, áreas borradas ou agregadas. As células médias e grandes também apresentam núcleo redondo e cromatina granular com áreas condensadas (REAGAN et al. 2008).

3.6 Trombocitopoiese

As plaquetas são produzidas na medula óssea através do citoplasma dos megacariócitos. Diferente das outras linhagens celulares ocorrem replicações no núcleo e divisões celulares (endomitoses) (HARVEY, 2001).

Os megacarioblastos são precursores iniciais que morfologicamente aparecem como células grandes com núcleo único e redondo e nucléolo proeminente. Diferenciam-se em promegacariócitos, com núcleo multilobado e citoplasma agranular azul escuro.

Os promegacariócitos tornam-se megacariócitos facilmente diferenciado na medula pelo seu tamanho grande, núcleo multilobado e citoplasma granular. É a partir deste citoplasma que são formadas as plaquetas, conhecidas como proplaquetas as quais se fragmentam em plaquetas que são de forma discoidal, tamanho pequeno, anucleadas e com citoplasma rosa claro que as vezes se torna roxo com grânulos (REAGAN et al. 2008)(Figura 6).

A cada três a cinco dias aproximadamente há necessidade de formação de plaquetas a partir dos megacariócitos, e a sua produção é controlada de acordo com o número e massa de plaquetas circulantes. Nos cães elas apresentam meia vida de 10 a 12 dias e função de hemostasia e aceleração da coagulação (HARVEY, 1984).

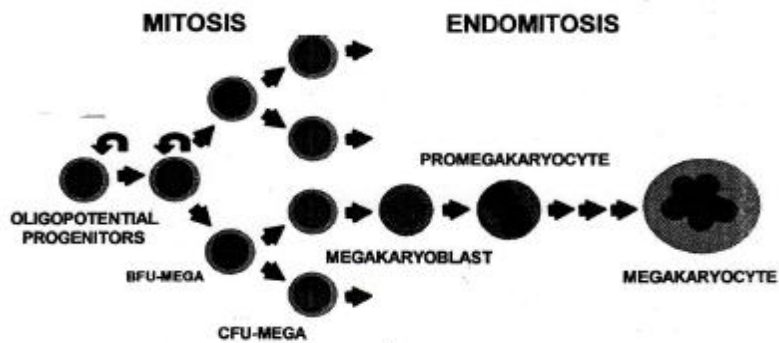


Figura 6- Resumo da trombocitopoiese. In Harvey, John W. Hematopoiesis. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. 2001. Editora: Saunders; 1 ed. 87-91.

4 Aplasia de Medula Óssea

A medula óssea possui um equilíbrio dinâmico e de acordo com a necessidade dos animais é continuamente e rapidamente ajustada às variações de demanda (BIENZLE, 2000). A falha na produção de todas as linhagens de células sanguíneas e medula óssea hipocelular substituída por tecido adiposo (WEISS et al.1990), podendo este ocupar mais de 95% do espaço hematopoiético (WEISS, 206),é chamada aplasia de medula,(WEISS et al. 1990), ou seja, quando há diminuição marcada ou ausência dos precursores hematopoiéticos (HARVEY, 2001).

A aplasia medular implica na desregulação das células tronco por exaustão ou defeito na diferenciação sendo incapazes de produzir linhagens sanguíneas, ou também pela presença de defeito no estroma das células de forma crônica desencadeando a falência da medula óssea (HASCHEK et al.1998). São atingidas as três linhagens celulares causando pancitopenia periférica, (COUTO, NELSON, 2010) são elas a eritróide, mieloide e megacariocítica (MORAES, TAKAHIRA, 2010). Esta pancitopenia acontece, pois a medula óssea tem capacidade de elevar sua produção em 5 a 10 vezes quando sua demanda aumenta, mas quando as células tronco ou pluripotentes tem diminuição de 10% do seu normal a capacidade de compensação diminui resultando na queda das linhagens (PEREZ et al. 2005).

Em um estudo feito por Brazzel e Wess sobre pancitopenia aplásica em 9 casos de cães, a média de idade dos animais com pancitopenia foi de 3 anos e 2 meses, com raça e sexo aparentemente indefinidos. A doença pode ser dividida em níveis de moderada a grave, e duas formas de evolução: aguda ou crônica (BRANCO et al.,2009).

A forma aguda da doença geralmente esta relacionada com a destruição das células progenitoras e sua proliferação dentro da medula óssea que apresenta áreas multifocais, células sanguíneas degeneradas e macrófagos. As manifestações clínicas são observadas duas semanas após a alteração medular como a trombocitopenia em 5 a 6 dias pós injúria e a leucopenia em 8 a 10 dias. A anemia geralmente é leve ou ausente devido ao longo período da vida média das hemácias (120 dias). Já quando crônica, a doença é resultante de uma injúria causada nas

células tronco com sinais de neutropenia, trombocitopenia e anemia moderada a severa não regenerativa (WEISS, 2006).

A recuperação do animal, em casos agudos geralmente é completa em 21 dias, e nos casos crônicos a repopulação da medula óssea é incerta, e pode demorar de semanas a meses quando acontece (WEISS, 2006).

4.1 Fisiopatologia (Etiologia e mecanismos)

A aplasia medular pode ser congênita, devido a um fator genético ou adquirida.

As causas adquiridas mais comuns em cães são infecciosas, medicamentosas, associadas a toxinas e radiação. Ou ainda, em alguns casos quando o diagnóstico é inconclusivo é denominada idiopática por exclusão de todas outras causas de pancitopenia (MORAES, TAKAHIRA, 2010; BRAZZELL, WEISS 2006; COUTO, NELSON, 2001).

Em um estudo retrospectivo de 51 cães com pancitopenia, 22 foram provocados por uso de drogas quimioterápicas, sete por neoplasias hematopoiéticas, cinco por agentes infecciosos e os demais por causas diversas (WEISS et al., 1999).

Os mecanismos podem ser os seguintes: destruição das células progenitoras ou células tronco que frequentemente são causadas por doenças infecciosas, drogas ou toxinas, mutações genéticas levando a diminuição da capacidade proliferativas das células tronco e desregulação da citocina hematopoiética ou alteração do estroma das células (WEISS, 2006).

Acredita-se que haja uma reação imunomediada ainda não completamente definida como etiologia da aplasia medular tanto em humanos como em cães. Estudos humanos relacionam o envolvimento de linfócitos T e alguns autores ainda

relatam especificamente à ação do interferon γ , fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina 2 (YUKI 2007; BARRAK, 2010).

A região em que vive o animal também influencia nas causas de aplasia de medula, que geralmente na veterinária estão associadas às hemoparasitoses como erliquiose, porém nem sempre é possível confirmar a etiologia (MORAES, TAKAHIRA, 2010) pela limitação no meio diagnóstico quando comparado com seres humanos (BRAZZELL, WEISS, 2006).

4.2 Induzida por agentes infecciosos

As causas infecciosas nos cães incluem parvovirose, erliquiose, septicemia e endotoxinas (WEISS, 2006).

A parvovirose é causada por um DNA vírus, o parvovírus canino tipo 2 que infecta cães de qualquer idade sendo mais comum em animais jovens. Causa lesão em epitélio comprometendo a barreira intestinal predispondo a endotoxemia e reações inflamatórias (BIRCHARD, SHERDING, 2008).

Boosinger et al (1982) em estudo com dois cães de 10 semanas de idade apresentando grave diarreia aquosa, estado de coma e desidratação analisou a citologia da medula óssea, afim de relacionar a parvovirose com alterações medulares. O material para citologia foi colhido imediatamente antes da eutanásia dos cães e foram notadas alterações nas linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica. A quantidade de neutrófilos maduros estava reduzida, com toxicidade e degeneração dos precursores mieloides, presença de macrófagos e fagocitose de neutrófilos. Este estudo concluiu que as alterações da medula óssea podem ser reflexo do efeito tóxico do vírus em células precursoras da medula óssea, entretanto podem estar relacionadas também com as toxinas liberadas por uma septicemia grave ou endotoxemia, por causarem lesões intestinais.

Acredita-se que uma das causas mais comuns de aplasia medular em cães em nosso meio seja erliquiose, causada pelo agente etiológico *Ehrlichia canis*,

transmitida por carrapatos causadora de importante trombocitopenia em todas as fases da doença (BIRCHARD, SHERDING, 2008). Na forma crônica, a doença é caracterizada por anemia, leucopenia, além da trombocitopenia, (ETTINGER, FELDMAN, 2010) e é nessa fase ou no estágio final da doença que a celularidade da medula óssea diminui drasticamente substituindo os tecidos hematopoiéticos por tecido gorduroso (BIRCHARD, SHERDING, 2008).

Brazzell e Weiss (2006) realizaram um estudo retrospectivo de 9 casos de aplasia medular em cães (1996-2003) em que sete não tiveram a causa definida e os dois restantes atribuiu-se à *Ehrlichia canis*.

Lewis (2000) acredita que a trombocitopenia causada pela erliquiose acontece por uma destruição imune mediada das plaquetas, mas os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

4.3 Induzida por medicamentos (iatrogênica)

Em estudo sobre associação de drogas e anemia aplásica em 8 cães, Weiss et al. (1990) afirma uma relativa facilidade de relacionar as drogas com a potencialização de falência medular, já que geralmente são dose dependentes. Altas doses são altamente tóxicas para a medula óssea sendo aconselhável o uso das doses terapêuticas para segurança.

Ainda segundo o autor, as drogas geralmente relacionadas com a falência da medula óssea são estrógeno, fenilbutazona, e quimioterápicos usados para tratamento de pacientes oncológicos (WEISS et al. 1990). Foram estudados 8 cães com alterações hematológicas por falência da medula óssea associada com histórico de uso de medicamentos, três dos cães estavam em uso de estrógeno, 2 deles faziam uso do medicamento para tratamento renal e o outro como prevenção de gestação. Todos eles apresentaram aplasia de medula com redução das linhagens megacariocíticas, eritrocitárias e mieloides, dois foram eutanasiados e um 4 semanas após tratamento apresentou melhora. Não se sabe mecanismo de ação

do estrógeno pós aplicação, mas sabe se que este causa efeito tóxico na medula óssea, com alterações hematológicas geralmente caracterizadas por trombocitopenia, supressão eritropoiética e anemia progressiva. Há diferença de acordo com a susceptibilidade particular de cada cão, mas geralmente após 30 a 40 dias da aplicação a medula reestabelece sua produção (WEISS et al. 1990).

Ettinger et al (2010 apud Chiu 1974), afirmou que o estrógeno causa efeito depressivo na medula óssea dos cães, sendo a alteração inicial com 12 a 14 dias pós administração por aparecimento de trombocitopenia, e em 17 a 22 dias uma queda abrupta dos leucócitos. O sangue periférico é afetado à medida que acontecem as alterações medulares, iniciando com uma hiperplasia mieloide e seguida de uma hipoplasia mieloide. Assim como Weiss (1990) o autor também acredita nos fatores individuais dos cães em relação à droga, a recuperação das células produzidas pela medula óssea acontece quando aplicada em doses subletais ficando mais difícil em casos de anemia aplásica crônica ou fulminante. As doses de estrógeno raramente excedem 0,75mg e nunca excedem 1 mg ou dose total de 20 mg para qualquer finalidade. Recomenda que doses altas não sejam repetidas durante 2 meses.

Crafts (2011) em estudo dos efeitos do estrógeno sobre a medula óssea de fêmeas caninas adultas concluiu que altas doses de estrógeno são tóxicas a medula óssea, mas esse efeito acontece por causa da toxicidade do medicamento em cada animal dependendo de sua condição física e não pelo efeito fisiológico estrogênico. Em estudo com duas fêmeas de peso e tamanho semelhantes foi aplicado em uma 5 mg de alfa estradiol diariamente e na outra 5 mg de estradio beta, conhecido por ter 1/40 da potencia do primeiro. Ambos animais responderam com aumento das células brancas seguidos de um “congestionamento” da medula óssea por estas células que são substituídas por edema, também acontece uma destruição das células da linhagem eritróide.

Outro estudo relacionando o estrógeno com a injuria medular, conclui que o medicamento produz e/ou secreta um fator que inibe a mielopoiese no interior da circulação dos cães, mas concorda que essa produção seja mediada de acordo com a sensibilidade de cada animal para a manifestação de toxicidade da medula óssea (FARRIS et al. 1993).

A fenilbutazona é um antiinflamatório não esteroide associado à aplasia de medula e granulocitopenia após longo período de tempo de tratamento. Segundo Weiss (2006), diferente do estrógeno, não é dose dependente e provavelmente causa injúria das células tronco. Dois cães foram tratados com o medicamento por problemas de discopatia e displasia, ao primeiro foi administrado 11 mg via oral durante 1 ano e 5 meses a cada 12 horas, enquanto o segundo ingeria quantidade desconhecida, também via oral a cada 12 horas durante 1 mês. Ambos os cães apresentaram pancitopenia e hemorragias com petéquias evoluindo ao óbito após 10 dias do diagnóstico que revelava aplasia de medula com substituição por tecido adiposo. Concluiu-se que a margem de segurança da droga apesar de ser alta, em doses elevadas torna-se mielotóxica causando anemia inicialmente leve quando usada por período prolongado exigindo monitoração por hemograma (WEISS et al. 1990).

Os quimioterápicos, são drogas tóxicas para as células da medula óssea e suas progenitoras, são consideradas altamente mielosupressivas causando aplasia de medula caracterizada por leucopenia e trombocitopenia. Sua descontinuidade reconstitui a produção hematológica e as drogas mais comuns de causadoras da injúria são: doxorubicina, ciclofosfamida e vinblastina (BRAZZELL, WEISS, 2006).

Outras drogas como sulfas devido a uma vasculite imuno mediada com redução do folato sérico, principalmente para animais das raças Doberman e Pinscher, cefalosporinas, albenzazol, captopril, quinidina, griseofulvina e tranquilizantes também são associadas a aplasia medular, em geral segundo Weiss (2006), os animais retornam a produção das células após a descontinuidade dos medicamentos.

4.4 Induzida por radiação

Normalmente a radiação é utilizada na terapia contra o câncer, anomalias genéticas e antes do transplante de medula óssea (BIRCHARD, SHERDING, 2008).

Ela produz uma supressão da medula óssea variando com o tempo e condições de exposição tanto transitória quanto prolongada, (HASCHEK et al. 1998) podendo dependendo da dose de exposição induzir a aplasia de medula em diferentes espécies, (WEISS, 2006) e a pancitopenia irreversível (BIRCHARD, SHERDING, 2008).

4.5 Idiopática

A aplasia de medula idiopática tem poucos relatos. Existem algumas teorias para supressão da medula óssea como destruição das células tronco comprometendo a hematopoiese, mudanças do estroma por microambiente, desregulação mediada por citocinas e processos imunomediados. Apesar da aplasia medular ser uma doença não diagnosticada com frequência, acredita se que a aplasia idiopática seja 67% dos casos nos cães (WEISS, 2006).

É definida como uma pancitopenia sanguínea com cerca de mais de 95% do espaço hematopoiético substituído por tecido adiposo, afetando cães com idade média de 2,9 anos. A anemia nestes casos é moderada a severa, com a média de menos de 1,000 neutrófilos/uL e menos que 10,000 plaquetas/uL (WEISS, 2006).

Weiss (2003) sugere que o diagnóstico da aplasia pancitopenica idiopática seja realizado seguindo os critérios: pancitopenia persistente por mais de 2 semanas e depois de tratamentos para sepse ou endotoxemia caso estejam presentes, animais não expostos a drogas que possam causar aplasia de medula nas últimas 4 semanas antes do diagnóstico, animais sem doença renal crônica, animais que não tenham evidência de massas testiculares ou testículos retidos ou ainda apresentando estros permanentes, animais com títulos negativos para *Ehrlichia sp*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Leishmania spp* e biopsia mostrando regiões da medula óssea substituída por tecido adiposo.

Assim para diagnosticar a doença como idiopática, é necessário investigar administrações prévias de medicamentos, exposições a radiação, agentes infecciosos e a concentração de estrógeno endógeno (BRAZZELL, WEISS, 2006).

4.6 Manifestações clínicas

A anamnese é importante para determinação da evolução do quadro e possível etiologia. Os sinais e sintomas clínicos dos cães com citopenias estão mais relacionados com as causas de base do que com as alterações hematológicas em si, exceto pela presença de palidez e sangramentos secundários a trombocitopenia. (COUTO, NELSON, 2010).

Os animais com aplasia medular aguda apresentam manifestações clínicas referentes à neutropenia como febre e infecção, e à trombocitopenia como petéquias, epistaxe e hematúria, além de uma anemia suave, porém progressiva. Já os animais com a doença crônica apresentam uma anemia não regenerativa severa e graus de neutropenia e trombocitopenia que permitem a instalação de infecções, hemorragias e desenvolvimento de uma anemia que pode durar de semanas a meses (WEISS, 2006).

Os sinais e sintomas clínicos também podem ser de grande importância para relacionar as citopenias com suas doenças causadoras, como por exemplo, sinais de feminilização em cães machos podendo sugerir a presença de tumor de células de Sertoli ou esplenomegalia difusa em resposta a um distúrbio primário na medula óssea (COUTO, NELSON 2010).

4.7 Diagnóstico Diferencial

Em alguns casos a aplasia de medula é classificada como idiopática, mas para isso existe a necessidade da exclusão de outras causas de pancitopenias (MORAES, TAKAHIRA, 2010).

A mielofitose é uma das doenças que devem ser excluídas, consiste na infiltração da medula óssea por células neoplásicas ou inflamatórias podendo desencadear citopenias podendo apresentar febre e sangramento por neutropenias e trombocitopenias. A mielofitose pode também apresentar sinais semelhantes a erliquiose crônica, toxicidade por estrógeno e mielodisplasias sendo necessário para diferenciação a análise citologia ou histopatológica da medula óssea (COUTO, NELSON, 2010).

Já as síndromes mielodisplásicas, outro diferencial, consistem em uma anormalidade das células tronco hematopoiéticas caracterizadas por citopenias periféricas, o que diferencia da aplasia medular é apresenta hiperplasticidade da medula óssea com aumento dos mieloblastos (BIRCHARD, SHERDING, 2008).

Por último a osteosclerose e osteopetrose são caracterizados pela presença de fibroblastos ou osteoblastos no interior da medula óssea por causa de infecções retrovirais, estímulos crônicos ou causas desconhecidas e por ter tecido fibroso depositado na medula óssea deslocando os precursores hematopoiéticos. Podem ser vistos, apesar de raras em cães com distúrbios hemolíticos crônicos, o diagnóstico é feito com base em citopenias combinadas com densidade radiográfica aumentada ou por biopsia da medula óssea (COUTO, NELSON, 2010).

4.8 Diagnóstico específico

Para diagnóstico do paciente com suspeita de aplasia de medula, deve ser feita uma anamnese completa com histórico do animal incluindo questões sobre uso de medicações que possam induzir a doença, quimioterápicos (WEISS, 2006) e testes sorológicos que diagnostiquem agentes infecciosos (COUTO, NELSON, 2010). Além deste, o hemograma completo, esfregaços sanguíneos, aspirado e

biopsia da medula óssea também fazem parte dos exames complementares. (WEISS, 2006)

4.9 Hemograma completo

O hemograma completo faz parte da rotina de avaliação dos pequenos animais, e é responsável por detectar anormalidades em diversos tecidos (BIENZLE, 2000). No caso da aplasia medular há formação de citopenias sanguíneas periféricas por diminuição ou ausência de precursores hematopoiéticos caracterizado geralmente por uma anemia que pode ser leve a moderada em casos agudos ou severa e arregenerativa em casos crônicos, (WEISS, 2006) levando a uma pancitopenia com neutropenia e trombocitopenia que acompanham a anemia (THRALL et al. 2007).

O sangue periférico é caracterizado por uma anemia (HARVEY, 2001) normocítica normocrômica (COUTO, NELSON, 2001) e não regenerativa, neutropenia, com neutrófilos abaixo de 1,000 células/uL e trombocitopenia com plaquetas abaixo de 10.000 células/uL (WEISS, 2006).

4.10 Aspirado da medula óssea

A análise da medula óssea é indicada quando existem alterações em sangue periférico não explicadas no hemograma (GRINDEM et al. 2002) sem possibilidade de diagnosticar a doença através do mesmo, como anemia não regenerativa, neutropenias e trombocitopenias que são encontrados nos casos de aplasia de medula, assim como outros casos como gamopatia e suspeita de doença neoplásica na medula (THRALL et al. 2007).

Os métodos de avaliação da medula óssea são aspiração, biopsia e biopsia incisional. A última é mais rara de ser realizada, porém traz resultados mais fidedignos sendo a aspiração da medula óssea a técnica mais utilizada (HARVEY, 1984).

Segundo Thrall (2007), “os locais mais utilizados para aspiração de medula óssea em cães são extremidade proximal do fêmur (Figura 7), na fossa entérica, crista ilíaca e úmero proximal”. Já Bienzle (1960), afirma que deve ser lembrado que animais idosos apresentam na medula dos ossos maior quantidade de tecido gorduroso, sendo mais proveitoso a retirada de material de ossos planos. E por sua vez, Harvey (1984) descreve que a aspiração deve ser feita no ílio, ou na crista ilíaca ou na depressão central do ílio caudal a crista e nos cães grandes pode ser feita na sétima, oitava ou nona costela ou terceira, quarta e quinta esternébra. Para o procedimento o animal deve estar sedado ou anestesiado, com anestesia infiltrativa no periósteo e subcutâneo.

A agulha utilizada depende do local e profundidade do sitio a ser biopsiado. Geralmente é usada uma agulha de tamanho 6 à 18G, do tipo Rosenthal (HARVEY, 1984). Deve ser usada agulha específica com estilete para que não haja obstrução por nenhum fragmento ósseo, como por exemplo, a cortical medular.

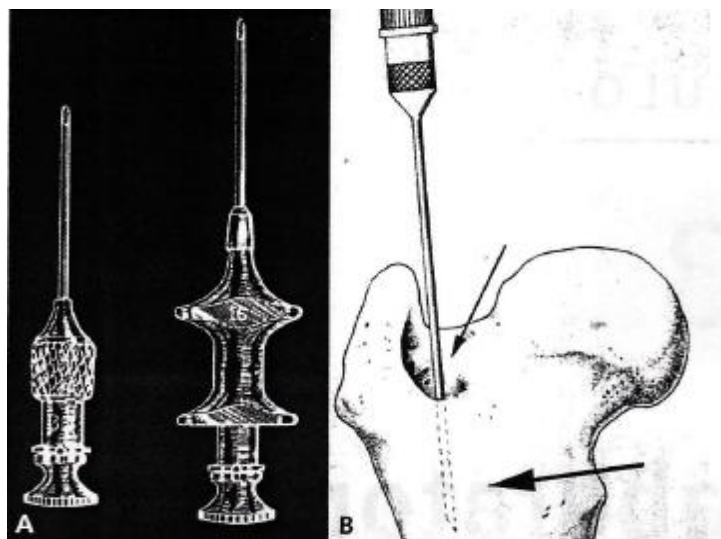


Figura 7- (A) Exemplo de agulha com estilete usada para aspiração de medula óssea. (B) Modo correto de introdução da agulha. In Thrall, Marry A; Baker, Dall C; Campbell, Terry W; Denicola, Dennis; Fetman, Martin J; Lassen, E Delane; Rebar, A;

Weiser, G. Avaliação laboratorial da medula óssea. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. 2007. Editora: Roca; 1 ed.141-169.

A agulha deve ser introduzida através da pele do animal girando de maneira que fique presa de forma firme no osso, avançando poucos milímetros com movimento e pressão constantes (BIENZLE, 1960; HARVEY, 1984; THRALL et al. 2007). O estilete deve ser removido e em seu lugar acoplada uma seringa de 10 ml para exercer pressão contrária. A finalidade é aspirar amostras da medula óssea do animal, que aparece como uma gota espessa no centro da seringa de coleta até atingir 0,5ml de conteúdo que após coletado deve ser depositado em um frasco ou tubo com Na EDTA ou lâminas preparadas, já que a amostra não pode coagular (BIENZLE, 1960; THRALL et al. 2007). Thrall (2007) cita a alternativa do uso de 2 a 3 gotas de solução de EDTA 10% na seringa de coleta também com finalidade de impedir a coagulação do material.

Se forem utilizadas lâminas para o exame devem ser utilizadas 6 a 8 lâminas sobre papéis absorventes (BIENZLE, 1960).

A preparação das lâminas deve ser feita de maneira cuidadosa, devem ser colocadas a 45° para retirada do excesso de medula, permanecendo só as partículas aderentes. Logo depois com delicadeza uma lâmina limpa deve ser colocada sobre a outra com a amostra sem exercer pressão para a amostra ficar espalhada sobre as lâminas e em seguida as lâminas devem ser separadas e secas ao ar livre e aplicar corante tipo Romanowsky. A preparação leva no máximo 1 minuto (BIENZLE, 1960; THRALL et al. 2007) (Figura 8).

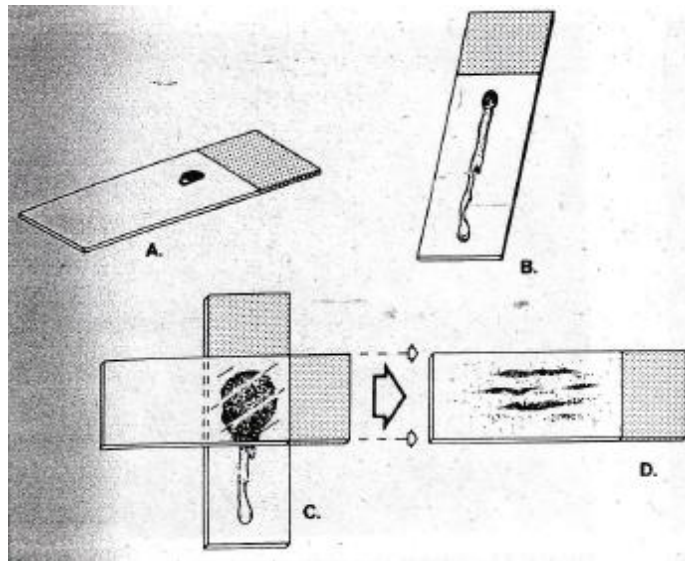


Figura 8- Esfregaço sanguíneo da medula óssea (A) material aspirado depositado na lamina de vidro. (B) Lamina colocada na vertical. (C) Deslizar uma lamina sobre a outra para espalhar o conteúdo. (D) Voltar a lâmina para posição original para secar. In Harvey, John W. Canine boné marrow: normal hematopoiesis, biopsy techniques, and cell identification and evaluation. Compend Cont Educ.1984; 6:909-926.

As características ideais de um aspirado é a presença de grânulos de medula pequenos e visíveis após a retirada de excesso de sangue da lamina que foi depositado, e podem ser também notados algumas gotículas de gordura no aspirado (BIENZLE, 1960).

O exame permite a identificação individual de cada célula presente na medula, (WEISS, 2006) e deve ser analisado junto ao hemograma completo de acordo com a queda nas linhagens vistas no hemograma em comparação com o exame da medula óssea.

Na aplasia de medula, a mesma aparece com acelularidade ou hipocelularidade de todas as linhagens celulares. (HARVEY, 1984).

4.11 Biopsia da medula óssea

As incisões cirúrgicas ou biopsias são feitas somente quando a aspiração de medula não tem sucesso ou quando o aspirado de medula mostra hipocelularidade. (HARVEY, 1984). Essa técnica traz resultados de maior confiança em relação à hipoplasia celular para que sejam analisadas áreas que deveriam ser de medula óssea ativa (SCOTT; STOCKHAM, 2011).

Algumas complicações são relacionadas com esse tipo de procedimento, como riscos causados pela anestesia e sedação dos animais, assim como possíveis hemorragias pós-procedimentos em animais que apresentam trombocitopenia, principalmente quando as plaquetas encontram-se em níveis baixos. Infecções iatrogênicas, também podem ser complicações por possíveis contaminações bacterianas (HARVEY, 1984).

A preparação inicia com a tricotomia e assepsia do local da biopsia, seguida da infusão de 2 a 3 ml de anestésico local de forma infiltrativa abaixo da pele e adjacente ao perióstio no local da biopsia.

A incisão é feita com lâmina de bisturi para facilitar a passagem da agulha estéril através da pele (HARVEY, 1984).

A agulha utilizada para este tipo de exame geralmente é a infantil 13 gauge, mas para animais de maior porte pode ser utilizada uma agulha pediátrica maior.

A biopsia é feita na asa do íleo, (Figura 9) na região dorsal da crista ilíaca com uma pressão moderada em que são realizadas vagarosas rotações com a agulha. O estilete é retirado quando a agulha estiver presa à medula óssea, aproximando de 1 a 2 cm de maneira firme e realizando movimentos no sentido horário e anti-horário e depois a agulha é removida do corpo do animal.

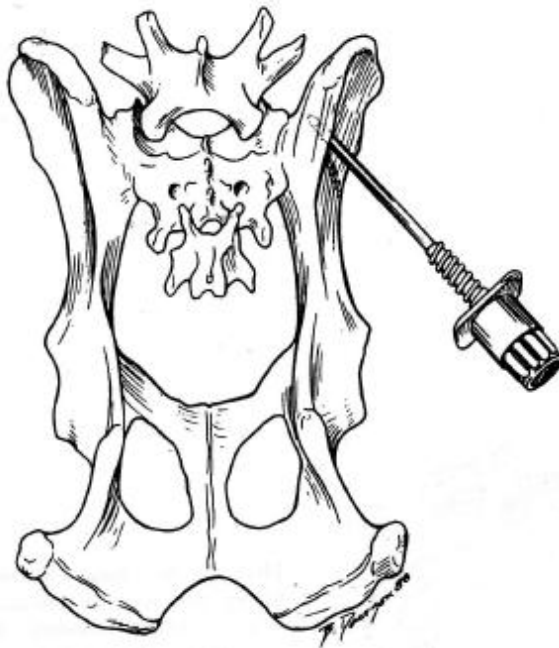


Figura 9- Biópsia de medula óssea no íleo. In Harvey, John W. Bone Marrow Examination. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. 2001. Editora: Saunders; 1 ed. 93-123.

O conteúdo da agulha é depositado em um fixador após ser depositada em uma lâmina. Os fixadores podem ser formalina 10% para exames histológicos ou durante 6 horas em solução Bouin's transferida para etanol 80% para avaliação morfológica mais precisa (HARVEY, 1984).

Neste exame, quando o animal está com aplasia pancitopenica, regiões de atividade hematopoiética encontram-se alteradas (WEISS et al. 2003).

A celularidade normal vista em uma biópsia de medula de cães é de 75% de células hematopoiéticas e 25% de adipócitos. Os megacariócitos são facilmente observados, enquanto os neutrófilos maduros e de banda e os rubrócitos e metarubrócitos são facilmente reorganizados em diferentes estágios iniciais de granulócitos, linfócitos e eritrócitos (HARVEY, 1984). Já no caso da aplasia de medula é observada a hipoplasia de todas as linhagens celulares (THRALL et al, 2007).

4.12 Tratamento

Na veterinária os tratamentos específicos para aplasia medular não estão bem definidos. A conduta clínica inicial será de acordo com a causa, como por exemplo, suspender a medicação ou introduzir o tratamento para hemoparasitoses (WEISS, 2003; BRAZZELL E WEISS, 2006).

O tratamento de suporte é essencial diante das citopenias graves. Consiste em: transfusões de hemocomponentes para animais anêmicos ($Hb < 7,0$ g/dL) e trombocitopênicos (< 50.000 plaquetas/ μ L com sangramento). Antibioticoterapia é indicada para pacientes leucopênicos (< 500 neutrófilos segmentados/L) devido a uma maior susceptibilidade às infecções bacterianas (WEISS, 2003).

O tratamento específico nos animais, segundo Weiss (2006), é realizado com drogas imunossupressoras supondo um processo imunomediado envolvido não bem estabelecido desde que não haja nenhuma causa infecciosa concomitante. Os agentes imunossupressores mais utilizados são: glicocorticóides, azatioprina, ciclosporina e micofenolato (GAN, 2005).

Os glicocorticóides são os mais utilizados em afecções imunomediadas. A prednisona em particular induz a inibição rápida e inespecífica do sistema imunitário, porém pode apresentar alguns efeitos colaterais tais como: trombocitose, hipertensão, aumento da possibilidade de infecções oportunistas, insuficiência congestiva cardíaca, pancreatite, resistência a insulina e secundário diabetes mellitus, ganho de peso, polidipsia, poliúria, polifagia e alopecia (NELSON; COUTO, 2001).

O micofenolato foi desenvolvido como uma alternativa à azatioprina com reduzida mielotoxicidade e hepatotoxicidade e hoje é amplamente utilizado em regimes com múltiplas drogas para a prevenção de rejeição a aloenxerto renal humano, mais amplamente na medicina de transplantes, e para o tratamento de doenças imuno-mediadas em Medicina (WHITLEY, 2011). É uma pró-droga cuja rápida hidrólise a transforma em sua forma ativa que é o ácido micofenólico, que inibe a enzima 5'-inosina monofosfato desidrogenase, que é responsável pela

síntese do nucleotídeo guanina; os linfócitos B e T são também altamente dependentes dessa enzima para que ocorra proliferação celular após a ativação dos mesmos (YUKI, 2007; BARRAK, 2010) . O micofenolato suprime proliferação de linfócitos B e T (GAN, 2005; SPINOSA, 2006; YUKI, 2011). Em recentes relatórios clínicos em seres humanos, o micofenolato demonstrou eficácia no tratamento de muitas doenças hematológicas, tais como anemia hemolítica auto-imune, púrpura trombocitopênica idiopática e anemia aplásica (YUKI, 2011). Em cães a dose a ser utilizada pode ser de 10mg/ Kg a cada 12 horas (YUKI, 2007). Baseado no mecanismo de ação, acredita-se que o micofenolato pode ser benéfico para o tratamento de aplasia medular (GAN, 2005). Os maiores efeitos colaterais em humanos incluem: diarreia, emese, disúria, leucopenia e anemia (YUKI, 2011), já em animais os principais efeitos colaterais são distúrbios gastroentéricos (êmese e diarreia), podendo também surgir maior suscetibilidade a processos infecciosos. (SPINOSA, 2006).

Há descrição de recuperação clínica e hematológica dos pacientes com aplasia de medula óssea em 2 a 3 meses de tratamento, com uso, para os cães, de prednisona (2 a 4 mg/ kg, via oral, a cada 24 ou 48 horas), associado ou não com azatioprina (50mg/m², via oral a cada 2 semanas), mas geralmente o tratamento é realizado durante a vida toda do animal (NELSON; COUTO, 2001).

O fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF) é linhagem específico e assim tem como função aumentar os neutrófilos circulantes já que esta é a primeira linhagem a sofrer diminuição devido ao seu tempo de vida médio de 4 a 8 horas na circulação. Segundo Lucid, Takahira (2007 apud Hammond, 1991) em cães é possível observar aumento da liberação de neutrófilos após duas horas da aplicação e a aceleração da produção em 1 a 6 dias, porém é indicado apenas em neutropenias persistentes como no caso da aplasia medular e muito utilizado pós transplante de medula em humanos tendo necessidade de acompanhamento com hemograma ou análise da medula óssea.

Lucid, Takahira (2007 apud Henry 1998) diz que a dose recomendada é de 5ug/kg dia, via subcutânea.

A eritropoetina recombinante humana é pouco citada como adjuvante no tratamento de aplasia medular em cães. Entretanto, em humanos a eritropoetina

recombinante humana pode auxiliar na melhora da anemia em 10-30% dos pacientes com aplasia medular (Yataro, 1998). Yuki et al. 2007 utilizaram a eritropoetina recombinante humana na dose de 300 UI/kg, com o objetivo de estimular a produção de plaquetas no cão com aplasia medular idiopática obtendo sucesso no tratamento.

O decanoato de nandrolona é um fármaco mais acessível. Em estudo realizado em ratos induzidos à mielossupressão com quimioterápicos demonstrou estímulo hematopoiético apenas nos casos leves de depressão da medula óssea, com efeito, somente após 7 a 10 dias de aplicação (PEREZ et al. 2005). Outro estudo também realizado com ratos obteve a mesma conclusão, de que não influencia no hemograma podendo não ter comportamento de estimulante hematopoiético nos animais desta espécie. Segundo o trabalho cabe analisar o efeito do medicamento em outras espécies com diferentes intervalos de doses para esclarecer a ação do medicamento (MARTINS EI al. 2009).

Todos estes medicamentos podem ser utilizados na tentativa de melhorar a produção da medula óssea, porém segundo Weiss, o melhor tratamento ainda seria o transplante de medula óssea porém as técnicas descritas em cães precisam ser ampliadas na clínica de pequenos animais e a compatibilidade entre doadores e receptores representa um desafio na medicina veterinária (WEISS et al. 2003).

4.13 Prognóstico

Para determinar o prognóstico da aplasia medular há necessidade de avaliar as causas e se o quadro é classificado como agudo ou crônico (FARRIS et al. 1993).

As causas agudas geralmente são reversíveis se o animal tiver tratamento suporte adequado eliminando os agentes quando infecciosos.

Quando a aplasia de medula for iatrogênica geralmente é irreversível com exceção, dos casos de aplasia induzida por anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), tratamento com fenilbutazona ou etrógeno. Já nos casos crônicos a

resposta ao tratamento é menor e alguns animais são eutanasiados antes mesmo de diagnosticar a enfermidade ou quando se diagnostica a mesma, mas pelo prognóstico desfavorável optam pela eutanásia. Entretanto quando submetidos ao tratamento suporte adequado podem responder a terapia em algumas semanas a meses (FARRIS et al. 1993; MORAES, TAKAHIRA, 2010; WEISS, 2006).

É, portanto uma doença de prognóstico grave, mas é esperado que futuramente o tratamento com transfusões sanguíneas seja maior, assim como uso de terapia com fatores de crescimento hematopoiéticos e transplantes de medula óssea para que o tempo de sobrevivência do animal aumente e a remissão dos casos aconteça (HASCHEK et al. 1998; WEISS, 2006).

5 Caso Clínico

No dia 1, um cão, da raça Yorkshire, de 6 anos de idade, pesando 4,4kg(Figura 10) foi atendido na Universidade Anhembi Morumbi, no setor de clínica de pequenos animais.



Figura 10- Imagem do animal Bryan em consulta veterinária no Hospital Veterinário Anhembi Morumbi. Fonte: Arquivo pessoal.

Proprietário relatava que o animal apresentava lesões lineares após tosa em diferentes regiões do corpo, áreas alopecicas, e histórico de ixodidiose há aproximadamente 3,5 anos. Apresentava normorexia, polidipsia, poliúria e fezes fétidas sem alterações em consistência.

Ao exame físico o animal apresentava estado geral bom, com frequência cardíaca de 160 bpm, frequência respiratória de 30mpm e TPC 2s. A mucosa ocular e oral apresentava se hipocorada e na inspeção foram observadas petéquias em região peripeniana direita, com esplenomegalia a palpação.

Em colega o animal havia sido medicado com Dipropionato de Imidocarb (5mg/kg/SC), Doxiciclina(4,5mg/kg), Prednisona(2,2mg/kg) e Timomodulina(1g/kg), desde Julho sem melhora.

Ainda no dia 1 foram realizados exame de hemograma completo com contagem de reticulocitos, teste sorológico para *Ehrlichia canis* e mensuração de albumina e proteína total. O hemograma revelou hematócrito 21%(37-54%), leucócitos 200 células/uL (96000-15000uL) e plaquetas $9 \times 10^3 \text{ mm}^3$ (Tabela 1).

A albumina foi 3,34(2,3-3,8), a proteína sérica total 6,9(5,3-7,7) e a sorologia foi positiva para *Ehrlichia canis* (ELISA) (Tabela 2).

Realizou- se fluidoterapia com NaCl 0,9% 100ml/IV, aplicação de Eritropoetina (181 UI/Kg subcutâneo); Doxiciclina (5mg/Kg intravenoso); Dexametasona (0,25mg/ Kg intravenoso). Para tratamento contínuo Filgrastim na dose de 10 mcg/kg via oral- 300mcg/ml- 0,17ml, SID); Eritropoetina até novas recomendações; Doxiciclina 25mg, BID durante mais 30 dias; Cloridrato de Ranitidina 15mg, BID.

No dia 2 o animal retornou referindo bom estado geral, com apenas um episódio de colúria e odor aliáceo, normorexia, normodipsia e normoquesia. Ao exame físico o animal apresentava mucosas pálidas, linfonodo submandibular direito aumentado, e na inspeção sulfusões em região abdominal.

Foi mantida a terapia medicamentosa e no dia 3 para realizar hemograma e citologia de medula óssea.

Dois dias após o hemograma, do dia 1, revelou hematócrito 23% (37-54%), leucócitos 1100uL (6000-15000 uL) e plaquetas $101 \times 10 \text{ mm}^{33}$ (200-500 x 10^3 mm^3)(Tabela1). A citologia de medula óssea revelou: intensa hipoplasia de medula óssea com hipocelularidade relativa das 3 linhagens celulares:eritrocítica, granulocítica e megacariocítica. A albumina apresentava valor 3,23 (2,3-3,8), e proteína sérica total 7,2(5,3-7,7)(Tabela2).

O animal estava prostrado no dia 3 e diante do resultados do mielograma confirmada a aplasia de medula óssea, foi medicado com Doxiciclina, Ranitidina, Eritropoetina e Filgrastim nas doses acima citadas, e Prednisona 10mg,SID.

No dia 5 o animal retornou em bom estado geral pós mielograma e foi mantido o mesmo tratamento. Já no dia 6 o animal apresentava hematoquesia e hematomas (Figura 11) em região abdominal, foram realizados novos exames como hemograma completo e a dose de Prednisona aumentou 10 mg SID durante 7 dias, após a cada 72 horas durante 7 dias.

No dia 7 o animal permaneceu estável (após 5 dias). Realizou se um hemograma controle 6 dias após que revelou hematócrito 15%, leucócitos 800uL e plaquetas $15 \times 10^3 \text{ mm}^3$. Realizada transfusão de concentrado de hemácias com hematócrito pós transfusão de valor 36% (Tabela 1).

Ao tratamento foram então adicionados Micofenolato de sódio (10mg/kg/BID) e Ciclosporina A (5mg/kg/BID), até novas recomendações.

No décimo dia, proprietário relatou que animal apresentou midríase após administração dos novos medicamentos, mas o quadro continuava estável, foi então repetido o hemograma. Havia intensa trombocitopenia e foi realizado transfusão de concentrado de plaquetas.

No dia 11, o quadro estava estável e a medicação foi mantida, realizado somente o hemograma completo para controle.

No dia 12 o animal encontrava se com a mucosa mais pálida, com poliúria e polidipsia e estava taquipneico ao exame físico.



Figura 11- Hematoma em região medial de membro pélvico direito. Fonte: Arquivo pessoal.

O tratamento com Doxiciclina foi suspenso e substituído por Enrofloxacina de 25 mg, , BID até novas recomendações. Foi realizado novo hemograma e no dia 14 o animal retornou para transfusão de concentrado de hemácias.

No dia 14, o animal retornou apresentando quadros de emese, cansaço, prostração, tosse e ao exame físico sopro anêmico e petéquia em região abdominal.

Foi realizada transfusão de Concentrado de Hemácias, pós transfusão o animal continuava prostrado e taquipneico, e o hematócrito havia elevado para 35%.

O animal voltaria após 3 dias para transfusão de Imunoglobulinas, porém no mesmo dia apresentou hematoemese e hematoquesia 1 hora após a transfusão de concentrado de hemácias evoluindo para óbito na residência do proprietário.

Dias (referências)	Hematócrito (37-54%)	Hemoglobina (12-18 g/dL)	Leucócitos (6000-15000/uL)	Plaquetas (200-500 x 10 ³ mm ³)
1	21%	7 g/dL	200 /uL	9 x 10 ³ mm ³
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	23%	7,7 g/dL	1100 /uL	101 x 10 ³ mm ³
5	-	-	-	-
6	21%	7 g/dL	700 /uL	128 x 10 ³ mm ³
7	-	-	-	-
8	15%	5 g/dL	800 /uL	15 x 10 ³ mm ³
9	36% (pós transfusão)	-	-	-
10	51%	17 g/dL	4850 /uL	6 x 10 ³ mm ³
11	40%	13,4 g/dL	5600 /uL	14 x 10 ³ mm ³
12	23%	7,66 g/dL	2950 /uL	6 x 10 ³ mm ³
13	20% (pós transfusão)	-	-	-
14	35%	-	-	-

Tabela 1- Dias de avaliação do animal e valores estudados do Hemograma completo.

Dias	Albumina (2,3-3,8)	Proteína sérica total (5,3 – 7,7)
1	3,34	6,9
4	3,23	7,2

Tabela 2- Dias de avaliação do animal e valores de Albumina e Proteína sérica total

6 Considerações Finais

A etiologia para aplasia de medula óssea em cães é diversificada envolvendo uma investigação minuciosa para estabelecimento da causa primária para que seja efetuada a terapia específica o mais rápido possível.

Ressalta se a importância da erliquiose e parvovirose como agentes infecciosos que podem ocasionar aplasia com alta incidência em nosso país.

É importante o conhecimento das drogas que afetam os precursores medulares utilizando-as com cautela e, caso haja indicação terapêutica para o uso delas monitorar o animal com hemogramas seriados.

Os avanços na Medicina Transfusional contribuíram muito para a manutenção da vida destes pacientes que necessitam de múltiplas transfusões.

Terapia com drogas imunossupressoras, especialmente as mais recentes, associados com estimulantes de colônias de granulócitos e eritropoetina podem contribuir na recuperação da medula óssea nos casos diagnosticados precocemente e que ainda tenham uma população mínima de precursores medulares.

Infelizmente, na medicina veterinária há poucos avanços na área de transplante de medula óssea em cães sendo este o tratamento mais promissor para estes pacientes cujo prognóstico varia de reservado a ruim.

7 REFERÊNCIAS

BARRAK, P. Immunosuppressive drugs: beyond glucocorticoids, *Veterinary Medicine*, 2010.

BICHARD, Stephen J.; SHERDING, Robert G. Manual Saunders Clínica de pequenos animais. 3ed. São Paulo: Roca. 2008.

BIENZLE, Dorothee. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. 2000.

BOOSINGER, T. R. et al. Bone Marrow Alterations Associated with Canine Parvoviral Enteritis. *Vet Pathology*. Sage, v.19, p.558.1982.

BRANCO, Milena C. et al. Erliquiose Canina Associada à Aplasia Medular em um cão atendido no Hospital Veterinária UFRPE. 2009.3f. Relato de caso. Faculdade de Medicina Veterinária- UFRPE, Pernambuco. 2009.

BRAZZELL, Jennifer L; WEISS, Douglas J.A retrospective study of aplastic pancytopenia in the dog: 9 cases (1996-2003). *Veterinary Clinical Pathology*, Santa Barbara, v.35, p.413-417. 2006.

BRODSKY, Robert A.; JONES, Richard. Aplastic anaemia. *The lancet*, Londres, v.365, p.1647-1656.2005.

CRAFTS, Roger C. The effects of estrogens on the bone marrow of adult female dogs. *The American Society of Hematology*, Washington, v.3, p 276-285. 2011.

ETTINGER, Stephen J; FELDMAN, Eduard C. Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. 7ed. ST. Louis: Saunders Elsevier. 2010. cap 12, p. 1620-1622.

FARRIS, Georgia M. et al. Inhibition of myelopoiesis by serum from dogs exposed to strogen. *American Journal of veterinary Research*, Chicago, v.54, p.1374-1379.1993.

FELDMAN, Bernard F. et al. Schalm's veterinary hematology. 5ed. Ames: Blackwell Publishing.2006 cap 6, p.301-335.

. FELDMAN, Bernard F. et al. Schalm's veterinary hematology. 5ed. Ames: Blackwell Publishing.2006 cap 8, p.356-404.

GAN, G.G.; LEONG, C.F.; SANGKAR, J.V. *et al.* The use of micophenolate mofetil in treating patients whith no responding aplastic anemia, *Med J Malaysia*, v.60, n.3, p.311-313, 2005.

GASPER, Peter W Schalm's Veterinary Hematology, The Hemopoietic System, 2000,cap. 11 p.63-78.

GRINDEM, Carol B.et al. Cytology of bone marrow. The veterinary Clinics of North America- Small Animal Practice, Philadelphia, v.32, p.1313-1374.2002.

HARVEY, John W. Canine boné marrow:normal hematopoiesis, biopsy techniques, and cell identification and evaluation. *Compend Cont. Educ*, v.6, n.10-12, p.909-926.1984.

HARVEY, John W. Atlas of Veterinary Hematology:blood and bone marrow of domestic animals. 1ed. Philadelphia:Saunders.2001.

HASCHEK, Wanda M.; ROUSSEAU, Colin G. Fundamentals Toxicologic Pathology. Sandiego: Academic Press. 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, José. Histologia Básica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1999.

KONIG, Horst E.; LIEBICH, Hans G. Anatomia dos animais domesticos. v.1. São Paulo: artmed.2002.

LEWIS, David C. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. 2000.

LUCIDI, Cynthia; TAKAHIRA, Regina. Uso de estimulantes de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.3, p.915-920, mai-jun.2007.

MARTINS, Danieli B. et al. Decanoato de nandrolona no hemograma e nas células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar hígdos. *Ciência Rural*, Santa Maria.2009.

MILLS, Jenny. . *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. 2000.

MORAES, Livia F; TAKAHIRA, Regina K; Aplasia Medular em cães. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.9, n.1, p.99-108. 2010.

NELSON, Richard W; COUTO, Guillermo C. *Medicina interna de pequenos animais*.2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

NELSON, Richard W; COUTO, Guillermo C. *Medicina interna de pequenos animais*. 4ed. Rio de Janeiro: Mosby. 2010, cap 12, p.1620-1622.

PEREZ, Regina R. et al. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre parâmetros hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n. 2, p.589-595, mai-jun. 2005.

REAGAN, William J et al. *Veterinary hematology: atlas of common domestic species*. 2ed. Ames: Willy- Blackwell.2008.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.

SCOTT, Michael A.; STOCKHAM, Steven L. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

THRALL, Mary Anna et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. 1 ed. São Paulo: Roca. 2007, cap. 13, p.142-169.

WEISS, Douglas J. et al. Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Lakewood, v.196, p.472-475.1990.

WEISS D J., EVANSON O A., SYKES J. A retrospective study of canine pancytopenia. *Veterinary Clinical Pathology*, Santa Barbara, v.28, p. 83- 88, 1999.

WEISS, Douglas J.; DVM; PHD. New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, Philadelphia, v.33, p.1317-1334.2003.

WEISS, Douglas J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Lawrence, v.20, p.955-961.2006.

WEISS, Douglas J.. *Schalm's Veterinary Hematology, The Hemopoietic System*, 2000, cap. 37 p.212-215.

WHITLEY, N.T.; DAY, M.J. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated diseases, *Journal of Small Animal Practice*, v.52, p.70-85, 2011.

YUKI, M.; SUGIMOTO, N.; OTSUKA, K.; Recovery of a dog from aplastic anemia after a treatment with micophenolate mofetil, *Australian Veterinary Journal*, v.85, p.495-497, 2007

YUKI, M. A case of non-regenerative immune-mediated anemia treated by combination therapy of human immune globulin and micophenolate mofetil in a dog, *Open Veterinary Journal*, v.1, p.46-49, 2011

Sites

www.renalvet.com