

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“FREQUÊNCIA DE TIPOS SANGÜÍNEOS EM UMA POPULAÇÃO DE  
CÃES DE RAÇA DE PORTO ALEGRE E REGIÃO METROPOLITANA”**

**VANESSA SINNOTT ESTEVES**

**PORTO ALEGRE  
2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“FREQUÊNCIA DE TIPOS SANGÜÍNEOS EM UMA POPULAÇÃO DE  
CÃES DE RAÇA DE PORTO ALEGRE E REGIÃO METROPOLITANA”**

**Autor:** Vanessa Sinnott Esteves

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e  
Patologia Animal. Especialidade de Patologia  
Clínica Veterinária.

**Orientador:** Félix Hilário Diaz González

**PORTO ALEGRE**

**2008**

E79f Esteves, Vanessa Sinnott

Frequência de tipos sanguíneos em uma população de cães de raça de Porto Alegre e região metropolitana. / Vanessa Sinnott Esteves. – Porto Alegre: UFRGS, 2008.

51 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2008. Félix Hilário Diaz González, Orient.

1. Grupos sanguíneos: cães: imunohematologia 2. Transfusão de sangue: veterinária: cães 3. Testes hematológicos: veterinária: cães I. Diaz González, Félix Hilário, Orient. II. Título.

CDD 619.6026

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Vanessa Sinnott Esteves

*“Frequência de tipos sanguíneos em uma população de cães de raça de Porto Alegre e Região Metropolitana”*

Aprovada em 29 de fevereiro, 2008.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Félix Hilario Diaz González  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ravazzolo  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Alonso Novais  
Membro da Comissão

---

Dr<sup>a</sup>. Berenice de Ávila Rodrigues  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Posso afirmar que o dia de hoje não é especial apenas para mim. Este projeto não é uma conquista individual, e sim de uma equipe fantástica, capaz de concretizar o que parecia impossível.

Todos os momentos, brincadeiras, brigas, risadas e lágrimas fazem com que sinta satisfação e nostalgia pelo término do trabalho. Acredito que o ritmo acelerado tenha permitido que, acima de tudo, estreitássemos laços de amizade e respeito, reconhecendo os limites de cada um.

Agradeço a todos os proprietários de cães envolvidos que gentilmente abriram as portas de suas casas, permitindo que seus animais participassem do estudo.

Agradeço a meu orientador, Félix, pela oportunidade e confiança, permitindo que demonstrasse o valor do meu trabalho.

Agradeço à Vivi e Camila por serem o ponto de equilíbrio e sensatez da equipe.

Agradeço à minha orientadora/colega de trabalho e exímia profissional Luciana Lacerda, por todo desprendimento, altruísmo e ajuda.

Agradeço também a meus amigos Thaís, Magnus, Fernanda e Viviane por serem tão profissionais quanto encantadores, não medindo esforços para me ajudar. Vocês me trazem serenidade, alegria e paz.

Muito obrigada a todos os outros amigos e incentivadores incríveis como Camila, Silvana, Didi, Nilson, Cely e tantos outros: vocês são fulminantes!

Obrigada a todos os estagiários, funcionários (em especial Suzana) e colegas de laboratório pela paciência nos momentos de ausência e estresse.

Agradeço a meus pais e irmãos (minha vida), por todos os sacrifícios, esperas, privações, incentivo, amor incondicional e contas de telefone imensas...vocês são a razão para tudo que faço.

Agradeço, sobretudo, a Deus, que permitiu que tudo isso fosse possível.

## RESUMO

Nas últimas décadas, a transfusão sanguínea e o estudo da imunohematologia em cães tornou-se extremamente importante no tratamento de diversas doenças. O avanço da técnica de hemoterapia e a maior segurança ao empregá-la estão diretamente relacionadas ao maior conhecimento dos tipos sanguíneos caninos e testes de compatibilidade. No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento no sentido de definir as freqüências de tais tipos sanguíneos em diferentes populações, incluindo cães de diferentes raças. Estudos sobre tipagem sanguínea canina já foram realizados em diversos países do mundo, sendo que este é o primeiro estudo realizado no Rio Grande do Sul. Cães apresentam 5 tipos sanguíneos considerados principais: DEA 1 (1.1, 1.2), DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7. O objetivo do trabalho foi determinar a freqüência dos tipos sanguíneos em uma população definida de cães de raça (Golden Retriever, Pastor Alemão, Rottweiler, Dogue Alemão e Dogo Argentino) de Porto Alegre e Região Metropolitana. Foram selecionados 100 cães, sendo 20 de cada uma das raças anteriormente citadas, entre 1 e 8 anos, sem distinção de sexo e clinicamente saudáveis. Amostras de sangue foram coletadas das veias cefálica ou safena lateral e a tipagem realizada através do teste de aglutinação em tubos, padronizado pelo Laboratório de Imunohematologia e Sorologia da Universidade de Michigan (Michigan - Estados Unidos) empregando-se os reagentes específicos (soro policlonal produzido em cães por meio de iso-imunização). Os resultados encontrados estão de acordo com os relatados previamente na literatura. As freqüências gerais observadas para as amostras populacionais utilizadas foram de 62% para o tipo DEA 1.1, 21% para o tipo DEA 1.2, 7% para o tipo DEA 3, 100% para o tipo DEA 4, 9% para o tipo DEA 5 e 16% para o tipo DEA 7. Concluindo, há particularidades entre os tipos sanguíneos de cada raça, que devem ser consideradas em procedimentos de transfusão. Além disso, testes de compatibilidade devem ser empregados em conjunto com a tipagem sanguínea para minimizar riscos de reações transfusionais.

Palavras-chave: cães, cães de raça, tipos sanguíneos, transfusão sanguínea, imunohematologia.

## ABSTRACT

*Over the past few decades, blood transfusions and the study of canine immunohematology have become extremely important for the treatment of a various diseases. Technical advances and greater safety in the use of transfusions are directly related to improved knowledge on canine blood types and compatibility tests. However, few studies have been conducted to date to define the frequencies of these different blood types in different populations, including dogs from different breeds. Studies on canine blood typing have already been conducted in several countries around the world, and this is the first study conducted in the state of Rio Grande do Sul and the second in Brazil. Dogs have 5 principal blood types: DEA 1 (1.1, 1.2), DEA 3, DEA 4, DEA 5 and DEA 7. The objective of the study was to determine the frequency of the blood types in a given population of 5 selected breeds (Golden Retriever, German Shepherd, Rottweiler, Great Dane and Dogo Argentino) from Porto Alegre and the surrounding Region. One hundred clinically healthy dogs were chosen, 20 from each of the aforementioned breeds, with ages between 1 and 8, with no distinction between genders. Blood samples were taken from cephalic or lateral saphenous veins and the blood was typed using the agglutination test in tubes, standardized by the Immunohematology and Serology Laboratory of the University of Michigan (Michigan – United States) using specific reagents (polyclonal serum produced in dogs by means of isoimmunization). The results of this study are in agreement with those previously found in the literature. The overall frequencies observed for the population sample used were 62% for type DEA 1.1, 21% for type DEA 1.2, 7% for type DEA 3, 100% for type DEA 4, 9% for type DEA 5 and 16% for type DEA 7. In conclusion, there are specific frequencies among the blood types of each breed, which must be taken into account during blood transfusions. In addition, compatibility tests should be used together with blood typing to minimize risks of transfusion reactions.*

*Key- words: dogs, purebred dogs, blood types, blood transfusion, immunohematology.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Histórico</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Caracterização dos tipos sanguíneos caninos</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Antígenos eritrocitários do sistema DEA</b>	<b>16</b>
	DEA 1 (Sistema A)	16
	DEA 3 (Sistema B)	18
	DEA 4 (Sistema C)	18
	DEA 5 (Sistema D)	19
	DEA 6	19
	DEA 7 (Sistema Tr)	20
	DEA 8	20
<b>2.2.2</b>	<b>Antígenos eritrocitários do sistema de classificação japonês</b>	<b>20</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Caracterização molecular e estrutural</b>	<b>21</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Frequência dos tipos sanguíneos</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Anticorpos relacionados</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Aloanticorpos naturais</b>	<b>25</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Aloanticorpos induzidos e auto-anticorpos</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Importância clínica dos antígenos eritrocitários em cães</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Reações transfusionais, monitoramento e complicações</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Métodos de tipagem sanguínea</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Frequência de tipos sanguíneos em uma população de cães de raça de Porto Alegre e Região Metropolitana, Rio Grande do Sul, Brasil</b>	<b>33</b>
	Resumo	33
	Abstract	34
	Introdução	34
	Material e Métodos	35
	Animais	35
	Amostragem	36
	Análises laboratoriais	36



Tipagem anti-DEA 1	37
Tipagem anti-DEA 3, 4, 5, 7	38
Resultados e Discussão	38
Conclusão	41
Agradecimentos	41
Referências	41
Tabelas	43
Figuras	44
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Da mesma forma que em medicina humana, em medicina veterinária, grandes avanços têm ocorrido nas últimas décadas na área da transfusão e hemoterapia (MORRISSEY, 2000). Adoção de critérios no que diz respeito à segurança do doador, processamento e armazenamento adequado do sangue e seus subprodutos, potencial transmissão de agentes infecciosos, reações transfusionais adversas, incluindo aquelas ocasionadas por incompatibilidade sangüínea, acompanharam a evolução do processo (GIGER et al., 2005).

A documentação da primeira transfusão sangüínea de animal para animal data de meados do século 17. Em 1950 Swisher demonstrou as primeiras técnicas de transfusão e sua classificação dos grupos sangüíneos serviu de base para estudos em medicina veterinária (MORRISSEY, 2000).

Estudos iniciais dos grupos sangüíneos caninos datam de 1910 e desde aquela época foram descritos mais de 20 tipos sangüíneos diferentes. Entretanto, não se sabe se há distinção sorológica entre os tipos, gerando necessidade de pesquisas na área (HOHENHAUS, 2004).

A disponibilidade de produtos do sangue e a hemoterapia têm se tornado prática comum, pois diferentes enfermidades, muitas vezes, resultam em alterações hematológicas distintas, sendo algumas vezes o sangue total o produto mais indicado (BRACKER & DRELLICH, 2005).

O fracionamento do sangue, que permite o uso isolado de cada um de seus elementos, e a identificação de doenças transmissíveis representam os avanços mais recentes desta área de tratamento (LUCAS et al., 2004).

De maneira geral, médicos veterinários utilizavam cães hospitalizados ou residentes de suas clínicas como doadores de sangue em caso de necessidade de transfusão, mas raramente era realizada prova cruzada ou tipagem sangüínea, o que tornava o procedimento extremamente perigoso (MORRISSEY, 2000).

Atualmente a seleção do cão doador também é considerada como fator decisivo no sucesso de um procedimento transfusional. Os cães utilizados devem ser saudáveis, temperamento calmo e dócil, que permitam a manipulação, sem histórico prévio de doenças e de fácil acesso venoso (veia jugular) (LUCAS et al., 2004; ROZANSKI et al., 2004).

No Brasil, o conhecimento sobre serviços e hemoterapia é escasso e pouco especializado (NOVAIS et al., 2003).

O uso seguro de terapias com componentes sangüíneos requer conhecimento dos grupos sangüíneos e prevalência dos anticorpos, além de conhecimento dos meios de minimizar os riscos de reações adversas como o uso de doadores apropriados e análises que facilitem a detecção de incompatibilidade sorológica (BRACKER & DRELLICH, 2005).

É de suma importância que antes de qualquer transfusão seja realizada a tipagem sangüínea e testes de compatibilidade (prova-cruzada), principalmente naqueles animais anteriormente expostos a produtos sangüíneos ou com histórico de prenhez a fim de verificar incompatibilidades entre doador e receptor (LUCAS et al., 2004).

A tipagem sangüínea permite a identificação dos grupos sangüíneos de pacientes receptores ou candidatos à doação de sangue, verificando se possuem antígenos de superfície eritrocitários semelhantes (LANEVSKI & WARDROP, 2001).

A prova-cruzada não identifica o grupo sangüíneo do animal, mas detecta uma incompatibilidade sorológica entre o paciente e o candidato à doação sangüínea (NOVAIS, 2003).

Modificações nas práticas de hemoterapia em pacientes caninos, como a determinação dos antígenos eritrocitários, são necessárias para incrementar a oferta de componentes sangüíneos e melhorar sua qualidade (BRACKER & DRELLICH, 2005).

O conhecimento das frequências dos tipos sangüíneos caninos em diferentes raças é essencial para realização de práticas transfusionais seguras e eficientes. Não menos importante é a caracterização dos antígenos de superfície, tanto em termos estruturais quanto em relação a presença de anticorpos naturais e a fisiopatologia das reações transfusionais desencadeadas neste processo. O avanço da medicina veterinária e, conseqüentemente, a melhor capacitação de profissionais veterinários, também inclui a implementação de práticas de tipagem sangüínea e testes de compatibilidade, extremamente difundidos e utilizados em medicina humana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

Atualmente, as transfusões sangüíneas permanecem como base para o auxílio na reparação de sangramentos graves, não apenas no intuito de reestabelecer a capacidade de oxigenação, mas também para auxiliar no reestabelecimento da homeostase e prevenção de sangramentos.

O estudo desta prática remonta ao começo do século 19, quando o médico inglês James Blundell deu início ao estudo das terapias transfusionais em humanos antes mesmo da descoberta dos grupos do sistema ABO. Blundell utilizou relatos e experimentos de seu precursor John Henry Leacock, médico cujos experimentos com transfusão datam do século 17, para basear seus próprios estudos (DZIK, 2007).

Leacock relatou a utilização de cães e gatos como receptores e cães e ovelhas como doadores de sangue em experimentos em que provocava a sangria dos animais e posterior reposição do sangue (SCHMIDT & LEACOCK, 2002).

As primeiras publicações de Blundell datam de 1828, mas seus estudos com transfusão sangüínea tiveram início 10 anos antes, quando o médico utilizou-se de modelos animais (principalmente cães) em estudos pré-clínicos. Ele foi o responsável pela descrição das primeiras reações transfusionais (DZIK, 2007).

Blundell executou uma série de experimentos nos quais transfundia sangue humano a pacientes caninos, concluindo princípios essenciais às práticas transfusionais como a necessidade de que doador e receptor sejam da mesma espécie, princípio já anteriormente salientado por Leacock (SCHMIDT & LEACOCK 2002). Mesmo que tais conclusões pareçam óbvias atualmente, os estudos de Blundell datam do século 19, quando não se tinha conhecimento de grupos sangüíneos espécie-específicos. Desta forma, percebeu-se que os cães não poderiam ser utilizados como modelos experimentais para humanos e os estudos com a espécie foram abandonados (DZIK, 2007).

Apesar do pioneirismo, Blundell não foi o primeiro a salientar a importância do sangue como fluido vital com propriedades “curativas”. Há relatos de sua utilização nas mais diversas formas por culturas milenares como os egípcios, gregos e romanos que, por exemplo, bebiam sangue porque acreditavam ser a cura para epilepsia

(MORRISSEY, 2000).

Durante a primeira metade do século 19, há relatos de apenas uma transfusão realizada por ano na Inglaterra. No restante do século, há descrição de 44 transfusões realizadas, incluindo as feitas por Blundell, demonstrando, assim, os progressos e popularização dos benefícios da prática transfusional (DZIK, 2007).

Somente no ano de 1901 é que Landsteiner descreveu primeiramente o que se conhece como grupos sanguíneos humanos (FELDMAN, 1999). Os grupos sanguíneos caninos baseados em isoaglutininas autoimunes foram reconhecidos por Von Dungern e Hirszfeld em 1910 (ANDREWS, 2000).

Em medicina veterinária os avanços da prática transfusional foram mais lentos, mas o interesse tem crescido nas últimas décadas. Tais procedimentos emergiram por volta dos anos de 1950, e ao longo do século 20 avanços e descobertas como o uso de anticoagulantes, a descoberta do sistema ABO humano e o desenvolvimento de práticas e ensaios de compatibilidade tornaram a prática mais segura e conhecida (LANEVSKI & WARDROP, 2001).

Animais de companhia são comumente tratados como membros familiares e nota-se uma crescente exigência por parte dos proprietários que estes animais recebam atendimento veterinário de qualidade e com todos os recursos disponíveis, incluindo transfusão sanguínea (HOHENHAUS, 2004).

A necessidade de maior compreensão do assunto levou pesquisadores de todo mundo a concentrar esforços no sentido de definir e compreender os mecanismos de identificação das células do próprio organismo e de rejeição das células estranhas, os quais conduziam ao sucesso ou fracasso das terapias transfusionais (BRACKER & DRELLICH, 2005).

## **2.2 Caracterização dos tipos sanguíneos caninos**

Cães têm no mínimo 12 grupos sanguíneos, cuja nomenclatura tem sofrido modificações ao longo dos anos (BRACKER & DRELLICH, 2005). Originalmente os grupos sanguíneos caninos eram descritos por letras do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G), mas por convenção passou a designar-se DEA (Dog Erythrocyte Antigen) seguido do número correspondente (SYMONS & BELL, 1992).

Dois tipos de células A foram identificadas de acordo com a força da reação de

aglutinação, sendo que a mais fraca só podia ser detectada através da presença do reagente de Coombs, sendo nomeada A' para diferenciar-se do tipo A. Posteriormente o nome dos tipos "A" sofreu alterações passando a serem designados A1 e A2 (ANDREWS et al., 1992).

Para alguns autores os grupos caninos padronizados internacionalmente são 8 e para outros seriam 7. No entanto, há acordo a respeito da disponibilidade de antisoros para apenas 5 desses grupos sangüíneos (GRACNER et al., 2007).

É possível que múltiplos antígenos estejam presentes nas membranas das células vermelhas. Maher et al. (1958) citam estudos realizados por Swisher e Young (1961) em que, de um grupo de 138 cães, 40 exibiam dois tipos sangüíneos, 62 apresentavam três tipos, 17 apresentavam quatro tipos sangüíneos e 8 animais apresentavam 5 tipos, sendo o tipo A (DEA 1) presente em 63% e o tipo C (DEA 4) em 98% do total de animais.

Os grupos sangüíneos são definidos por antígenos polimórficos, espécie-específicos, presentes na superfície dos eritrócitos e demonstrados a partir de reações imunes utilizando anticorpos (REID & WESTHOFF, 2003).

Utiliza-se o termo polimórfico no sentido de que um determinado antígeno não é necessariamente expresso por todos os indivíduos da espécie. Caso todos os indivíduos apresentassem ou não o mesmo antígeno, esse seria chamado monomórfico (BLANCHER et al., 2000).

Antígenos eritrocitários são marcadores de superfície celular com características herdadas (GIGER et al., 2005). A maior parte dos antígenos é um componente integral de membrana composto por glicossacarídeos complexos associados a lipídeos ou proteínas, inseridos na membrana eritrocitária, sendo denominados de glicolipídeos ou glicoproteínas conforme a estrutura conjugada. Em qualquer caso, a especificidade sorológica é determinada pela estrutura do carboidrato (REID & WESTHOFF, 2003).

Os carboidratos associados à membrana dos eritrócitos possuem, ainda, função de *glicocálix*, criando um campo elétrico negativo, que impede a adesão entre os eritrócitos, além de impedir que imunoglobulinas como IgG liguem-se diretamente aos antígenos de superfície, principalmente aqueles localizados próximos à bicamada lipídica da membrana. Dessa forma, o *glycocálix* afeta a capacidade dos anticorpos IgG de causarem aglutinação direta. Assim, a distância na qual o antígeno se localiza da

bicamada lipídica possui maior importância em reações de aglutinação do que a quantidade de anticorpos presentes (REID & WESTHOFF, 2003). Sabe-se que alguns antígenos eritrocitários humanos, que dependem de estruturas protéicas, necessitam de cadeias de glicosacarídeos ou proteínas adicionais para sua expressão (BLANCHER et al., 2000).

É importante esclarecer a diferença entre grupos sanguíneos e aglutinógenos de membrana. Aglutinógenos são estruturas definidas da membrana dos eritrócitos, herdadas geneticamente, enquanto que os tipos sanguíneos são determinações dos aglutinógenos que podem ser demonstradas sorologicamente. Os aglutinógenos possuem estrutura em mosaico, permitindo que uma mesma estrutura origine vários tipos ou subtipos sanguíneos. Entretanto, essas estruturas não são bem estabelecidas para a espécie canina (WIENER & WEXLER, 1952).

Grupos de antígenos sanguíneos foram demonstrados em praticamente todas as espécies até o momento. Na maioria das vezes os reagentes são obtidos através de isoimunizações e heteroimunizações acidentais ou intencionais. Há grandes semelhanças funcionais e de herança genética de antígenos de superfície de outras espécies com os antígenos humanos descritos até o momento (REID & WESTHOFF, 2003).

Os antígenos eritrocitários (DEA) podem variar em imunogenicidade, prevalência e significado clínico, sendo alguns tipos pouco prevalentes (BRACKER & DRELLICH, 2005). Sua detecção e descrição baseiam-se em sorologia por meio de anticorpos policlonais ou monoclonais (CORATO et al., 1997). Em medicina veterinária, este significado está ligado à ocorrência de reações transfusionais, isoeritrolise neonatal e disputa de paternidade. Além disso, embora ainda não esteja comprovado, os antígenos de grupos sanguíneos podem exercer algum papel em enfermidades como a anemia hemolítica imuno-mediada, servindo como marcadores de doenças (ANDREWS, 2000).

Os sistemas de tipos sanguíneos caninos são utilizados para verificar a compatibilidade entre doador e receptor em procedimentos de transfusão sanguínea, transplantes de órgãos, testes de paternidade e em medicina experimental. No Japão, o grupo D (pertencente a outro sistema de classificação) é comumente utilizado para atribuição de paternidade (EJIMA & KUROKAWA, 1980).

O sistema de classificação proposto por pesquisadores japoneses, não é

reconhecido pelo Comitê Internacional de Imunogenética Canina (EJIMA & KUROKAWA, 1980). Comparações entre os tipos sangüíneos e os diferentes reagentes propostos raramente são realizadas, sendo que o sistema de classificação DEA permanece como o único internacionalmente reconhecido (BLAIS et al., 2007).

Em 1975, Suzuki e colaboradores descreveram quatro novos fatores designados Nf4, 5, 6 e 7, sendo os últimos dois pertencentes a um sistema fechado (SYMONS & BELL, 1992).

Recentemente, estudos demonstraram a existência de um novo tipo sangüíneo, denominado *Dal*, com base na detecção de aloanticorpos (da classe IgG) em um paciente da raça Dálmata previamente sensibilizado e outros animais doadores de sangue de raças distintas. Sua identificação também foi comprovada a partir de técnicas de compatibilidade (*crossmatching*) como responsável por reações transfusionais. Neste mesmo estudo, verificou-se que tal tipo sangüíneo é bastante comum, com elevada freqüência na população testada (93% dos 105 cães testados pertencentes ao programa de cães doadores da Universidade da Pensilvânia) e não possui correlação com os demais tipos sangüíneos reconhecidos do sistema DEA. Cogitou-se a hipótese de tal antígeno pudesse estar relacionado ou ter a mesma especificidade que os antígenos DEA 6 ou DEA 8, mas não há no mercado disponibilidade de antisoro para tais tipos, impossibilitando quaisquer comparações (BLAIS et al., 2007).

A prática da tipagem sangüínea é pouco utilizada por médicos veterinários, em parte, devido à dificuldade de obtenção dos reagentes necessários (MORRISSEY, 2000). Atribui-se importância clínica apenas aos grupos DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 7, de forma que, quando há oportunidade de realizar a tipagem sangüínea, esses são os antígenos frequentemente selecionados (GRACNER et al., 2007).

Há indícios de que somente os sistemas DEA 1 e DEA 7 possuem múltiplos alelos (SYMONS & BELL, 1992).

### 2.2.1 Antígenos Eritrocitários do Sistema DEA

#### DEA 1 (Sistema A)

Este grupo sangüíneo é composto atualmente por 2 fenótipos e um tipo nulo (DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1 negativo), sendo o tipo DEA 1.1 o mais prevalente e



significativo na população canina, seguido do DEA 1.2 e finalmente o tipo nulo. A herança genética é autossômica recessiva (GRACNER et al., 2007).

Giger e colaboradores (2005) discutem o fato de que o tipo DEA 1.2 seja um alelo mais fraco do alelo DEA 1.1. Tal teoria é ressaltada pelos autores quando avalia-se o fato de que os reagentes policlonais DEA 1.X (MSU- Michigan State University) reconhecem tanto células DEA 1.1 quanto DEA 1.2 (reação cruzada), provavelmente devido à similaridade entre os antígenos (ANDREWS, 2000). Cada indivíduo exibe somente um dos fenótipos para o grupo DEA 1. Como característica, o antisoro isoimune produzido contra um dos antígenos pode exibir graus de reatividade cruzada com os outros antígenos desse grupo (WARDROP, 2000).

Alguns autores (ANDREWS, 2000) citam que há um terceiro subgrupo (DEA 1.3), mas na literatura atual este subgrupo é considerado como uma forma de reação mais branda do subgrupo DEA 1.2 (HOHENHAUS, 2004).

Wardrop (2000) cita a descoberta do tipo DEA 1.3 e seu potencial de provocar reações hemolíticas, mas frisa a incapacidade de detectá-lo devido à ausência de antisoro. Hohenhaus (2004) cita a descrição do tipo DEA 1.3 apenas na Austrália, onde aparentemente é comum em cães da raça Pastor Alemão.

Segundo Morrissey e colaboradores (2000), cerca de 50% da população canina é positiva para o tipo DEA 1. Relatos demonstram frequências de 45% de animais DEA 1.1 positivos e 20% de DEA 1.2 positivos nos Estados Unidos (ANDREWS, 2000).

Através de técnicas de imunoprecipitação e a utilização de anticorpos monoclonais anti-DEA 1.1 é possível definir que este subgrupo é composto por duas proteínas de membrana com 50 e 200 kDa, respectivamente (ANDREWS, 2000). Já o subgrupo DEA 1.2 é composto por apenas uma proteína de membrana, cujo peso molecular é de 85 kDa (CORATO et al., 1997).

A obtenção do antisoro policlonal anti-DEA 1.X se dá através da imunização de um cão DEA 1 (DEA 1.1, DEA 1.2) negativo com células DEA 1.1 positivas. O antisoro anti-DEA 1.X promove aglutinação e hemólise fortes (na presença do complemento) em células DEA 1.1 positivas e promove variados graus de aglutinação, mas não promove hemólise, em células vermelhas positivas para DEA 1.2. Antisoro anti-DEA 1.1 é obtido através da imunização de um cão DEA 1.2 positivo com células vermelhas DEA 1.1 positivas. Esse antisoro reage apenas com células DEA 1.1 positivas. Tentativas de produzir antisoro específico DEA 1.2 não foram bem sucedidas

(ANDREWS, 2000).

Doença hemolítica em cães recém-nascidos ou Isoeritrólise neonatal ocorre quando a cadela, imunizada por transfusão prévia, transmite anticorpos aos filhotes através do leite. A patofisiologia da doença assemelha-se a que se desenvolve em bebês humanos e gatos (YOUNG et al., 1951).

#### DEA 3 (Sistema B)

Este grupo sanguíneo é chamado de B em literaturas mais antigas e como D<sub>1</sub> e E por pesquisadores japoneses (EJIMA et al., 1986). Trata-se de um tipo sanguíneo determinado por um único fator, possuindo, desta forma, dois fenótipos (DEA 3 positivo e DEA 3 nulo), sendo o tipo DEA 3 positivo considerado dominante (ANDREWS, 2000). Através de imunoprecipitação, obtém-se o perfil de proteínas de membrana com formação de 5 bandas com pesos moleculares correspondentes de 34 a 71 kDa (HOHENHAUS, 2004).

Estudos prévios encontraram, em raças caninas nativas do Japão como Shikoku e Akita, uma incidência de até 60% deste tipo sanguíneo, enquanto raças não nativas como Maltês, Beagle e Setter Inglês são predominantemente negativas para tal tipo. Por outro lado, todos os Labradores Retrievers testados em um estudo australiano com 122 cães mostraram-se negativos para o grupo DEA 3 (HOHENHAUS, 2004). Nos Estados Unidos há relatos de que aproximadamente 6% da população canina geral apresenta o antígeno. No entanto, há particularidades relacionadas, pois cães da raça Greyhound apresentam frequências mais elevadas (23%) do que o restante da população (ANDREWS, 2000).

A porcentagem de animais apresentando anticorpos naturais relacionados a este tipo sanguíneo está em torno de 20%. Atribui-se ainda a este tipo sanguíneo a capacidade de promover reações transfusionais agudas severas em cães previamente sensibilizados. As células transfundidas são retiradas rapidamente da circulação em um prazo de até 5 dias (ANDREWS, 2000).

#### DEA 4 (Sistema C)

Anteriormente chamado de C, este grupo sanguíneo mostra-se dominante ao tipo

nulo. Através de técnicas de imunoprecipitação, é possível determinar proteínas de membrana presentes numa mesma banda difusa, com pesos moleculares correspondentes a 32 a 40 kDa (CORATO et al., 1997). Estudos prévios apontam que aproximadamente 98% da população canina mundial é positiva para esse tipo sanguíneo (BLAIS et al., 2007). Não há relatos de reações transfusionais ou casos de isoeritrólise neonatal atribuídos a esse tipo sanguíneo, porém a sua importância ainda não foi completamente esclarecida (ANDREWS, 2000).

A importância do antígeno DEA 4 como potencial indutor de reações transfusionais foi salientada através do relato recente em que um cão sensibilizado desenvolveu reação hemolítica aguda após transfusão. Esse antígeno não era levado em consideração justamente pelo fato de ter elevada frequência na população geral, mas isso não diminui a sua importância, devendo ser considerado no momento da escolha de um doador compatível, assim como ocorre com o antígeno *Dal* (BLAIS et al., 2007).

#### DEA 5 (Sistema D)

Assim como os antígenos DEA 3 e DEA 4, este é definido por dois fenótipos (DEA 5 positivo e DEA 5 nulo), sendo o tipo DEA 5 considerado dominante (ANDREWS, 2000). Há relatos de que 10 % da população não transfundida de cães dos EUA apresentem anticorpos naturais contra o antígeno (ANDREWS, 2000).

Outra particularidade deste antígeno de membrana é a elevada frequência (aproximadamente 30%) atribuída à raça Greyhound (ANDREWS, 2000). Não há relatos da ocorrência de isoeritrólise neonatal, porém, cães submetidos a transfusões incompatíveis têm as células retiradas da circulação por seqüestro esplênico em 3 dias (ANDREWS, 2000). Não foi possível determinar os pesos moleculares através de imunoprecipitação (CORATO et al., 1997).

#### DEA 6

Também definido por dois fenótipos, sendo o DEA 6 positivo dominante ao nulo. A literatura cita que aproximadamente 100% dos cães é positiva para o tipo sanguíneo, mas devem-se considerar variações existentes entre raças e diferentes regiões geográficas. Não há relatos de isoeritrólise neonatal e acredita-se que cães sensibilizados tenham células rapidamente retiradas da circulação (ANDREWS, 2000).

Atualmente não há antisoro disponível no mercado para a determinação deste grupo (HOHENHAUS, 2004).

#### DEA 7 (Sistema Tr)

Denominado antígeno Tr em outros sistemas de nomenclatura, trata-se de um antígeno definido por 6 genótipos demonstrados em 3 fenótipos. Há dois alelos envolvidos no processo: Tr<sup>tr</sup> e Tr<sup>o</sup>. O tipo nulo representa a ausência de ambos alelos (Tr) (HOHENHAUS, 2004). O antígeno Tr não é um antígeno integral de membrana, sendo um antígeno solúvel não produzido pelos eritrócitos. Após produzido, ele é adsorvido na superfície das células vermelhas. Acredita-se que esteja presente em aproximadamente 45 a 50% da população e seja capaz de promover reações em cães DEA 7 negativos (ANDREWS, 2000).

Anticorpos anti-DEA 7 de ocorrência natural, incapazes de promover hemólise e em baixos títulos são relatados em aproximadamente 20 a 50% da população segundo Andrews (2000), animais DEA 7 sensibilizados demonstram perda e seqüestro das células transfundidas em 72 h (ANDREWS, 2000). Através de técnicas de imunoprecipitação determinam-se 3 bandas com pesos moleculares de 53, 58 e 63 kDa (CORATO et al., 1997).

#### DEA 8

Este antígeno foi inicialmente denominado He e foi descoberto através de antisoro proveniente de isoimunizações (ANDREWS, 2000). Atualmente não há antisoro disponível no mercado para a determinação deste tipo.

#### 2.2.2 Antígenos eritrocitários do sistema de classificação japonês

Apesar de não reconhecido internacionalmente, é interessante que se tenha conhecimento do sistema de classificação japonês e dos estudos comparativos realizados, pois não foi comprovado que estes tipos sangüíneos correspondem aos mesmos classificados pelo sistema DEA. Inicialmente o sistema consistia de 16 tipos sangüíneos: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, A, B, C, E, F, G, H, I, L, M, 2<sub>a</sub>, 43, 44 e 180<sub>a</sub> (EJIMA &

KUROKAWA, 1980).

Os antisoros anti-D<sub>1</sub> e anti- D<sub>2</sub> são heteroanticorpos obtidos a partir de coelhos imunizados com células vermelhas de cães que permitem a determinação de três fenótipos sendo, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, (HARA et al., 1991).

Há grande desvantagem na utilização de antisoros policlonais, por isso, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de obter linhagens celulares capazes de produzir anticorpos monoclonais. Até o momento a produção de anticorpos monoclonais foi bem sucedida para o tipo DEA 3 (HARA et al., 1991).

Os antisoros anti-A, E, F, G, L, M e 2<sub>a</sub> são antisoros isoimunes, enquanto os antisoros anti-B, H, I, 43, 44 e 180<sub>a</sub> são antisoros de ocorrência natural. O antisoro correspondente ao tipo C é uma lectina obtida das sementes de *Clerodendron trichotomum*, e posteriormente esse antisoro passou a ser designado J2 (EJIMA et al., 1986).

No ano de 1980, um estudo comparativo foi desenvolvido visando validação dos antisoros japoneses. Os resultados foram obtidos de uma amostra composta por 15 cães, sendo 11 da raça Beagle e 4 cães mestiços. Nenhum dos antisoros japoneses demonstrou possuir a mesma especificidade dos antisoros DEA 1.1 e DEA 1.2. Já anti-D<sub>1</sub> e anti-E apresentaram resultados semelhantes aos obtidos para o tipo DEA 3. O tipo DEA 5, quando comparado ao tipo anti-A também apresentou resultados semelhantes, bem como anti-180<sub>a</sub> e anti DEA 8. O restante dos tipos sangüíneos sugeridos pelos autores não apresentaram correlação com o sistema DEA (EJIMA et al., 1980).

Os procedimentos do protocolo utilizado para tipagem utilizando esses antisoros é o mesmo empregado para os antisoros do sistema DEA, inclusive utilizando os mesmos padrões para leitura (EJIMA & KUROKAWA, 1980).

### 2.2.3 Caracterização molecular e estrutural

Pouco se sabe a respeito da caracterização molecular e da estrutura bioquímica e composição dos antígenos de superfície eritrocitários caninos. Há necessidade da caracterização e conhecimento aprofundado da estrutura e bioquímica dessas moléculas para que novos antisoros sejam desenvolvidos, aperfeiçoando as técnicas de tipagem disponíveis e o conhecimento a respeito do mecanismo de atuação de certas doenças relacionadas (CORATO et al., 1997).

Alguns glicolipídeos da membrana dos eritrócitos caninos foram descobertos e parecem estar relacionados a grupos sanguíneos específicos (CORATO et al., 1997). Similarmente ao que ocorre em felinos, os glicolipídeos de caninos são esfingoglicolipídeos contendo resíduos de ácido siálico (HOHENHAUS, 2004).

O peso molecular de alguns desses antígenos foi determinado através de imunoprecipitação a partir da membrana de eritrócitos utilizando um pool de antisoros conhecidos. O mesmo estudo comprovou através da imunoprecipitação de autoanticorpos isolados do soro de um cão com Anemia Hemolítica Auto-imune (AHAI) que estes eram capazes de precipitar proteínas de membrana com mobilidade semelhante às proteínas e glicoproteínas relacionadas ao fator Rh de eritrócitos humanos, surgindo, assim, a teoria de que eritrócitos caninos expressam moléculas homólogas aos grupos sanguíneos humanos Rh. Estudos prévios já haviam comprovado a existência de antígenos Rh conservados em diversas espécies, incluindo cães (CORATO et al., 1997; REID & WESTHOFF, 2003; HOHENHAUS, 2004).

Diversos antígenos eritrocitários humanos, dentre eles o fator Rh, possuem complexas estruturas com múltiplas passagens através da membrana, além de porções intracitoplasmáticas. Deve-se verificar se tais estruturas ocorrem com a mesma disposição em caninos (CORATO et al., 1997).

Em contraste, segundo Corato e colaboradores (1997), as tentativas de imunoprecipitação dos antígenos DEA 1.1, DEA 3 e DEA 5 não foram bem sucedidas. O antígeno DEA 4 forneceu bandas difusas, cujo peso molecular correspondia de 32 a 40 kDa. O tipo DEA 7 permitiu a formação de três bandas distintas com pesos moleculares de 53, 58 e 66 kDa, enquanto o tipo DEA 1.2 precipitou uma única banda com peso molecular de 85 kDa, conforme descrito anteriormente (CORATO et al., 1997).

A ocorrência de mutações em antepassados da espécie pode ser responsável por antígenos transferidos por várias gerações. O polimorfismo entre espécies já foi descrito por diversos autores, presente inclusive entre sub-populações da mesma espécie (BLANCHER et al., 2000).

É possível estabelecer correlação entre alguns grupos sanguíneos humanos e a susceptibilidade a alguns agentes infecciosos, desta forma, parasitas, bactérias e vírus teriam influenciado na seleção de grupos sanguíneos mais resistentes (BLANCHER et al., 2000).

#### 2.2.4 Frequências dos tipos sanguíneos

A determinação da frequência dos grupos sanguíneos tem sido pesquisada ao longo dos anos por diversos autores. Swisher e Young (1961) estabeleceram a frequência do tipo DEA 1.1 em uma população composta por 332 cães mestiços, encontrando-o em 44% das amostras. O mesmo autor no ano de 1973 encontrou resultados semelhantes, com 40% dos animais testados positivos para o tipo DEA 1.1. Em 1975, uma nova pesquisa realizada por Suzuki e colaboradores verificou uma frequência de 36% de DEA 1.1 em 61 cães. Da mesma forma, Wriesendorp e colaboradores (1976) obtiveram frequências para DEA 1.1 de 36 % em cães mestiços, 43% em Beagles e 29% em Retrievers. Kohn (1998) testou 88 animais para o tipo DEA 1.1, estabelecendo uma frequência de 52% (GRACNER et al., 2007).

Ejima e colaboradores (1986), estudaram a frequência dos tipos sanguíneos (antisoros utilizados: DEA 1, DEA 3, DEA 5, DEA 6, D, J1, J2, J3, J4 e J5, com especificidade estabelecida em experimento prévio) em diferentes raças. Observou-se marcante diferença entre raças com relação aos tipos DEA 1, DEA 3, DEA 6, D E J1. Para o tipo DEA 1, as frequências de animais positivos foram mais elevadas em raças de origem japonesa (Keeshond, Shiba, Mongrel, Akita) e em Yorkshire Terrier. Em relação ao tipo DEA 3, as frequências positivas foram maiores nas raças Akita, Mongrel e Shiba. Por outro lado, as raças de origem européia e americana apresentaram baixa frequência, sendo que 100% dos animais das raças Collie, English Pointer, English Setter, Pastor Alemão, Keeshond, Shih Tsu e outros foram negativos para DEA 3 (EJIMA et al., 1986). Baixas frequências também são relatadas para o tipo DEA 5. Tais resultados apontam correlações positivas entre alguns tipos sanguíneos e raças. Porém, ao analisar tais informações, deve-se levar em conta o reduzido número de amostra de algumas raças utilizadas nesse experimento (EJIMA et al., 1986).

No mesmo experimento, apesar do reduzido número de animais da raça Pastor Alemão (6), nenhum deles apresentou positividade para o tipo DEA 1.1, que é considerado o mais freqüente, dividindo-se entre os tipos DEA 1.2 (40% dos animais) e tipo nulo (60% dos animais). Ainda com relação a essa raça, nenhum dos animais era positivo para o tipo DEA 3 e baixa frequência foi encontrada para o tipo DEA 5.

Em 1999, Novais et al. realizaram experimento compreendendo 150 cães de

diferentes raças, obtendo índices de 91,3% dos animais positivos para o tipo DEA 1, sendo destes 51,3% DEA 1.1 positivos, 40% positivos para o tipo DEA 1.2 e 8,7% dos cães negativo para o grupo DEA 1.

Um levantamento utilizando diferentes raças atribuiu à raça Rottweiler a maior frequência (78%) encontrada para o tipo DEA 1.1 (GRACNER et al., 2007). Ainda relacionado ao tipo DEA 1.1, estudo recente utilizando 20 cães da raça Istrian Pointers, observou uma frequência de 66,7% de cães positivos (GRACNER et al., 2007).

Grande parte dos estudos realizados até o momento não considera a frequência dos tipos sanguíneos em relação a raças distintas, e sim a uma população geral. A partir dos trabalhos existentes não é possível verificar se há diferenças significativas entre as diferentes raças (GRACNER et al., 2007).

Giger e colaboradores (1995) em experimento realizado com 224 cães na cidade da Filadélfia (EUA) relatam que 33% dos cães testados eram positivos para o tipo DEA 1.1, valores de acordo com a literatura prévia, enquanto que as frequências encontradas para o tipo DEA 1.2 estavam abaixo dos valores citados na literatura. Descreve, ainda, que as variações encontradas podem ser atribuídas a amostragem pequena, variações geográficas ou diferenças nos antisoros utilizados.

As frequências dos diferentes tipos sanguíneos em cães, relatadas na literatura podem ser visualizadas na Tabela 1.

A biologia molecular das estruturas responsáveis pela determinação dos grupos sanguíneos, os genes responsáveis por codificar proteínas relacionadas e as enzimas responsáveis por sua síntese ainda permanecem pouco estudadas em medicina veterinária (BLANCHER et al., 2000).

**Tabela 1. Frequência dos tipos sanguíneos caninos relatados em diferentes estudos**

Nº de cães	Grupo sanguíneo DEA (%)						Autor
	1.1	1.2	3	4	5	7	
332	40	20	6	98	22	45	SWISHER & YOUNG (1961)
Nd	40	20	5	98	25	45	SWISHER et al. (1973)
217	36	51	10	nd	nd	nd	SUZUKI et al. (1975)
31	37	4	5	56	8	31	VRIESENDORP (1976)
545	44	22	24	nd	nd	nd	EJIMA et al. (1986)
224	33	7	nd	97	nd	8	GIGER et al. (1993)
150	51	40	nd	nd	nd	nd	NOVAIS (1996)
200	60,5	38,5	10,5	96,4	10,5	9,5	NOVAIS (2003)
23	39	17,4	13	91,3	22	nd	GIGER et al. (2005)
30	66,7	nd	nd	nd	nd	nd	GRACNER et al. (2007)

nd: não descrito



## 2.3 Anticorpos relacionados

### 2.3.1 Aloanticorpos naturais

Alguns autores sugerem que cães não apresentam anticorpos naturais contra antígenos eritrocitários estranhos (aloanticorpos de ocorrência natural), e que quando são encontrados no soro de cães não submetidos a transfusões prévias, sua importância clínica é limitada. Anticorpos contra DEA 3, DEA 5 e DEA 7, foram identificados e são responsáveis pela remoção precoce das células transfundidas da circulação sem, no entanto, provocar hemólise. Aloanticorpos contra DEA 1.1 e DEA 1.2 são raros (FELDMAN, 1999).

Títulos de aglutininas frias, principalmente DEA 7, estão presentes em aproximadamente 50% da população, segundo Giger et al. (1995) e em 15%, segundo Feldman (1999). Entretanto seus títulos e importância permanecem desconhecidos. Estudos mais recentes colocam em dúvida a existência de tais aloanticorpos para o tipo sanguíneo DEA 7 (BRACKER et al, 2005). Anticorpos de origem natural ou induzidos através de transfusões prévias ou gestação podem ser detectados através da prova cruzada maior em testes de compatibilidade (*major crossmatch*) (GIGER et al., 2005).

### 2.3.2 Aloanticorpos induzidos e auto-anticorpos

Aloanticorpos induzidos são originados a partir do estímulo do sistema imune através de transfusões sanguíneas incompatíveis (HOHENHAUS, 2004). Sabe-se que anticorpos contra o tipo sanguíneo DEA 1.1 desenvolvem-se num período de aproximadamente 9 dias após a administração de células incompatíveis e podem ocasionar episódios severos de hemólise e manifestações de reações transfusionais (LANEVSKI & WARDROP, 2001).

Anticorpos contra DEA 1.2 ocasionam fraca aglutinação e a incompatibilidade pode gerar manifestações de inaparentes a severas (HOHENHAUS, 2004). Anticorpos contra as aglutininas frias (DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA7) parecem não promover hemólise *in vitro*, mas são responsáveis pelo aumento na velocidade de retirada das células transfundidas da circulação (HOHENHAUS, 2004).

Estudos experimentais atribuem ao tipo DEA 1.1 a maior imunogenicidade, seguido pelo tipo DEA 1.2 e DEA 7, todos reagindo como aglutininas com a exceção de que os aloanticorpos do tipo DEA 1.1 têm mais característica de hemolisinas que aglutininas (GIGER et al., 1995).

Relatos de incompatibilidades em cães são raros e podem ser relacionados a baixa ocorrência de aloanticorpos, ao fato de que dificilmente um cão recebe duas transfusões e o mais provável: falta de conhecimento por parte dos médicos veterinários em reconhecer as manifestações de reações transfusionais e ainda não notificá-las (HOHENHAUS, 2004).

O tipo sanguíneo considerado mais imunogênico e capaz de causar maiores danos é o DEA 1.1, sendo descritas reações hemolíticas agudas severas no caso de cães previamente sensibilizados que receberam sangue incompatível. Tais manifestações podem concorrer com febre, hemoglobinúria e hemoglobinemia dentre outros. Os aloanticorpos responsáveis por tais reações são normalmente da classe IgG, demonstrando títulos elevados de hemolisinas e hemaglutininas (HOHENHAUS, 2004).

Outra questão bastante importante no que diz respeito a aloanticorpos caninos é a interpretação errônea da formação de *rouleaux*, muitas vezes confundidos com aglutinação por pessoas com pouca prática. Além disso, algumas reações febris, alérgicas e outras não hemolíticas que ocorram após transfusões sanguíneas podem ser falsamente atribuídas a reações transfusionais quando se tratam de outros processos. Como a prática da leucorredução e separação de hemocomponentes ainda é pouco utilizada em veterinária é possível que grande parte desses processos sejam desencadeados por antígenos leucocitários, plaquetários ou ainda incompatibilidade a proteínas plasmáticas (GIGER et al., 1995).

Talvez a maior implicação de não existirem aloanticorpos importantes nos cães esteja no fato de que é bastante comum que transfusões sejam realizadas sem grandes preocupações, visto que não promoveriam reações. No entanto, isso não implica na compatibilidade sanguínea dos animais envolvidos no processo. Assim, caso o doador seja incompatível, seus antígenos celulares estimulam o sistema imune do receptor que pode ser prejudicado caso necessite de uma segunda transfusão. Devido à produção de anticorpos, os eritrócitos transfundidos também podem ser rapidamente retirados da circulação, destruídos dentro de 1 a 2 semanas após a transfusão, caracterizando as reações tardias, observadas através do decréscimo do hematócrito. É importante

ressaltar também que estes anticorpos permanecem circulantes por diversos anos (GIGER et al., 1995).

No caso de animais previamente sensibilizados submetidos a outra transfusão ocorre uma reação transfusional hemolítica aguda, associada a diversos sinais como febre, tremores, vômito, defecação e àqueles relacionados à hemólise. Em contrapartida, as lesões renais agudas tão características em humanos, não são descritas em cães (GIGER et al., 1995).

Não há relatos de que a administração de corticoterapia possa auxiliar na redução dos sinais observados, mesmo este procedimento sendo considerado padrão nestas circunstâncias (GIGER et al., 1995).

Já os autoanticorpos estão presentes em animais com doenças auto-imunes, como a anemia hemolítica auto-imune. Pesquisadores verificaram a presença de imunoglobulinas das classes IgG e IgM nos eritrócitos de cães afetados pela doença (HOHENHAUS, 2004).

Resultados positivos para cada tipo sanguíneo podem ser visualizados na forma de aglutinações ou lise das células vermelhas referidas como hemaglutinação ou hemólise respectivamente (GIGER et al., 2005).

A meia-vida normal de eritrócitos compatíveis transfundidos é de aproximadamente 21 dias, enquanto que na ocorrência de reações hemolíticas transfusionais, a meia-vida dos eritrócitos incompatíveis cai para aproximadamente 12 horas (CALLANN et al., 1995).

A sensibilização e o concomitante estímulo do sistema imune com produção de anticorpos ocorrem após a segunda transfusão. As diferenças entre o tipo de anticorpos produzidos influenciam no tipo e gravidade de uma reação transfusional, ou seja, se a resposta será aguda ou tardia, severa ou moderada (BRACKER & DRELLICH, 2005).

Apesar dos esforços empreendidos até o momento para se investigar os grupos sanguíneos dos cães, ainda existem várias perguntas a serem esclarecidas. Nas condições brasileiras, isto ocorre devido à dificuldade de obtenção de reagentes importados para tipagem sanguínea, o que encarece e inviabiliza o método para a grande maioria dos hospitais veterinários (NOVAIS et al., 1999; NOVAIS et al., 2003).

É extremamente importante que as técnicas de tipagem sejam bem estudadas e padronizadas, além de que se estabeleçam as frequências e particularidades dos tipos sanguíneos em cada raça canina. Assim, será possível detectar os antígenos presentes

nas células em animais doadores e receptores garantindo transfusões sanguíneas compatíveis (GIGER et al., 2005).

#### **2.4 Importância clínica dos antígenos eritrocitários em cães**

Idealmente apenas cães negativos para o tipo DEA 1.1 deveriam ser utilizados como doadores, a menos que as células positivas sejam transfundidas para um receptor também positivo para o grupo DEA 1.1 (HOHENHAUS, 2004). Como grande parte da população apresenta o antígeno DEA 1.1, é comum que cães positivos apenas para DEA 1.1 e DEA 4 sejam utilizados como doadores sem maiores riscos (LUCAS et al., 2004).

A idéia de um cão doador universal é bastante controversa. A princípio seria um animal negativo para os grupos DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 3, DEA 5 e DEA 7, mas positivo para DEA 4. Acredita-se que apenas 15 % da população apresente este perfil (LUCAS et al., 2004). Este fato é contestado principalmente devido a um recente relato de reação transfusional em que um cão DEA 4 negativo reagiu a células DEA 4 positivas (GIGER et al., 2005).

Não há relatos da ocorrência de doença hemolítica em recém-nascidos caninos, a menos que a mãe tenha sido sensibilizada por transfusão prévia, ou sensibilização da mãe através da placenta durante a gestação, fato incomum. Anticorpos não são transferidos aos filhotes durante a gestação, embora isso ocorra durante a lactação. Achados clínicos em filhotes acometidos constam de hepatomegalia, esplenomegalia, fraqueza e morte. Os filhotes afetados nascem com hematócrito normal, mas esse decresce ao longo do tempo. Outros achados hematológicos incluem reticulocitose, esferocitose, presença de células sanguíneas nucleadas, hemoglobinemia e hiperplasia eritróide da medula óssea (HOHENHAUS, 2004).

Os anticorpos contra antígenos presentes nos eritrócitos resultam de exposição natural (aloantígenos), experimental ou acidental (adquiridos) do indivíduo ao antígeno que não faz parte da estrutura de suas células (BLANCHER et al., 2000).

Acredita-se que cães não possuem uma quantidade de aloanticorpos naturais clinicamente importante. Algumas fontes sugerem, de forma questionável, que há aloanticorpos correspondentes ao tipo sanguíneo DEA 7 (BRACKER & DRELLICH, 2005). É incomum que a primeira transfusão sanguínea entre dois cães com tipos sanguíneos desconhecidos promova reações transfusionais, mesmo que sejam de tipos

diferentes (BRACKER et al, 2005).

#### 2.4.1 Reações transfusionais, monitoramento e complicações

Feldman (1999) compilou de forma simples a definição clínica de reação transfusional ao afirmar que “indica que o produto administrado não está atuando como deveria, está causando problemas e prejudicando ainda mais um paciente debilitado”. As reações manifestam-se através de uma gama de sinais clínicos e achados laboratoriais e podem ser prevenidas ou minimizadas através da realização de tipagem sanguínea, provas de compatibilidade ou ainda ambos.

Há dois tipos de reações transfusionais, aquelas que ocorrem imediatamente ou até 24 horas após a transfusão e aquelas que podem levar dias, meses ou até anos para ocorrerem. A severidade de tais reações varia de moderada (febre) a severa (morte) (LANEVSKI & WARDROP, 2001).

Maher e colaboradores (1958) realizaram uma série de experimentos envolvendo cães submetidos a procedimentos de hemodiálise, onde sangue “homólogo”, como mencionado pelos autores, era utilizado. Várias reações são descritas nos pacientes, sendo algumas atribuídas à incompatibilidade sanguínea entre doador e receptor. O experimento possibilitou aos autores a identificação de reações tardias, observadas principalmente através do decréscimo do hematócrito dos pacientes. Além disso, observaram reações mais severas em animais que haviam recebido repetidas transfusões chamando a atenção para o desenvolvimento de anticorpos através do estímulo do sistema imune e sensibilização dos animais.

Reações imunológicas podem ser desencadeadas por eritrócitos, leucócitos ou componentes do plasma incompatíveis com o receptor (DAUSSET et al., 1971). Caso o paciente receptor esteja previamente sensibilizado e os eritrócitos recebidos sejam incompatíveis, estes serão destruídos nos vasos sanguíneos, promovendo hemoglobinemia e hemoglobinúria (MORRISSEY, 2000).

Reações transfusionais tardias também podem ocorrer e os principais indícios são o decréscimo do hematócrito no decorrer dos dias após a transfusão (MORRISSEY, 2000). Estudos recentes em humanos atribuem a Antígenos de Histocompatibilidade Menor (mHAs) a responsabilidade por reações transfusionais tardias (crônicas). Tratam-se de peptídeos polimórficos apresentados através do Sistema de Histocompatibilidade

Principal (MHC) desencadeando respostas celulares específicas (células T). Esses antígenos eritrocitários são apresentados pelo MHC classe I às células apresentadoras de antígeno (APC) do receptor, estimulando células T e, conseqüentemente resposta imune. Foi proposto que transfusões crônicas imunizam o receptor contra múltiplos antígenos do doador, contribuindo também para a rejeição de células na medula e outros órgãos. Há indícios também de que os principais responsáveis pelo desencadeamento destas respostas seriam leucócitos presentes em unidades de células vermelhas, o que leva a necessidade de que estas unidades sejam leucorreduzidas (ZIMRING et al., 2006).

Mediante manifestações de reação transfusional deve-se suspender imediatamente a administração do produto, além de administrar fluidos, terapia imunossupressora e suporte terapêutico para combater os sintomas, como febre, emese, tremores, etc. (GIGER et al., 1995). Segundo Feldman (1999), a regra básica a ser seguida para uma transfusão sangüínea bem sucedida está no fato de não administrar ao paciente um antígeno que este ainda não possui.

## **2.5 Métodos de tipagem sangüínea**

O princípio dos métodos de tipagem sangüínea baseia-se na reação de hemaglutinação visível (macroscópica), resultando da ligação dos antígenos de superfície do eritrócito a um conhecido anticorpo monoclonal ou policlonal (GIGER et al., 2005).

Atualmente, os testes de compatibilidade ainda são amplamente utilizados em medicina humana, pois são simples, de fácil execução, baratos, não necessitam de equipamentos especializados e, quando realizados corretamente, são sensíveis e específicos em termos de importância clínica (REID & WESTHOFF, 2003).

Cartões para tipagem sangüínea, impregnados por anticorpos monoclonais, desenvolvidos na Universidade do Estado de Kansas (EUA) ou anticorpos policlonais produzidos na Universidade de Michigan (MSU), que possuem a desvantagem de não serem homogêneos, são as técnicas mais empregadas em medicina veterinária (GIGER et al., 2005).

Os cartões para tipagem sangüínea de cães e gatos estão disponíveis comercialmente (Rapid Vet-H feline e canine blood-typing cards; DMS Laboratories,

Flemington, New Jersey, USA). O teste é simples e rápido de ser realizado, permitindo a detecção do tipo DEA 1.1. Entretanto, esse teste tem a desvantagem de produzir fraca reação com sangue de cães positivos para DEA 1.2, reconhecendo apenas o tipo DEA 1.1 (GIGER et al., 2005).

Alguns outros métodos para tipagem sangüínea de cães surgiram baseados em técnicas de tipagem para humanos que utilizam uma coluna de gel (matriz), a qual estão ligados anticorpos monoclonais contra o tipo DEA 1.1 (BLAIS et al., 2007).

Finalmente, há o método de tipagem sangüínea desenvolvido por pesquisadores japoneses, utilizando anticorpos monoclonais (hemaglutinação em tubo). No entanto, o método ainda não é padronizado e não foram feitos estudos comparativos que estabelecessem com sucesso a relação entre os anticorpos utilizados pelos pesquisadores japoneses e os demais reagentes reconhecidos internacionalmente. Este método utiliza 4 tipos de anticorpos monoclonais, classificando os antígenos caninos da seguinte forma: A, B, D e E (GIGER et al., 2005).

Em recente estudo comparativo, Giger e colaboradores (2005) compararam os métodos de tipagem disponíveis comercialmente nos Estados Unidos da América. Ao comparar os reagentes internacionalmente reconhecidos do sistema DEA (produzidos pela MSU) e os sugeridos pelos pesquisadores japoneses, encontraram correlação apenas entre o tipo DEA 3 e o tipo A do sistema japonês. Os outros tipos sangüíneos aparentemente não demonstraram nenhuma correlação entre si. Ainda no mesmo estudo, concluiu-se que há correlação satisfatória entre os diferentes métodos de tipagem em relação ao tipo sangüíneo DEA 1.1 (GIGER et al., 2005).

Até o momento, existem dois anticorpos monoclonais distintos que são utilizados nos testes de cartão e gel para o grupo DEA 1.1. Os anticorpos policlonais (MSU) necessitam do reagente de Coombs para apresentarem aglutinação satisfatória (BLAIS et al., 2007).

O reagente de Coombs (anti-imunoglobulina G policlonal) ou teste da antiglobulina direta é utilizado para demonstrar a presença de anticorpos ligados à membrana dos eritrócitos sensibilizados *in vivo*, como ocorre em reações transfusionais ou auto-anticorpos como ocorre em casos de Anemia hemolítica auto-imune (AHAI) ou na Doença da aglutinina fria (CHAD) (REID & WESTHOFF, 2003). No caso de pacientes com AHAI ocorre reconhecimento de autoanticorpos ou complemento (C3) presentes na membrana (DAY et al., 1999).

Aglutinação indireta é usada para detectar antígenos na superfície de eritrócitos sensibilizados *in vitro*, como em tipagens sanguíneas, detecção de anticorpos e identificação e provas-cruzadas (*crossmatching*). Na tipagem sanguínea, o reagente reconhece os anticorpos (do antisoro) ligados aos antígenos de superfície do eritrócito (REID & WESTHOFF, 2003).

A utilização de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos permite a melhor padronização no que diz respeito a detecção do tipo DEA 1.1. Grande parte dos autores é unânime ao dizer que não há como obter resultados conclusivos quando se utilizam antisoros policlonais sem utilizar o reagente de Coombs. Tais observações somam-se à maior disponibilidade dos antisoros monoclonais, bem como suas práticas formas de apresentação e de fácil utilização na clínica (cartão e gel) (BLAIS et al., 2007). Para realização da tipagem sanguínea há necessidade de que as amostras contenham anticoagulantes como EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) ou mesmo ACD (Solução Ácido Citrato Dextrose) (WARDROP, 2000).



### **3 FREQUÊNCIA DE TIPOS SANGÜÍNEOS EM UMA POPULAÇÃO DE CÃES DE RAÇA DE PORTO ALEGRE E REGIÃO METROPOLITANA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

*Frequency of blood types in a population of purebred dogs in Porto Alegre and Metropolitan Region, Rio Grande do Sul, Brazil*

Vanessa Sinnott Esteves<sup>a\*</sup>, Luciana de Almeida Lacerda<sup>a</sup>, Camila Serina Lasta<sup>a</sup>, Viviane Pedralli<sup>a</sup>, Félix H. D. González<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Bento Gonçalves, 9090 - 91540.000 - Porto Alegre, RS. \*E-mail: vanessastvs@yahoo.com.br

#### **Resumo**

Nas últimas décadas, a transfusão sangüínea e o estudo da imuno-hematologia em cães tornou-se importante no tratamento de diversas doenças. No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento no sentido de definir as frequências de tipos sangüíneos em diferentes populações de cães. O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência dos tipos sangüíneos em uma população definida de cães de raça (Golden Retriever, Pastor Alemão, Rottweiler, Dogue Alemão e Dogo Argentino) da região Metropolitana de Porto Alegre. Foram selecionados 100 cães, sendo 20 de cada uma das raças anteriormente citadas, entre 1 e 8 anos, sem distinção de sexo e clinicamente saudáveis. Amostras de sangue foram coletadas das veias cefálica ou safena lateral e a tipagem realizada através do teste de aglutinação em tubos, padronizado pelo Laboratório de Imuno-hematologia e Sorologia da Universidade de Michigan (MSU, Estados Unidos) utilizando antisoro policlonal produzido em cães por meio de iso-imunização. Os resultados encontrados estão de acordo com os relatados previamente na literatura. A população estudada apresentou frequência de 62% para o tipo DEA 1.1, 21% para o tipo DEA 1.2, 7% para o tipo DEA 3, 100% para o tipo DEA 4, 9% para o tipo DEA 5 e 16% para o tipo DEA 7. Houve diferenças entre raças na frequência dos vários tipos sangüíneos, devendo se levar em consideração este aspecto em procedimentos de transfusão. Recomenda-se que testes de compatibilidade devem ser sempre empregados para minimizar riscos de reações transfusionais.

Palavras-chave: cães, raças, tipo sangüíneo, imuno-hematologia, , transfusão sangüínea.

## **Abstract**

*Over the past few decades, blood transfusions and the study of canine immunohematology have become extremely important for the treatment of a variety of diseases. However, few studies have been conducted currently to define the frequencies of these different blood types in different populations, including dogs from different breeds. The objective of this study was to determine the the blood types frequency in a given population of 5 selected breeds (Golden Retriever, German Shepherd, Rottweiler, Great Dane and Dogo Argentino) from Porto Alegre and the surrounding Region. One hundred clinically healthy dogs were chosen, 20 from each of the aforementioned breeds, between the ages of 1 and 8, with no distinction between genders. Blood samples were taken from cephalic or lateral saphenous veins and the blood was typed using the agglutination test in tubes, standardized by the Immunohematology and Serology Laboratory of the University of Michigan (Michigan – United States) using specific reagents (polyclonal serum produced in dogs by means of isoimmunization). The results found are in agreement with those previously found in the literature. The sample used presented frequencies of 62% for type DEA 1.1, 21% for type DEA 1.2, 7% for type DEA 3, 100% for type DEA 4, 9% for type DEA 5 and 16% for type DEA 7. Specific frequencies of the blood types were found among the different breeds studied, which must be taken into account during blood transfusions. Compatibility tests should be used together with blood typing to minimize risks of transfusion reactions.*

*Key-words: dogs, breeds, blood types, blood transfusion, immunohematology.*

## **Introdução**

Grandes avanços na área de imuno-hematologia e transfusão sangüínea ocorreram nas últimas décadas devido a necessidade de maior compreensão do assunto e maior preocupação com as conseqüências de transfusões sangüíneas incompatíveis (Morrisey et al., 2001).

Atualmente são reconhecidos internacionalmente 7 tipos sangüíneos caninos, com disponibilidade de antisoros para apenas 5 deles. Os antisoros disponíveis contra antígenos do sistema DEA, único sistema reconhecido internacionalmente, são DEA 1 (DEA 1.1, DEA 1.2), DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7 (Blais et al., 2007).

Os grupos sangüíneos são definidos por antígenos polimórficos, espécie-específicos, presentes na superfície dos eritrócitos e demonstrados a partir de reações imunes utilizando anticorpos (Reid & Westhoff, 2003). Os antígenos eritrocitários podem variar em imunogenicidade e significado clínico e a detecção e descrição destes é realizada através de testes sorológicos (Hohenhaus, 2004).

É de suma importância que antes de qualquer transfusão seja realizada a tipagem sangüínea e testes de compatibilidade (prova cruzada) em todos os animais, principalmente aqueles expostos a produtos sangüíneos ou com histórico de prenhez a fim de verificar incompatibilidades entre doador e receptor, podendo diminuir o número e severidade de reações transfusionais (Lucas et al., 2004; Bracker & Drellich, 2005).

A tipagem sangüínea permite a identificação dos grupos sangüíneos de pacientes receptores ou candidatos a doador, verificando se possuem antígenos de superfície eritrocitários semelhantes (Feldman, 1999; Lanevski & Wardrop, 2001).

Em 1999, Novais et al. realizaram experimento compreendendo 150 cães de diferentes raças, obtendo índices de 91,3% dos animais positivos para o tipo DEA 1, sendo destes 51,3% DEA 1.1 positivos, 40% positivos para o tipo DEA 1.2 e 8,7% dos cães negativo para o grupo DEA 1.

No ano de 2003, Novais, a partir de uma amostra de 200 cães de diferentes raças, determinou as seguintes frequências para os tipos sangüíneos: 60,5 % positivos para o tipo DEA 1.1, 38,5% da amostra positiva para o tipo DEA 1.2, 10,5 % para o tipo DEA 3, 96,5% para o tipo DEA4, 10,5% dos animais eram positivos para o tipo DEA 5 e apenas 9,5% positivos para o tipo DEA 7.

Grande parte dos estudos realizados até o momento não consideram variações dos tipos sangüíneos entre diferentes raças e suas frequências. Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a frequência dos tipos sangüíneos em uma população definida de cães de raça (Golden Retriever, Pastor Alemão, Rottweiler, Dogue Alemão e Dogo Argentino) da região Metropolitana de Porto Alegre.

### ***Material e Métodos:***

#### ***Animais***

Foram utilizados um total de 100 cães, sendo 20 de cada uma das seguintes raças: Golden Retriever, Pastor Alemão, Dogo Argentino, Rottweiler e Dogue Alemão. Os

animais selecionados apresentavam idades entre 1 e 8 anos, de ambos os sexos e eram clinicamente saudáveis. Todos os cães utilizados no estudo pertencem a criadores registrados no estado do Rio Grande do Sul ou a proprietários particulares. Os animais foram avaliados e selecionados conforme critérios pré-estabelecidos, realizado mediante a autorização dos proprietários, os quais foram informados previamente sobre todos os procedimentos realizados.

Os critérios para a seleção das raças utilizadas no presente trabalho obedeceram às características padrão para cães doadores de sangue, tais como: fácil acesso venoso (veias calibrosas), temperamento (tais raças são comumente utilizadas como animais doadores de sangue devido à docilidade e temperamento calmo) e disponibilidade no número de animais. O volume de amostra retirado (15,5 mL) não foi prejudicial ao animal.

### ***Amostragem***

As amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa cefálica ou safena lateral utilizando-se sistema de coleta a vácuo (BD Vacutainer, Becton Dickinson, São Paulo, Brasil). Foram utilizados tubos contendo anticoagulante EDTA K<sub>2</sub> (ácido etilenodiaminotetracético dipotássico) para a realização de hemograma (3 mL), tubos contendo ACD-A (Ácido-Citrato-Dextrose) (8,5 mL) para a análise da tipagem sangüínea e tubos de 4 mL sem aditivo para obtenção do soro, para a realização das análises bioquímicas.

### ***Análises laboratoriais***

Com o objetivo de avaliar o estado geral dos animais foram realizados hemograma e determinação da concentração sérica de creatinina e da atividade sérica da enzima alanina amino-transferase (ALT).

As contagens globais do hemograma foram realizadas em amostras de sangue com anticoagulante EDTA, utilizando-se contador automático (modelo Celm 530, Celm, São Paulo, Brasil). Para a contagem diferencial de leucócitos, os esfregaços sangüíneos foram corados com corante Panótico Rápido (Laborclin, Curitiba, PR).

As análises bioquímicas foram feitas no soro sangüíneo. A atividade da enzima ALT foi determinada através do método de Reitman e Frankel e a determinação da creatinina pelo método do picrato alcalino. As análises bioquímicas foram realizadas utilizando

kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), por meio de espectrofotometria, conforme descrito nos protocolos de realização dos exames, utilizando espectrofotômetro Metrolab 160 Plus (Argentina).

As amostras de sangue armazenado com ACD-A para tipagem sanguínea foram submetidas a centrifugação para separação do plasma, o qual foi submetido posteriormente a três lavagens consecutivas com solução tampão fosfato (PBS) a 2250 g (3500 rpm), durante 5 minutos. As hemácias foram suspensas em solução a 5% (50  $\mu$ L de papa de hemácias em 1000  $\mu$ L de PBS).

A tipagem sanguínea foi realizada por meio do teste de aglutinação em tubos, padronizado pelo Laboratório de Imuno-hematologia e Sorologia da Universidade de Michigan (MSU, Estados Unidos) utilizando soro policlonal produzido em cães por meio de iso-imunização. Segundo indicação do fabricante, deve-se realizar inicialmente a tipagem para DEA 1.X e para aqueles resultados positivos utiliza-se o reagente DEA 1.1 (Giger et al., 2005). No presente trabalho, entretanto, ambos testes foram realizados.

### ***Tipagem anti-DEA 1***

Para cada animal testado, dois tubos de 12 x 75 mm foram identificados como tubo 1: controle e tubo 2: anti-DEA 1.X. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de PBS no tubo 1 e 50  $\mu$ L de anti-DEA 1.X no tubo 2, seguido do acréscimo de 50  $\mu$ L de suspensão de hemácias a 5% em cada tubo. Depois de incubação durante 15 minutos a 37°C, e realizada centrifugação a 2.250 g, durante 15 segundos, e procede-se à leitura para a reação de aglutinação. Para o antisoro DEA 1.1 foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o tipo DEA 1.X. O teste para o tipo DEA 1.1 foi realizado após a obtenção dos resultados para o tipo DEA 1.X

A leitura utiliza o seguinte esquema (resultados representados na Figura 1):

Negativo (-)	nenhuma reação (animal negativo para o sorotipo testado)
Uma cruz (+1)	vários grumos pequenos em sobrenadante avermelhado
Doas cruzes (+2)	vários grumos um pouco maiores em sobrenadante ligeiramente avermelhado
Três cruzes (+3)	um grumo médio e alguns grumos pequenos em sobrenadante quase límpido
Quatro cruzes (+4)	um único grande grumo em sobrenadante límpido

Todos os animais que apresentaram reações negativas ou até 1 + para os antisoros anti-DEA 1.X e anti-DEA 1.1 foram submetidos a três lavagens com PBS (1 mL), obedecendo o mesmo esquema de centrifugação anteriormente descrito. Após as lavagens, retirou-se o sobrenadante (PBS) e acrescentou-se 50  $\mu$ L de reagente de Coombs canino (antisoro de cabra anti IgG, anti IgM, anti C3 canino, Washington, USA) para realização do teste da antiglobulina direta. As amostras foram incubadas novamente a 37°C por 15 minutos e, após, a leitura realizada conforme descrito anteriormente. O resultado obtido após a realização do teste de Coombs foi o considerado definitivo.

#### ***Tipagem anti-DEA 3, 4, 5 e 7***

Para cada animal testado, cinco tubos foram identificados como se segue: tubo 1 controle, tubo 2 anti-DEA 3, tubo 3 anti-DEA 4, tubo 4 anti-DEA 5 e tubo cinco anti-DEA 7. Em seguida, adicionaram-se 40  $\mu$ L de PBS no tubo 1 e 40  $\mu$ L de anti-DEA 3, 4, 5 e 7, respectivamente, nos tubos restantes. Na etapa seguinte, acrescentou-se 40  $\mu$ L de suspensão de hemácias a 4% do animal a ser tipado, em todos os tubos, os quais foram incubados durante 30 minutos a 4°C, e posteriormente centrifugados a 2.250 g, durante 15 segundos, realizando-se a leitura para a reação de aglutinação, utilizando-se o esquema descrito anteriormente.

#### ***Resultados e Discussão***

As amostras que apresentaram resposta negativa ou até 1+ foram consideradas negativas e as amostras com reação de 2+ a 4+ foram consideradas positivas para todos os

antiseros utilizados no experimento.

A Tabela 1 apresenta as frequências dos tipos sanguíneos para as raças estudadas. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os relatados na literatura (Ejima et al., 1986; Giger, 2005). Deve-se considerar, no entanto, que o número de cães utilizados no presente estudo é pequeno, portanto tais resultados não devem ser considerados como absolutos.

A frequência geral do tipo DEA 1 foi elevada, conforme o esperado, sendo maior para o grupo DEA 1.1, seguido do DEA 1.2 e do DEA 1 negativo (Ejima et al., 1986; Giger, 2005).

Swisher e Young (1961) estabeleceram frequências de 44% para o tipo DEA 1.1 em uma amostra composta por 332 cães mestiços. O mesmo autor, no ano de 1973, encontrou resultados semelhantes, com 40% dos animais testados positivos para o tipo DEA 1.1. Em 1975, Suzuki e colaboradores verificaram uma frequência de 36% de DEA 1.1 em 61 cães. Da mesma forma, Wriesendorp e colaboradores (1976) obtiveram frequências para DEA 1.1 de 36% em cães mestiços, 43% em Beagles e 29% em Retrievers. Kohn (1998) testou 88 animais para o tipo DEA 1.1, estabelecendo uma frequência de 52%. Giger e colaboradores (1995) em experimento realizado com 224 cães relatam que 33% dos cães testados eram positivos para o tipo DEA 1.1, enquanto as frequências encontradas para o tipo DEA 1.2 estavam abaixo dos valores citados na literatura. Mencionam ainda, que as variações encontradas podem ser atribuídas a amostragem pequena, variações geográficas ou diferenças nos antiseros utilizados.

Os resultados obtidos também estão de acordo com Novais et al. (1999) que em experimento compreendendo 150 cães de diferentes raças, obteve índices de 91,3% dos animais positivos para o tipo DEA 1, sendo destes 51,3% positivos para DEA 1.1, 40% positivos para o tipo DEA 1.2 e 8,7% dos cães negativo para o grupo DEA 1.

No ano de 2003, Novais, a partir de uma amostra de 200 cães de diferentes raças, determinou as seguintes frequências gerais para os tipos sanguíneos: 60,5 % positivos para o tipo DEA 1.1, 38,5% da amostra positiva para o tipo DEA 1.2, 10,5 % para o tipo DEA 3, 96,5% para o tipo DEA4, 10,5% dos animais eram positivos para o tipo DEA 5 e apenas 9,5% positivos para o tipo DEA 7.

Para cada uma das raças verificou-se também as combinações de tipos sanguíneos mais frequentes conforme verifica-se na tabela 2.

Algumas particularidades podem ser atribuídas às raças testadas. Na literatura não há

dados a respeito de algumas dessas raças, o que apenas permite a comparação com valores da população em geral.

Os tipos DEA 3 (7%), DEA 5 (9%) e DEA 7 (16%) apresentaram frequências baixas na população total utilizada no estudo, o que está de acordo com estudos prévios (Ejima et al., 1986).

O tipo sanguíneo DEA 4 apresentou frequência de 100% nos animais estudados, demonstrando ser o antígeno mais comum, conforme já havia sido descrito por Swisher e Young (1961), que relataram frequências de 98% para a população canina geral.

Nas raças Pastor Alemão e Dogo Argentino, as frequências dos tipos DEA 1.2 e DEA 1 negativo encontradas são mais elevadas que em relação às outras raças utilizadas. Dentre todos os cães Dogo Argentinos utilizados, apenas dois (10%) foram positivos para o tipo DEA 1.1.

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos relatados para a raça Pastor Alemão por Ejima e colaboradores (1986). Apesar do pequeno número de animais utilizados por esses autores (6), nenhum deles apresentou positividade para o tipo DEA 1.1. O tipo DEA 1.2 apresentou frequências de 40%, enquanto o tipo DEA 1 negativo 60%. Ainda, com relação a essa raça, nenhum dos animais utilizados pelos autores era positivo para o tipo DEA 3 e baixa frequência foi encontrada para o tipo DEA 5, enquanto no presente estudo ambos tipos apresentaram frequências de 15%.

A combinação de tipos sanguíneos mais comumente encontrada no presente estudo é a de DEA 1.1 positivo e DEA 4 positivo, com frequências de 85% para animais da raça Rottweiler, 80% para Dogue Alemão e 70% para Golden Retriever (Tabela 2). Estudos prévios haviam descrito a elevada frequência do tipo DEA 1.1 para a raça Rottweiler (78%) (Gracner et al., 2007).

Duas raças apresentaram diferenças marcantes com relação ao resto de cães. Na raça Dogo Argentino, a frequência da combinação DEA 1.1 positivo e DEA 4 positivo foi de apenas 10% e nenhum animal da raça Pastor Alemão apresentou tal combinação de antígenos. Para estas duas raças, a combinação de antígenos mais frequente foi DEA 1.2 positivo e DEA 4 positivo, com 55% para a Dogo Argentino e 30% para a Pastor Alemão.

Outra característica destas duas raças é que os valores encontrados para animais positivos apenas para o antígeno DEA 4 foram elevados quando comparadas às outras raças, sendo de 20% na raça Pastor Alemão e 35% na raça Dogo Argentino. A literatura



descreve que aproximadamente 15% da população apresenta apenas o antígeno DEA 4 (Lucas et al., 2004). Para as raças Golden Retriever e Dogue Alemão, 5% da amostra era positiva apenas para DEA 4 e não foram encontrados animais Rottweiler com tal perfil.

Grande parte dos estudos realizados até o momento não considera a frequência dos tipos sanguíneos em relação a raças distintas, e sim a uma população geral, o que dificulta a interpretação de diferenças significativas entre as diferentes raças (Gracner et al., 2007). Há que se considerar que para a criação de algumas dessas raças diversas gerações de outras raças foram cruzadas entre si. Levanta-se a hipótese de que os tipos sanguíneos de tais raças também apresentariam características semelhantes. Entretanto, essa afirmação não se confirmaria quando se observa que uma das raças que deu origem à raça Dogo Argentino é a Dogue Alemão (Tauz et al., 2005), e essas duas raças apresentaram características de antígenos eritrócitários bastante diferentes no presente estudo. Obviamente há outras diversas variáveis e raças envolvidas no processo, mas é interessante pensar nas características de herdabilidade de tais antígenos de superfície, bem como as implicações que tais diferenças entre raças possuem no momento de selecionar doadores de sangue.

### ***Conclusão***

Foram encontradas particularidades no que diz respeito aos tipos sanguíneos de cada raça, o que deve ser considerado em casos de transfusões sanguíneas. Deve-se realizar mais estudos para definir se há diferenças significativas entre os padrões de tipos sanguíneos de outras raças.

Aconselha-se o emprego de testes de compatibilidade em conjunto com a tipagem sanguínea para minimizar riscos de reações transfusionais.

### **Agradecimentos**

Agradecimentos à equipe executora e aos proprietários dos animais envolvidos no estudo.

### **Referências**

BLAIS, M-C. et al. Canine *Dal* Blood Type: A Red Cell Antigen Lacking in Some

Dalmatians. **J Vet Intern Med.** V. 21, pp. 281-286, 2007.

BRACKER, K. E., DRELLICH, S. Transfusion Reactions. **Compendium**, julho 2005.

EJIMA, H.; KUROKAWA, K.; IKEMOTO, S. Phenotype and gene frequency of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. **Jpn. J. Vet. Sci.** , v. 48, p. 363-368, 1986.

FELDMAN, B. F. In-House Canine and Feline Blood Typing. **Journal of the American Animal Hospital Association.** V. 35, pp. 455-456, 1999.

GIGER, U. et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. **JAVMA**, v.206, n. 9, p. 1358-1362, 1995.

GRACNER, D. et al. Blood groups and haematology in Istrian pointers. **Veterinarski Arhiv.** V. 77, n. 2, pp. 95-102, 2007.

HOHENHAUS, A. E. Importance of Blood Groups and Blood Group Antibodies in Companion Animals. **Transfusion Medicine Reviews.** V. 18, n. 2, pp. 117-126, abril, 2004.

LANEVSKI, A., WARDROP, K. J.; Principles of transfusion medicine in small animals. **J. Can. Vet.**, v. 42, p. 447-454, 2001.

LUCAS, R. L., LENTZ, K. D., HALE, A. S. Collection and Preparation of Blood Products. **Clinical Techniques in Small Animal Practice.**, v. 19, n. 2, p. 55-62, 2004.  
MORRISSEY, P. I Need Blood, Stat! Canine Transfusion Medicine. **Veterinary Technician.** V. 21, n. 5, maio, 2000.

NOVAIS, A. A ; SANTANA, A E; VICENTIN, L A. Prevalence of DEA 1 canine blood group system in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) reared in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1/3, p.23-27, 1999.

REID, M. E.; WESTHOFF, C. M. Membrane Blood Group Antigens and Antibodies. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. .E.; NESS, P. M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine –Basic Principles & Practice.** Churchill Livingstone, 1 ed., 2003, p. 11-19.

SUZUKI, K. ET AL. New antibodies in dog blood groups. **Transplantation Proceedings**, v. 7, n. 3, p. 365-367, 1975.

SWISHER, S. N., YOUNG, L. E. The blood grouping systems of dogs. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 41, p. 495-520, 1961.

## Tabelas

**Tabela 1. Frequência dos tipos sanguíneos do sistema DEA em diferentes raças de cães (n= 100) na região de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil).**

RAÇA	Nº ANIMAIS		TIPO SANGÜÍNEO DEA						
	MACHOS	FÊMEAS	1.1	1.2	1 neg	3	4	5	7
Dogue Alemão	7	13	95	0	5	15	100	5	15
Rottweiler	8	12	100	0	0	0	100	0	15
Golden Retriever	8	12	95	0	5	5	100	20	25
Pastor Alemão	9	11	10	50	40	15	100	15	25
Dogo Argentino	6	14	10	50	40	0	100	0	0
Frequência Geral			62	21	17	7	100	9	16

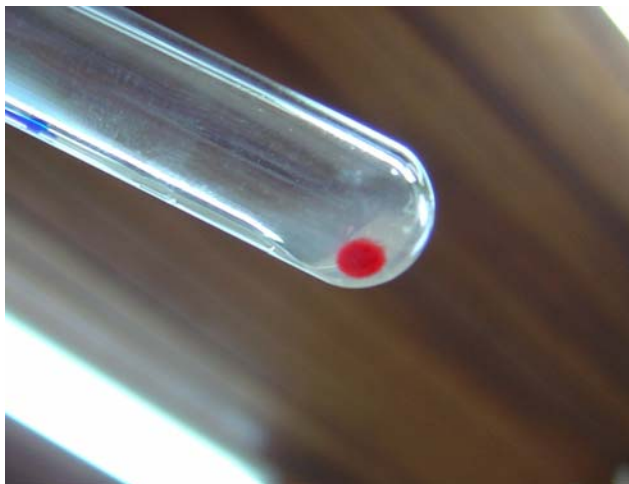
**Tabela 2. Frequências das combinações de grupos sanguíneos encontrados por raça.**

COMBINAÇÕES	FREQUÊNCIA ENCONTRADA POR RAÇA (%)				
	Dogue Alemão	Rottweiler	Golden Retriever	Pastor Alemão	Dogo Argentino
DEA 1.1, DEA 4	80	85	70	0	10
DEA 4	5	0	5	20	35
DEA 1.1, DEA 3, DEA 4, DEA 7	10	0	0	5	0
DEA 1.1, DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 7	5	0	5	0	0
DEA 1.1, DEA 4, DEA 7	0	15	5	0	0
DEA 1.1, DEA 4, DEA 5, DEA 7	0	0	15	0	0
DEA 1.2, DEA 4, DEA 5	0	0	0	5	0
DEA 1.2, DEA 4	0	0	0	30	55
DEA 1.2, DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 7	0	0	0	5	0
DEA 1.2, DEA 3, DEA 4, DEA 7	0	0	0	15	0
DEA 4, DEA 5	0	0	0	10	0
DEA 4, DEA 7	0	0	0	5	0
DEA 1.2, DEA 4, DEA 7	0	0	0	5	0

## Figuras



**Figura 1. Reações de hemaglutinação nos testes de tipagem sanguínea. Da esquerda para direita: negativo, 1+, 2+, 3+.**



**Figura 2. Reação de hemaglutinação nos testes de tipagem sanguínea. Representada reação classificada como 4+.**

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso adequado e seguro do sangue e seus componentes está diretamente relacionado ao conhecimento dos tipos sanguíneos do animal doador e receptor, visando diminuir complicações e possíveis reações transfusionais, assegurando assim, o sucesso do tratamento.

A proposta de se realizar testes como a tipagem sanguínea e testes de compatibilidade antes de procedimentos de transfusão é fazer com que estes ofereçam maior segurança e benefício ao paciente, sem provocar danos ou destruição celular, além de considerar o fato de que, caso o animal necessite de transfusões sanguíneas futuras, não estará sensibilizado aos antígenos eritrocitários e, conseqüentemente, terá maior possibilidade de sucesso no procedimento.

Várias questões no que diz respeito a particularidades dos grupos sanguíneos caninos nas diferentes raças permanecem sem esclarecimento, deixando evidente a necessidade de mais pesquisas na área. Ressalta-se, ainda, a importância da criação de um método de tipagem sanguínea mais preciso, visto que reagentes policlonais, que são os mais utilizados, não têm características homogêneas entre lotes.

Espera-se que este trabalho possa contribuir para melhor compreensão dos antígenos eritrocitários caninos em diferentes raças, servindo de embasamento para futuras pesquisas.

## REFERÊNCIAS

- ANDREWS, G.A., CHAVEY, P.S., SMITH, J. E. Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n. 10, p. 1549-1552, 1992.
- ANDREWS, G.A. Red blood cell antigens and blood groups in the dog and cat. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. (Ed.). **SCHALM'S Veterinary hematology**, Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., p. 767-773, 2000.
- BLAIS, M-C. et al. Canine *Dal* Blood Type: A Red Cell Antigen Lacking in Some Dalmatians. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 21, p. 281-286, 2007.
- BLANCHER, A.; REID, M. E.; SOCHA, W. W. Cross-reactivity of Antibodies to Human and Primate Red Cell Antigens. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 14, n. 2, p. 161-179, abril, 2000.
- BRACKER, K. E., DRELLICH, S. Transfusion Reactions. In: COMPENDIUM. [s.l: S.h], 2005.
- CALLAN, M.B., JONES L. T., GIGER, U. Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a common antigen. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 4, p. 277-279, 1995.
- CORATO, A., MAZZA, G., HALE, A.S., BARKER, R.N., DAY, M.J. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 59, p. 312-323, 1997.
- DAUSSET, J. et al. Histocompatibility Studies in a Closely Bred Colony of Dogs. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 134, p. 1222-1237, 1971.
- DAY, M. J. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 69, p. 215-225, 1999.
- DZIK, W. H. The James Blundell Award Lecture 2006: transfusion and the treatment of haemorrhage: past, present and future. **Transfusion Medicine**. v. 17, p. 367-374, 2007.
- EJIMA, H.; KUROKAWA, K. Comparison test of antibodies for dog blood grouping. **Japanese Journal of Veterinary Science**. v. 42, p. 435-441, 1980.
- EJIMA, H.; KUROKAWA, K.; IKEMOTO, S. Phenotype and gene frequency of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. **Japanese Journal of Veterinary Science**. v. 48, p. 363-368, 1986.

FELDMAN, B. F. In-House Canine and Feline Blood Typing. **Journal of the American Animal Hospital Association.** v. 35, p. 455-456, 1999.

GIGER, U. et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.206, n. 9, p. 1358-1362, 1995.

GIGER, U., STIGER, K., PALOS, H. Comparison of various canine blood-typing methods. **American Journal of Veterinary Research.** v. 66, n. 8, p. 1386-1392, 2005.

GRACNER, D. et al. Blood groups and haematology in Istrian pointers. **Veterinarski Arhiv.** v. 77, n. 2, p. 95-102, 2007.

HARA, Y. et al. Preparation of monoclonal antibodies against dog erythrocyte antigen D1 (DEA 3). **Journal of Veterinary Medical Science.** v. 53, p. 1105-07, 1991.

HOHENHAUS, A. E. Importance of Blood Groups and Blood Group Antibodies in Companion Animals. **Transfusion Medicine Reviews.** V. 18, n. 2, pp. 117-126, abril, 2004.

JUTKOWITZ, L. A. Blood Transfusion in the Perioperative Period. **Clinical Techniques in Small Animal Practice.** V. 19, n. 2, pp 75-82, may, 2004.

LANEVSKI, A., WARDROP, K. J.; Principles of transfusion medicine in small animals. **Canadian Veterinary Journal.** v. 42, p. 447-454, 2001.

LUCAS, R. L., LENTZ, K. D., HALE, A. S. Collection and Preparation of Blood Products. **Clinical Techniques in Small Animal Practice.**, v. 19, n. 2, p. 55-62, 2004.

MAHER, F. T.; LEE, M. D.; WATKINS, Jr.; BROADBENT, J. C. Significance of Homologous Donor Blood to the Toxic Reaction in Dogs Undergoing Extracorporeal Hemodialysis. **Circulation Research.** v. 6, jan, 1958.

MORRISSEY, P. I Need Blood, Stat! Canine Transfusion Medicine. **Veterinary Technician.** v. 21, n. 5, may, 2000.

NOVAIS, A . A ; SANTANA, A E; VICENTIN, L A. Prevalence of DEA 1 canine blood group system in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) reared in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1/3, p.23-27, 1999.

NOVAIS, A.A. **Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos em cães domésticos (*Canis familiaris*) e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) criados no Brasil.** Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

REID, M. E.; WESTHOFF, C. M. Membrane Blood Group Antigens and Antibodies. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E.; NESS, P. M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine – Basic Principles & Practice**. Churchill Livingstone, 1 ed., 2003, p. 11-19.

ROZANSKI, E. Transfusion Medicine in Veterinary Emergency and Critical Care Medicine. **Clinical Techniques in Small Practice**. v. 19, n. 2, pp 83-87, may, 2004.

SCHMIDT, P. J., LEACOCK, A. G. Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados. **British Medical Journal**. v. 325, p. 1485-1487, 2002.

SUZUKI, K. ET AL. New antibodies in dog blood groups. **Transplantation Proceedings**, v. 7, n. 3, p. 365-367, 1975.

SWISHER, S. N., YOUNG, L. E. The blood grouping systems of dogs. **Physiological Reviews**. v. 41, p. 495-520, 1961.

SYMONS, M., BELL, K. Expansion of the canine A blood group system. **Animal Genetics**. v. 22, p. 227-235, 1992.

TAUZ, B., et al. **Larousse dos cães: comportamento, cuidados, raças**. Larousse do Brasil, 1 ed, São Paulo, 2005, 288 p.

WARDROP, K.J. Clinical blood typing and crossmatching. **Schalm's Veterinary Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., 2000, p. 795-798.

WIENER, A. S. WEXLER, I. B. The Mosaic Structure of Red Blood Cell Agglutinogens. **Bacteriological Reviews**. v. 16, n. 2, pp. 69-87, 1952.

YOUNG, L. E.; ERVIN, D. M.; YUILE, C. L. Hemolytic Reactions Produced in Dogs by Transfusion of Incompatible Dog Blood and Plasma. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF HEMATOLOGY. Buffalo, New York, aug, 1948.

YOUNG, L. E. et al. Hemolytic Disease in Newborn Dogs. **Blood- the Journal of Hematology**. v. 6, n. 4, p. 291-313, 1951.

ZIMRING, J. C. et al. Immunization to minor histocompatibility antigens on transfused RBCs through crosspriming into recipient MHC class I pathways. **Blood- the Journal of Hematology**. v. 107, n. 1, jan, 2006.