



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DE ESTOQUES DE FERRO NA MEDULA**

**ÓSSEA DE GATOS JOVENS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS:**

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA**

**Nilson Júnior da Silva Nunes**

**Porto Alegre**

**2019**

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

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DE ESTOQUES DE FERRO NA MEDULA  
ÓSSEA DE GATOS JOVENS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS:  
DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA**

**Autor:** Nilson Júnior da Silva Nunes  
Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
– UFRGS como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Veterinárias

**Orientador:** Félix Hilário Diaz  
González

**Co-orientadora:** Stella de Faria Valle

Porto Alegre

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

#### CIP - Catalogação na Publicação

da Silva Nunes, Nilson Júnior  
AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DE ESTOQUES DE FERRO NA  
MEDULA ÓSSEA DE GATOS JOVENS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS:  
DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA / Nilson Júnior  
da Silva Nunes. -- 2019.  
44 f.  
Orientador: Félix Hilário Diaz González.

Coorientadora: Stella de Faria Valle.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Gatos. 2. Medula Óssea. 3. Citologia. 4. Ferro. 5. Mielograma. I. Hilário Diaz González, Félix, orient. II. de Faria Valle, Stella, coorient. III. Título.

Nilson Júnior da Silva Nunes

AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DE ESTOQUES DE FERRO NA MEDULA ÓSSEA  
DE GATOS JOVENS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS: DETERMINAÇÃO DE  
VALORES DE REFERÊNCIA

Aprovado em 12 de MAR 2019

APROVADO POR:

---

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

---

Prof. Dr. Alexandre Krause  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Raqueli Teresinha França  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Fernanda Vieira Amorim da Costa  
Membro da Comissão

## RESUMO

A medula óssea possui a função de produção de todos os tipos celulares, respondendo de maneira sensível à demanda dessas células pelo organismo através da ação de fatores de crescimento hematopoiéticos. Assim, a citologia da medula óssea é indicada para investigar anormalidades encontradas no hemograma ou algumas anormalidades pontuais, como hipertermia, hipoproteinemia e demais alterações de origem desconhecida. O objetivo deste presente estudo foi avaliar quali e quantitativamente citologias obtidas por aspirados de medula óssea de felinos jovens clinicamente saudáveis, determinando valores de referência para o mielograma, bem como avaliar os parâmetros do metabolismo do ferro. Para isso, foram analisados aspirados de medula óssea de 41 felinos domésticos jovens, clinicamente saudáveis, de ambos os sexos, sem raça definida e sorologicamente negativos para retrovírus. Em relação ao metabolismo do ferro, foram avaliados o ferro sérico, a capacidade total e livre de ligação do ferro, transferrina e o índice de saturação de transferrina, além da presença de estoques de ferro da medula óssea. Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados e os testes T e Mann-Whitney para verificar as diferenças entre machos e fêmeas, além da estatística descritiva com avaliação de média, desvio padrão (DP), mediana e intervalo de confiança de 95%. Do total de citologias de medula óssea analisadas, 23 eram de fêmeas (56,1%) e 18 de machos (43,9%), com idade média de 1,8 anos (6 meses a 5 anos). A contagem celular diferencial e classificação das medulas ósseas foram realizadas em todas as amostras. Na avaliação do mielograma, apenas os metarrubríctos apresentaram diferença significativa entre machos e fêmeas, enquanto que na avaliação do metabolismo do ferro, a capacidade total e livre de ligação do ferro e a transferrina mostraram diferenças. Em relação à avaliação dos estoques de ferro da medula óssea desses animais, 11 (26,8%) apresentavam estoque de ferro positivo na medula óssea através da avaliação dos esfregaços e confirmados pela coloração de azul da Prússia. Destes, 9 (81,8%) eram fêmeas e 2 (18,2%) eram machos. Conclui-se que existem certos padrões de populações específicas que podem variar quando comparados com trabalhos já existentes. O presente trabalho propõe novos valores de referência para contagens celulares de medula óssea em felinos jovens clinicamente saudáveis, além de confirmar a presença de depósitos de ferro na medula óssea destes animais.

**Palavras-chave:** mielograma; citologia; linhagens celulares; ferro.

## ABSTRACT

*Bone marrow has a production function of all cell types, responding to the body's ability to defend cells through the action of hematopoietic growth factors. Thus, cytology of the bone marrow is indicated to investigate abnormalities found without hemogram or some specific abnormalities, such as hyperthermia, hypoproteinemia and other changes of unknown source. The present study was evaluated quantitatively and qualitatively cytological by bone marrow aspirates from healthy cats, determining reference values for the myelogram, as well as iron metabolism parameters. For this, bone marrow aspirates were analyzed from 41 healthy adult domestic cats, of both sexes and without breed and serologically negative alterations for retroviruses. In relation to iron metabolism, serum iron, total and free iron binding capacity, transferrin and transferrin saturation index, as well as the presence of iron stores in the bone marrow were evaluated. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normality of the data and the T test and Mann-Whitney test to verify the differences between males and females, as well as the descriptive statistics with mean, standard deviation (SD), median and interval confidence of 95%. Of the total number of bone marrow cytologies analyzed, 23 were females (56.1%) and 18 males (43.9%), with a mean age of 1.8 years (6 months to 5 years). The differential cell count and bone marrow classification were performed in all samples. In the evaluation of the myelogram, only the metarrubycytes showed a significant difference between males and females, whereas in the evaluation of the iron metabolism, total and free iron binding capacity and transferrin showed differences. In relation to the evaluation of the bone marrow iron stores of these animals, 11 (26.8%) presented positive iron stores in the bone marrow through the smears evaluation and confirmed by Prussian blue coloration. Of these, 9 (81.8%) were females and 2 (18.2%) were males. It is concluded that there are certain patterns of specific populations that may vary when compared to existing works. The present work proposes new reference values for bone marrow cell counts in healthy cats, besides confirming the presence of iron deposits in the bone marrow of these animals.*

**Keywords:** myelogram; cytology; cell lines; iron.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
2.1	Medula óssea.....	10
2.2	Citologia da medula óssea.....	10
2.2.1	Linhagemeritroide.....	12
2.2.2	Linhagemgranulocítica.....	12
2.2.3	Linhagensmegacariocíticas, monocíticase linfocíticas .....	13
2.2.4	Demais células .....	14
2.3	Metabolismo do ferro.....	14
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A medula óssea é considerada um órgão hematopoiético e linfóide primário, possuindo um tecido estruturado em microambientes que fornecem o suporte estrutural e nutricional para a diferenciação, proliferação, maturação e liberação ordenada de todos os tipos celulares sanguíneos (SHARKEY & HILL, 2010; HARVEY, 2012). A função principal da medula óssea é a produção, principalmente de células das linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica, respondendo de maneira sensível ao aumento da demanda dessas células levando em consideração fatores de crescimento hematopoiéticos (SHARKEY & HILL, 2010).

O exame citológico da medula óssea é indicado para investigar anormalidades encontradas no hemograma como citopenias e trombocitoses persistentes, leucocitoses, alterações morfológicas atípicas de células no sangue periférico, presença de células imaturas na circulação, além de hiperproteinemia, hipercalcemia ou hiperglobulinemia em pacientes com febre persistente de origem desconhecida ou ainda anormalidades nas células sanguíneas periféricas que não possuem ligação com o estado clínico ou com outros diagnósticos (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012). Outras indicações são no acompanhamento do estadiamento de condições neoplásicas e investigações de afecções parasitárias, como é o caso da leishmaniose (TURINELLI *et al.*, 2015).

O ferro é um mineral que participa de inúmeros eventos metabólicos no organismo, em especial na síntese de hemoglobina e na participação como cofator enzimático de diversas enzimas (WIJAYANTI & KATZ, 2004). Na análise do metabolismo do ferro, podem ser realizadas mensurações de ferro sérico, transferrina e seus índices de saturação e de ligação total e livre, presença de depósitos de ferro na medula óssea, além das avaliações hematológicas completas (NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012). O número de hemossiderófagos nas espículas de aspirados de medula óssea é um indicativo de ferro armazenado, que deve estar aumentado nos casos de inflamação crônica e na anemia imunomediada, onde a fagocitose de eritrócitos está aumentada (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002). Esses depósitos de ferro, até então, não foram encontrados em aspirados de medula óssea de felinos jovens clinicamente saudáveis.

Estudos relacionados a doenças que atingem direta ou indiretamente a medula óssea dos gatos já foram realizados, como infecções por vírus da imunodeficiência



felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) ou vírus da panleucopenia felina (SHIMODA *et al.*, 2000; WEISS, 2006; HARTMANN, 2011; HARTMANN, 2012; WEEDEN *et al.*, 2016). Contudo, tornam-se necessários estudos que avaliem a citologia de aspirados de medula óssea, divididos entre machos e fêmeas, considerando um número maior de felinos jovens clinicamente saudáveis do que a utilizada atualmente de Jain, 1993, que utiliza apenas sete gatos, não diferenciando entre os sexos (JAIN, 1993). O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar e quantificar os tipos celulares encontrados em citologias obtidas por aspirados de medula óssea de gatos clinicamente saudáveis, estimando diferenças entre os sexos, caracterizando valores de referência para o mielograma, bem como avaliar os parâmetros do metabolismo do ferro e avaliar a presença de depósitos de ferro na medula óssea desses animais.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Medula óssea**

A medula óssea, além de ser o órgão hematopoiético mais importante nos animais adultos, também possui funções de órgão linfoide primário (HARVEY, 2012). Além disso, como principal formador das células do sangue periférico, sua função inclui o total reabastecimento das séries eritroide e mieloide, agindo diretamente no transporte de oxigênio, e na defesa do organismo e equilíbrio dos mecanismos de manutenção da coagulação (SHARKEY & HILL, 2010).

Fisicamente, a medula óssea é encontrada no interior da grande maioria de todos os ossos, como costelas, vértebras e extremidades de ossos longos como fêmur e úmero (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Sua estrutura é composta por tecido adiposo ou medula óssea amarela, sendo que animais jovens possuem menor quantidade de tecido adiposo, enquanto que os animais velhos apresentam maior quantidade; e tecido hematopoiético propriamente dito, composto pela medula óssea vermelha, que é responsável pela produção e maturação das células sanguíneas (HARVEY, 2012). Na medula óssea vermelha estão presentes os compartimentos de produção das origens das séries mieloide, eritroide e megacariocítica, além das células de origem não-hematopoiéticas (SHARKEY & HILL, 2010).

### **2.2 Citologia da medula óssea**

O exame citológico da medula óssea é indicado para investigar, além de anormalidades encontradas no hemograma, como anemias pouco ou não regenerativas, neutropenias, trombocitopenias e leucocitoses persistentes, alterações morfológicas atípicas de células no sangue periférico, presença de células imaturas na circulação, hiperproteinemia, hipercalcemia, hiperglobulinemia, em pacientes com febre persistente de origem desconhecida ou demais alterações ou anormalidades nas células sanguíneas periféricas que não possuem associação com estado clínico, exame físico ou outros exames, como análises bioquímicas ou ultrassonográficas (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012, TURINELLI & GAVAZZA, 2018). Outras indicações são no estadiamento de condições neoplásicas, como linfoma e mastocitoma, além de investigações de afecções parasitárias, como é o caso da leishmaniose e ehrlichiose (RASKIN & MESSICK, 2012, TURINELLI *et al.*, 2015).

Em gatos, os aspirados de medula óssea são realizados sob anestesia geral e analgesia leve (HARVEY, 2012). Após a indução anestésica deve ser realizada a tricotomia e antissepsia no local de punção, que pode ser a tuberosidade proximal do úmero, fossa trocântérica femoral, e a crista ilíaca (REAGAN *et al.*, 2011). Porém, sugere-se a coleta do úmero proximal em felinos, sendo considerado um local associado a uma maior taxa de sucesso nas coletas, por proporcionar uma amostra de melhor qualidade e uma coleta rápida, visto que o acesso é mais facilitado (BYERS, 2017). Para o procedimento em cães e gatos, utiliza-se uma agulha de coleta de medula óssea do tipo Rosenthal estéril de calibre 15 a 18 G por 1 a 2 polegadas e aspiradas com seringa de 10 mL contendo aproximadamente 1 a 2 mL de solução de EDTA-K<sub>2</sub> a 4,5% diluída em solução salina isotônica (RASKIN & MESSICK, 2012; HARVEY, 2012). Após a aspiração da medula óssea, o material obtido é depositado em uma placa de Petri para a seleção das espículas e realização dos esfregaços através da técnica de *squash*, sendo as lâminas dos esfregaços de medula óssea coradas com corante do tipo Romanosky (HARVEY, 2012; BYERS, 2017). Outras colorações como as bacteriológicas de Gram e técnicas citoquímicas, podem ser aplicadas para favorecer a identificação de células de difícil diferenciação morfológica e microorganismos (RASKIN, 2010; HARVEY, 2012).

Na avaliação citológica sistemática da medula óssea, em primeiro momento, são determinadas a celularidade e a população celular geral, análise da linhagem megacariocítica, além da identificação de possíveis agentes infecciosos (*Leishmaniaspp.*, *Histoplasmaspp.*, *Cytauxzoon spp.*, etc.) (HARVEY, 2012). Na classificação e contagem diferencial celular são consideradas a avaliação da linhagem eritroide (rubriblastos, pró-rubríctos, rubríctos e metarrubríctos) e avaliação da linhagem mieloide (mieloblastos, pró-mielócitos, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados, eosinófilos e basófilos) bem como as contagens de plasmócitos, monócitos, linfócitos e macrófagos, e avaliação da linhagem megacariocítica (megacariócitos) (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012, STACY & HARVEY, 2017). Na linhagem megacariocítica, os megacarioblastos e os megacariócitos são quantificados e avaliados morfológicamente usando uma objetiva de 200x e 1.000x, respectivamente, e a relação mieloide:eritroide (M:E) é calculada baseada na quantidade, em porcentagem, de células das linhagens eritroide e mieloide (JAIN, 1993; MORITZ *et al.*, 2010; HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012).

Usando uma objetiva de 100x, a avaliação do estoque de ferro na medula é realizada através da visualização dos acúmulos de ferro em hemossiderófagos confirmada utilizando a coloração específica de azul da Prússia, a qual detecta quantidades muito pequenas de ferro, assim, o número de hemossiderófagos nas espículas da medula óssea é indicativo da quantidade de ferro armazenado (HARVEY, 2012; STACY & HARVEY, 2017). Para essa coloração, os esfregaços de medula óssea são corados com uma solução de ácido clorídrico para desnaturação de proteínas fixadas ao ferro, seguida de uma adição de ferrocianeto de potássio que liga as moléculas de  $Fe^{3+}$ , resultando em uma coloração azul (RADAKOVICH & OLVER, 2017).

### **2.2.1 Linhagem eritroide**

A eritropoiese é a proliferação progressiva da diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em progenitores eritroides (OLVER, 2010). O progenitor mieloide comum dá origem ao progenitor megacariócito-eritrócito que, por sua vez, se diferencia em progenitores megacariócitos e progenitores eritroides, estes últimos, estimulados por fatores de crescimento, dão origem à série eritroide (HARVEY, 2012). O rubriblasto é o primeiro precursor eritroide que pode ser identificado no esfregaço de citologia, seguido do pró-rubricito e assim formando a linhagem eritroide imatura (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012). Após essa fase de multiplicação, ocorre a maturação e diferenciação do pró-rubricito em rubricito, metarrubricito, reticulócito e hemácia anucleada, estabelecendo assim a linhagem eritroide madura (OLVER, 2010; HARVEY, 2012).

Morfologicamente, os precursores eritroides são menores que os da linhagem mieloide, com núcleo mais redondo e cromatina mais condensada, variando também o grau de basofilia citoplasmática (STACY & HARVEY, 2017). À medida que esses precursores vão maturando e diferenciando, o núcleo vai diminuindo até ser expulso da célula, formando por fim, a hemácia madura, que será liberada para a circulação (HARVEY, 2012; STACY & HARVEY, 2017).

### **2.2.2 Linhagem granulocítica**

Nos mamíferos, a linhagem granulocítica é originada a partir de células-tronco pluripotencial hematopoiética, originando células progenitoras mieloides comuns, que por sua vez se diferenciam em células progenitoras granulocíticas, que darão origem a

série granulocítica (RADIN & WELLMAN, 2010). A primeira célula da linhagem granulocítica identificada no esfregaço de medula óssea é o mieloblasto, que inicia sua multiplicação até se diferenciar em pró-mielócito, formando assim a linhagem mieloide imatura (HARVEY, 2012; STACY & HARVEY, 2017). A linhagem mieloide madura se inicia com o pró-mielócito, que dá origem ao mielócito e, por sua vez, se diferencia em metamielócito, bastonete e granulócitos maduros, sendo o neutrófilo segmentado o mais encontrado (HARVEY, 2012).

Em comparação à série eritroide, a linhagem granulocítica é formada por células maiores, com núcleo mais variável e com cromatina mais frouxa e menos condensada (HARVEY, 2012; STACY & HARVEY, 2017). Durante o processo de maturação, os grânulos citoplasmáticos secundários tornam-se evidentes a partir da diferenciação do mielócito, assim, ele pode direcionar a sua diferenciação em três tipos celulares: neutrófilos (grânulos incolores), eosinófilos (grânulos rosa) e basófilos (grânulos basofílicos-azulados) (RADIN & WELLMAN, 2010; STACY & HARVEY, 2017).

### **2.2.3 Linhagens megacariocíticas, monocíticas e linfocíticas**

Os megacariócitos são derivados de células progenitoras megacariocitos-eritroides (BOUDREAUX, 2010). A linhagem megacariocítica é formada inicialmente por megacarioblastos, apresentando elevada relação núcleo:citoplasma (N:C), núcleo único e citoplasma intensamente basofílico, porém, estes são difíceis de serem diferenciados morfológicamente; seguidos por pró-megacariócitos e megacariócitos, podendo ser encontrados entre 5 a 15 megacariócitos por campo (RIZZI; CLINKENBEARD; MEINKOTH, 2010; HARVEY, 2012; STACY & HARVEY, 2017).

A linhagem monocítica inicia sua maturação a partir do monoblasto e do pró-monócito, também de difícil diferenciação morfológica com corantes de rotina, seguido do monócito propriamente dito, que se apresenta quase idêntico ao que se encontra presente no sangue periférico (HARVEY, 2012).

A linhagem linfocítica é formada inicialmente pelos linfoblastos, seguida por pró-linfócitos e pequenos linfócitos (RIZZI; CLINKENBEARD; MEINKOTH, 2010; HARVEY, 2012).

#### 2.2.4 Demais células

Os mastócitos são raramente identificados na medula óssea de animais saudáveis, podendo ser encontrados acima dos valores de referência nos casos de metástases de mastocitomas (STACY & HARVEY, 2017). Os macrófagos podem conter restos fagocitados intracitoplasmáticos, como hemossiderina, sendo também pouco visualizados (HARVEY, 2012). Osteoclastos, osteoblastos, fibrócitos e células endoteliais podem ser encontradas em filhotes de gato, enquanto que, em adultos, sua detecção é rara, sendo encontrados em situações de remodelamento ósseo (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012; STACY & HARVEY, 2017).

Os plasmócitos são facilmente identificados por possuírem um núcleo esférico e excêntrico e uma zona mais clara perinuclear contendo o complexo de Golgi (HARVEY, 2012). Esse tipo celular pode estar em maior número nos casos de estimulação antigênica ou no mieloma múltiplo (HARVEY, 2012; RASKIN & MESSICK, 2012). Podem também ser chamadas de células de *Mott*, quando se apresentarem com inclusões intracitoplasmáticas basofílicas arredondadas (STACY & HARVEY, 2017).

#### 2.3 Metabolismo do ferro

O ferro, além de ser essencial para inúmeros processos fisiológicos no metabolismo celular, tem como função principal o transporte de oxigênio através da hemoglobina, além de ser componente de múltiplas enzimas, incluindo citocromos, necessárias para a geração de energia (CRICHTON, 2016; PANTOPOULOS *et al.*, 2012; WITMER, 2013). A maioria do ferro funcional está contido na hemoglobina, e em menores quantidades na mioglobina e citocromos (CRICHTON, 2016). O ferro é estocado no fígado como ferritina, principal proteína de armazenamento, ou na medula óssea como hemossiderina (HARVEY, 2008).

O  $\text{Fe}^{3+}$  procedente da dieta deve ser solubilizado a partir do ácido clorídrico no estômago e, em sua forma  $\text{Fe}^{2+}$ , é absorvido no duodeno por meio de uma proteína chamada proteína transportadora de metal bivalente 1 (DMT1) (BRASSE-LAGNE *et al.*, 2011; NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012). Após absorvido, ele tem duas rotas possíveis, ser transportado na circulação para dentro das células ou desviado para armazenamento por uma proteína presente no plasma chamada transferrina (NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012). Quando requerido pelo organismo, as

moléculas de ferro são transportadas dos enterócitos para a transferrina no plasma, através da ferroportina (WEISS, 2010; BRASSE-LAGNE *et al.*, 2011).

A dieta é uma fonte de ferro, porém, como a maior parte do ferro está presente na hemoglobina, outra fonte importante de ferro se dá através da fagocitose de hemácias senescentes (ANDREWS, 2008; GANZ & NEMETH, 2011). As alterações bioquímicas da membrana das hemácias senescentes fazem com que os macrófagos no baço e medula óssea, e as células de Kupffer no fígado, reconhecem e sinalizam sua fagocitose, degradação e reciclagem, assim, o ferro é estocado no próprio macrófago ou exportado para ferroportina (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006). Após exportado, o  $\text{Fe}^{2+}$  será oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  e transportado pela transferrina até a medula óssea, para ser reutilizado e participar da hemoglobinizacão de novas hemácias com auxílio de macrófagos especializados na medula óssea, chamados *nurse cells* (CHUNG & WESSLING-RESNICK, 2003; KNUTSON & WESSLING-RESNICK, 2003).

A transferrina possui dois sítios com alta afinidade pelo  $\text{Fe}^{3+}$ , assim, quando o ferro está ligado à transferrina, sua incorporação é iniciada pela ligação desse complexo a um receptor específico na superfície das células, iniciando o mecanismo de sua captura (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006; HARVEY, 2008; ANDREWS, 2008). Depois de reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$ , o ferro é liberado pela transferrina e transferido para o citosol da célula pela DMT-1 (BRASSE-LAGNE *et al.*, 2011). A integração do ferro ao anel de protoporfirina irá formar o grupamento heme e, em combinação com as cadeias de globina, formarão a molécula de hemoglobina (HARVEY, 2008; NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012).

As reservas corporais são reguladas para fornecer a quantidade de ferro adequada às necessidades celulares, já que o corpo não possui mecanismo para excretar ferro em excesso (LAWEN & LANE, 2013). O efluxo de ferro é regulado pela hepcidina, um hormônio produzido pelos hepatócitos, que pode inibir a absorção do mineral no duodeno pela degradação da ferroportina (BRASSE-LAGNE *et al.*, 2011; GANZ & NEMETH, 2011; BOHN, 2013). Assim, a produção de hepcidina diminui nos casos de deficiência de ferro e em situações de aumento da eritropoiese ou aumenta a sobrecarga de ferro no organismo e em casos de inflamação (CRICHTON, 2016; GRIMES; GIORI; FRY, 2012).

Na avaliação do status do ferro podem ser incluídos hemograma completo (hemoglobina, volume corpuscular médio [VCM], concentração de hemoglobina

corpuscular média [CHCM], contagem de reticulócitos), concentração sérica de ferro, capacidade total e livre de ligação do ferro, transferrina e seu índice de saturação e concentração de ferritina além análise hepática para avaliação do fígado e sua produção de hepcidina (HARVEY, 2008; BOHN, 2013). Mensurações dos receptores de transferrina são utilizados na medicina humana, porém, não existem estudos consistentes na medicina veterinária (BOHN, 2013). A mensuração de hepcidina possui variações relacionadas às espécies, antigenicidade limitada e depuração rápida da proteína (HILTON & LAMBERT, 2008; MALYSZKO, 2009; GRIMES; GIORI; FRY, 2012).



### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DE ESTOQUES DE FERRO NA MEDULA  
ÓSSEA DE GATOS JOVENS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS:  
DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA**

**EVALUATION OF CYTOLOGICAL AND IRON STOCKS IN THE BONE  
Marrow OF CLINICALLY HEALTHY YOUNG CATS: DETERMINATION  
OF REFERENCE VALUES**

Nilson J. da S. Nunes<sup>1\*</sup>, Naila C. B. Duda<sup>1</sup>, Felipe Y. Okano<sup>1</sup>, Bruno A de Almeida<sup>1</sup>,  
Stella de F. Valle<sup>1</sup>, Fernanda V. A. da Costa<sup>2</sup>, Félix H. D. González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias

<sup>2</sup>Serviço de Medicina Felina, Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

\*Endereço para correspondência: njuniorvet@gmail.com - Tel.: +55 (51) 3308-8033.  
Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária - UFRGS. Av.  
Bento Gonçalves nº 9090. Bairro Agronomia. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

## 1 **RESUMO**

2 **Background:**O tecido da medula fornece o suporte estrutural e nutricional para todos os  
3 tipos celulares sanguíneos, tendo como função principal a produção de todas as  
4 linhagens celulares. O mielograma é indicado na investigação de citopenias e  
5 leucocitoses persistentes, além de avaliações do estadiamento de neoplasias, como  
6 linfoma e mastocitoma. Estudos relacionados a doenças que afetam a medula óssea de  
7 felinos já foram realizados, porém, tornam-se necessários estudos que avaliem a  
8 citologia de aspirados de medula óssea de gatos clinicamente saudáveis e possíveis  
9 variações entre machos e fêmeas, considerando um número maior de felinos jovens  
10 clinicamente saudáveis do que a utilizada atualmente.

11 **Objetivo:**Avaliar e quantificar os tipos celulares de citologias de aspirados de medula  
12 óssea, determinando valores de referência para o mielograma, investigar a presença de  
13 estoques de ferro na medula óssea de felinos jovens clinicamente saudáveis, além de  
14 mensurar as concentrações de ferro sérico, transferrina, índice de saturação de  
15 transferrina e capacidade total e livre de ligação com ferro e comparar com os estoques  
16 de ferro observados nos esfregaços de medula óssea.

17 **Materiais e Métodos:**Foram obtidos aspirados de medula óssea de 41 felinos  
18 jovens clinicamente saudáveis, de ambos os sexos e sem raça definida e sorologicamente  
19 negativos para FIV e FeLV.A análise sistemática dos aspirados de medula óssea levou  
20 em consideração o número e a morfologia celular de todas as linhagens (eritroide,  
21 mieloide, megacariocítica), além de outros tipos celulares, como plasmócitos,  
22 monócitos, linfócitos e macrófagos. Baseada no total de células das linhagens mieloide  
23 e eritroide, foi calculada a relação mieloide:eritroide (M:E). Para a análise do  
24 metabolismo do ferro, foram determinados os valores de ferro sérico, transferrina,  
25 índice de saturação de transferrina e capacidade total e livre de ligação com ferro.Além

26 da estatística descritiva com avaliação de média, desvio padrão (DP) e mediana, foi  
27 verificada a normalidade dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov e as  
28 diferenças entre os sexos através dos testes T e de Mann-Whitney. Foi utilizado o  
29 programa SPSS v20.0 e consideradom intervalo de confiança de 95%.

30 **Resultados:**Um total de 41 aspirados de medula óssea foram analisados, sendo 23  
31 fêmeas (56,1%) e 18 machos (43,9%), com idade média de 1,8 anos (6 meses a 5 anos).  
32 Na avaliação do mielograma, apenas os metarrubrócitos apresentaram diferença  
33 significativa, sendo mais encontrados em fêmeas, bem como na avaliação do  
34 metabolismo do ferro, a capacidade total e livre de ligação do ferro e a transferrina  
35 também apresentaram valores maiores nas fêmeas. Em relação à avaliação dos estoques  
36 de ferro da medula óssea desses animais, 11 (26,8%) apresentavam estoque de ferro  
37 positivo na medula óssea através da avaliação dos esfregaços e confirmados pela  
38 coloração de azul da Prússia, sendo 9 (81,8%) fêmeas e 2 (18,2%) machos.

39 **Conclusão:**Conclui-se que existem variaçõesna citologia da medula óssea, quando  
40 comparados os valores de referência de Jain, 1993. A variação dos valores das  
41 contagens apresentadas dos gatos pode vir a estabelecer novos valores de referência  
42 para contagens celulares de medula óssea de gatos jovens clinicamente  
43 saudáveis.Confirma-se a hipótese de que felinos jovens clinicamente saudáveis estocar  
44 ferro na medula óssea, sendo que o acúmulo é mais frequente nas fêmeas. Esse depósito  
45 pode estar relacionado principalmente ao sexo.

46

47 **Palavras-chave:** mielograma; felinos; citologia; transferrina; classificação celular.

48

49 **INTRODUÇÃO**

50 O tecido da medula óssea é estruturado em microambientes que fornecem o  
51 suporte estrutural e nutricional para a diferenciação, proliferação, maturação e liberação  
52 ordenada de todos os tipos celulares sanguíneos.<sup>1</sup> Por ser um tecido dinâmico, a medula  
53 óssea é capaz de responder funcional e estruturalmente em resposta ao aumento da  
54 demanda celular para produção das linhagens eritroide, mieloide e megacariocítica,  
55 através de estímulos de fatores de crescimento hematopoiéticos e sua interação com o  
56 microambiente que o circunda.<sup>2,3</sup>

57 O exame citológico da medula óssea é indicado para investigar anormalidades  
58 encontradas no hemograma, como anemias pouco ou não regenerativas, neutropenias,  
59 trombocitopenias e leucocitoses persistentes, alterações morfológicas atípicas  
60 observadas no sangue periférico, presença de células imaturas na circulação,  
61 hiperproteinemia, hipercalcemia, hiperglobulinemia, pacientes com febre persistente de  
62 origem desconhecida ou demais alterações hematológicas que não possam ser  
63 explicadas pelo histórico, avaliação clínica e exames complementares, como análises  
64 bioquímicas e exames de imagem.<sup>1,4-6</sup> Outras indicações incluem estadiamento de  
65 neoplasias, como linfoma e mastocitoma, além de investigações de afecções  
66 parasitárias.<sup>4-6</sup>

67 Outra análise importante na avaliação da medula óssea de felinos é a presença de  
68 depósitos de ferro, já que este é um mineral que participa de inúmeros eventos  
69 metabólicos no organismo, dentre eles a homeostase celular; na síntese de hemoglobina;  
70 participando diretamente no transporte de oxigênio; a síntese de DNA; formação do  
71 colágeno; produção de mielina; funções do sistema imune e no metabolismo  
72 energético.<sup>7</sup> Além disso, o ferro é cofator de diversas enzimas, como as citocromos,  
73 necessárias para produção de energia e metabolização de certas drogas.<sup>8</sup> No plasma, o  
74 ferro é transportado para os tecidos através da proteína transferrina, porém, a maior

75 parte do ferro está ligada à hemoglobina, além de estar também presente na mioglobina,  
76 em algumas enzimas e macrófagos.<sup>9</sup>Diversos estudos relacionados a doenças que  
77 afetam direta ou indiretamente a medula óssea dos pacientes felinos já foram realizados,  
78 principalmente nas infecções retrovirais como o vírus da imunodeficiência felina (FIV)  
79 e vírus da leucemia felina (FeLV) e infecções com o vírus da panleucopenia felina.<sup>10-15</sup>  
80 Contudo, para comparações dos achados na medula de pacientes doentes, tornam-se  
81 necessários valores de referência de felinos jovens clinicamente saudáveis.

82 A maioria do ferro funcional está contido na hemoglobina, e em menores  
83 quantidades na mioglobina e citocromos, sendo estocado no fígado como ferritina,  
84 principal proteína de armazenamento, ou na medula óssea como hemossiderina.<sup>16,17</sup> Até  
85 o presente momento, nenhum estudo objetivou investigar a presença de estoques de  
86 ferro de medula óssea de felinos clinicamente saudáveis, sendo este identificado apenas  
87 em animais doentes. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar e quantificar  
88 os tipos e linhagens celulares encontrados em citologias obtidas por aspirados de  
89 medula óssea, determinando novos valores de referência, bem como verificar a  
90 existência de depósitos de ferro na medula óssea de felinos jovens clinicamente  
91 saudáveis, mensurando também os níveis de ferro sérico, transferrina, índice de  
92 saturação de transferrina e capacidade total e livre de ligação com ferro.

93

## 94 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 95 **Seleção dos animais e coleta das amostras**

96 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade  
97 Federal do Rio Grande do Sul (processo nº 34023). Neste estudo, foram utilizados 41  
98 felinos jovens clinicamente saudáveis, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da  
99 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre (Brasil) e encaminhados

100 para castração eletiva, durante o período de janeiro a outubro de 2018. Foram  
101 considerados aptos para o estudo felinos domésticos jovens de ambos os sexos,  
102 independente de raça, vermifugados e com protocolos vacinais concluídos, que não  
103 apresentavam histórico de quadro anêmico ou doença recente, clinicamente saudáveis e  
104 com resultado negativo para as FIV e FeLV no ensaio imunoenzimático. Pacientes que  
105 apresentaram quaisquer alterações no exame clínico, que estivessem em tratamento  
106 medicamentoso ou que apresentassem doenças concomitantes foram excluídos do  
107 estudo. Os tutores dos animais selecionados assinaram um termo de consentimento para  
108 o procedimento de coleta de medula óssea e participação do projeto.

109 Após avaliação clínica dos gatos, onde foram aferidos parâmetros como índice  
110 de desidratação, temperatura corporal, tempo de preenchimento capilar, ausculta  
111 cardiopulmonar, frequência respiratória e cardíaca, foi obtido sangue periférico por  
112 punção da veia jugular, posteriormente à antissepsia (álcool 70%), com auxílio de  
113 agulha 21G (BD Vacutainer, Brasil) na seguinte ordem: 3 mL em tubos secos para os  
114 testes bioquímicos e exame imunoenzimático e 2 mL em tubos com anticoagulante  
115 etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA-K<sub>2</sub>) para hemograma e contagem de  
116 plaquetas.

117 Os aspirados de medula óssea foram realizados sob anestesia geral e analgesia  
118 leve. Foi utilizado o protocolo composto dos seguintes fármacos: tiletamina/zolazepam  
119 (4 mg/kg-1, IM) e cloridrato de tramadol (2 mg/kg-1, IM) como MPA (medicação pré-  
120 anestésica), propofol (2 mg/kg-1, IV) para indução e isoflurano (ao efeito) para  
121 manutenção, além disso, foi realizado bloqueio no local da punção, com lidocaína 2%  
122 (sem vasodilatador; 0,15-0,2 ml/kg). Após a indução anestésica foram realizadas a  
123 tricotomia e antissepsia (álcool 70%) no local de punção (úmero proximal esquerdo-  
124 entre o tubérculo maior e a cabeça do úmero), com agulha específica para coleta de

125 medula óssea (Rosenthal) de 15 ou 18 G e aspiradas com seringa de 10 mL contendo  
126 aproximadamente 2 mL de solução de EDTA-K<sub>2</sub> a 4,5% diluída em solução salina  
127 isotônica. Após a aspiração da medula óssea o material foi depositado em uma placa de  
128 Petri para a seleção das espículas e realização dos esfregaços através da técnica de  
129 *squash*. Três lâminas dos esfregaços de medula óssea de cada animal foram coradas com  
130 corante de Wright e avaliadas em microscópio óptico.

131

### 132 **Análises de hematologia, bioquímica clínica e imunoensaio rápido**

133 As amostras de sangue em tubos com EDTA-K<sub>2</sub> foram utilizadas para o  
134 hemograma em analisador hematológico automático (ProCyte DX  
135 Hematology Analyzer, Idexx Laboratories, EUA). O hematócrito foi confirmado pelo  
136 método de microhematócrito a 9.520 g por cinco minutos (Microcentrífuga Thermo  
137 Fisher Scientific, Langensfeld, Germany). A contagem diferencial, a obtenção da  
138 estimativa plaquetária e a análise do esfregaço sanguíneo foram realizadas através de  
139 microscopia óptica (Panótico rápido, Laborclin, Brasil), todos pelo mesmo observador.

140 Para complementar a avaliação laboratorial dos felinos, as amostras sem  
141 anticoagulante foram centrifugadas a 2.000 g por cinco minutos (Centrífuga Excelsa II  
142 206L, Fanem, Brasil) para obtenção de soro, e assim, destinados a análise dos seguintes  
143 parâmetros por método colorimétrico enzimático: albumina, ALT (alanina  
144 aminotransferase), creatinina, ureia, FA (fosfatase alcalina), globulinas e proteínas  
145 totais. Todas as análises foram realizadas com kits comerciais conforme instruções do  
146 fabricante em um espectrofotômetro automático (CM 200, WienerLab Group,  
147 Argentina). O soro obtido para os testes bioquímicos também foi utilizado para a  
148 realização do teste de imunoensaio rápido para detecção de antígeno de FeLV e  
149 anticorpo de FIV (Snap FIV/FeLV Combo Test, Idexx Laboratories, EUA).

150

151 **Análises de medula óssea**

152 A análise da medula óssea foi realizada de maneira sistemática previamente  
153 descrita, avaliando, por ordem, a celularidade e quantidade de espículas por lâmina;  
154 presença de partículas como depósitos de ferro; megacariócitos; presença de células do  
155 estroma e células hematopoiéticas; relação mieloide:eritroide (M:E); avaliação  
156 morfológica e sequência de maturação das linhagens megacariocítica, eritroide e  
157 mieloide, além da presença de células imaturas e morfologia de demais células como  
158 plasmócitos, linfócitos e monócitos.<sup>5,18</sup>Todas as interpretações foram avaliadas  
159 juntamente com o hemograma e análises bioquímicas.

160 Na avaliação citológica da medula óssea foram utilizadas apenas amostras com 3  
161 - 10 espículas/lâmina. As amostras que apresentassem hemodiluição ou ausência de  
162 celularidade foram excluídas da análise. Depois de coradas, foi avaliada e estimada, em  
163 porcentagem, a celularidade geral de cada lâmina, usando a objetiva de 10x. A avaliação  
164 levou em consideração a verificação da população celular em geral e da qualidade das  
165 espículas, seguida de contagem diferencial de 1.000 células e análise morfológica em  
166 microscópio óptico na imersão com uma objetiva de 1.000x.

167 Para a avaliação morfológica e contagem diferencial, foram consideradas as  
168 linhagens eritroide imatura (rubriblastos e pró-rubríctos), eritroide madura (rubríctos e  
169 metarrubríctos), mieloide imatura (mieloblastos e pró-mielócitos) e mieloide madura  
170 (mielócitos, metamielócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados, eosinófilos e  
171 basófilos). Além disso, foram realizadas as avaliações morfológicas e a contagem de  
172 plasmócitos, monócitos, linfócitos e macrófagos, bem como da linhagem  
173 megacariocítica (megacariócitos). Na linhagem megacariocítica, os megacarioblastos e  
174 megacariócitos foram quantificados e avaliados morfolologicamente usando uma objetiva



175 de 10x e 100x, respectivamente. A relação M:E foi calculada baseada em quantidade,  
176 em porcentagem, de células das linhagens eritroide e mieloide, e comparada com  
177 estudos já descritos.<sup>18</sup>Biópsias de material para exame histopatológico não foram  
178 realizadas.

179 A avaliação do estoque de ferro na medula foi realizada utilizando a avaliação  
180 direta em lâmina, através da visualização de macrófagos contendo hemossiderina, e  
181 confirmada utilizando a coloração específica de azul da Prússia, a qual detecta  
182 quantidades pequenas de ferro.<sup>1,5</sup> Para essa coloração, os esfregaços de medula óssea  
183 foram corados com uma solução de ácido clorídrico para desnaturação de proteínas  
184 fixadas ao ferro, seguida de uma adição de ferrocianeto de potássio que liga as  
185 moléculas de  $Fe^{3+}$ , resultando em uma coloração azul.<sup>19</sup>

186

### 187 **Análise dos metabólitos do ferro**

188 Para a análise do metabolismo do ferro, foram determinadas por método  
189 colorimétrico, os valores de ferro sérico ( $\mu\text{g/dL}$ ), a capacidade total ( $\mu\text{g/dL}$ ) e livre de  
190 combinação do ferro ( $\mu\text{g/dL}$ ), a transferrina ( $\text{mg/dL}$ ) e o índice de saturação de  
191 transferrina (%), além da avaliação dos pigmentos de ferro na medula óssea através de  
192 coloração de azul da Prússia. A partir da capacidade total de ligação do ferro obteve-se  
193 o valor da transferrina (TRF) pela fórmula:  $\text{TRF (mg/dL)} = \text{capacidade total de ligação}$   
194  $\text{com ferro} \times 0,7$ . Os índices de saturação da transferrina (IST) foram obtidos pela  
195 fórmula:  $\text{IST (\%)} = (\text{ferro sérico} / \text{capacidade total de ligação do ferro}) \times 100$ .

196

### 197 **Análise estatística**

198 Primeiramente, todas as análises foram submetidas ao teste de Kolmogorov-  
199 Smirnov para verificar a normalidade dos dados.<sup>20</sup> As variáveis que apresentaram

200 distribuição paramétrica foram descritas pela média e desvio padrão e as variáveis que  
201 apresentaram distribuição não paramétrica foram descritas pela mediana, mínimo e  
202 máximo. Foi utilizado o programa SPSS v20.0 e para as variáveis com distribuição  
203 paramétrica, foram utilizados o teste Teste T para verificar a existência de diferenças  
204 significativas entre machos e fêmeas, e o teste de Mann Whitney para as variáveis com  
205 distribuição não paramétrica, considerado um intervalo de confiança de 95%.

206

## 207 **RESULTADOS**

208 Foram obtidos 41 aspirados de medula óssea que foram analisados  
209 concomitantemente com os valores bioquímicos e hematológicos. Do total de animais  
210 amostrados, 23 eram fêmeas (56,1%) e 18 machos (43,9%), com idade média de 1,8  
211 anos (6 meses a 5 anos). A contagem celular diferencial e classificação das medulas  
212 ósseas foram realizadas em todas as amostras (Tabela 1) e os valores demonstrados por  
213 sexo (Tabela 2). Os parâmetros com distribuição anormal foram celularidade,  
214 megacariócitos, mielócitos, rubrícitos, rubriblastos, pró-rubrícitos, plasmócitos,  
215 monócitos, macrófagos, basófilos e mitoses típicas, os demais apresentaram distribuição  
216 normal. Somente os metarrubrícitos apresentaram diferença significativa entre machos e  
217 fêmeas. Os resultados das avaliações hematológicas e das mensurações bioquímicas do  
218 sangue periférico estão na Tabela 3 e 4.

219 Em relação ao metabolismo do ferro, os parâmetros com distribuição anormal  
220 foram capacidade total de ligação do ferro, capacidade livre de ligação do ferro e  
221 transferrina, os demais apresentaram distribuição normal. Somente a concentração  
222 média do ferro sérico não apresentou diferença significativa entre machos e fêmeas  
223 (Tabela 5). Os resultados de ferro sérico, capacidade total e livre de combinação com  
224 ferro, transferrinae o índice de saturação de transferrina estão demonstrados na Tabela

225 6. Em relação à avaliação dos estoques de ferro da medula óssea desses animais, 11  
226 (26,8%) apresentavam estoque de ferro na medula óssea visualizando os macrófagos  
227 contendo grânulos de hemossiderina, e confirmado utilizando a coloração específica de  
228 azul da Prússia (Figura 1). Dos 11 felinos com estoque de ferro na medula, 9 (81,8%)  
229 eram fêmeas e 2 (18,2%) eram machos.



230

231 **Figura 1.** Aspirado de medula  
232 óssea felina. Coloração específica  
233 de azul da Prússia evidenciando  
234 depósitos de ferro de coloração  
235 azul-esverdeada (1.000x).

236

## 237 **DISCUSSÃO**

238 O presente estudo avaliou a contagem diferencial de células da medula óssea de  
239 felinos jovens clinicamente saudáveis com o objetivo de determinar valores de  
240 referência considerando um número maior de animais dividindo-os entre sexo,  
241 comparando com estudos de Jain, 1993, que utilizou apenas 7 gatos.

242 Os valores da contagem diferencial, quando comparados com a referência  
243 utilizada atualmente<sup>18</sup> demonstraram que a hiperplasia eritroide esteve presente em  
244 mais da metade dos felinos amostrados (53,3%). Quando comparados com os valores de

245 referência, 16 felinos foram classificados com discreta a moderada hiperplasia eritroide  
246 sem presença de anemia (Hematócrito  $33,6\% \pm 4,8$ ).<sup>18</sup> Este aumento pode ter  
247 influenciado na presença de reduzida relação M:E e aumento da porcentagem da  
248 linhagem eritroide. Somente a porcentagem de metarrubricitos apresentou diferença  
249 significativa entre os sexos, sendo maior nas fêmeas. Atualmente, os valores de  
250 referência consideram um pequeno número de animais e, quando comparado com as  
251 médias obtidas, nota-se que alguns animais foram identificados com distúrbios da  
252 linhagem, principalmente eritroide.<sup>18</sup> Porém, essa hiperplasia não é justificável  
253 clinicamente ou por exames laboratoriais, já que os animais apresentavam-se não  
254 anêmicos e não passaram por situações de regeneração eritroide. Nos casos de  
255 hiperplasia eritroide em felinos, deve-se avaliar se esse distúrbio estabelece  
256 concordância com a condição clínica do paciente ou com situações que cursem com  
257 processos regenerativos.<sup>5,18</sup> Assim, evita-se que pacientes sejam identificados  
258 erroneamente com distúrbios de hiperplasia.

259 A hiperplasia linfocítica é estabelecida quando a contagem de pequenos  
260 linfócitos é superior a 20% do total de células nucleadas associada à linfocitose.<sup>1</sup> Com  
261 relação aos linfócitos, quando comparado os valores obtidos a referência, 10/41 (24,4%)  
262 dos gatos apresentaram hiperplasia e apenas um dos 10 felinos apresentava discreta  
263 linfocitose. Destes, a hiperplasia linfocítica foi considerada relativamente discreta em 7  
264 animais, com aumentos inferiores a 5% do limite superior.<sup>18</sup> Dois animais com aumentos  
265 superiores a 5% do limite superior de referência haviam recebido pelo menos uma dose  
266 de vacina recente, o que poderia assim, explicar a possível hiperplasia linfocítica. Os  
267 demais animais apresentavam protocolos vacinais concluídos, não sofrendo influência  
268 sobre estimulação antigênica por vacinação recente, apontando que o aumento discreto  
269 da linhagem linfocítica na contagem celular pode estar relacionado com a idade dos

270 felinos, já que animais jovens tem seu sistema imune ainda sendo estimulado e em  
271 constante desenvolvimento.<sup>21</sup>

272 Na linhagem eosinofílica, em comparação com valores de referência, a  
273 hiperplasia foi observada em três felinos (7,3%), sendo que 2/3 apresentavam  
274 eosinofilia, confirmando esse aumento da linhagem eosinofílica na medula óssea. Esta  
275 variação da linhagem eosinofílica pode estar relacionada à carga parasitária dos felinos.  
276 Assim, torna-se importante sugerir que os valores de referência considerem avaliação  
277 prévia de exames parasitológicos de fezes dos animais, bem como protocolo de  
278 vermifugação e tratamento de ectoparasitos recente.<sup>22</sup> A hiperplasia basofílica foi  
279 observada em apenas um animal (2,4%), sem possuir significado específico.

280 A hipoplasia eosinofílica foi a segunda mais observada, estando 10 animais  
281 (24,3%) dentro desta categoria. Para Jain<sup>18</sup>, o ideal é possuir > 0,8% de eosinófilos,  
282 sendo que os valores encontrados nestes 10 animais ficaram entre 0,17 – 0,67%. Em  
283 18/41 felinos (43,9%), os valores de plasmócitos (média de 0,17%) estavam abaixo da  
284 referência atualmente utilizada.<sup>18</sup> Já a hipoplasia mielóide apareceu em dois casos (4,8%)  
285 e, a diminuição desses valores foi discreta, ficando apenas 2% abaixo do valor  
286 encontrado por Jain<sup>18</sup>. Em relação às linhagens de megacariócitos, monócitos,  
287 macrófagos e a porcentagem de mitoses típicas encontradas não obtiveram diferenças  
288 quando comparados com os valores de referência atual.<sup>18,23</sup> Os valores das contagens  
289 celulares de basófilos, eosinófilos e plasmócitos foram os que mais se diferenciaram dos  
290 encontrados na literatura atual.<sup>18</sup> Isto se deve ao fato de que a presença destas células  
291 nas contagens diferenciais de citologias de medula óssea podem ser nulas ou próximas a  
292 zero, tornando as médias, medianas e intervalos pequenos. Sendo assim, uma pequena  
293 variação de diferença já pode incluir os animais na categoria de hipoplasia na linhagem  
294 analisada, apesar dessa diminuição não ser extremamente significativa. É importante

295 salientar que intervalos de referência baseados em uma população têm sido muito  
296 utilizados na medicina veterinária, porém a quantidade de animais amostrados deve ser  
297 levada em consideração.<sup>20,24</sup> Além disso, as análises para determinação de valores de  
298 referência de uma população específica devem estimar pequenas variações climáticas e  
299 biológicas naturais dos indivíduos, visto que existem diferenças entre populações, como  
300 condições climáticas e sazonais, de dieta, estilo de vida, ambiente, idade, protocolos  
301 vacinais e vermifugações que podem causar variações nos novos intervalos.<sup>25,26</sup>

302         Em relação aos estoques de ferro, 11 de 41 gatos amostrados apresentaram  
303 depósitos de ferro na medula óssea, até o momento, desconhecem-se relatos que referem  
304 à presença destes depósitos na medula óssea de felinos jovens clinicamente saudáveis.  
305 Considerando as avaliações clínicas, hematológicas, bioquímicas, além dos indicadores  
306 do metabolismo do ferro, a presença dos depósitos de ferro na medula óssea dos felinos  
307 não ocorreu devido a situações de distúrbios ou doenças, agudas ou crônicas.

308         A presença de possíveis processos inflamatórios mascarados causando alterações  
309 no metabolismo do ferro é improvável, visto que a capacidade total de ligação do ferro  
310 não estava abaixo dos valores de referência, e a concentração de transferrina, bem como  
311 o mielograma dos felinos estavam dentro dos valores de referência.<sup>27,28</sup> O índice de  
312 saturação de transferrina encontrado foi de 24,5%, que demonstra a relação entre a  
313 concentração sérica de ferro e a capacidade total de ligação do ferro, e deve estar entre  
314 20% e 50%, quando abaixo de 20% indica deficiência de ferro.<sup>29</sup> Animais mais jovens  
315 possuem uma demanda maior desse mineral, assim, já que a média de idade dos animais  
316 foi de 1,8 anos, os gatos do estudo poderiam estar estocando ferro para que este se torne  
317 disponível devido à demanda hematopoiética acentuada.<sup>28</sup>

318         No organismo, o ferro é obtido por duas vias principais, a primeira, por absorção  
319 intestinal pelos enterócitos do epitélio duodenal, e a segunda pela reciclagem do ferro

320 nas hemácias mais velhas.<sup>29</sup> A dieta pode não ter interferência na presença de depósitos  
321 de ferro na medula óssea, já que, como a grande maioria do ferro no organismo está  
322 ligada à hemoglobina, a fagocitose pelos macrófagos na reciclagem do ferro eritrocitário  
323 é a principal fonte de aporte de ferro.<sup>29-31</sup>

324 Os depósitos de ferro foram encontrados em maior quantidade na medula óssea  
325 das fêmeas, bem como os valores da capacidade total de ligação do ferro, capacidade  
326 livre de ligação do ferro e transferrina. A menor quantidade de ferro sérico encontrado  
327 nas fêmeas, embora sem diferença significativa relacionado ao sexo, associado aos  
328 aumentos das capacidades total e livre de ligação do ferro, pode fazer com que ocorram  
329 depósitos na medula óssea, já que este está em menor quantidade na circulação. As  
330 glândulas mamárias tanto de caninos quanto de felinos acumulam grandes  
331 concentrações de ferro, assim, esta pode ser uma hipótese para maior ocorrência de  
332 depósitos de ferro na medula óssea das fêmeas.<sup>32</sup> Estudos realizados com ratos  
333 demonstram que o estrogênio das fêmeas associado à citocromos e NADPH formam  
334 radicais livres de superóxido, que reduzem o  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$ , causando a liberação de  
335 ferro, que pode vir a ser estocado na medula óssea.<sup>33</sup>

336 Estudos em cães demonstram que o ferro possui valores circulantes variados de  
337 acordo com o período do dia e com o nível de cortisol, porém em felinos esse fator  
338 ainda não foi estudado.<sup>34</sup> A maioria das coletas foram realizadas no período matutino,  
339 diminuindo assim possíveis fatores de diferenças de horário de coleta. Em relação à  
340 raça, todos os felinos foram classificados como SRD (sem raça definida), assim, este  
341 fator também não foi implicado na variação nos achados de depósitos de ferro na  
342 medula óssea. Não foram realizadas as mensurações de ferritina felina devido à  
343 ausência de reagentes comerciais específicos para esta dosagem, aliada à baixa  
344 especificidade de outros estudos com reagentes humanos.<sup>35</sup> Porém, é interessante inferir

345 que, de acordo com os aumentos encontrados nas mensurações do metabolismo do  
346 ferro, a concentração de ferritina nesses animais, principalmente nas fêmeas,  
347 provavelmente estaria elevado, já que a ferritina é o único metabólito que possui relação  
348 significativa com os estoques de ferro.<sup>36</sup>

349 No presente trabalho pode-se concluir que existem certos padrões de distribuição  
350 das populações celulares específicas que podem variar, inclusive entre os sexos, quando  
351 comparados com Jain, 1993.<sup>18</sup> Considerando que foram avaliados gatos jovens  
352 clinicamente saudáveis, a variação dos valores encontrados pode vir a estabelecer novos  
353 valores de referência para contagens celulares de medula óssea para esses animais. Os  
354 valores encontrados nesse estudo das mensurações de ferro sérico, capacidade total e  
355 capacidade livre de combinação do ferro, transferrina e índice de saturação de  
356 transferrina para gatos, machos e fêmeas podem ser utilizados como rotina e como  
357 valores de referência para a espécie. Além disso, por este achado, pode-se comprovar  
358 que, felinos jovens clinicamente saudáveis, principalmente gatas fêmeas, podem fazer  
359 depósitos de ferro na medula óssea, sem ter qualquer relação aparente com síndromes  
360 ou doenças, sejam elas agudas ou crônicas. Contudo, sugere-se que novos estudos sejam  
361 realizados com gatos de outras idades e de outros ambientes para confirmar esses  
362 achados.

363

## 364 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 365 1. Harvey JW. Disorders of bone marrow. In: Harvey JW. *Veterinary hematology:*  
366 *a diagnostic guide and color atlas*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders;  
367 2012:260–318.
- 368 2. Weiss DJ. Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative  
369 immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. *Journal of*  
370 *Comparative Pathology*. 2008;138:46-53.



- 371 3. Sharkey LC, Hill SA. Structure of bone marrow. In: WEISS, D.J.; WARDROP,  
372 K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Ames, IA:Wiley-Blackwell;  
373 2010:8-13.
- 374 4. Weiss DJ, Evanson OA. A retrospective study of feline pancytopenia.*Comp*  
375 *Haematol In*. 2000;10:50–55.
- 376 5. Raskin RE, Messick JB. Bone marrow cytologic and histologic biopsies:  
377 indications, technique, and evaluation.*Veterinary Clinical: Small Animal*  
378 *Practice*.2012;42:23-42.
- 379 6. Turinelli V, Gavazza A, Stock G, Fournel-Fleury C. Canine bone  
380 marrowcytological examination, classification and referencevalues: a  
381 retrospective study of 295 cases. *Res Vet Sci*.2015;103:224–230.
- 382 7. Wijayanti N, Katz N. Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem*.  
383 2004;11:981-986.
- 384 8. Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais  
385 mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*.  
386 2008;30:390-397.
- 387 9. McCown JL, Specht, AJ. Iron Homeostasis and Disorders in Dogs and Cats: A  
388 Review. *AmAnimHosp Assoc*. 2011;47:151–160.
- 389 10. Hagiwara MK, Reche Júnior A, Lucas SRR. Estudo clínico da infecção de  
390 felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *RevistaBrasileira de*  
391 *CiênciaVeterinária*. 1997;4:35-38.
- 392 11. Fujino Y, Horiuchi H, Baba K, et al. Prevalence of hematological abnormalities  
393 and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline  
394 immunodeficiency virus infection. *Veterinary microbiology*. 2009;136:217-225.
- 395 12. Hartmann K. Clinical aspects of feline of feline immunodeficiency and feline  
396 leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.  
397 2011;143:190-201.
- 398 13. Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*.  
399 2012;11:2684-2710.
- 400 14. Korman RM, Hetzel N, Harvey AM, et al. A retrospective study of 180 anaemic  
401 cats: features, aetiologies and survival data. *Journal of feline medicine and*  
402 *surgery*. 2013;15:81-90.

- 403 15. Stanley EL, Eatroff AE. Hypocobalaminaemia as a cause of bone marrow failure  
404 and pancytopenia in a cat. *Australian veterinary journal*. 2017;95:156-160.
- 405 16. Crichton, R. *Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical*  
406 *consequences*. John Wiley & Sons. 2016.
- 407 17. Harvey, JW. Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW,  
408 Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Burlington,  
409 Massachusetts: Elsevier; 2008:259–285.
- 410 18. Jain N. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia. Lea and Febiger;  
411 1993:3-18.
- 412 19. Radakovich LB, Olver CS. Pigments: Iron and Friends. *Veterinary Clinics:*  
413 *Small Animal Practice*. 2017;47:17-29.
- 414 20. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, et al. ASVCP reference interval  
415 guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species  
416 and other related topics. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:441-453.
- 417 21. Von Dehn B. Pediatric clinical pathology. *Veterinary Clinics: Small Animal*  
418 *Practice*. 2014;44:205-219.
- 419 22. Valenciano A, Rizzi, T, Tyles, RD, et al. Atlas of canine and feline peripheral  
420 blood smears. Saint Louis: Saunders Elsevier; 2013:253-272.
- 421 23. Stacy NI, Harvey JW. Bone marrow aspirate evaluation. *Veterinary Clinical*  
422 *Small Animal*. 2017;47:31-52.
- 423 24. Geffre A, Friedrichs K, Harr K, et al. Reference values: a review. *Vet*  
424 *Clin Pathol*. 2009;38:288–298.
- 425 25. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation  
426 in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1989;27:409–437.
- 427 26. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab*  
428 *Med*. 2004;42:758–764.
- 429 27. Von Roedern M, Buriko Y, Prittie J, Lamb K. Investigation of iron status and  
430 markers of inflammation in anaemic and non-anaemic hospitalised cats. *Journal*  
431 *of Small Animal Practice*. 2017;58:323-329.
- 432 28. Smith JE. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, JJ et al. *Clinical*  
433 *biochemistry of domestic animals*. San Diego: Academic; 2008:259-285.
- 434 29. Bohn AA. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and  
435 cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2013;43:1319-1330.

- 436 30. Fairbanks VG, Beutler E. Iron metabolism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller  
437 BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams-Hematology*. 6th ed. New York:  
438 Mcgraw-Hill; 2001;295-304.
- 439 31. Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer  
440 insights. *European journal of haematology*. 2008;81:411-424.
- 441 32. Munson L, Moresco A. Comparative pathology of mammary gland cancers in  
442 domestic and wild animals. *Breast Dis*. 2007;28:7–21.
- 443 33. Wyllie S, Liehr JG. Release of iron from ferritin storage by redox cycling of  
444 stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free  
445 radical damage by estrogen. *Arch. Biochem. Biophys*. 1997; 346:180-186.
- 446 34. Worwood M. Iron-deficiency anaemia and iron overload. In: LEWIS, S.M. et al.  
447 (Eds). *Practical haematology*. 9.ed. London: Churchill Livingstone; 2001:115-  
448 128
- 449 35. Pires LSA, Dittrich RL, Souza AC, Bertol MAF, Patricio LFL. Parâmetros  
450 utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. *Ciência Rural*. 2010.
- 451 36. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE. Enzyme-linked immune sorbent assay to  
452 measure serum ferritin and the relationship between serum ferritin and nonheme  
453 iron stores in cats. *Veterinary pathology*. 1994;31:674-678.
- 454 37. Rizzi TE, Meinkoth JH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the cat. In:  
455 WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Ames,  
456 IA:Wiley-Blackwell; 2010:811-820.
- 457 38. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic*  
458 *animals*. 6th ed. Amsterdam: Elsevier-Academic Press, 2008.

**Tabela 1-**Avaliação dos aspirados de medula óssea de felinos machos e fêmeas clinicamente saudáveis.

Parâmetro	Referência <sup>18</sup>	Total (n=41)	Machos (n=18)	Fêmeas (n=23)	P
Celularidade (%)	25 - 75*	80 (50 -85)	80 (50 -85)	80 (50 -85)	0,957
Megacariócitos (campo/10x)	5 - 15	7 (3 - 10)	7 (3 - 10)	7 (3 - 10)	0,947
Relação Mieloide:Eritroide	1,21 - 2,16	1,12 ± 0,46	1,25 ± 0,47	1,02 ± 0,44	0,112
Eritroide maduro (%)	11,2 - 39,8	39,26 ± 10,66	36,25 ± 8,71	41,62 ± 11,61	0,206
Eritroide imaturo (%)	0 - 2,4	1,62 ± 0,54	1,62 ± 0,54	1,62 ± 0,65	0,968
Rubriblastos (%)	0 - 0,8	0,43 (0 - 1)	0,33 (0,16 - 1)	0,48 (0 - 1)	0,533
Pró-Rubríctos (%)	0 - 1,6	1,15 ± 0,41	1,19 ± 0,44	1,11 ± 0,38	0,702
Rubríctos (%)	8,6 - 23,2	13,6 (8,3 - 40)	13,7 (8,3 - 33,1)	13,5 (8,56 - 40)	0,783
Metarrubríctos (%)	1 - 10,4	23,3 ± 6,02	21,2 ± 5,87	24,99 ± 5,72	<b>0,045</b>
Mieloide maduro (%)	24,6 - 59,8	39,79 ± 9,27	41,88 ± 8,73	38,16 ± 9,54	0,206
Mieloide imaturo (%)	0 - 3,4	1,77 ± 0,78	1,92 ± 0,66	1,66 ± 0,87	0,302
Mieloblasto (%)	0 - 0,4	0,33 (0 - 0,97)	0,33 (0,16 - 0,66)	0,33 (0 - 0,97)	0,817
Pró-Mielócito (%)	0 - 3	1,42 ± 0,72	1,57 ± 0,62	1,31 ± 0,78	0,989
Mielócitoneutrofílico (%)	0,6 - 8	3,07 ± 1,32	3,25 ± 1,47	2,93 ± 1,21	0,450
Metamielócito (%)	4,4 - 13,2	3,65 ± 1,56	3,64 ± 1,65	3,66 ± 1,53	0,977
Neutrófilos bastonetes (%)	12,8 - 16,6	5,21 ± 2,41	5,7 ± 2,4	4,84 ± 2,36	0,259
Neutrófilos segmentados (%)	6,8 - 22	26,08 ± 8,29	27,5 ± 7,44	24,92 ± 8,89	0,318
Eosinófilos (%)	0,8 - 3,2	1,58 ± 1,22	1,38 ± 1,09	1,74 ± 1,31	0,356
Linfócitos (%)	11,6 - 21,6	16,41 ± 7,83	17,39 ± 7,26	15,63 ± 8,33	0,483
Monócitos (%)	0,2 - 1,6	0,50 (0,17 - 1,46)	0,50 (0,17 - 1,17)	0,67 (0,22 - 1,46)	0,540
Basófilos (%)	0 - 0,4	0 (0 - 0,66)	0 (0 - 0,66)	0 (0 - 0,33)	0,246
Plasmócitos (%)	0,2 - 1,8	0,33 (0 - 1,83)	0,33 (0 - 1,43)	0,32 (0 - 1,83)	0,490
Macrófagos (%)	0 - 0,2	0 (0 - 1)	0 (0 - 0,5)	0 (0 - 1)	0,226
Mitoses típicas (%)	0 - 2	0 (0 - 0,67)	0 (0 - 0,67)	0 (0 - 0,33)	0,353

Dados paramétricos apresentados pela mediana (min-máx), com significância obtida pelo teste Mann Whitney.

Dados não paramétricos apresentados pela média e desvio padrão, com significância obtida pelo Teste T.

\*Variáveis conforme a idade do animal (jovens > 75% células e idosos >75% de gordura)

**Tabela 2-** Valores de média, desvio padrão (DV), máximo, mínimo e mediana de felinos machos (n=18) e fêmeas clinicamente saudáveis (n=23).

Parâmetro	Média		DP		Máximo		Mínimo		Mediana	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Celularidade (%)	74,35	76,39	13,59	10,54	85,00	85,00	50,00	50,00	80,00	80,00
Megacariócitos (campo/10x)	6,70	6,72	2,32	1,67	10,00	10,00	3,00	3,00	7,00	7,00
Relação Mieloide:Eritroide	1,02	1,25	0,44	0,47	2,04	2,18	0,32	0,44	0,90	1,16
Eritroide maduro (%)	41,62	36,25	11,61	8,71	70,89	57,70	26,33	22,17	38,83	36,75
Eritroide imaturo (%)	1,62	1,62	0,55	0,54	2,83	2,50	0,33	0,83	1,67	1,67
Rubriblastos (%)	0,46	0,42	0,24	0,24	1,00	1,00	0,00	0,16	0,48	0,33
Pró-Rubríctos (%)	1,11	1,19	0,38	0,44	1,95	1,83	0,33	0,60	1,00	1,08
Rubríctos (%)	16,55	14,99	7,83	5,63	40,00	33,10	8,56	8,30	13,50	13,70
Metarrubríctos (%)	24,99	21,21	5,72	5,87	35,22	32,60	16,50	11,50	24,50	20,65
Mieloide maduro (%)	38,16	41,88	9,54	8,73	59,67	53,83	21,67	24,49	36,83	43,42
Mieloide imaturo (%)	1,66	1,92	0,87	0,66	3,33	3,17	0,33	1,12	1,50	1,83
Mieloblasto (%)	0,33	0,33	0,18	0,16	0,97	0,66	0,00	0,16	0,33	0,33
Pró-Mielócito (%)	1,31	1,57	0,78	0,62	3,00	2,83	0,16	0,66	1,14	1,54
Mielócitoneutrofílico (%)	2,93	3,25	1,21	1,47	5,00	6,60	0,66	1,00	2,83	2,92
Metamielócito (%)	3,66	3,64	1,53	1,65	6,83	6,60	1,50	1,50	3,44	3,33
Neutrófilos bastonetes (%)	4,84	5,70	2,36	2,44	10,17	10,00	1,83	2,30	4,50	4,95
Neutrófilos segmentados (%)	24,92	27,56	8,89	7,44	48,30	38,30	10,60	12,75	23,00	27,30
Eosinófilos (%)	1,74	1,38	1,31	1,09	5,85	4,15	0,17	0,17	1,50	1,17
Linfócitos (%)	15,63	17,39	8,33	7,26	31,3	30,00	1,67	1,75	14,67	17,22
Monócitos (%)	0,65	0,57	0,32	0,27	1,46	1,17	0,22	0,17	0,67	0,50
Basófilos (%)	0,03	0,08	0,08	0,17	0,33	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00
Plasmócitos (%)	0,45	0,50	0,48	0,44	1,83	1,43	0,00	0,00	0,32	0,33
Macrófagos (%)	0,16	0,06	0,25	0,13	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Mitoses típicas (%)	0,05	0,10	0,10	0,18	0,33	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabela 3-**Resultados dos valores hematológicos de felinos machos e fêmeas clinicamente saudáveis.

Parâmetro	Referência <sup>37</sup>	Total(n=41)	Machos (n=18)	Fêmeas (n=23)
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μL)	6-10	8,2 ± 1,4	8,3 ± 1,6	8,1 ± 1,3
Hemoglobina (g/dL)	8-15	10,9 ± 1,6	11 ± 2,2	10,9 ± 1,1
Hematócrito (%)	24-45	35 (26 – 45)	35 (35 – 46)	34 (26 – 38)
VCM (fL)	39-55	41,2 ± 3,5	41,1 ± 3	41,5 ± 3,9
CHCM (%)	31-35	32,5 (30 – 41,2)	32,4 (30 – 34)	32,5 (30,3 – 41,2)
Plaquetas (10 <sup>3</sup> / μL)	200-800	343,8 ± 119,2	310,1 ± 121,1	362,2 ± 118,5
Leucócitos totais (/μL)	5000-19500	11100 (4600 – 23800)	11000 (5300 – 20000)	11250 (4600 – 23800)
Neutrófilos bastonetes (/μL)	0-300	0 (0 – 188)	0 (0 – 98)	0 (0-188)
Neutrófilos segmentados (/μL)	2500-12500	7400 ± 4100	6991 ± 3381	7689 ± 4749
Eosinófilos (/μL)	100-1500	605 (0 – 6188)	485 (0 – 2256)	786 (110 – 6188)
Linfócitos (/μL)	1500-7000	3356 ± 1800	3076 ± 1626	3222 ± 1612
Monócitos (/μL)	0-850	174 (0 – 880)	174 (0 - 880)	147 (0 – 768)

**Tabela 4-**Resultados dos valores dos testes bioquímicos de felinos machos e fêmeas clinicamente saudáveis.

Variável	Referência <sup>38</sup>	Total (n=41)	Machos (n=18)	Fêmeas (n=23)
Albumina (g/dL)	2,6 – 3,3	3,17 ± 0,22	3,18 ± 0,22	3,17 ± 0,22
ALT (U/L)	< 83	53 (2 - 128)	60 (13 – 128)	40 (2 – 112)
Creatinina (mg/dL)	0,8 - 1,8	0,98 ± 0,23	0,99 ± 0,24	0,97 ± 0,23
FA (U/L)	< 93	59 (19 – 265)	75 (27 – 217)	59 (19 -265)
Globulina (g/dL)	2,6 – 5,1	3,6 (2,7 – 5,5)	3,8 (2,7 – 5,3)	3,3 (2,8 – 5,5)
Proteína Total (g/dL)	5,4 - 7,8	6,8 (5,9 – 8,4)	6,9 (5,9 – 8,2)	6,7 (6 – 8,4)
Ureia (mg/dL)	32 – 54	54 (38 – 76)	52 (38 – 76)	55 ( 43 – 75)

**Tabela 5-** Valores médios de concentração de ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro, capacidade livre de ligação do ferro, transferrina e índice de saturação de transferrina em gatos fêmeas e machos clinicamente saudáveis.

<b>Parâmetro</b>	<b>Referência<sup>38</sup></b>	<b>Total (n=41)</b>	<b>Machos (n=18)</b>	<b>Fêmeas (n=23)</b>	<b>P</b>
Ferro Sérico(µg/dL)	68 – 215	78 (36 – 147)	82,5 (36 – 147)	74,5 (47 – 124)	0,423
Capacidade total de ligação do ferro (µg/dL)	290	331,3 ± 59,6	279 ± 52,2	343 ± 49,2	0,002
Capacidade livre de ligação do ferro (µg/dL)	105 – 205	231,1 ± 66,2	195,6 ± 67,9	266,6 ± 42,2	0,003
Transferrina (mg/dL)	-	217,9 ± 41,7	195,3 ± 36,5	240,5 ± 34,4	0,002
Índice de saturação da transferrina (%)	20 – 50	24,5 (11 – 59)	32 (11 – 59)	21 (15 – 33)	0,044

**Tabela 6** - Valores de média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo de parâmetro do metabolismo do ferro em gatos clinicamente saudáveis.

Parâmetro/Referência <sup>38</sup>	Resultados
Ferro sérico (68 – 215 µg/dL)	78 (36 – 147)
Média	79,6
Mediana	78
Desvio Padrão	24,4
Máximo	147
Mínimo	36
Capacidade total de ligação do ferro (290 µg/dL)	331,3 ± 59,6
Média	311,3
Mediana	313
Desvio Padrão	59,6
Máximo	465
Mínimo	184
Capacidade livre de ligação com ferro (105 – 205 µg/dL)	231,1 ± 66,2
Média	231,1
Mediana	236
Desvio Padrão	66,2
Máximo	378
Mínimo	101
Transferrina (mg/dL)	217,9 ± 41,7
Média	217,9
Mediana	219,1
Desvio Padrão	41,7
Máximo	325,5
Mínimo	128,8
Índice de saturação da transferrina (%)	24,5 (11 – 59)
Média	26,5
Mediana	24,5
Desvio Padrão	11
Máximo	59,3
Mínimo	11,3



#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste trabalho foi possível verificar que existe variação na contagem diferencial das células da medula óssea em comparação com os valores de referência descritos por Jain, 1993 para felinos domésticos. Tais variações podem não ser significativas de doenças ou síndromes, uma vez que as condições clínicas dos gatos não demonstravam alterações. Assim, os achados deste trabalho podem estabelecer novos valores de referência para contagens celulares de medula óssea de gatos jovens clinicamente saudáveis.

Os valores para ferro sérico, capacidade total e capacidade livre de combinação do ferro, transferrina e índice de saturação de transferrina para gatos, machos e fêmeas jovens clinicamente saudáveis, encontrados podem ser utilizados como rotina e como valores de referência para a espécie em laboratórios de patologia clínica veterinária. Este estudo também comprova que gatos jovens clinicamente saudáveis podem fazer depósitos de ferro na medula óssea, sem ter qualquer relação com síndromes ou doenças, sejam elas agudas ou crônicas. Contudo, sugere-se que novos estudos sejam realizados com gatos de outras idades e de outros ambientes para confirmar esse achado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ANDREWS, N.C. Forging a field: the golden age of iron biology. **Blood**, v.112(2):219–230, 2008.

BOHN, A.A. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v.43(6):1319-1330, 2013.

BOUDREAUX, M.K. Trombopoiesis. *In*: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010. Cap. 9, p. 56-60.

BRASSE-LAGNEL, C.; KARIM, Z.; LETTERON, P.; et al. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. **Gastroenterology**,v.140:261–271, 2011.

BYERS, C. Diagnostic bone marrow sampling in cats: currently accepted best practices. **Journal of Feline Medicine and Surger**, v. 19(7):759-767, 2017.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Crit Rev Clin Lab Sci**,v. 40(2):151-182, 2003.

CRICHTON, R. **Iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences**. John Wiley & Sons. 2016.

DONOVAN, A.; ROY, C.N.; ANDREWS, N.C. The ins and outs of iron homeostasis. **Physiology**, v. 21 (2):115-123, 2006.

GANZ, T.; NEMETH, E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. **Hematology Am SocHematolEduc Program**, p. 538–542, 2011.

GRIMES, C.N.; GIORI, L.; FRY, M.M. Role of hepcidin in iron metabolism and potential clinical applications. **Vet Clin North Am Small AnimPract**, v.42:85–96, 2012.

GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A.Cytology of bone marrow. **Vet Clin N Am Small AnimPract**, v. 32:1313 – 1374, 2002.

HARTMANN,K. Clinical aspects of feline of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**,v. 143:190-201, 2011.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review.**Viruses**,v. 4(11):2684-2710, 2012.

HARVEY, J.W. Disorders of bone marrow. *In*: Harvey JW (ed).**Veterinary hematology. A diagnostic guide and color atlas**. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012. cap. 9. p. 260–318.

HARVEY, J.W. Iron metabolism and its disorders. *In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Burlington, Massachusetts: Elsevier, 2008, cap. 9, p. 259–285.

HILTON, K.B.; LAMBERT, L.A. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene*, v. 415:40–48, 2008.

JAIN N. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea &Febiger. 1993.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticulo endothelial system. *Crit Rev BiochemMolBiol*, v. 38(1):61-88, 2003.

LAWEN, A.; LANE D.J. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid Redox Signal*, v.18(18):2473–2507, 2013.

MALYSZKO, J. Hepcidin assays: ironing out some details. *Clin J Am SocNephrol*, v. 4(6):1015–1016, 2009.

MORITZ, A.;BAUER, N.B.; WEISS, D.J.; et al. Evaluation of bone Marrow. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd,2010, cap. 132, p. 1039 – 1046.

NAIGAMWALLA, D.Z.; WEBB, J.A.; GIGER, U. Iron deficiency anemia. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 53(3): 250, 2012.

OLVER, C.S. Eritropoiesis. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 20, p. 36-42.

PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S.K.; TARTAKOFF, A.; et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, v. 51:5705–5724, 2012.

RADAKOVICH, L.B.; OLVER, C.S. Pigments: Iron and Friends. *Veterinary Clinics: Small Animal Practic*, v.47:17-29, 2017.

RADIN, M.J.; WELLMAN, M.L. Granulopoiesis. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 7, p. 43-49.

RASKIN, R.E. Cytochemical staining. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 144, p. 1141–61.

RASKIN, R.E.; MESSICK, J.B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 42(1):23-42, 2012.

REAGAN, W.J.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; POITOUT-BELISSENT, F.; et al. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 40(2):119-135, 2011.

RIZZI, T.E.; CLINKENBEARD, K.D.; MEINKOTH, J.H. Normal hematology of the cat. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 105, p. 811-820.

SHARKEY, L.C.; HILL, S.A. Structure of bone marrow. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 2, p. 8-13.

SHIMODA, T.; SHIRANAGA, N.; MASHITA, T.; et al. Bone marrow necrosis in a cat infected with feline leukemia virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62(1):113-115, 2000.

STACY, N.I.; HARVEY, J.W. Bone marrow aspirate Evaluation. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 47(1):31-52, 2017.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Medula Óssea e linfonodos. *In: Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, cap. 2, p. 263-302.

TURINELLI, V.; GAVAZZA, A. Retrospective study of 152 feline cytological bone marrow examinations: preliminary classification and ranges. **Jornal of Feline Medicine and Surgery**, 1-11, 2018.

TURINELLI, V.; GAVAZZA, A.; STOCK, G.; et al. Canine bone marrow cytological examination, classification and reference values: a retrospective study of 295 cases. **Res Vet Sci**, v. 103:224–230, 2015.

WEEDEN, A.L.; TAYLOR, K.R.; TERRELL, S.P.; et al. Suspected myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a feline leukemia virus-negative cat. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45(4): 584-593, 2016.

WEISS, D.J. Iron and copper deficiencies and disorders of iron metabolism. *In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's veterinary hematology*. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, cap. 26, p. 167-171.

WEISS, D.J. A retrospective study of the incidence and classification of bone marrow disorder in cats (1996–2004). **Comparative Clinical Pathology**, v. 14(4):179-185, 2006.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N. Biology of heme in health and disease. **Curr Med Chem**, v. 11(8):981-986, 2004.

WITMER, C.M. Hematologic manifestations of systemic disease (including iron deficiency, anemia of inflammation and DIC). **Pediatric Clinics**, v. 60(6):1337-1348, 2013.