



## IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS CD45<sup>+</sup> E SUBPOPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

Sofia Borin-Crivellenti<sup>1</sup>, Leandro Zuccolotto Crivellenti<sup>1,2</sup>, Fabiana Rossetto de Moraes<sup>3</sup>, Aureo Evangelista Santana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal (sofiaborinrivellenti@yahoo.com.br), São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Citometria de Fluxo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

### RESUMO

O presente artigo objetivou quantificar a população de leucócitos CD45<sup>+</sup> e suas respectivas subpopulações na doença renal crônica canina nos estádios 2, 3 e 4 através da técnica de citometria de fluxo. Os dados permitiram verificar Nenhuma alteração significativa na contagem global leucocitária de caninos com DRC foi identificada por este trabalho. Por outro lado, a contagem da linhagem linfocitária apresentou-se seriamente comprometida nos animais com DRC em fase terminal (estádio 4), ressaltando a importância da avaliação imunológica deste grupo de pacientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Caninos, imunofenotipagem celular, linfócitos.

### IMMUNOPHENOTYPING OF CD45<sup>+</sup> CELLS AND LEUKOCYTE SUBPOPULATIONS IN DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

#### ABSTRACT

This paper aimed to quantify the population and subpopulation of CD45<sup>+</sup> leukocytes in dogs with chronic kidney disease at stages 2, 3 and 4 through flow cytometry technic. There is no significant difference in total leukocyte count in dogs with CKD, but the lymphocyte lineage presents seriously compromised in animals in the terminal stage of CKD, showing how important is to evaluate their immunity periodically.

**KEYWORDS:** Canine, cell immunophenotyping, lymphocytes.

#### INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC), principal afecção renal dos cães, reflete-se na perda da capacidade excretora e concentradora dos rins, com redução da filtração glomerular e conseqüente aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias que são, normalmente, eliminadas (BARTGES & POLZIN, 2011; POLZIN, 2011; CRIVELLENTI, 2012).

Do ponto de vista diagnóstico, tanto para fins clínicos quanto experimentais, a classificação do paciente com DRC sem os sinais clínicos de uremia é um desafio para os pesquisadores da área (CRIVELLENTI et al., 2009). Assim sendo, atualmente tem se adotado a classificação ditada pela *International Renal Interest Society* (IRIS), a qual instituiu um estadiamento para a DRC, caracterizando-a em 4 estádios: 1 – ausência de azotemia, 2 – azotemia leve, 3 – azotemia moderada e 4 – azotemia severa (IRIS, 2009).

O acúmulo de substâncias que deveriam ser normalmente eliminadas pelos rins é traduzido, clinicamente, por uma constelação de sinais clínicos conhecida como síndrome urêmica, que incluem o desequilíbrio hídrico e natrêmico, anemia, intolerância a carboidratos, distúrbios neurológicos, distúrbios gastrintestinais, osteodistrofias (BARTGES & POLZIN, 2011), deficiência imunológica, acidose metabólica e processos inflamatórios que predispõem à fibrose e esclerose renais (OTS et al., 2000).

Na década de setenta, foram encetados estudos sobre o perfil imunológico de pacientes urêmicos humanos, os quais apresentaram resultados que variaram consideravelmente, e cuja função das células linfocitárias mostrou-se reduzida, em alguns casos (QUADRACCI et al., 1976), normal (DANIELS et al., 1971) e aumentada em outros (NAKHLA & GOGGIN, 1973). De acordo com STEWART & MILLER (1980), tais contradições derivam de dois fatores relevantes. O primeiro guarda relação com o fato dos grupos estudados estarem inseridos em programas de diálise ou terem sido transplantados, pois a necessidade de se manter o tratamento farmacológico ou cirúrgico impossibilitou a avaliação do estado urêmico por si só. O segundo decorre possivelmente da forma como os experimentos foram conduzidos. Alguns pesquisadores utilizaram-se de suspensões de isolados de linfócitos (*in vitro*), enquanto outros trabalharam com testes *in vivo*.

No ano de 1980, em dois importantes experimentos nos quais foram utilizados cultivos celulares, foi demonstrada marcante influência da uremia, experimentalmente induzida e controlada, na imunidade celular em ratos (STEWART & MILLER, 1980). Em ensaios realizados em pacientes humanos em hemodiálise, observou-se que o plasma de pacientes urêmicos contém fatores inibitórios capazes de influenciar a resposta linfocitária *in vitro* (RASKA et al., 1980), além de causar anormalidades das funções granulocitárias de aderência, fagocitose e quimiotaxia (CHARPENTIER et al., 1983).

A partir dos ensaios e resultados referidos precedentemente, os estudos se verticalizaram e, mais recentemente, por intermédio de técnicas de citometria de fluxo, obtiveram-se resultados que indicam baixa resposta imunológica associada à significativa redução de linfócitos circulantes nos estádios mais avançados da doença renal crônica humana (NAIRN et al., 2005; PAHL et al., 2010).

Presentemente, há grande interesse no estudo do leucograma de pacientes com DRC, também na medicina veterinária de pequenos animais. Assim, baseando-se em resultados preliminares (BORIN et al., 2010) e utilizando-se da imunofenotipagem celular, objetivou-se com este trabalho quantificar a população de leucócitos CD45<sup>+</sup> e suas respectivas subpopulações na doença renal crônica canina nos estádios 2, 3 e 4 segundo a classificação da IRIS (2009). Hipotetizou-se que à luz de tais resultados, outras comparações poderiam ser realizadas futuramente, além da possibilidade de se descrever como o sistema imunológico celular se apresenta nas diversas fases em que

esta doença progressiva se manifesta. Ademais, considerando-se a maior incidência de DRC em cães idosos (POLZIN 2011), e que a idade é um fator que pode vir a comprometer a hematopoiese, a comparação dos resultados obtidos com os cães idosos saudáveis possibilitaria verificar o grau de influência da DRC nas alterações no leucograma de cães acometidos por esta enfermidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

O grupo controle compôs-se de três fêmeas (30%) e sete machos (70%), todos sem raça definida. Apresentaram idades que variaram de oito a 12 anos, sendo que 73% dos animais encontraram-se na faixa etária de oito a nove anos.

O grupo de doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2) compôs-se de três fêmeas (33,33%) e seis machos (66,64%), com idades entre oito e 15 anos, sendo 44,45% situado na faixa etária entre oito e 10 anos. Destes, três animais (33,34%) sem raça definida, e os demais das raças Poodle (2), Cocker Spaniel (2), Maltês (1) e Boxer (1). O grupo DRC3 constituiu-se de cinco fêmeas (50%) e cinco machos (50%), com idades variando entre dois e 15 anos, sendo que 50% deles encontravam-se na faixa etária de 10 a 15 anos. Destes, dois (20%) eram da raça Poodle, dois (20%) Weimaraner, e outros dois (20%) sem raça definida. Os quatro cães remanescentes distribuíram-se nas raças ShihTzu (1), São Bernardo (1), Fox Terrier (1) e Chow Chow (1). Os cães doentes renais crônicos classificados no estágio 4 (DRC4) perfizeram três fêmeas (30%) e sete machos (70%), com idades variando entre dois e 16 anos, sendo 50% situado na faixa etária de nove a 16 anos. Sete cães (70%) não apresentaram definição racial e os demais eram das raças Poodle (2) e Labrador (1).

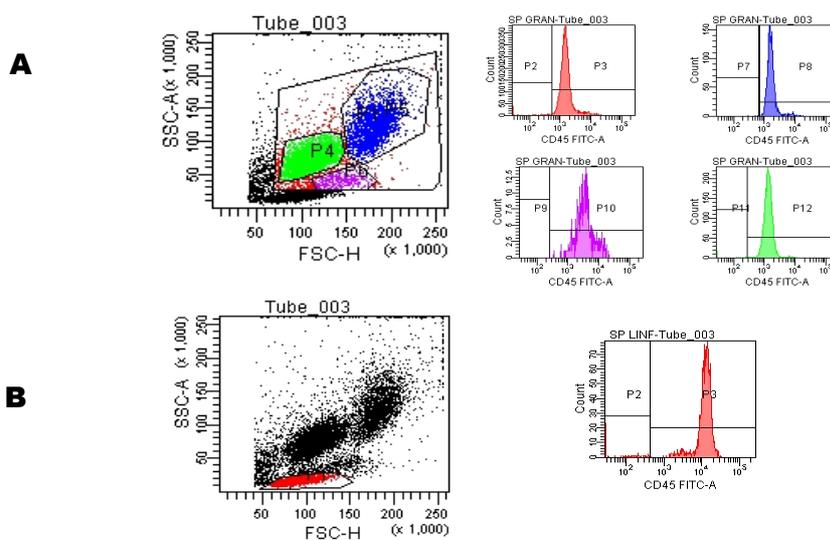
Como critério de inclusão para o grupo DRC, foram levados em consideração a evolução clínica de mais de 15 dias, valores de creatinina sérica superiores à 1,4 mg/dL após devida hidratação do paciente, obtida em dois ou três momentos diferentes ao longo de algumas semanas. Além disso, não foram incluídos no grupo/subgrupos de doentes renais crônicos, pacientes que já tivessem sido submetidos a transfusões sanguíneas ou ao tratamento com quaisquer fármacos indutores de hematopoiese (Nandrolona, rhG-CSF, Timomodulina e/ou Eritropoietina).

As amostras de sangue periférico foram obtidas por venipunção jugular e foram envasadas em tubos a vácuo contendo K<sub>2</sub>-EDTA. A preparação das amostras para os estudos citométricos foi realizada num prazo máximo de 24 horas após as coletas, e as respectivas leituras em no máximo 72 horas após a marcação celular. Para tanto, alíquotas do sangue periférico foram encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, SP. A metodologia para a avaliação citométrica consistiu, inicialmente, na identificação de três tubos estéreis para cada amostra (tubo 1 – só células, tubo 2 – IgG2bFITC e tubo 3 - CD45FITC). Foram adicionados 100 µL de amostra (sangue periférico ou medula óssea) e dois µL de IgG2bFITC (MCA1212F, Serotec, USA) no tubo 2; e anti-CD45<sup>+</sup> conjugado com FITC (MCA1042F, Serotec, USA) no tubo 3.

Os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Um mL de tampão de lise de hemácias (*FACS Lysing Solution* – Becton Dickinson) foi adicionado a cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por dez minutos à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, realizam-se lavagens da suspensão

de células com solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (PBS), por três vezes, cujo procedimento consistiu na centrifugação a 1800 G por três minutos, desprezo do sobrenadante e adição de 2,0 mL de PBS. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 500 µL de PBS com formol à 1% nos três tubos para preservação do material. As amostras foram mantidas sob refrigeração. Após transporte adequado ao supracitado Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto, SP, foram submetidas à análise no citofluorômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA) com vistas à contagem das células CD45<sup>+</sup>.

O modo de aquisição linear foi utilizado para as avaliações do sangue periférico. As análises das populações das células CD45<sup>+</sup> totais e subpopulações leucocitárias foram realizadas por profissional treinado e experiente e na forma de estudo cego. Foram obtidos 10000 eventos, para identificação e quantificação das células CD45<sup>+</sup>, no sangue periférico (Figura 1) utilizando-se do programa FACSDiva (BD). O cálculo dos valores absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico foi realizado multiplicando-se os valores percentuais das referidas células pela contagem global de leucócitos.



**FIGURA 1.** Representações gráficas das seleções padrões dos *gates* utilizados para a avaliação das subpopulações de leucócitos CD45<sup>+</sup> pela técnica de citometria de fluxo em sangue periférico canino (FSC vs. SSC). Em (A) observa-se marcação celular CD45<sup>+</sup> nos *gates* das populações de granulócitos (*gates* verde e azul) e monócitos (*gate* roxo), e em (B) da população de linfócitos (*gate* vermelho).

Salienta-se que os demais exames, pertinentes a classificação dos cães nos três diferentes estádios da DRC e à determinação do bom estado geral dos cães do grupo controle foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário da UNESP, campus de Jaboticabal, SP.

Os dados foram avaliados pela análise de variância de via única seguida pelo *post hoc* teste de Tukey. Para cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média, erro padrão da média, valores mínimo e máximo. Sempre que necessário considerou-se o nível de significância de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho buscou avaliar a distribuição das populações de leucócitos CD45<sup>+</sup> totais e suas respectivas subpopulações (monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup>) na doença renal crônica canina nos estádios 2, 3 e 4 segundo a classificação da IRIS (2009), assim como compará-los aos obtidos em um grupo controle composto por cães saudáveis idosos, pois embora não haja predileção racial e etária (POLZIN, 2011), sabe-se que a DRC é predominante nos pacientes caninos em idade mais avançada (BARTGES & POLZIN, 2011).

Relativamente à quantificação total no sangue periférico não foram verificadas diferenças significativas nas contagens de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos e granulócitos entre os animais do grupo controle e doentes renais crônicos nos três subestádios. Entretanto, verificou-se redução significativa dos linfócitos CD45<sup>+</sup> no grupo DRC4 quando comparados aos animais do grupo controle e aos doentes renais no estágio 2 da DRC (Tabela 1).

**TABELA 1.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média, valores mínimo e máximo) da quantificação imunofenotípica de células CD45<sup>+</sup> totais, monócitos, granulócitos e linfócitos CD45<sup>+</sup> no sangue periférico dos cães controle (GC), doentes renais crônicos estágio 2 (DRC2), 3 (DRC3) e 4 (DRC4).

	GC	DRC2	DRC3	DRC4	<i>p</i>
<b>CD45<sup>+</sup> totais</b>	7.749 $\pm$ 833,5	8.786 $\pm$ 540,6	7.987 $\pm$ 735,2	6.613 $\pm$ 704,9	0,09
<b>Monócitos</b>	367,0 $\pm$ 105,3	346,0 $\pm$ 66,16	226,0 $\pm$ 74,25	392,0 $\pm$ 73,55	0,54
<b>Granulócitos</b>	5.365 $\pm$ 803,3	7.105 $\pm$ 656,0	5.594 $\pm$ 719,7	5.031 $\pm$ 564,7	0,13
<b>Linfócitos</b>	1.293 $\pm$ 173,7 <sup>a</sup>	1.325 $\pm$ 172,2 <sup>a</sup>	963,4 $\pm$ 249,0 <sup>ab</sup>	428,7 $\pm$ 93,52 <sup>b</sup>	<0,001

\* Médias seguidas de diferentes letras diferiram significativamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Desde a década de 50 autores sugeriram, segundo revisão feita por NAKHLA & GOGGIN (1973), haver um importante desequilíbrio na resposta imunológica de humanos doentes renais crônicos, manifestada principalmente por deficiência na contagem absoluta de linfócitos circulantes. Desde então, muito já se pesquisou a respeito das alterações nas subpopulações leucocitárias decorrentes da doença renal crônica em humanos em terapia dialítica. Semelhante aos resultados aqui obtidos, estudos em humanos dialíticos revelam baixa resposta imunológica associada à significativa redução no número de linfócitos circulantes nos estágios mais avançados da doença, destacando, inclusive, a redução e alterações funcionais dos linfócitos B (PAHL et al., 2010) e de linfócitos T (NAIRN et al., 2005). Cabe ressaltar que tais dados podem somente parcialmente serem extrapolados e comparados aos encontrados na espécie canina, e a razão reside no fato da maioria deles trazer informações acerca da

fase dialítica da DRC e não da fase pré-dialítica, a qual se assemelha aos estádios da DRC canina.

A imunossenescência é caracterizada por alterações quantitativas e/ou qualitativas em componentes celulares e moleculares, os quais levam a um estado de inadequada atividade do sistema imunológico. Tal fato propicia uma maior suscetibilidade a infecções, menor resposta a imunizações, maior índice de fenômenos autoimunes, neoplásicos e degenerativos, quando comparados a indivíduos mais jovens (AW et al., 2007). Embora a grande maioria dos cães com DRC tenham idade avançada, observou-se que as contagens das células CD45<sup>+</sup> e suas subpopulações nos cães idosos saudáveis utilizados como grupo controle assemelharam-se aos valores obtidos nos cães em estágio 2 da DRC, inclusive não diferenciando-se estatisticamente dos cães em estágio 3 da doença.

Dentre os poucos trabalhos que avaliaram a imunidade celular em humanos com doença renal crônica em fase pré-dialítica, BOUTS et al. (2004) observaram que crianças com DRC pré-dialítica apresentavam baixa resposta imunológica em decorrência da quantidade insuficiente de linfócitos B (CD45<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>). Tais resultados assemelham-se, em parte, aos dados descritos, porém não permitiram a comparação entre os diversos estádios da doença vista as formas de classificação em cães e humanos serem realizadas de forma diferente.

Corroborando estes resultados, KRALOVA et al. (2010) apontaram não haver diferença significativa na contagem total de leucócitos, monócitos e granulócitos, porém marcante linfopenia no estágio final da doença renal crônica canina. Cabe ressaltar que tais autores não utilizaram a classificação segundo a IRIS (2009), sendo possível apenas fazer a comparação dos resultados entre os estádios mais avançados da DRC, já que os animais que apresentaram linfopenia eram detentores de valores médios de creatinina sérica superiores a 10,99, o que os classificaria segundo a IRIS em cães portadores de DRC estágio 4.

## CONCLUSÃO

Nenhuma alteração significativa na contagem global leucocitária de caninos com DRC foi identificada por este trabalho. Por outro lado, a contagem da linhagem linfocitária apresentou-se seriamente comprometida nos animais com DRC em fase terminal (estádio 4), ressaltando a importância da avaliação imunológica deste grupo de pacientes.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio científico e financeiro (Processos nº 2008/56616-1 e 2009/52230-4).

## REFERÊNCIAS

AW, D.; SILVA, A.B.; PALMER, D.B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. **Immunology**, v.120, p.435-46, 2007.

BARTGES, J.; POLZIN, D.J. Historical information and physical examination. In: BARTGES, J.; POLZIN, D.J. **Nephrology and urology of small animals**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p.25-27.2011.

BORIN, S.; CRIVELANTI, L. Z.; PEDRAZA, L. N.; MIOTTO, M. R.; CHAVES, M.R.S.; CAMPOS FILHO, E.; MORAIS, F. R.; CARVALHO, M. B.; SANTANA, A. E. Imunofenotipagem de células CD45<sup>+</sup> em el estudio de la hipoplasia sanguínea de perros con enfermedad renal crónica - resultados preliminares. **Anais...** In: LATIN AMERICAN VETERINARY CONFERENCE 2010, Lima, Perú.

BOUTS, A. H. M.; DAVIN, J. C.; KREDIET, R. T.; MONNENS, L. A. H.; NAUTA, J.; SCHRÖDER, C. H.; VAN, R. A. W. Children with chronic failure have reduced numbers of memory B cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.137, p. 589-594, 2004.

CHARPENTIER, B.; LANG, P. H.; MARTIN, B.; NOURY, J; MATHIEU, D.; FRIES, D. Depressed polymorphonuclear leukocyte functions associated with normal cytotoxic functions of T and natural killer cells during chronic hemodialysis. **Clinical Nephrology**, v.19, p.288-294, 1983.

CRIVELLENTI, L.Z. Nefrologia e Urologia. In: CRIVELLENTI, L.Z; BORIN-CRIVELLENTI, L.Z. **Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. Cap. 8, MedVet: São Paulo, 2012.

CRIVELLENTI, L.Z; BORIN, S.; BRUM, A.M. Abordagem atual da insuficiência renal crônica canina. **Nucleus Animalium**, v.1, n.1, p. 143-155, 2009.

DANIELS, J. C., SAKAI, H., REMMERS, A. R., SARLES JUNIOR, H. E., FISH, J. C., COBB, E. K., LEVIN, W. C; RITZMANN, S. E. In vitro reactivity of human lymphocytes in chronic uraemia: analysis and interpretation. **Clinical and Experimental Immunology**, v.8, p.213-227, 1971.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS) - **staging system for chronic kidney disease (CKD)**, 2009. Disponível em <[http:// www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)>.

KRALOVA, S.; LENKA, L.; MIROSLAV, T. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.74, p.124-129, 2010.

NAIRN, J.; GREG HODGE, P. H.; HENNING, P. Changes in leukocyte subsets: clinical implications for children with chronic renal failure. **Pediatric Nephrology**: Journal of the International Pediatric Nephrology Association, v.20, p.190-196, 2005.

NAKHLA, L.S.; GOGGIN, M. Lymphocyte transformation in chronic renal failure. **Immunology**, v.24, p.229-235, 1973.

OTS, M.; PECHTER, U.; TAMM, A. Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**; International Journal of Clinical Chemistry, v.297, p.29-41, 2000.

PAHL, M. V.; GOLLAPUDI, S. G.; PAVAN, L. S.; ELAHIMEHR, R.; VAZIRI, N. D. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte Subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. **Nephrology, Dialysis, Transplantation** : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, v.25, p.205-212, 2010.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. **The Veterinary Clinics of North America**. Small Animal Practice, v.41, p.15-30, 2011.

QUADRACCI, L. J.; RINGDEN, O.; KRZYMANSKI, M. The effect of uraemia and transplantation on lymphocyte subpopulations. **Kidney International**, v.10, p.179-184, 1976.

RASKA, K.; MORRISON, A. B.; RASKOVA, J. Humoral inhibitors of the immune response in uremia: III. The immunosuppressive factor of uremic rat serum is a very low density lipoprotein. **Laboratory Investigation**; A Journal of Technical Methods and Pathology, v.42, p.636-642, 1980.

STEWART, E.; MILLER, T. E. Host immune status in uraemia – II Serum factors and lymphocyte transformation. **Clinical and Experimental Immunology**, v.41, p.123-129, 1980.