Investigação

AVALIAÇÃO ERITROCITÁRIA ATRAVÉS DA BIOTECNOLOGIA DE CITOMETRIA DE FLUXO

Erythrocyte evaluation by flow cytometry biotechnology

Lucas Amoroso Lopes de Carvalho^{1*}, Nathan da Rocha Neves Cruz¹, Patrícia Jáballi Bueno¹ e Aureo Evangelista Santana¹

Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelanni, sn, Zona Rural, Jaboticabal, SP.
*autor-correspondente: lucas.amoroso92@hotmail.com

RESUMO

Os eritrócitos podem ser facilmente analisados por meio da citometria de fluxo, por terem uma complexidade particular e não precisarem de marcações imunofenotípicas específicas como as células nucleadas, reduzindo assim o custo da utilização da técnica. O presente trabalho tem como objetivo fazer uma revisão de relatos científicos sobre a utilização da citometria de fluxo para a avaliação eritrocitária. Dessa forma, o trabalho visa apresentar essa biotecnologia como uma possível ferramenta diagnóstica para avaliação da morfocitometria, fragilidade osmótica, reticulocitometria, marcações de eritroparasitas e marcadores anti-eritrocitários em amostras veterinárias.

Palavras-chave: Hematologia, eritrócitos, FACS

ABSTRACT

Erythrocytes can be easily analyzed by flow cytometry due to their singular complexity, and because they do not require specific immunophenotypic markings like nucleated cells. Therefore, the application cost of the erythrocyte technique is lower. This review aims to report the use of flow cytometry for erythrocyte evaluation. Examples of biotechnology as a diagnostic tool in veterinary samples examined in this paper include: erythrocyte morphocitometry, osmotic fragility, reticulocitometry, erythroparasite markers and anti-erythrocyte markers.

Key-words: Hematology, erythrocytes, FACS

INTRODUÇÃO

O hemograma é o exame laboratorial que caracteriza e mensura as frações sanguíneas (celulares e proteicas) e, a partir dos valores referenciais estabelecidos em animais saudáveis, pode-se identificar e interpretar as possíveis alterações fisiopatológicas e suas consequências no organismo (TVEDTEN e WEISS, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

No hemograma, o eritrograma dedica-se a quantificar e qualificar os eritrócitos e, através da correlação dos índices hematimétricos: o volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), sendo possível classificar as anemias e as policitemias (THORN, 2010). Além disso, no eritrograma pode-se avaliar a condição de regeneração por meio do índice de anisocitose (RDW) e este conjunto auxilia na determinação das causas das alterações hematológicas (THRALL, 2015).

Os contadores hematológicos automáticos determinam certas características celulares, tais como o volume de eritrócitos por intermédio de imagens gráficas, construídas a partir de histogramas de frequência que podem, assim, evidenciar possíveis variações no tamanho celular (anisocitose) mesmo quando não há alteração do VCM, porque a frequência é construída em relação a todas as células contadas (HARVEY, 2012).

Quando há predomínio de células microcíticas, há um desvio do pico de frequência para a esquerda do gráfico, indicando uma alteração hematológica carencial, por outro lado, quando há o surgimento de células

macrocíticas ocorre uma frequência de células à direita do eixo de eritrócitos normais, pode estar relacionado com uma possível presença de reticulócitos ou até eritropoiese defeituosa por alterações hereditárias ou metabólicas (BARGER, 2010).

Outra metodologia empregada na avaliação eritrocitária é a citometria de fluxo (CF), também denominada FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter); a análise é feita pela detecção óptico-eletrônica, na qual as partículas suspensas passam individualmente por um fluxo fluido de solução salina tamponada, na qual serão interceptadas por um conjunto de lasers. Através deste contato é gerado um índice de refração, passível de ser interpretado de três formas: a refração frontal (forward scatter ou FSC), que avalia o tamanho e o volume celular; a refração lateral (side scatter ou SSC), referente à complexidade interna de uma célula, ou seja, o conteúdo interno de uma célula (SHAPIRO, 2003; WEISS e WILKERSON, 2010); o citômetro pode ainda detectar a emissão de determinada fluorescência, isto é, as células são marcadas por corantes ou fluorocromos ligados a anticorpos específicos e, quando excitados pelos conjuntos ópticos do aparelho, auxiliam a identificação e caracterização de uma população de interesse (DAVIS et al. 2002). Sendo assim, com base nas leituras de FSC, SSC e fluorescências, as aquisições realizadas pelo citômetro são dispostas em representações gráficas (plots) e, por meio de desenhos (gates) que correlacionam as leituras realizadas pelo equipamento, é possível qualificar e identificar uma determinada da população.

O objetivo desta revisão científica foi verificar o uso da citometria de fluxo e apresentar exemplos da utilização dessa biotecnologia para avaliação eritrocitária.

APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO ERITROCITÁRIA

A CF pode ser uma importante ferramenta diagnóstica, pois permite a avaliação de propriedades fisiológicas e morfológicas de células sanguíneas, possibilitando diferentes análises que podem ser realizadas por seu intermédio. Na medicina humana, o uso clínico da CF é bem estabelecido, já na medicina veterinária, a tecnologia vem se tornando uma ferramenta promissora, com aplicações na rotina clínica em equinos (DAVIS et al. 2002), animais de companhia (TARRANT, 2005), principalmente para identificação de células-tronco hematopoiéticas, diferencial de medula óssea, quantificação de reticulócitos, imunofenotipagem de linfócitos e a quantificação de citocinas e interleucinas, além da contagem e imunofenotipagem de plaquetas reticuladas (NAKAGE et al. 2005).

Para eritrócitos, a citometria pode ser empregada em estudos da morfologia eritrocitária, fragilidade osmótica, na contagem de reticulócitos, na detecção de parasitas eritrocitários e na determinação de anticorpos anti-eritrocitários (WEISS, 2002).

MORFOCITOMETRIA E FRAGILIDADE OSMÓTICA

Os eritrócitos podem sofrer alterações em sua morfologia diante de diferentes patologias medulares, renais e metabólicas como deficiências nutricionais e diabetes (TURCHETTI et al. 1997; DELLA PORTA et al. 2006). Dessa forma, a técnica de citometria pode estabelecer valores referenciais mais acurados para a investigação de possíveis anormalidades eritrocitárias, cujos índices hematimétricos tradicionais (VCM e CHCM) não se alteram precocemente.

Piagnerelli et al. (2007), por meio do uso da CF, determinaram

populações eritrocitárias anisocíticas de hemácias de indivíduos humanos saudáveis que apresentam uma distribuição de tamanho bimodal, ou seja, com dois tamanhos médios quando analisados por citometria considerando o canal de tamanho celular (FSC).

As hemácias estão suscetíveis a alterações do pH sanguíneo em diversas patologias que levam a modificações do equilíbrio ácido-básico que diminuem a resistência a lise celular, ou seja, há o aumento da fragilidade osmótica eritrocitária (SANT'ANA et al. 2001). Quando o meio se torna hipertônico há uma ocorrência de microcitose (representação mais baixa e deslocada a direita no eritrocitograma) em comparação a hemácias em meios isotônicos, como encontrado no estudo de Yamamoto et al. (2014) que determinou um citograma de análise de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) dos eritrócitos humanos em diferentes meios osmóticos seguido de processo de hemólise conforme a alteração osmótica.

RETICULOCITOMETRIA

A citometria pode ser empregada para o diagnóstico e prognóstico de distúrbios eritrocitários por meio da associação da morfocitometria eritrocitária e quantificação dos reticulócitos (células jovens) para caracterização da atividade eritropoiética no sangue periférico.

Um exemplo da aplicação da metodologia citométrica, os reticulócitos são expostos a um corante para marcação de RNA residual (laranja de tiazole) e emitem fluorescência quando excitados pelo laser azul (FL1 – FITC – 488 nm), de forma mais acurada e rápida por quantificar um maior número de eritrócitos e reticulócitos, se comparados à metodologia manual (novo azul de metileno). Lee et al. (1986) descrevem um índice de confiança de 95%

em comparação com metodologia manual e justifica essa maior precisão ao número de eventos contados, que na citometria é 10.000 por amostra contra 1.000 na contagem manual.

Outros registros na literatura corroboram a maior eficácia da citometria de fluxo. Lacombe et al. (1999) afirmam que a contagem citofluorométrica pode ser 1,5 vezes maior que a contagem manual, devido a sua maior sensibilidade e precisão. Pereira et al. (2008), em estudo comparando cães saudáveis e anêmicos do tipo regenerativo e arregenerativo, mostraram que os resultados foram mais altos em todos os grupos na CF, ademais, no grupo classificado anêmico arregenerativo, apenas uma parcela de cães estudados foi diagnosticada positivamente pela microscopia de luz, observando uma maior sensibilidade da citometria.

Riley et al. (2001) afirmam que as contagens citométricas possuem uma boa correlação com resultados da técnica manual quando esta tem valores acima de 2%, o mesmo observado na reticulocitometria voltado a amostras de gatos (REAGAN et al. 1992). Estes últimos afirmam, também, que há uma boa correlação e reprodutibilidade em relação à técnica manual quando há altos valores, por isso, faz-se necessário a validação e estabelecimento de valores referenciais para a espécie que se deseja realizar a reticulocitometria (PEREIRA et al. 2008). Uma limitação da reticulocitometria para gatos é que, quando há muitos reticulócitos pontilhados, as contagens são baixas porque nesta fase há uma concentração maior de mitocôndrias e nenhum resquício de RNA (REAGAN et al. 1992).

Além do laranja de tiazole, outro corante que pode ser utilizado para marcação de reticulócitos é a acridina laranja, que em protocolos padronizados para amostras de humanos demonstrou uma boa taxa de correlação quando comparada à metodologia manual (novo azul de metileno ou azul de cresil brilhante) e à metodologia automática de contadores hematológicos comerciais (VIANA et al., 2014).

No entanto, ambos os corantes descritos possuem uma alta afinidade de ligação pelo RNA e DNA, sendo assim, as contagens reticulocitárias podem estar aumentadas quando há presença de eritrócitos nucleados nas amostras, apesar de terem um pico de excitação maior do que o referente aos reticulócitos (REAGAN et al. 1992; RILEY et al. 2001; VIANA et al. 2014).

LIGAÇÃO IMUNOGLOBULINA-ERITRÓCITO

A anemia hemolítica imunomediada (IMHA) surge quando os eritrócitos, ou precursores eritróides da medula óssea, são destruídos através do mecanismo de hipersensibilidade do tipo II, que, após fixação de proteínas do sistema complemento e/ou imunoglobulinas na membrana eritrocitária, desencadeiam a formação de complexos de ataque à membrana, fagocitose ou destruição celular por lise (DAY, 2010).

Quigley et al. (2001) desenvolveram um teste de imunofluorescência de eritrócitos para CF e compararam com o teste direto de antiglobulina (DAT), um método comum nas rotinas clínicas para a detecção de imunoglobulina (IgG e IgM) e complemento (C3) em cães com IMHA e em cães saudáveis. Na comparação das técnicas, o diagnóstico positivo de IMHA foi maior na citometria (acima de 90%) e com taxa de sensibilidade de 92% da CF em relação à DAT.

Essa maior sensibilidade deve-se ao fato de que amostras com baixos níveis de ligação de imunoglobulinas e C3, nas membranas eritrocitárias, podem resultar em falsos negativos na DAT pelo fato desta metodologia verificar visualmente a aglutinação, pois, quando há pouca ligação não há aglutinação (QUIGLEY et al. 2001), diferente da citometria que possui uma boa empregabilidade no diagnóstico desta patologia em humanos (VAN DER MEULEN et al. 1980; ASMUSSEN et al. 1996), devido a sua alta sensibilidade mesmo em baixos níveis de ligação.

PARASITAS ERITROCITÁRIOS

A citometria pode ser empregada na identificação de parasitas intra-eritrocitários com auxílio de corantes que marcam os parasitas, identificando as hemácias parasitadas, como o brometo de etidina (GALLOP et al. 1984) e o SYTO 16 (MORETTA et al. 2008) ou na utilização anticorpos anti-parasitas com marcações com fluorocromos tipo FITC, PE APC, por exemplo (STAALSOE et al. 1999).

Um exemplo da utilização fluorocromos conjugados às estruturas parasitárias, na pesquisa desenvolvida por Staalsoe et al. (1999), os autores identificaram uma proteína específica de fases tardias (trofozoítos e esquizontes) de *Plasmodium falciparum*, a PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1), para detectar eritrócitos infectados em seres humanos portadores de malária.

Wyatt et al. (1991) realizaram um experimento *in vitro* com eritrócitos infectados por *Babesia bovis* (B. bovis), em que verificaram a viabilidade parasitária através da conversão metabólica de hidroetidina em etídeo, um fluorocromo que se incorpora ao DNA do parasita, e compararam os resultados obtidos na CF com a metodologia usual de esfregaço sanguíneo corado por Giemsa, evidenciando que a CF é uma metodologia mais rápida e acurada em relação ao exame da extensão sanguínea e pode ser empregada para acompanhar a taxa de morte dos parasitas mediante a administração de antiparasitários durante um protocolo terapêutico.

Bittar (2002), em estudo de imunização experimental em bovinos na região de Minas Gerais, Brasil, utilizou a marcação por hidroetidina para detecção de hemácias parasitadas por B. bovis e observou que a CF obteve um resultado positivo mais rápido e que se manteve positivo

durante todo o período de infecção, em contrapartida, o método do esfregaço sanguíneo apresentou um atraso na detecção e não evidenciou o parasita em todos os estágios da doença.

Outro emprego da CF na parasitologia é a pesquisa dedicada à biologia e mecanismo de infecção, Moretta et al. (2014) verificaram a evolução da parasitemia relacionando à redução nas contagens de eritrócitos e ao aumento de células infectadas por *Anaplasma marginale*, marcadas com SYTO 16, com tempo de evolução da doença e aparecimento de anemia, bem como a debelação parasitária após administração de antibióticos.

Sánchez-Pérez et al. (2013) desenvolveram uma metodologia de marcação de micoplasmas hemotrópicos em eritrócitos de felinos através da marcação de DNA parasitário pelo corante DRAQ5, evidenciando células positivas para a infecção quando analisadas por CF. Ao contrário das metodologias usuais para o diagnóstico, que permitem apenas a identificação da espécie, a CF permitiu averiguar a proporção de eritrócitos infectados; além disso, esta metodologia mostrou-se mais acessível e rápida em relação aos testes de PCR, que são comumente utilizados no reconhecimento de micoplasmas.

Em cães com babesiose, a alteração clínica mais característica é a anemia do tipo hemolítica, que pode induzir ao aparecimento de anticorpos anti-eritrocitários ligados na membrana dos eritrócitos. Carli et al. (2009), em estudo com cães infectados com duas subespécies de *Babesia*, *Babesia canis canis* (B. c. canis) e *Babesia canis vogeli* (B. c. vogeli), visaram estabelecer, por intermédio da citometria, uma ferramenta para diagnóstico de animais positivos utilizando anticorpos marcados com fluorocromos para IgG e IgM, que se ligam à membrana de eritrócitos e descobriram que houve positividade para 67% dos cães infectados para B. c. vogeli, e nenhum dos cães infetados para B. c. canis.

A diferença desses resultados é justificada pelos autores, com

base no decurso das referidas doenças, ou seja, devido a B. c. vogeli ser mais crônica e branda, há um maior tempo para haver uma produção de anticorpos anti-eritrocitários para hemácias infectadas, situação que não acontece com a B. c. canis, que possui progressão mais aguda da parasitemia (CARLI et al. 2009), observação também encontrada por Adachi e Makimura (1992) em cães infectados com *Babesia gibsoni*.

Em bovinos anêmicos parasitados por *Theileria sergenti* também ocorre um aumento na ligação de anticorpos anti-eritrócitos à membrana dos eritrócitos infectados, relacionando-se com o aumento do quadro anêmico, porém, somente esta ligação não é o único fator responsável pela massiva destruição das hemácias, tendo o estresse oxidativo e a fagocitose decorrente do reconhecimento dos anticorpos anti-eritrocitários por macrófagos um importante papel na patogênese da anemia em infecções por T. sergenti (SHIONO et al. 2004).

Portanto, os testes destinados ao estudo de parasitas intra-eritrocitários devem levar em consideração a especificidade do anticorpo de marcação com o parasita (STAALSOE et al. 1999), a expressão de marcador celular específico (ADACHI e MAKIMURA, 1992; CARLI et al. 2009), inclusive, considerar o comportamento biológico da doença com o aparecimento de imunoglobulinas anti-celulares para células infectadas (SHIONO et al. 2004) ou se há uma afinidade do parasito com corantes fluorescentes (MORETTA et al. 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A citometria de fluxo mostra-se como uma metodologia rápida, eficaz e não subjetiva, capaz de realizar análises com altos índices de confiabilidade baseando-se em uma grande quantidade de aquisições celulares, sem invalidar as características individuais (tamanho e complexidade). Em contrapartida, o alto custo do equipamento pode ser visto como um empecilho para uma maior

popularização da metodologia.

Atualmente, no mercado hematológico veterinário já existem contadores celulares que adotam a citometria de fluxo para diferencial leucocitário, morfocitometria eritrocitária e quantificação de reticulócitos, sendo um exemplo da popularização da técnica na atividade veterinária.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Stuart Milne (University of Stirling, Scotland) pela revisão da língua inglesa.

REFERÊNCIAS

A Adachi K, Makimura S. 1992. Changes in anti-erythrocyte membrane antibody level of dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 54(6):1221–1223.

Asmussen C, Gutensohn K, Wittkopff D et al. 1996. Rapid detection of IgG subclasses on DAT positive RBC membranes by flow cytometry (FC). *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*. 33:35-39.

Barger AM. 2010. *Erythrocyte Morphology*. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's: Veterinary Hematology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. pp. 144-151.

Bittar JFF. 2002. Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*. Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral. 88f. Belo Horizonte, MG. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais.

Carli, E, Tasca S, Trotta M et al. 2009. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Veterinary Parasitology*. 162(1–2):51–57.

Davis EG, Wilkerson MJ, Rush BR. 2002. Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16(4):404–410.

Day MJ. 2010. *Immune-Mediated Anemias in the Dog*. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's: Veterinary Hematology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. pp. 242-251.

Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R. et al. 2006. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 20(4):549-555.

Gallop P, Paz M, Henson E et al. 1984. Dynamic approaches to the delivery of reporter reagents into living cells. *BioTechniques*. 2(1):32-36.

Harvey JW. 2012. Evaluation of erythrocytes. In: _____. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*. 1. ed. Missouri: Elsevier Saunders. pp. 93-96.

Lacombe F, Lacoste L, Vial JP et al. 1999. Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurement. Comparison of ABX PENTRA 120 Retic, Sysmex R-2000, flow cytometry, and manual counts. *American Journal of Clinical Pathology*. 112(5):677–686.

Lee LG, Chia-Huei C, Laura AC. 1986. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry*. 7(6):508–517.

Moretta R, Ruybal P, Mesplet M et al. 2008. Flow cytometry to evaluate *Anaplasma marginale* parasitemia using a fluorescent nucleic acid stain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149:111–113.

Moretta R, Petrigh R, Ruybal P. et al. 2014. The dynamics of erythrocyte infection in bovine anaplasmosis: a flow cytometry-based analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 107:47-54.

Nakage APA, Santana AE, Cápua MLB et al. 2005. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Ciência Rural*. 35(4):966-973.

Pereira PM, Seki MC, Palma PVB et al. 2008. Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(1):66-70.

Piagnerelli M, Zouaoui BK, Brohee D et al. 2007. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 60(5):549-554.

Quigley KA, Brian JC, Deborah MH, Marion LJ. 2001. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(4):297–300.

Reagan WJ, Vap LM, Weiser MG. 1992. Flow cytometric analysis of feline reticulocytes. *Veterinary Pathology*. 29:503-508.

Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R et al. 2001. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Animal*. 15(5):267-294.

Sánchez-Pérez A, Brown G, Malik R et al. 2013. Rapid detection of haemotropic mycoplasma infection of feline erythrocytes using a novel flow cytometric approach. *Parasites & Vectors*. 6:158.

Sant'Ana VAC, Birgel EH, Mourão GB et al. 2001. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. *Ciência Rural* 31(4): 609–614.

Shapiro HM. 2003. Overture. In: _____. *Practical Flow Cytometry*. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 2003. pp. 1-60.

Shiono H., Yagi Y, Kumar A et al. 2004. Accelerated binding of autoantibody to red blood cells with increasing anaemia in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*. *Journal of Veterinary Medicine*. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health. 51(1):39–42.

Staalsoe T, Giha HA, Dodoo D et al. 1999. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry*. 35(4):329–336.

Stockham SL, Scott MA. 2011. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 40-45.

Tarrant JM. 2005. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *The Veterinary Journal*. 170(3):278–288.

Thorn CE. 2010. Normal hematology of the pig. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's: Veterinary Hematology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. pp. 1089-1095.

Thrall MA. 2015. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca. pp. 20-30.

Turchetti V, De Matteis C, Leoncini F. et al. 1997. Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 17(3):209-215.

Tvedten H, Weiss DJ. 2010. *Laboratory and clinical diagnosis of anemia*. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's: Veterinary Hematology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. pp. 152-161.

Van der Meulen FW, de Bruin HG, Goosen PCM, et al. 1980. Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: an application of flow cytometry. *British Journal of Haematology*. 46(1):47–56.

Viana KA, Carvalho MG, Dusse LMS et al. 2014. Flow cytometry reticulocyte counting using acridine orange: validation of a new protocol. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 50(3):189-199.

Weiss DJ. 2002. Application of Flow Cytometric Techniques to Veterinary Clinical Hematology. *Veterinary Clinical Pathology*. 31(2):72–82.

Weiss DJ, Wilkerson MJ. 2010. Flow cytometry. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Schalm's: Veterinary Hematology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. pp. 1074-1081.

Wyatt CR, Goff W, Davis WC. 1991. A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *Journal of Immunological Methods*. 140(1):23-30.

Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y. et al. 2014. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *Journal of Laboratory Automation*. 19(5):483-487.