

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Estudo comparativo do efeito da ambientação e dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio sobre a agregação plaquetária em amostras sanguíneas de gatos domésticos**

**Cláudio Monteiro Bernardo**

**Areia, 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Estudo comparativo do efeito da ambientação e dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio sobre a agregação plaquetária em amostras sanguíneas de gatos domésticos**

**Cláudio Monteiro Bernardo**

**Trabalho de conclusão de curso realizado e apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, sob orientação da profa. Dra. Ivia Carmem Talieri.**

**Areia, 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Cláudio Monteiro Bernardo

**Estudo comparativo do efeito da ambientação e dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio  
sobre a agregação plaquetária em amostras sanguíneas de gatos domésticos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba

Aprovado em:

Nota:

**Banca Examinadora**

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ivia Carmem Talieri – UFPB  
Orientadora

\_\_\_\_\_  
Dra. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano - UFPB

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Fabiana Satake - UFPB

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto – UFPB  
Coordenação de TCC

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, por todo apoio nessa longa jornada.

Aos professores, por toda contribuição na minha formação.

À minha orientadora, Ivia Carmem, por ter se dedicado na realização do experimento.

À minha amiga e parceira de projeto, Débora Silva, que tornou tudo mais leve e divertido.

A todos os amigos que estiveram comigo durante esses anos, me fazendo enxergar o verdadeiro valor da amizade.

A todos os colegas de curso e pessoas que disponibilizaram seus gatos para realização do experimento.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Posicionamento de felino em bolsa de contenção para realização de coleta de sangue utilizando a técnica invertida. .... 13
- Figura 2.** Felino totalmente contido em bolsa de contenção utilizando técnica invertida para coleta sanguínea. .... 13
- Figura 3.** Posicionamento de felino para realização de coleta sanguínea na jugular utilizando método alternativo de contenção. .... 14
- Figura 4.** Contenção de felino em decúbito lateral para realização de coleta sanguínea na safena medial. .... 15
- Figura 5.** Diferença de tamanho entre as plaquetas em esfregaço sanguíneo de gato doméstico. .... 16
- Figura 6.** Agregação plaquetária intensa em esfregaço sanguíneo de gato doméstico. .... 25
- Figura 7.** Agregação plaquetária moderada em esfregaço sanguíneo de gato doméstico. .... 25
- Figura 8.** Agregação plaquetária discreta em esfregaço sanguíneo de gato doméstico. .... 26
- Figura 9.** Demonstração gráfica comparativa dos níveis de agregação plaquetária encontrados em amostras sanguíneas com EDTA e com citrato de sódio a 3,8%, de gatos domésticos submetidos à ambientação (AS) com feromônio facial sintético. .... 29
- Figura 10.** Demonstração gráfica comparativa dos níveis de agregação plaquetária encontrados em amostras sanguíneas com EDTA e com citrato de sódio a 3,8%, de gatos

domésticos não submetidos à ambientação (NAS) com feromônio facial sintético.  
..... 29

**Figura 11.** Frequência relativa da contagem de plaquetas de gatos na lâmina, independente de grupo ou anticoagulante. .... 31

**Figura 12.** Frequência relativa da contagem automática de plaquetas em gatos, independente de grupo ou anticoagulante. .... 31

**Figura 13.** Frequência relativa da contagem de plaquetas de gatos na câmara, independente de grupo ou anticoagulante. .... 32

## RESUMO

BERNARDO, Cláudio Monteiro, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2017. **Estudo comparativo do efeito da ambientação e dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio sobre a agregação plaquetária em amostras sanguíneas de gatos domésticos.** Orientadora: Ivia Carmem Talieri.

O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da ambientação e de dois anticoagulantes sobre a agregação plaquetária, bem como comparar os métodos de contagem manual e automática de plaquetas em amostras sanguíneas de gatos. Um grupo, formado por dez animais, foi submetido à uma hora de ambientação com a sala difundida por feromônio facial felino sintético, antes da colheita de sangue. O outro grupo, composto por dez gatos, não passou pelo período de ambientação pré-colheita. Em ambos os grupos, colheu-se 1ml de sangue da veia safena medial, com auxílio de *scalp* n.23 acoplado à seringa de 3ml. Metade do volume foi depositado em tubo de polipropileno com EDTA e metade em tubo de polipropileno com citrato de sódio a 3,2%. No Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPB, as amostras foram processadas em aparelho automático e os esfregaços sanguíneos confeccionados. As agregações plaquetárias foram classificadas subjetivamente, de acordo com a quantidade de grumos presentes nas bordas e na franja do esfregaço em: discretas, moderadas e intensas. Somente as amostras com nível de agregação discreto ou moderado, foram submetidas à contagem estimada das plaquetas em câmara de Neubauer e no esfregaço sanguíneo. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre as contagens de plaquetas dos gatos ambientados comparativamente aos não ambientados. Houve diferença estatística entre a contagem manual estimada em lâmina e a contagem automática e também entre os anticoagulantes EDTA e citrato de sódio a 3,8%, sendo o último responsável pela maior parte das agregações plaquetárias intensas.

**Palavras-chave:** pseudotrombocitopenia, felinos, ambientação, citrato de sódio, EDTA.

## **ABSTRACT**

BERNARDO, Cláudio Monteiro, Universidade Federal da Paraíba, July, 2017. **Comparative study of the acclimatation and anticoagulants EDTA and sodium citrate effects on platelet aggregation in blood samples of domestic cats.** Adviser: Ivia Carmem Talieri.

The purpose of the research was to analyse the acclimatation and two anticoagulants effects on platelet aggregation and compare the manual and automatic platelet counting methods in blood samples of cats. One group of ten animals was submitted to a pre blood collection acclimatation under the effects of a facial pheromone difusor, one hour long. The other group of ten cats either, did not submitted to the pre-collection acclimatation. In both groups was collected 1 mL of blood from the saphenous vein with a n.23 *scalp* and 3 mL syringe. Half volume was transferred to an *ependorf* container with EDTA and the other half was transferred to an *ependorf* container with sodium citrate 3.2%. The samples were processed on the Clinical Pathology Laboratory of the UFPB Veterinary Hospital, by automatic counter and then the blood smears were prepared. The platelet aggregations were subjectively classified according to the amount of clumps on the lateral margins and feathered edge as discreet, moderate and intense. Only the samples with discreet and moderate aggregation were submitted to the manual counting in Neubauer chamber and blood smear estimation. The results shown that there was no significant statistical difference in the platelet counts between the acclimated and the non acclimated groups. There was significant difference between the blood smear counting and the automatic counting and between the anticoagulants EDTA and sodium citrate 3.2%. The sodium citrate 3.8% was largely responsible for the intense platelet aggregations.

**Key words:** pseudothrombocytopenia, feline, acclimatation, sodium citrate, EDTA.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	10
2.1 Comportamento do felino doméstico.....	10
2.2 Métodos de contenção e locais de coleta sanguínea em felinos .....	11
2.3 Plaquetas .....	16
2.3.1 Produção e cinética.....	16
2.3.2 Funções .....	17
2.3.3 Trombocitopenia em felinos .....	18
2.3.4 Contagem estimada de plaquetas .....	20
2.4 Anticoagulantes .....	22
2.4.1 EDTA .....	22
2.4.2 Citrato de sódio .....	23
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Ambientação <i>versus</i> não ambientação .....	28
4.2 EDTA <i>versus</i> citrato de sódio .....	28
4.3 Contagem automática <i>versus</i> contagem em lâmina <i>versus</i> contagem em câmara.....	30
5.CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS	

## 1. INTRODUÇÃO

A coleta de sangue em felinos é um desafio com o qual o clínico veterinário se depara de forma corriqueira. Isso se dá devido à característica comportamental da espécie. Os felinos apresentam um comportamento diferenciado, sendo por esse motivo, necessária a aplicação de um manejo especial, tanto para assegurar a manutenção do bem estar do paciente, como para a integridade do profissional envolvido (VOLPATO, 2013).

Comportamentos agressivos fazem parte dos padrões comportamentais de quase todas as espécies animais. Gatos agressivos podem ser extremamente perigosos, pois além de morderem e arranharem tem a capacidade de escalar e pular, o que torna sua contenção um problema (TELHADO, 2012). Várias condições médicas ou ambientais podem provocar respostas agressivas (HORWITZ, 2009).

O hemograma é um exame complementar de extrema importância para o médico veterinário, pois através dele consegue-se atingir mais facilmente um diagnóstico, estabelecer o tratamento adequado, além de monitorar a evolução do quadro (BARGER, 2003). Porém, para realização desse exame, o felino precisa ser contido de forma que seja possível colher o volume sanguíneo adequado. Essa contenção gera estresse, que pode produzir alterações significativas na análise hematológica, dificultando sua interpretação.

O sítio de coleta preferencial em felinos é a punção da veia jugular (ELSE; KELLY *et al.*, 1998). Vários gatos não se mostram cooperativos no momento da contenção física e punção da veia jugular (GODFREY, 1997). Por esse motivo, o procedimento de colheita sanguínea realizado em animais nem sempre pode ser feito sem a utilização de sedativos, principalmente em felinos (VOLPATO, 2013).

A liberação de adrenalina é uma resposta imediata associada à excitação, também chamada de resposta de “fuga ou luta”. Essa liberação tem como resultado o aumento do fluxo sanguíneo, que por sua vez promove um desvio dos leucócitos do compartimento marginal para o compartimento circulante do vaso sanguíneo. O efeito é bem observado no leucograma como um número dobrado de leucócitos, sendo notado, principalmente, nos neutrófilos e nos linfócitos (WEISER, 2015a).

A agregação plaquetária é um problema comum no hemograma de gatos, podendo gerar um artefato, com diminuição do número de plaquetas na contagem.

A esta alteração dá-se o nome de pseudotrombocitopenia (ESTRIN; SPANGLER, 2011). A lesão no vaso sanguíneo provocada pela colheita gera uma vasoconstrição local com exposição do colágeno subendotelial, ao qual as plaquetas se aderem através de um receptor presente em sua membrana. Após essa aderência, as plaquetas sofrem alteração no seu formato e ativação, com o posterior recrutamento de mais plaquetas, que se aderem ao local da lesão e umas às outras. Essa adesão entre plaquetas é denominada de agregação (JAVINSKY, 2016). As plaquetas dos gatos sofrem agregação de forma rápida (BAKER, 2015).

O comportamento de esfregar a cabeça e o corpo em móveis e nas pessoas demonstra que os gatos estão se sentindo seguros e confortáveis no ambiente. Durante este comportamento ocorre a liberação de uma substância chamada feromônio facial felino, que é espécie-específico e transmite a sensação ou a mensagem de tranquilidade entre os indivíduos da espécie felina. O Feliway® (Ceva Saúde Animal Ltda. – Paulínia-SP) é um análogo sintético da fração F3 do feromônio facial felino, desenvolvido para ser usado em situações adversas que possam estressar os gatos. Acredita-se que o feromônio tenha um efeito calmante sobre os felinos (HORWITZ, 2009).

Devido à elevada frequência da pseudotrombocitopenia no hemograma de gatos e sabendo que uma das principais causas pode ser o nervosismo do animal no momento da colheita sanguínea, propôs-se estudar o efeito do feromônio facial felino sintético sobre o índice de agregação plaquetária em amostras sanguíneas de gatos. O estudo teve como objetivo, ainda, comparar a eficácia de dois anticoagulantes utilizados rotineiramente nos laboratórios, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o citrato de sódio em diminuir a agregação plaquetária, bem como comparar as contagens de plaquetas pelo aparelho automático com as contagens manuais no hematocítômetro e no esfregaço sanguíneo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Comportamento do felino doméstico

A relação entre o homem e o gato mudou de forma relevante nos últimos anos, uma vez que os gatos são considerados na atualidade como uma das espécies mais importantes no que se refere a animais de companhia, chegando a ultrapassar o número de cães no Reino Unido. Isso se relaciona com a mudança do estilo de vida da população, deixando o gato em uma posição de animal do tipo *pet* mais conveniente para o convívio humano. Por sua vez, isso resultou no aumento das exigências sobre os gatos em termos de companhia, gerando um acréscimo no relato de problemas comportamentais em felinos (HEATH, 2006).

Para compreender o comportamento dos felinos inicialmente o veterinário deve atentar para as características físicas do gato, como suas habilidades sensoriais e seu tamanho, porque esses aspectos estão intimamente relacionados. O felino doméstico é um caçador solitário, de hábito crepuscular, da família dos felídeos. Ainda existem dúvidas quanto ao gato doméstico ser uma única espécie ou ser um subtipo do gato selvagem (*Felis silvestres*) do norte da África (LEY; SEKSEL, 2015).

Sua domesticação é relativamente recente, tendo ocorrido provavelmente no Egito, há mais ou menos 4.000 anos. Devido à economia egípcia se basear na produção de grãos, roedores eram atraídos, o que provavelmente também atraiu os gatos selvagens para áreas habitadas por humanos (BRADSHAW, 2000; SERPELL, 2000). Acredita-se ter ocorrido permanência de alguns destes gatos, que foram se reproduzindo nessas áreas, aumentando o contato com os humanos, os quais provavelmente incluíram os filhotes desses animais como companhia. Formou-se assim uma relação vantajosa, pois os gatos tinham alimento e beneficiavam os humanos protegendo-os contra roedores e outras pragas (SERPELL, 2000). O gato atingiu uma importância cada vez maior para os egípcios, sendo representado entre as várias divindades da mitologia da época. Entretanto, a relação entre o felino e o homem não resultou em modificação significativa do seu comportamento (GENARO, 2004).

Alguns padrões de comportamento, a exemplo da alimentação, caça, autolimpeza, marcação de território e reprodução, são inatos do felino, evidenciando o seu instinto. Esse comportamento instintivo em felinos é apurado através do aprendizado e das experiências (LEY; SEKSEL, 2015).

O conhecimento da espécie felina está em constante aprendizado e evolução. Isso se relaciona com o fato de que o gato como espécie “domesticada” é muito recente.

Conseqüentemente, existe uma necessidade de compreender o gato através do seu ponto de vista. Somente após essa compreensão, o homem terá a possibilidade de entender de forma mais assertiva suas particularidades e peculiaridades. Várias dessas peculiaridades e diferenças, quando comparadas com as de outras espécies, são bastante evidenciadas no gato, e devem ser consideradas nas clínicas e hospitais veterinários que tem o felino como paciente. Seu comportamento adrenérgico se mistura com uma grande habilidade em ocultar sintomas (DANIEL, 2015).

Este comportamento diferenciado faz com que o médico veterinário seja desafiado no momento de realizar alguns tipos de procedimentos no felino. Muitos gatos podem se sentir amedrontados e ameaçados, podendo resultar em agressão. Na maioria das vezes, o medo é consequência da falta de socialização e habituação. Nestas situações, os gatos tendem a escolher a fuga como método primário de defesa, porém, se isso não for possível, eles tendem a apresentar um comportamento agressivo, com o objetivo de afastar a ameaça. É mais provável que isso aconteça quando o felino é encurralado em gaiola ou local pequeno, ou no momento de uma contenção. Quando há distanciamento do estímulo ameaçador, por afastamento ou por retirada do gato da situação, o comportamento é reforçado, devido à percepção felina de êxito, que aumenta o potencial para que ele utilize a agressividade quando o estímulo for novamente apresentado (HEATH, 2006).

## **2.2 Métodos de contenção e locais de coleta sanguínea em felinos**

O gato é uma espécie muito sensível a mudanças ambientais e alterações de estados emocionais, a exemplo do medo. Essa sensibilidade pode gerar alterações hematológicas. Acrescenta-se a isto, o fato da obtenção do sangue nessa espécie ser difícil. Além da dificuldade de contenção, os vasos sanguíneos dos membros pélvicos e torácicos geralmente não permitem a coleta de sangue em quantidade suficiente. O sangue geralmente flui de forma lenta, fazendo com que as plaquetas comecem a se aderir, o que pode gerar formação de coágulo na amostra (NAVARRO, 2005).

Uma contenção adequada do paciente é imprescindível para que se consiga realizar a punção venosa de forma eficaz. A punção venosa em gatos pode ser realizada nas veias cefálica, jugular, femoral ou safena medial. Nos gatos, a veia jugular é frequentemente a de primeira escolha (KIRK; BISTNER, 1987), pois o fluxo da veia cefálica pode ser lento (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006).

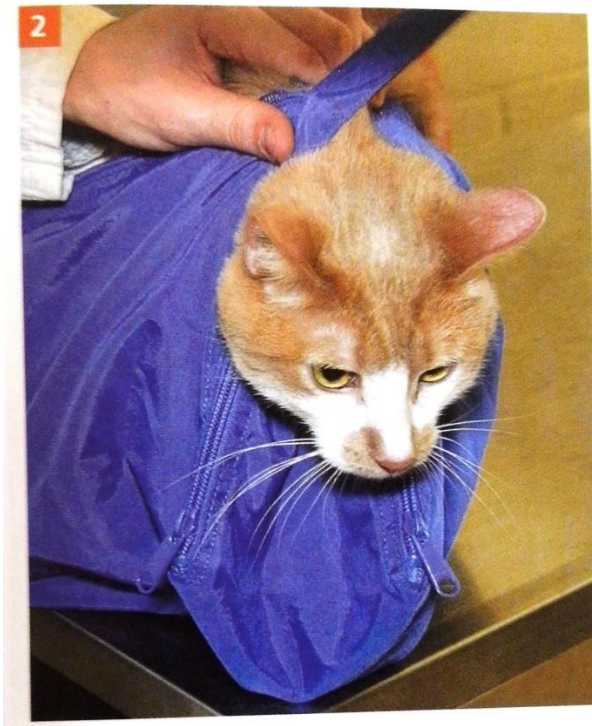
É importante que a punção venosa seja asséptica e sem contaminação tecidual, pois esta última pode resultar em agregação plaquetária e coagulação das amostras, mesmo utilizando-se anticoagulantes (WEISER, 2015b). A técnica que faz a punção na veia safena medial é mais vantajosa em gatos (TAYLOR, 2011). Várias técnicas de contenção são recomendadas.

Na venopunção da jugular, o animal deve ser contido sobre a mesa, em decúbito esternal. Os membros torácicos são segurados pouco acima das articulações do carpo, trazendo-os para fora da mesa. O pescoço deve ser estendido, deixando o nariz do animal direcionado para cima. A veia deve ser distendida por meio de garrote por pressão aplicado na entrada do tórax, ventral ao sulco jugular, lateral à traqueia. O vaso sanguíneo deve ser palpado, e caso não puder ser observado nem palpado, deve ser feita tricotomia de uma pequena área ao longo do sulco jugular. Aplica-se álcool e introduz-se a agulha com o bisel voltado para cima, formando um ângulo de 20 a 30 graus em relação à veia. Assim que a extremidade da agulha penetrar, deve ser feita a sucção com a seringa para coletar o sangue. Em caso de parada do fluxo, deve-se deslocar levemente a agulha para que seja restabelecido. Nessa técnica, alguns gatos reagem de forma violenta à contenção, sendo indicada a técnica invertida (TAYLOR, 2011).

Para a contenção de felinos, pode-se envolver o animal em uma toalha, mantendo os membros pélvicos expostos externamente (KIRK; BISTNER, 1987). Na técnica invertida, o animal é contido através do auxílio de uma bolsa ou uma toalha, deixando apenas a cabeça e o pescoço expostos. O felino deve ser contido pela nuca e posicionado sobre a bolsa aberta. Existem velcros nas bandas que devem ser apertados em volta do pescoço do gato. Os membros pélvicos devem ser contidos com uma mão e rotacionados para frente, em direção ao tórax do gato. O zíper da parte de trás da bolsa deve ser fechado. Em seguida, posiciona-se o animal em decúbito dorsal sobre uma mesa, com o auxiliar segurando-o com um braço contra seu corpo (TAYLOR, 2011).



**Figura 1.** Posicionamento de felino em bolsa de contenção para realização de coleta de sangue utilizando a técnica invertida (TAYLOR, 2011).



**Figura 2.** Felino totalmente contido em bolsa de contenção utilizando técnica invertida para coleta sanguínea (TAYLOR, 2011).

Existe um método alternativo de contenção para coleta de sangue na veia jugular de gatos. O autor refere que mais de 90% dos felinos não se debatem durante o procedimento. Vários gatos com comportamento agressivo se mostram cooperativos durante a coleta utilizando esse método. O profissional deve se sentar numa mesa ou em um local alto, mantendo as pernas unidas e apoiadas de maneira que os joelhos fiquem elevados. O gato deve ser posicionado sobre seu dorso, com sua cabeça nos joelhos do profissional e os membros apoiados em seu abdômen. Pode ser que o animal a princípio fique apreensivo. Caso o gato se mostre muito relutante em permanecer nessa posição, deve-se abortar este método. O auxiliar deve conter a cabeça do animal, estendendo seu pescoço e virando seu queixo cerca de 45° de distância da veia jugular que será puncionada. Outro auxiliar fará a contenção dos membros anteriores do gato contra seu abdômen com uma mão e com a outra os membros pélvicos (NORSWORTHY, 2009).



**Figura 3.** Posicionamento de felino para realização de coleta sanguínea na jugular utilizando método alternativo de contenção (NORSWORTHY, 2009).

Utilizando a técnica de coleta de sangue na veia safena medial, o gato deve ser contido em decúbito lateral, com os membros em direção ao profissional e o dorso voltado para o auxiliar que está realizando a contenção. O auxiliar deve segurar o gato pela nuca, esticando-o com uma mão e retraindo o membro pélvico livre com a outra. Deve ser feita uma pressão na região inguinal para evidenciar a veia distendida com sangue. Após observar e palpar a veia safena medial, o profissional deve posicionar o dedo lateralmente ou sobre a veia para evitar movimentos durante a venopunção. É mais indicado que as tentativas de punção comecem na parte mais distal do membro, caso seja necessário mais de uma tentativa. Como esse vaso possui um diâmetro pequeno, sucção excessiva poderá causar colapso (TAYLOR, 2011). A vantagem da técnica é que o gato não consegue observar o que está acontecendo na porção caudal do seu corpo, fato que pode diminuir o nervosismo em alguns felinos (HEATH; RODAN, 2016).



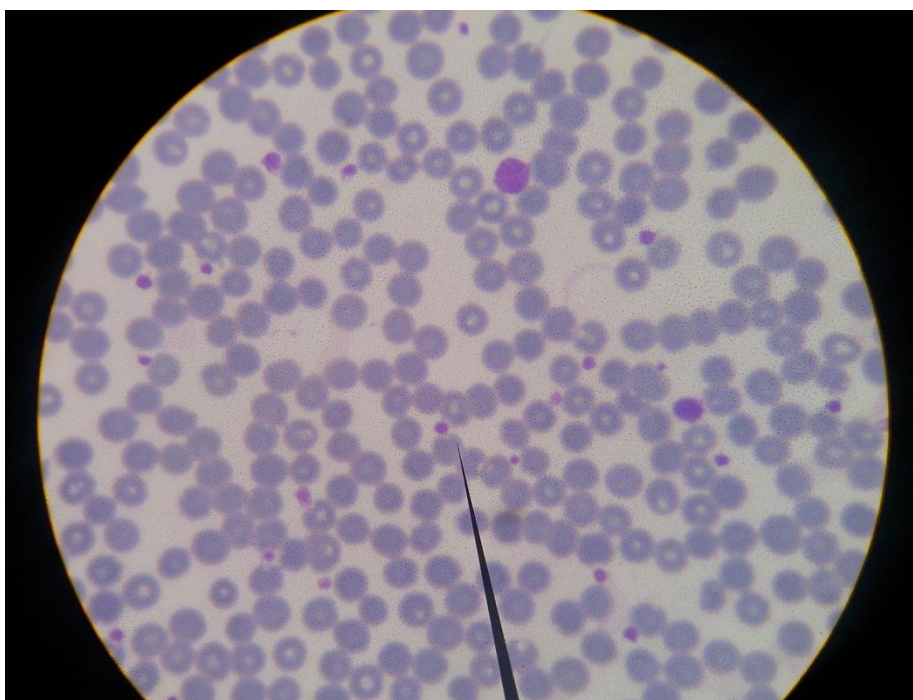
**Figura 4.** Contenção de felino em decúbito lateral para realização de coleta sanguínea na safena medial (TAYLOR, 2011).

## 2.3 Plaquetas

### 2.3.1 Produção e cinética

A hematopoese é o processo de formação das células sanguíneas. Nos neonatos e gatos imaturos, a medula de todos os ossos produz ativamente as células do sangue. Com a maturidade, a hematopoese se restringe à medula dos ossos chatos e às extremidades proximais dos ossos longos, especialmente do úmero e do fêmur (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006).

As plaquetas são fragmentos do citoplasma do megacariócito, tendo no seu interior várias organelas citossólicas (BAKER, 2015). A medula óssea possui uma estrutura de pirâmide, onde uma célula tronco dará origem a muitas células filhas (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006). As plaquetas têm como precursor uma célula pluripotente (*stem cell*), que vai originar toda a linhagem megacariocítica. A célula inicial da linhagem dos megacariócitos é o megacarioblasto, que vai originar o pró-megacariócito e o megacariócito. Nessa fase, a divisão celular é cessada, mas a divisão do núcleo permanece, podendo ser encontradas células de 4 a 64 núcleos. Esses fragmentos do citoplasma do megacariócito serão liberados na corrente sanguínea. As plaquetas possuem o formato de discos com grânulos avermelhados, com dois a cinco micrômetros de diâmetro. Nos gatos o tamanho das plaquetas é variável (LOPES *et al*, 2007).



**Figura 5.** Diferença de tamanho entre as plaquetas em esfregaço sanguíneo de gato doméstico (Acervo pessoal).

A maior parte das plaquetas é produzida na medula óssea, porém algumas podem surgir a partir de megacariócitos presentes no parênquima pulmonar (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006). Um estudo recente, conduzido em ratos, mostrou que a contribuição dos pulmões para a biogênese das plaquetas é substancial, representando aproximadamente 50% da produção total de plaquetas, ou 10 milhões de plaquetas por hora (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017).

As plaquetas não são consideradas células verdadeiras pela ausência de núcleo e por não terem a capacidade de fazer mitose (SILVA; HASHIMOTO, 2006). A produção de plaquetas (trombopoese) é regulada pela trombopoetina, que gera estímulo para todos os estágios de megacariocitopoese e maturação. Quando há aumento de número e tamanho dos megacariócitos, também há o mesmo aumento nas plaquetas. Outras substâncias também estimulam, em menor escala, a produção de plaquetas. São a interleucina-6, interleucina-11 e a eritropoetina. A trombopoetina é produzida pelo fígado, medula óssea e em outros locais do organismo, e provavelmente seu nível é regulado de forma descendente pelo número de plaquetas (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Após o estímulo de produção, as plaquetas aparecem na corrente sanguínea entre três a cinco dias e seu tempo de vida médio é de oito dias (LOPES *et al.*, 2007).

### **2.3.2 Funções**

As plaquetas dão início e promovem o processo de coagulação do sangue. Fazem adesão a qualquer sítio de lesão no endotélio vascular, agregando subsequentemente a esse local. Liberam fatores que promovem vasoconstrição transitória e hemostasia, e a membrana das plaquetas possui lipídeos de superfície carregados negativamente para a montagem de complexos de coagulação (ESTRIN; SPANGLER, 2011). São responsáveis pela cessação inicial temporária do fluxo de sangue após lesão no leito microvascular (BAKER, 2015).

Estas células respondem à lesão vascular que expõe colágeno, laminina e fibronectina. A trombina (fator IIa), formada durante a ativação da coagulação é um forte agonista da ativação plaquetária. As plaquetas podem aderir ao colágeno da membrana basal e do estroma extravascular por meio de um complexo receptor de superfície (glicoproteína [gp] 1b-V-IX), que se liga à glicoproteína plasmática conhecida como fator de von Willebrand que, por sua vez, se liga ao colágeno. As plaquetas também se aderem diretamente ao colágeno por meio

de um mecanismo de cisalhamento (como acontece nas artérias), principalmente por meio de  $\alpha 2B1$  e GP VI da superfície. Após a adesão, as plaquetas passam por um mecanismo denominado sinalização *inside out* por meio de receptores da integrina, a fim de aumentar a afinidade ao receptor, e por um mecanismo de *outside-in*, ou uma segunda onda de sinalização, para, adicionalmente, estabilizar o desenvolvimento do trombo de plaqueta e fibrina. A agregação plaquetária e o recrutamento de plaquetas adicionais são induzidos pela reação de liberação, no qual os grânulos se esvaziam, lançando seus produtos diretamente no plasma (KNOTTENBELT ; BLACKWOOD, 2006; THRALL, 2007).

Entende-se por **agregação plaquetária** a ligação de uma plaqueta à outra, e por **adesão** a união da plaqueta ao endotélio vascular, sendo necessário para os dois mecanismos a presença do fator de von Willebrand, glicoproteína que possibilita essas ligações (LOPES *et al*, 2007). Os fatores de coagulação armazenados nos grânulos garantem a formação de fibrina, fundamental para a formação do tampão de plaquetas. Durante a agregação plaquetária não ocorre lise das mesmas. Tromboxano A2 é produzido e liberado para fazer ligação com o receptor de superfície, com objetivo de ativar adicionalmente as plaquetas, através de um mecanismo de retroalimentação positivo. Alguns medicamentos, como o ácido acetilsalicílico e outros anti-inflamatórios não esteróides alteram a função da plaqueta por impedirem a síntese do tromboxano A2 (BAKER, 2015).

### 2.3.3 Trombocitopenia em felinos

A diminuição do número de plaquetas na corrente sanguínea pode ser resultado de queda na produção, aumento da destruição, aumento do consumo ou aumento do sequestro (COUTO, 2010). Frequentemente, pode-se ter o envolvimento de mais de um mecanismo. Por exemplo, medula óssea suprimida, consumo de plaquetas secundário à vasculite, sequestro esplênico, aumento da destruição de plaquetas através de mecanismos imunomediados ou não, mielodisplasia associada a vírus e disfunções mieloproliferativas. Todas estas condições clínicas podem contribuir para gerar um quadro de trombocitopenia em animais que sejam portadores de doenças infecciosas (CALLAN, 2008).

Uma quantidade insuficiente de plaquetas ou disfunção plaquetária pode gerar hemorragia. O intervalo de referência do número de plaquetas para gatos varia de 200.000 a 500.000 plaquetas/ $\mu$ l. Caso haja menor produção de plaquetas pela medula óssea, também haverá menor quantidade de megacariócitos. Inversamente, essa quantidade é maior quando

há destruição ou consumo aumentado de plaquetas. Quando há produção e liberação acelerada das plaquetas, essas podem se apresentar em tamanho maior que o normal (BAKER, 2007).

O sinal clínico de trombocitopenia é a formação de petéquias, que são reflexo do sangramento venoso capilar ou pós-capilar, geralmente visibilizadas em locais com grande pressão intravascular, a exemplo de abdômen ventral, mucosa oral e genital e locais de fricção como a região axilar ou inguinal (REBAR *et al.*, 2003).

Em felinos, a diminuição real no número de plaquetas é um achado incomum. A causa mais comum de trombocitopenia em gatos é a agregação plaquetária. As causas mais comumente relacionadas com trombocitopenia verdadeira em felinos são infecciosas (JAVINSKY, 2015). Estão relacionadas com o vírus da leucemia felina (FeLV) e o vírus da imunodeficiência felina (FIV) (REBAR *et al.*, 2013). Os mecanismos associados à trombocitopenia durante uma infecção viral podem ser multifatoriais e variam de acordo com o agente. A trombocitopenia induzida por vírus pode ser causada pela redução da megacariocitopoese, dano direto ou lise pelo próprio vírus, remoção das plaquetas pelo sistema mononuclear fagocitário ou por coagulação intravascular disseminada (KOHN, 2006).

A trombocitopenia imunomediada é causada pela remoção de plaquetas que tem anticorpos em sua superfície por macrófagos no baço. Esses anticorpos podem se direcionar contra antígenos de superfície da plaqueta ou contra antígenos semelhantes em estrutura aos antígenos plaquetários. A doença pode fazer com que antígenos ocultos na superfície da plaqueta sejam expostos. Os complexos antígeno-anticorpo podem se depositar na membrana da plaqueta e gerar uma resposta de hipersensibilidade do tipo três (JAVINSKY, 2015).

Outros motivos relacionados à trombocitopenia felina mencionados na literatura são fármacos, a exemplo do metimazol, griseofulvina, albendazol, cloranfenicol, ribavirina, estreptomicina, acetazolamida, e medicamentos citotóxicos, como a doxorrubicina, vincristina, cisplatina, ciclofosfamida, carboplatina e azatioprina (KOHN, 2006; THOMAS, 2010). A doença inflamatória é outra causa importante para a diminuição do número de plaquetas em gatos. No estado de doença inflamatória, a interação das plaquetas com superfícies endoteliais alteradas ou que sofreram dano causa ativação extensa, aglomeração e remoção de plaquetas pelo sistema mononuclear fagocitário (KOHN, 2006).

### 2.3.4 Contagem estimada de plaquetas

As plaquetas dos felinos não podem ser contadas com precisão por aparelhos hematológicos automáticos devido à agregação e por apresentarem, com frequência, tamanho maior que o limite estabelecido para o instrumento. O esfregaço sanguíneo sempre deve ser avaliado para confirmação da baixa contagem de plaquetas em gatos (ESTRIN; SPANGLER, 2011).

Os contadores por impedância não possuem habilidade suficiente para diferenciar os eritrócitos das megaplaquetas, por essas células apresentarem tamanhos aproximados, o que pode gerar uma contagem errônea das plaquetas (KNOLL; ROWELL, 1996). Apresentam precisão limitada a baixos níveis de plaquetas, com grande variação da contagem devido à falha desta técnica em diferenciar as plaquetas de debris e de fragmentos celulares (OLSEN *et al.*, 2004). A contagem fidedigna de plaquetas vem se tornando cada vez mais importante em pacientes críticos, principalmente nos que apresentam trombocitopenia (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os métodos de contagem manual de plaquetas, como o hematocitômetro e o estiraço sanguíneo tem uma grande importância nos laboratórios clínicos veterinários que usam analisadores hematológicos, visto que a contagem feita pelos métodos automáticos não se mostra confiável em pacientes com trombocitopenia (TVEDTEN, 1993). No entanto, esses métodos demandam muito tempo e é necessária experiência do analisador (OLSEN *et al.*, 2004). Apesar disso, a utilização da citometria de fluxo representa um grande avanço no que se refere a contagem de plaquetas (SEGAL *et al.*, 2005). Os contadores hematológicos modernos apresentam alto nível de precisão (LEWIS; ROWAN; KUBOTA, 1990).

O método considerado oficial de referência pelo Comitê Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) é o realizado pela diluição do sangue total e lise dos eritrócitos em hematocitômetro (câmara de Neubauer) (TASKER; CRIPPS; MACKIN, 2001).

O método mais simples e confiável para estimativa do número de plaquetas é a partir de um estiraço sanguíneo (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006). O exame de um esfregaço sanguíneo de boa qualidade possibilita a avaliação referente à morfologia e ao número de plaquetas. Primeiramente, deve-se avaliar o esfregaço em objetiva de baixo aumento, para observação de grumos de plaquetas. Esses grumos são agregações plaquetárias que comumente resultam numa falsa trombocitopenia. Posteriormente, em objetiva de imersão, vários campos onde, aproximadamente, 50% das hemácias encostam umas nas outras, devem ser avaliados, e o número de plaquetas contado em cinco campos. Em gatos

normais, devem ser observadas de 10 a 12 plaquetas por campo. Via de regra, cada plaqueta visibilizada em objetiva de imersão equivale a uma quantia de 12.000 a 15.000 plaquetas/ $\mu$ l. Ao mesmo tempo em que se avalia a quantidade de plaquetas, a sua morfologia também deve ser analisada, com a finalidade de verificar a existência de função plaquetária prejudicada (NELSON; COUTO, 2001).

Segundo Thrall (2012), deve haver um número mínimo de cinco a dez plaquetas por campo, em objetiva de grande aumento (1000x, em óleo de imersão). O número normal de plaquetas é variável entre as espécies de animais, mas em todas elas, a variação situa-se entre 100.000 a 800.000 plaquetas/ $\mu$ l. Caso haja agregados de plaquetas no esfregaço sanguíneo, obtém-se a contagem de plaquetas falsamente diminuída. Menos que três plaquetas por campo de imersão sugerem contagem de 50.000 plaquetas/ $\mu$ l, ou menos, se não houver agregação plaquetária.

Uma estimativa da contagem de plaquetas pode ser baseada na avaliação do esfregaço sanguíneo pela multiplicação do número médio de plaquetas por campo de imersão (baseando-se na avaliação de pelo menos 10 campos) por 15.000 ou 20.000/ $\mu$ l (ESTRIN; SPANGLER, 2011).

Segundo Tasker *et al.*, (1999), cada plaqueta por campo de imersão representa uma contagem de plaquetas circulantes de  $20 \times 10^9/l$ . Portanto, contar as plaquetas em 10 campos em objetiva de imersão e multiplicar o resultado por dois fornece a contagem estimada de plaquetas em  $x \times 10^9/l$  (KNOTTENBELT; BLACKWOOD, 2006).

Um método indireto de contagem de plaquetas é realizado em extensões sanguíneas coradas pela relação eritrócitos/plaquetas. Em cada extensão são contadas 2000 células (englobando eritrócitos e trombócitos), e dentre esses, marcam-se quantos trombócitos aparecem. Através de regra de três, calcula-se o número total de trombócitos (PITOMBEIRA; MARTINS, 1966; HRUBEC; SMITH, 1998).

## 2.4 Anticoagulantes

A coagulação do sangue para a realização de hemograma deve ser evitada, e com esse intuito, várias substâncias anticoagulantes são utilizadas: oxalatos, citratos, ácido etilenodiaminotetracético( EDTA), heparina, dentre outras (PAIVA, 2013).

### 2.4.1 Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

É o anticoagulante de escolha para a maioria dos exames hematológicos (REBAR *et al.*, 2003, THRALL, 2007). Comercialmente, o ácido etilenodiaminotetracético vem no tubo de tampa de cor lavanda. Ele preserva de forma eficaz o volume celular e a morfologia das células nos estiraços sanguíneos corados (WEISER, 2015). Essa preservação dos elementos celulares permanece durante seis horas (SILVEIRA, 1988).

A amostra com EDTA pode ser utilizada para realização do hemograma, determinação do fibrinogênio e contagem de plaquetas (LOPES *et al.*, 2008). Quando se utiliza analisador hematológico automático, a preparação líquida de sal tripotássico é a forma mais utilizada do EDTA, preservando o volume celular. As formas em pó do EDTA não são indicadas, pelo fato de serem difíceis de homogeneizar com o sangue adicionado ao tubo (THRALL, 2007). Para contagem de plaquetas, ele deve ser utilizado como o anticoagulante de escolha (SILVEIRA, 1998). Segundo Paiva (2013), o EDTA é o único anticoagulante que impede a agregação plaquetária.

O EDTA é um agente quelante do fator IV ( $Ca^{2+}$ ) na cascata da coagulação, que é essencial em várias de suas etapas e atua como um mediador, bem como na relação célula a célula durante as reações de coagulação (HARR *et al.*, 2005; NAVARRO, 2005). O volume de sangue depositado no tubo com EDTA deve ser o indicado para sua capacidade recomendada, pois o excesso de anticoagulante pode gerar um falso aumento da proteína plasmática total e diminuição do volume globular e hematimetria. O encolhimento das hemácias gera uma queda no volume corpuscular médio (REBAR *et al.*, 2003). Quando o EDTA for escolhido como agente anticoagulante, o ideal é que o esfregaço sanguíneo seja feito utilizando sangue sem anticoagulante. Se isso não for possível, deve ser feito logo após a coleta, para evitar a presença de artefatos que o EDTA pode gerar nos leucócitos

(MEINKOTH; ALLISON, 2007). No que diz respeito às plaquetas, em um estudo comparativo entre o EDTA e o citrato de sódio em cães, o EDTA se mostrou mais eficaz na inibição da formação de agregados plaquetários (MYLONAKIS *et al.*, 2008).

#### **2.4.2 Citrato de sódio**

Em apresentação comercial, o citrato de sódio vem em tubo com tampa azul. É usado para determinação bioquímica de substâncias ou fatores que se relacionam aos mecanismos de coagulação (THRALL, 2007). Ele reage com cálcio, o que impede sua ação no processo de coagulação. Apresenta como desvantagem a interferência em muitos testes químicos (NAVARRO, 2005).

Em provas de coagulação, como tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada, é o anticoagulante de escolha. É empregado em soluções de 1,34 g%, na proporção de 10%, o que resulta em 0,5 ml de citrato para 4,5 ml de sangue (LOPES *et al.*, 2008). É utilizado em bolsas para transfusão de sangue, em solução de 3,8% para bolsa de 500 ml ou manipulado (1 ml de solução 3,8% para 9 ml de sangue ou 0,5 g para 100 ml de sangue (LACERDA, 2008).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), sob o número 030/2017. Foram coletadas e analisadas amostras sanguíneas de 25 gatos hígdos, a partir dos quatro meses de idade e sem preferência de sexo, divididos em dois grupos. Todos os gatos foram submetidos à coleta de um ml de sangue da veia safena medial esquerda ou direita, através de *scalp* n.23 acoplado em seringa de três ml.

Quinze animais compuseram o grupo de gatos que não foram submetidos à ambientação antes da coleta de sangue. O grupo foi denominado de “não ambientado safena” (NAS). O outro grupo, composto por 10 gatos, foi submetido à ambientação prévia e foi denominado “ambientado safena”(AS).

Em ambos os grupos, foi coletado o volume total de um ml por gato, sendo 0,5 ml de sangue depositado em tubo de polipropileno contendo 10µl de EDTA a 10% e 0,5 ml

depositado em tubo de polipropileno contendo 10µl de citrato de sódio a 3,8%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e submetidas primeiramente à confecção de esfregaço sanguíneo e à contagem automática de plaquetas.

Os animais do grupo NAS tiveram amostra colhida a logo após a entrada na sala de coleta, com a presença do tutor e dos dois examinadores responsáveis pelo procedimento. O animal foi posicionado em decúbito lateral no colo do tutor, enquanto um dos examinadores fez a contenção por meio da pele do pescoço, membros anteriores e posteriores e o outro ficou responsável pela introdução do *scalp* para coleta do sangue.

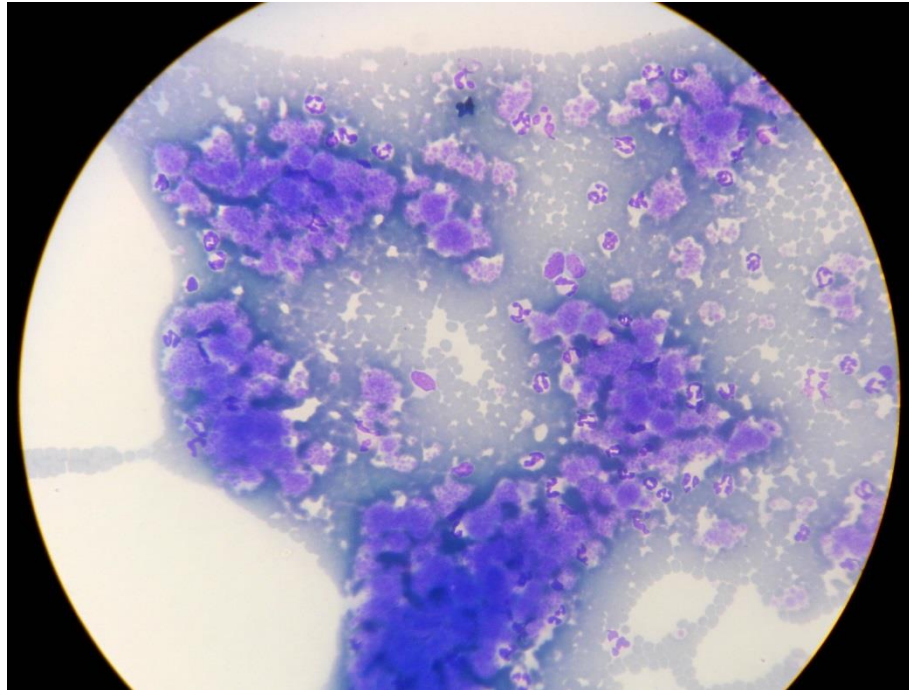
Os gatos do grupo AS permaneceram por uma hora em uma sala livre de odores de outras espécies (como cães, por exemplo), acompanhado de três examinadores responsáveis pelo procedimento. A sala foi previamente difundida com feromônio sintético semelhante ao feromônio facial liberado pelos felinos em momentos de tranquilidade. Ao homem, este feromônio é inodoro, mas é percebido pelo gato. A substância foi liberada na sala de coleta por meio de um difusor elétrico (Feliway® - Ceva Saúde Animal Ltda. – Paulínia-SP), o qual permaneceu ligado durante toda a pesquisa. Durante o período da ambientação, o comportamento dos gatos foi observado. Movimentos de andar, rolar, dormir e esfregar-se em objetos e nos examinadores foram considerados comportamentos indicativos de tranquilidade (ambientação). Ao contrário, manifestações como soprar, miar e andar compulsivamente, procurar rota de fuga, esquivar-se e esconder-se foram considerados comportamentos de estresse, indicando ausência de ambientação. Após o período de uma hora, a coleta sanguínea da veia safena medial foi realizada, de modo semelhante a do grupo NAS.

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram conduzidas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário do CCA, submetidas à contagem automática no Contador Hematológico Automático PockpH-100iV Diff®, e, dependendo do nível de agregação plaquetária observado na lâmina, foram também submetidas à contagem manual. .

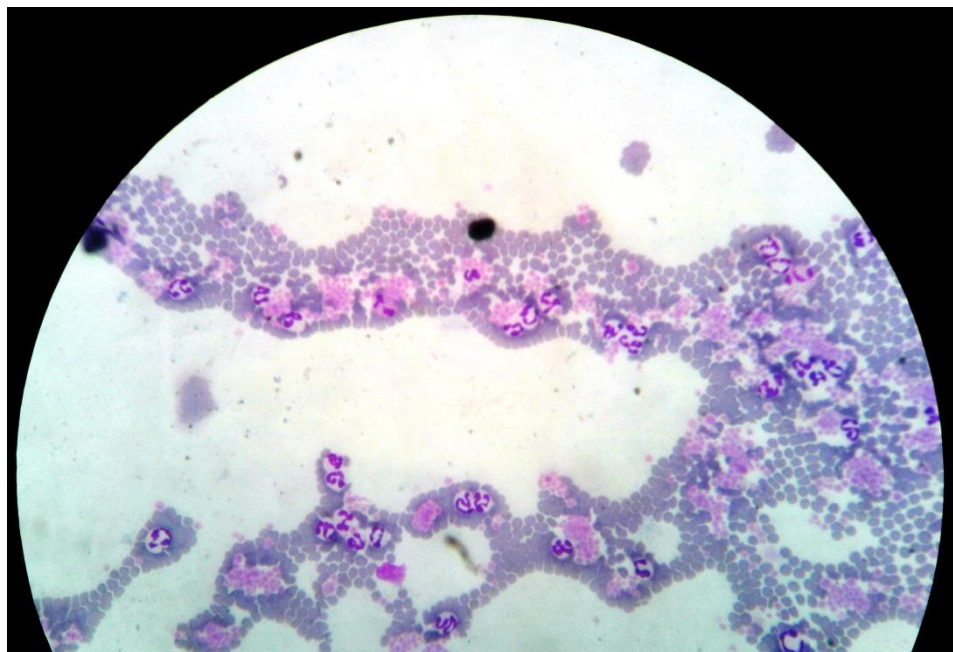
Esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados em Panótico rápido. Após a secagem, eles foram analisados em microscópio óptico, para identificação de agregações plaquetárias. As bordas e a franja dos esfregaços foram observadas em objetiva de 40x para identificar as agregações e em objetiva de 100x para a confirmação das mesmas.

O nível de agregação foi classificado em discreto, moderado e intenso. A fim de selecionar as amostras que estariam aptas para passar pela contagem manual, valeu-se de uma classificação subjetiva da agregação plaquetária, onde: considerou-se **agregação discreta** o esfregaço com presença de pequenos agregados em sua franja; **agregação moderada** quando

havia pequenos grumos presentes na borda e grumos medianos na franja do esfregaço e **agregação intensa** quando foram encontrados grumos pequenos e medianos na borda e grumos grandes na franja.



**Figura 6.** Agregação plaquetária intensa em esfregaço sanguíneo de gato doméstico (Acervo pessoal).



**Figura 7.** Agregação plaquetária moderada em esfregaço sanguíneo de gato doméstico (Acervo pessoal).



**Figura 8.** Agregação plaquetária discreta em esfregaço sanguíneo de gato doméstico (Acervo pessoal).

As amostras com agregação plaquetária intensa não passaram por contagem manual. As amostras com agregação discreta e moderada foram submetidas aos dois métodos de contagem manual, a contagem na lâmina e a contagem na câmara de Neubauer.

A contagem estimada de plaquetas na lâmina foi realizada através de um método indireto, baseado no de Pitombeira *et al.* (1966), fazendo correlação com a hematimetria, fornecida pela contagem automática do aparelho. Foram contados 10 campos com distribuição homogênea de células. Uma linha imaginária foi traçada no meio de cada campo. Foram contadas metade das hemácias e o total de plaquetas por campo. O número de hemácias de cada campo foi multiplicado por dois. Ao final da contagem, foi somado o número total de hemácias e plaquetas, e feita regra de três com a hematimetria, fornecida pelo aparelho automático.

Exemplo: 3000 Hemácias \_\_\_\_\_ 100 Plaquetas  
7,6 (Hematimetria do paciente) \_\_\_\_\_ x

Para contagem na câmara de Neubauer, foi utilizado o método de Brecher & Cronkite. As amostras foram diluídas na proporção de 1:200 (10  $\mu$ L de sangue para 1990  $\mu$ L de solução de Brecher) em tubo de ensaio de polipropileno. Foram homogeneizadas por inversão durante 5 minutos em homogeneizador automático. Após esse processo, foram preenchidos

ambos os compartimentos da câmara de Neubauer. Esperou-se a sedimentação das plaquetas na câmara por 20 minutos, em câmara úmida (placa de petri + papel absorvente umedecido). No microscópio óptico foi realizada a contagem das plaquetas de forma semelhante à contagem de hemácias, contando-se cinco quadrados, com iluminação reduzida para facilitar a visualização das plaquetas e diminuir a confusão com artefatos (bactérias ou sujidades). Após a soma dos quadros, o valor final foi multiplicado por 2500, obtendo-se o número de plaquetas por  $\mu\text{L}$ , como sugerido por Jain (1986).

Os resultados das contagens plaquetárias foram analisados utilizando o teste de Tukey para comparar os fatores ambientação (ambientação *versus* não ambientação) e anticoagulantes (EDTA *versus* citrato de sódio). Os métodos de contagem das plaquetas (automático *versus* manual) foram comparados por meio do teste de Wilcoxon. O nível de confiança adotado para este estudo foi de 95%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ambientação *versus* não ambientação

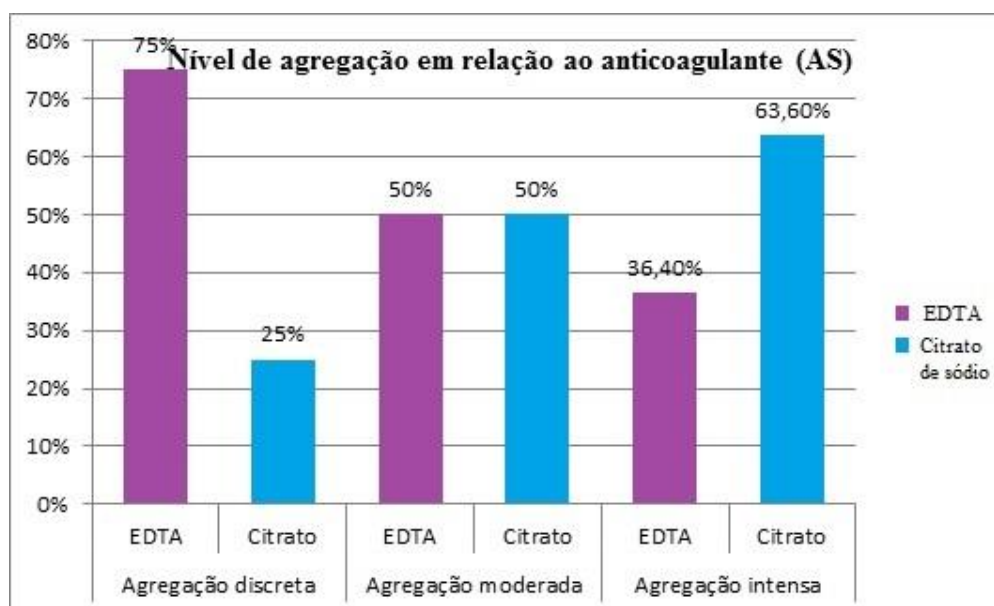
O teste de Tukey não demonstrou diferença significativa entre o emprego da ambientação e não ambientação ( $p = 0.3368$ ). No grupo AS 70% dos animais exibiram comportamentos que indicaram ambientação e 30% não exibiram. Apesar de grande parte dos gatos manifestarem tranquilidade durante sua permanência na sala de ambientação, muitos deles não se mostraram cooperativos no momento da venopunção. Estes resultados foram similares aos observados por Kronen *et al.* (2006), os quais também utilizaram a fração sintética do feromônio facial felino em gatos submetidos a cirurgias eletivas. Os autores afirmaram que o feromônio foi capaz de acalmar os animais, porém não reduziu o estresse para a realização da cateterização venosa.

Com relação à presença de agregação plaquetária, 94,4% das amostras do grupo AS apresentou algum tipo de agregação em lâmina, enquanto no grupo NAS, esta porcentagem foi de 100%. Independentemente do anticoagulante empregado, no grupo AS, 61,1% das agregações corresponderam à forma intensa, 11,1% moderada, 22,2% discreta e 5,6% não apresentaram agregação. No grupo NAS, 60% das agregações foram intensas, 5% moderadas e 35% foram discretas.

A observação da alta porcentagem de agregação plaquetária no grupo ambientado corrobora com os achados de Kronen *et al.* (2006), provando que o feromônio facial não foi eficaz em ambientar os gatos a tal ponto que não apresentassem agregação plaquetária. Tais achados podem ser justificados pela contaminação tecidual, a qual pode ocorrer durante coletas traumáticas, induzindo agregação plaquetária como relatado por Weiser (2015).

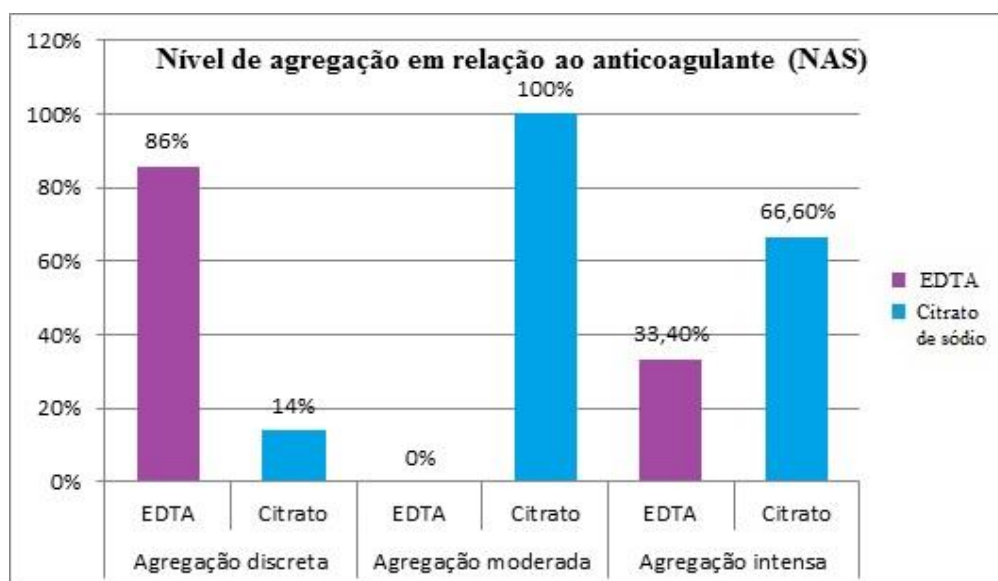
### 4.2 EDTA *versus* citrato de sódio

No grupo AS, 75% das agregações discretas ocorreram quando se utilizou o EDTA e 25% quando se utilizou o citrato de sódio a 3,8%. Em relação à agregação moderada, 50% ocorreram com o EDTA e 50% com o citrato de sódio. Do total de agregações intensas, 36,40% ocorreram quando se utilizou o EDTA e 63,6% com o citrato de sódio (Figura 9).



**Figura 9.** Demonstração gráfica comparativa dos níveis de agregação plaquetária encontrados em amostras sanguíneas com EDTA e com citrato de sódio a 3,8%, de gatos domésticos submetidos à ambientação (AS) com feromônio facial sintético.

No grupo NAS, 86% das agregações discretas ocorreram quando se utilizou o EDTA e 14% quando se usou o citrato de sódio. Todas as agregações moderadas ocorreram com o citrato de sódio. Nas agregações intensas, 33,4% ocorreram quando se utilizou o EDTA e 66,6% quando o citrato de sódio foi utilizado (Figura 10). Em ambos os grupos, o teste de Tukey demonstrou diferença significativa entre o EDTA e o citrato de sódio ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Demonstração gráfica comparativa dos níveis de agregação plaquetária encontrados em amostras sanguíneas com EDTA e com citrato de sódio a 3,8%, de gatos domésticos não submetidos à ambientação (NAS) com feromônio facial sintético.

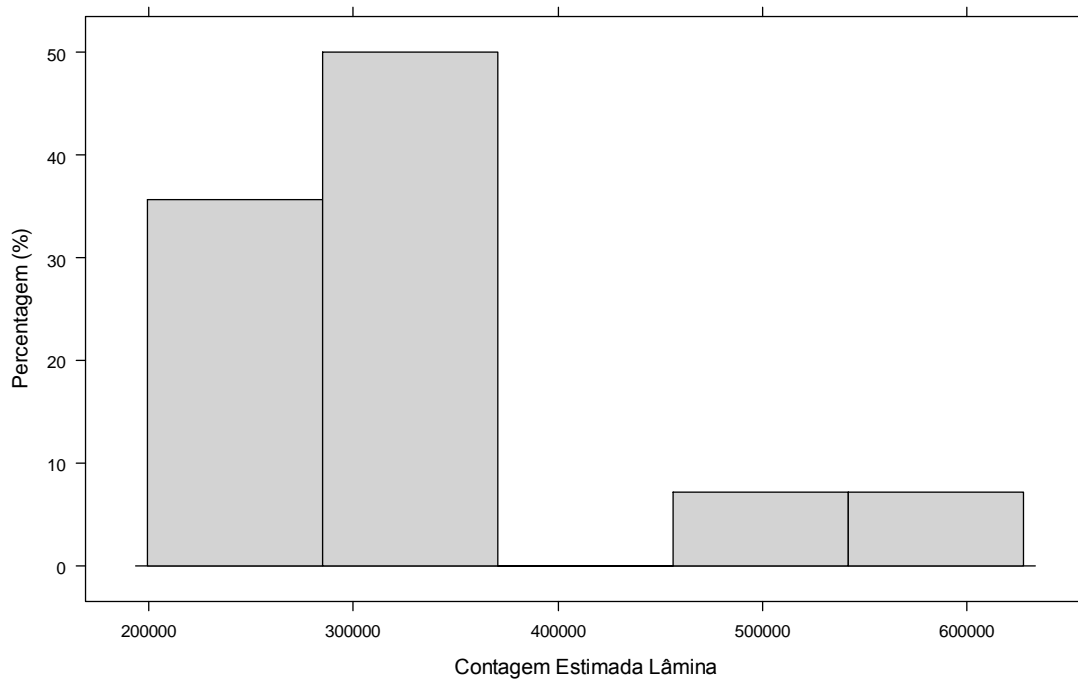
Segundo Mylonakis *et al.* (2008), a associação significativa de citrato de sódio com a formação de agregação plaquetária pode impedir seu uso para determinação do número de plaquetas na espécie canina. Em seu estudo, os pesquisadores compararam o efeito dos anticoagulantes (Citrato de sódio e EDTA) e das condições de armazenamento da amostra sobre o tamanho das plaquetas e agregação plaquetária em cães saudáveis. O estudo revelou que a agregação plaquetária foi 1,9 vezes mais provável com o citrato de sódio, comparativamente ao EDTA. Essa informação corrobora com o grande percentual de agregação intensa observada no presente estudo, quando o citrato de sódio foi empregado.

Em contrapartida, Fuck *et al.* (2012) realizaram um estudo comparando os efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas de gatos domésticos. Foi observado que a contagem de plaquetas foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) em sangue com EDTA e se manteve estável em sangue com citrato de sódio. Segundo esse estudo, o citrato de sódio pode ser recomendado como anticoagulante para colheita de sangue em felinos, oferecendo vantagem sobre o EDTA, por diminuir a incidência de trombocitopenia.

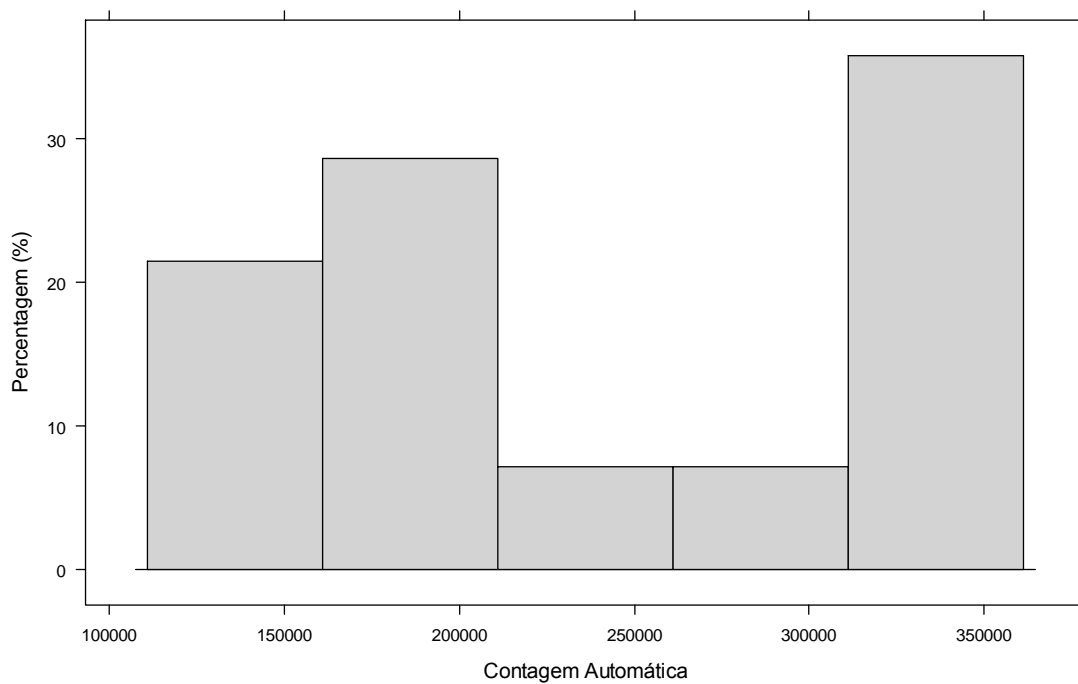
#### **4.3 Contagem automática versus contagem em lâmina versus contagem em câmara**

No teste de Wilcoxon, houve diferença significativa entre os métodos de contagem estimada na lâmina e a contagem automática ( $p < 0,05$ ) (Figuras 11 e 12). Não houve diferença estatística significativa entre a contagem da câmara (Figura 13) e automática nem entre a contagem da câmara e a contagem da lâmina. No estudo de Schweigert *et al.* (2010) não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos pelos três métodos de contagem de plaquetas, contudo, a pesquisa foi realizada em cães. Acredita-se que as diferentes particularidades das plaquetas da espécie canina e felina possam ter influenciado na obtenção de diferentes resultados.

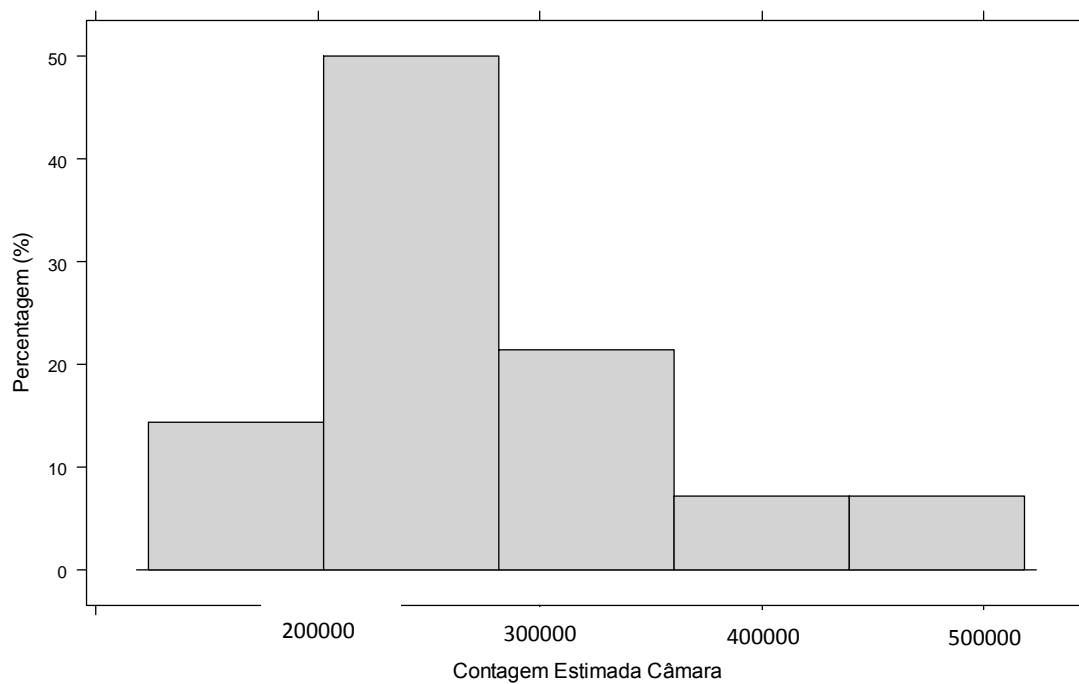
Como o gato apresenta um número grande de megaplaquetas, os aparelhos automáticos que utilizam método de impedância para contagem apresentam dificuldade para diferenciar as megaplaquetas das hemácias, por apresentarem tamanhos aproximados (KNOLL; ROWELL, 1996). Essas plaquetas sendo contadas como hemácias gerando uma pseudotrombocitopenia. As megaplaquetas são facilmente diferenciadas das hemácias no esfregaço sanguíneo, o que corrige o valor obtido na contagem estimada e garante um resultado mais confiável.



**Figura 11.** Frequência relativa da contagem de plaquetas de gatos na lâmina, independente de grupo ou anticoagulante.



**Figura 12.** Frequência relativa da contagem automática de plaquetas em gatos, independente de grupo ou anticoagulante.



**Figura 13.** Frequência relativa da contagem de plaquetas de gatos na câmara, independente de grupo ou anticoagulante.

## 5. CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível concluir que:

- 1- A ambientação com o feromônio facial felino sintético exerceu certo efeito de tranquilização nos gatos, porém não suficiente para impedir o estresse no momento da colheita sanguínea e, por conseguinte, não diminuindo a frequência de pseudotrombocitopenia por agregação plaquetária em gatos;
- 2- No que se refere à eficácia dos anticoagulantes, o EDTA foi responsável pela maior parte das agregações discretas e o citrato de sódio pela maior parte das agregações intensas e, portanto, sendo o pior para obtenção de contagens plaquetárias confiáveis;
- 3- A comparação entre os métodos de contagens de plaquetas reforça a importância da avaliação realizada no esfregaço sanguíneo, a fim de se alcançar um resultado fidedigno.

## REFERÊNCIAS

- BAKER, D. C.. Diagnóstico das Anormalidades de Hemostasia. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015. p.399–439.
- BAKER, D. C.. Diagnóstico dos Distúrbios Hemostáticos. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2006. p. 170 – 187.
- BARGER, A. M.. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.33, p.1207-1222, 2003.
- BRADSHAW, J. W. S. **The behaviour of the domestic cat**. Oxon: CABI Publishing, 2000. 219p.
- CALLAN, M. B. Petéquias e Equimoses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.227–230.
- COUTO, C. G. Distúrbios da Hemostasia. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.1243–1260.
- DANIEL, A. G. T. **Casos em Medicina Felina**, 1. ed. São Paulo: MedVet, 2015. 390p.
- ELSE, R.W., KELLY, B.G., Collection and handling of samples for diagnosis. In: Davidson MG, Else RW, Lumsden JH, eds. **BSAVA manual of small animal clinical pathology**. Gloucester, England: British Small Animal Veterinary Association, 1998. p.3–25.
- ESTRIN, M. A.; SPANGLER, E. A. Coagulação Intravascular Disseminada. In: AUGUST, J. R. **Medicina Interna de Felinos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.639–651.
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do cão e do gato**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- FUCK, E. M. T. *et al.* Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo. **MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 10, n. 33, p. 276-283, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/140521>.
- GENARO, G.. **MEDVEP REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA: Pequenos Animais e Animais de Estimação**. São Paulo: Maio, v. 2, n. 5, jan/mar. 2004. Trimestral.
- GODFREY, D.R. Bronchial rupture and fatal tension pneumothorax following routine venipuncture in a kitten. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.33, p.260–263, 1997.
- HARR, K. E. RASKIN, R. E.; HEARD, D. J. Temporal effects of commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from Macaws and Burmese pyhons. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.4, p.383 – 388, 2005.

HEATH, S; RODAN, L. Handling the Cat that is in Pain. In: RODAN, L.; HEATH, S. **Feline Behavioral Health and Welfare**. Elsevier, 2016. p. 287 – 305.

HEATH, S. Problemas Comportamentais Comuns em Felinos. In: CHANDLER, E. A; GASKELL, C. J; GASKELL, R. M. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed. São Paulo: ROCA, 2006. p. 41 – 56.

HORWITZ, D. F. Eliminação Inapropriada em Felinos. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S, F.; TILLEY, L. P. **O Paciente Felino**, 3. ed. São Paulo: ROCA, 2009. p. 446 – 449.

HORWITZ, D. F. Marcação de Território. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S, F.; TILLEY, L. P. **O Paciente Felino**, 3. ed. São Paulo: ROCA, 2009. p. 450 – 453.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S. A Hematology of fishes. In.: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, M. C. Eds. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Blackburg: Wiley-Blackwell. 1998, p. 1120 – 1125.

JAVINSKY, E. Hematologia e Distúrbios Imunorrelacionados. In: LITTLE, S. E. **O Gato – Medicina Interna**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 619 – 677.

KIRK, R. W.; BISTNER, S. I. **Manual de Procedimentos e Tratamento de Emergência em Medicina Veterinária**. São Paulo: Editora Manole, 1987. 994 p.

KNOLL, J. S.; ROWELL, S. Clinical hematology in clinic analysis, quality control, reference values and system selection. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.26, n.5, p.981-1002, 1996.

KNOTTENBELT, C. M; BLACKWOOD, L. Sangue. In: CHANDLER, E. A; GASKELL, C. J; GASKELL, R. M. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3. ed. São Paulo: ROCA, 2006. p. 194 – 230.

KOHN, B. Thrombocytopenia in cats. In: WORLD CONGRESS WSAVA/FECAVA/CSAVA, 31, 2006, Prague. **Artigo**. Prague: World Congress Wsava/fecava/csava, 2006. p. 337 - 375.

KRONEN, P. W. *et al.* A synthetic fraction of feline facial pheromones calms but does not reduce struggling in cats before venous catheterization. **Veterinary Anaesthesia And Analgesia**, Us, v. 33, n. 4, p.258-265, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2995.2005.00265.x>.

LACERDA, L. A. Transfusão Sanguínea em Veterinária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Patologia Clínica Veterinária: Texto Introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. p. 73 – 94.

LEFRANÇAIS, E. *et al.* **The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors**. 2017. Disponível

em:<<http://www.nature.com/nature/journal/v544/n7648/full/nature21706.html>>. Acesso em: 11 jul. 2017.

LEY, J. M; SEKSEL, K. Comportamento Normal de Gatos. In: LITTLE, S. E. **O gato – Medicina Interna**, 1 ed. Rio de Janeiro: ROCA, 2015. p. 182 - 188.

LEWIS, S. M.; ROWAN, R. M.; KUBOTA, F. Evaluation of prototype for a reference platelet counter. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.43, n.11, p.932-936, 1990.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. Hematologia Clínica. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Patologia Clínica Veterinária : Texto Introductório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. p. 1 – 57.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, S. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MEINKOTH, J. H.; ALLISON, R. W. Sample collection and handling: getting accurate results. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 37, n. 2, p. 203-219, v, 2007.

MYLONAKIS, M. E. *et al.* Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 6, p. 774-779, 2008.

NAVARRO, C. E. K. G. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: VARELA, 2005. 206 p.

NELSON, R.W.; COUTO, C. G. Distúrbios da Hemostasia. In: \_\_\_\_\_ **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 235 – 246.

NORSWORTHY, G. D.. Coleta de Sangue Jugular: Método Alternativo. In: \_\_\_\_\_ **O Paciente Felino**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2009. Cap. 206. p. 640-641.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Is automated platelet counting still a problem in thrombocytopenic blood? **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v.121, n.1, 2003.

PAIVA, M. J. *et al.* Colheita de Sangue. In: \_\_\_\_\_ **Métodos para análise hematológica em peixes**, 1. ed. Maringá: Eduem, 2013. p. 19 – 34.

PITOMBEIRA, M. S.; MARTINS, J.M. A direct method for White blood cell count in fishes. **Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará**, v . 6, n. 2, p. 605, 1966.

REBAR, A. H. *et al.* **Hematologia para Cães e Gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. 291 p.

SCHWEIRGERT, A. *et al.* Avaliação da contagem plaquetária pelo contador automático QBC Vet Autoread® comparado com estimativa em esfregaço sanguíneo e contagem em hemocítmetro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31. n. 4, p. 1001 – 1008, out./dez.2010.

SEGAL, H. C. *et al.* Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.128, n.4, p.520-525, 2005.

SERPELL, J. A. Domestication and history of the cat. In: TURNER, D. C.; BATESSON, P. **The domestic cat: the biology of its behavior**. 2. ed. Cambridge University Press, p. 179 – 192, 2000.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação – Visão laboratorial da hemostasia primária e secundária**. Rio de Janeiro: Reinventer, 2006.

SILVEIRA, J. M. **Patologia Clínica Veterinária – Teoria e Interpretação**. Rio de Janeiro: GUANABARA, 1998. 196 p.

TASKER, S.; CRIPPS, P. J.; MACKIN, A. J. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.42, n.7, p.326-332, 2001.

TAYLOR, S. M.. Coleta de Sangue Venoso. In: \_\_\_\_\_ **Semiotécnica de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 1-13.

TELHADO, J. **Curso básico de comportamento felino**. Rio de Janeiro. 2012. 30 p.

THRALL, M. A. *et al.* Coleta e Processamento de Amostras e Análises das Opções de Serviços Laboratoriais. In: \_\_\_\_\_ **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2007. p 37–42.

THOMAS, J. N. Non-Immune-Mediated Thrombocytopenia. In: WEISS. D. J; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: WILEY-BLACKWELL, 2010. p. 596-604.

TVEDTEN, H. Advanced hematology analyzers interpretation of results. **Veterinary Clinical Pathology**. Santa Barbara, v.22, n.3, p.72-80, 1993.

VOLPATO, J. **Efeitos da contenção física e química sobre as variáveis hematólicas e hemostáticas em gatos**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

WEISER, G. Coleta e Processamento da Amostra e Análise das Opções de Serviços Laboratoriais. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015b. p. 87 – 99.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária na Doença. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015a. p. 276 – 305.