



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



**Avaliação da agregação plaquetária em gatos ambientados e não ambientados,
comparando os anticoagulantes Citrato de sódio 3,2% e EDTA e diferentes
métodos de contagem de plaquetas**

Débora Cristina Basílio Crispim da Silva

Areia, 2017



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



Avaliação da agregação plaquetária em gatos ambientados e não ambientados, comparando os anticoagulantes Citrato de sódio 3,2% e EDTA e diferentes métodos de contagem de plaquetas

Débora Cristina Basílio Crispim da Silva

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 PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Cristina Basílio Crispim da Silva

Avaliação da agregação plaquetária em gatos ambientados e não ambientados, comparando os anticoagulantes Citrato de sódio 3,2% e EDTA e diferentes métodos de contagem de plaquetas

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

Aprovada em: 27 de Julho de 2017
Nota: 9,3

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ivia Carmem Talieri
Orientadora

Dra. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano

Profa. Dra. Fabiana Satake

Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coordenação de TCC

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que possam se beneficiar com o conhecimento nele contido, e que venham de alguma forma, a aplicá-lo ou aprofundá-lo, visando melhorar o manejo clínico dos felinos e diminuir os erros que possam vir a acarretar em resultados laboratoriais imprecisos.

Dedico também a todos os gatos, principalmente aos que serviram de cobaias para o experimento e puderam contribuir para o nosso aprendizado. A estes todo o meu agradecimento e respeito.

Agradecimentos

Não poderia começar os meus agradecimentos sem ser pela minha mãe, Cristina, que desde sempre me apoiou e não me deixou desistir de me formar médica veterinária. Obrigada por tudo o que sempre fizeste e desculpa pelo trabalho que dou até hoje.

Ao meu pai Roberto e meus irmãos, Rubens, Diana, Daniela (*in memoriam*) e Daniel por sempre me incentivarem, e sempre me lembrarem de quem eu sou e do que eu posso ser capaz.

Ao meu marido Juscelino, pelo apoio e paciência nestes momentos finais (sei que não fui nada fácil de conviver), obrigada por permanecer ao meu lado, me acalmando e confiando em mim, te amo.

Aos meus filhos Áries e Athos, por serem perfeitos e me motivarem por simplesmente existirem.

Aos meus melhores amigos que sempre torceram por mim desde a época de Patos, e sempre me amaram independente das minhas escolhas, Klélia, Aline, Gláubia, Valdemir, Juliana, Isabela, Isamara, Kamyla, Jozélio, Alano.

A todos os meus amigos de curso, por me fazerem chegar até aqui, me fazendo sentir no lugar certo e na hora certa, me ajudando a superar todas as dificuldades que apareceram no caminho e tornando possível a minha chegada até aqui.

À Raiene, Quênia, Isadora, Lanne, Marcelo, Carol “Negona”, Carol “Bombeira”, Driele, Wellington, Fiel, Vanessa “doida”, Carlosman, Alininha, Monalisa, Lucas, Allan, Fernanda, Francisca, Rubita, vocês não sabem o quanto foram importantes e fizeram a diferença na minha vida, e o quanto contribuíram para este título, adoro todos vocês.

Aos demais amigos que a faculdade me trouxe, em especial ao pessoal da Semio, obrigada por me fazerem crescer a cada dia.

À professora Fabiana, por sempre ser gentil comigo e com Áries.

À professora Gisele, pelo carinho com Áries, e pelo apoio e conselhos.

À professora Vanessa por todos os bons conselhos e preocupação com o meu futuro.

Ao professor Luiz por ter sido, além de um excelente professor, um ótimo amigo.

Ao professor Péricles pela disponibilidade e por não ter medido esforços para nos acudir com a estatística.

Ao pessoal do Hospital Veterinário, Vânia, Rafael, Dani dos Lafetá, Juliette, Manu, Carla, Rui, Ivana, Fabíola, Tereza, Camila, Débora, Gilsane, Luana, Dona Gilma, Regina, Bethania, Antônio, Lívia, por fazer o HV um lugar de muitas recordações maravilhosas.

A todos os tutores e amigos que trouxeram seus gatos para realizarmos as coletas e que não mediram esforços sempre que precisamos. Isto não seria possível sem cada um de vocês.

Ao Cláudio, por ter vivido comigo essa maravilha que foi realizar este projeto, obrigada por todas as risadas, guloseimas, conversas boas, nem tão boas assim, os *closes*, tudo, não sei por que não nos misturamos antes, convivemos muito em tão pouco tempo, e com certeza és uma pessoa que quero manter pra sempre por perto.

E por último, mas jamais menos importante, à professora Ivia por, além da idealização deste trabalho, ter participado a ponto de abrir mão das horas de descanso ou de lazer com a família para nos ajudar com as coletas. Obrigada pela amizade, conselhos, ajuda sempre que precisei, inclusive com Áries. Não sei nem como agradecer a presença de vocês na minha formação profissional e, principalmente, pessoal.

A todos vocês, muito obrigada de todo o coração!

“No Egito Antigo os gatos eram considerados deuses. Os gatos nunca se esqueceram disso.” (autor desconhecido)

Lista de figuras

Figura 1A – Fotomicrografia eletrônica de plaqueta em repouso (x10.000); B - Fotomicrografia eletrônica de plaqueta ativada. Notar a emissão de pseudópodes e a centralização das organelas (x10000).....	05
Figura 2 – Fotomicrografia óptica de megaplaquetas (seta maior) e plaquetas de tamanho normal (seta menor) em objetiva de 100x.....	08
Figura 3 – Veias de coleta sanguínea em gatos.....	13
Figura 4 – Punção da veia jugular em um gato contido em decúbito lateral.....	14
Figura 5 – Punção da veia jugular em um gato contido em estação.....	14
Figuras 6A e B – Contenção do membro pélvico para coleta da amostra sanguínea. Foi realizada tricotomia da área para melhor visualização do vaso. Coleta do sangue, com seringa e agulha.....	15
Figura 7 - “Técnica de encaixe” facilita a punção venosa da veia safena medial.....	16
Figura 8 - Localização do órgão vômeronasal em felinos.....	19
Figura 9 - Gato expressando o Reflexo de Flehming.....	19
Figura 10 - Tubos a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com citrato de sódio 3,2% (tampa azul) e K3 EDTA (tampa lilás) utilizados.....	21
Figura 11 - A – Colocação de microgota de sangue e posicionamento da lâmina extensora à frente do sangue; B – Movimento para trás para adesão do sangue à lâmina extensora; C - Movimento para frente para a confecção do esfregaço; D – Esfregaço confeccionado, uniforme e com comprimento de aproximadamente 75% do tamanho da lâmina.....	23
Figura 12 – Componentes do esfregaço sanguíneo (cabeça, corpo, borda e cauda/franja).....	24
Figura 13 - Agregação intensa (setas) em cauda de esfregaço sanguíneo de gato em amostra com citrato de sódio 3,2% no aumento de 100x.....	24
Figura 14 - Agregação intensa (setas) em borda de esfregaço sanguíneo de gato em amostra com citrato de sódio 3,2%, no aumento de 400x).....	25
Figura 15 - Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos não ambientados (NA), independente do anticoagulante.....	28
Figura 16 - Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos ambientados (A), independente do anticoagulante.....	29
Figura 17 - Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos, com citrato de sódio 3,2% ou EDTA.....	30

Lista de tabelas

Tabela 1: Resultados das contagens plaquetárias realizadas em contador automático (PockpH-100iV Diff®), câmara de Neubauer e em esfregaço sanguíneo a partir de amostras sanguíneas de gatos ambientados e/ou não ambientados, acondicionados em anticoagulante citrato de sódio 3,2% e/ou EDTA.....	31
---	----

Resumo

SILVA, Débora Cristina Basílio Crispim da, Universidade Federal da Paraíba, Julho de 2017. **Avaliação da agregação plaquetária em gatos ambientados e não ambientados, comparando os anticoagulantes Citrato de sódio 3,2% e EDTA e três métodos de contagem de plaquetas.** Orientadora: Ivia Carmem Talieri

O hemograma é o exame laboratorial mais requisitado na rotina clínica veterinária. Através dele é possível obter informações importantes sobre o estado de saúde dos pacientes, inclusive sobre as plaquetas. Os felinos são uma espécie com muitas características particulares, tanto comportamentais quanto biológicas, e é de extrema importância que o médico veterinário conheça essas particularidades a fim de evitar falhas no diagnóstico. A coleta sanguínea e a escolha do anticoagulante são fatores que podem interferir no plaquetograma. Foram coletados dois ml de sangue da veia jugular em dois grupos, cada um composto por dez gatos hípidos, sem distinção de gênero, idade ou raça, um com ambientação pré-coleta e o outro sem ambientação. Um ml foi acondicionado em tubo a vácuo com citrato de sódio a 3,2% e um ml em tubo a vácuo com EDTA. A ambientação foi realizada durante uma hora sob o efeito de feromônio facial felino (Feliway®- Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia-SP). As contagens das plaquetas foram realizadas de forma automática, manual em câmara de Neubauer e em esfregaço sanguíneo, imediatamente após a coleta. Nas análises estatísticas os dois anticoagulantes apresentaram diferença significativa ($p = 0.0013$), e as contagens automáticas tiveram diferença significativa em relação às contagens em lâmina (teste de Wilcoxon: $p = 0.0006104$; teste t : $p = 0.02314$). A ambientação *versus* a não ambientação, a contagem automática *versus* a contagem em câmara e a contagem em câmara *versus* a contagem em lâmina não demonstraram diferença significativa.

Palavras-chave: felinos, contagem automática, contagem câmara, contagem lâmina, ambientação.

Abstract

SILVA, Débora Cristina Basílio Crispim da, Universidade Federal da Paraíba, July, 2017. **Evaluation of the platelet aggregation in acclimated and non-acclimated cats, comparing the anticoagulant sodium citrate 3.2% with EDTA and different platelet counting methods.** Adviser: Ivira Carmem Talieri

The hemogram is the most required laboratory examination in the veterinary clinical routine. Through it it's possible to obtain important informations about the health condition of the patients, including about the platelets. Cat's are a very particular species, both behaviorial and biological, and is extremely important that the veterinary knows that particularities in order to avoid failure in the diagnosis. Both blood collection and the anticoagulant choice can interferences in platelet counts. It was as collected two mL of blood from de jugular vein from two distinct groups, each one composed by ten healthy cats with no distinction of gender, age or race, one under pre collection acclimatation and the other one without it. One mL was setted in a sodium citrate 3.2% vacuotainer and the other one in an EDTA vacuotainer. The acclimatation was performed for one hour under the effect of a facial pheromone (Feliway®- Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia-SP). Both blood samples was processed and the platelets was counted in automatic and manual methods in Neubauer chambers and blood smear estimation. There was significant difference between the EDTA and sodium citrate aggregation ($P = 0.0013$), and the correlation between the automatic counting and the blood smear counting had a significant difference (Wilcoxon test: $P = 0.0006104$; t test: $P = 0.02314$). The acclimatation *versus* non-acclimatation, the automatic counting *versus* chamber counting and the chamber counting *versus* the blood smear counting has shown no significant difference.

Key words: feline, automated counting, chamber counting, blood smear counting, acclimatation.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O hemograma.....	3
2.2 Hemostasia.....	3
2.2.1 Plaquetas.....	4
2.3 Pseudotrombocitopenia em gatos.....	7
2.3.1 Agregação plaquetária <i>in vitro</i>	8
2.3.2 Os anticoagulantes e a Pseudotrombocitopenia.....	8
2.4 Contagem de plaquetas.....	10
2.4.1 Contagem automática.....	10
2.4.2 Contagens manuais.....	11
2.5 A coleta sanguínea em felinos.....	12
2.5.1 Veia Jugular.....	13
2.5.2 Veia safena medial.....	14
2.6 Comportamento felino.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Coletas.....	21
3.2 Ambientação.....	22
3.3 Contagens.....	22
3.3.1 Contagem automática.....	22
3.3.2 Confeção do esfregaço sanguíneo.....	23
3.3.3 Classificação das agregações plaquetárias.....	24
3.3.4 Contagens manuais.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Ambientação <i>versus</i> não-ambientação.....	27
4.2 Citrato <i>versus</i> EDTA.....	29
4.3 Contagem automática (PockpH-100iV Diff®) <i>versus</i> manual em câmara de Neubauer <i>versus</i> manual em lâmina.....	31
4 CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXOS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O hemograma é o exame laboratorial mais requisitado na rotina clínica veterinária e todo médico veterinário está apto a realizá-lo. É um exame prático, econômico e muito útil como ferramenta no auxílio diagnóstico; como acompanhamento da eficácia de um protocolo terapêutico; como fonte de informações para determinar o prognóstico do paciente, além de outras utilidades (LOPES *et al.*, 2009).

O eritrograma é a parte do hemograma que consiste na contagem total de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e hematócrito; o leucograma é a parte composta pela contagem global e diferencial das células da linhagem branca do sangue e o plaquetograma, onde é realizada a contagem das plaquetas e a observação da sua morfologia, importantes parâmetros para avaliar a hemostasia do paciente (LOPES *et al.*, 2007; WEISER, 2015a).

Para que se possa afirmar com confiança a existência de uma patologia causando determinada alteração no hemograma, é necessário prevenirem-se todas as possíveis alterações causadas por falhas durante a coleta sanguínea, isto porque coletas que geram estresse ao animal provocam a liberação de hormônios, como epinefrina, os quais desencadeiam alterações momentâneas nos parâmetros normais, podendo ser confundidos com doenças, se não levados em consideração (FAM *et al.*, 2010; WEISER, 2015a).

Um exemplo comum dos efeitos desses hormônios é a observação de aumentos consideráveis no número de hemácias e plaquetas, causado pelo deslocamento sanguíneo esplênico, visto que o baço funciona como um reservatório de plaquetas e hemácias. Quando submetido à ação da epinefrina, o baço contrai-se, liberando essa reserva celular na circulação sanguínea. Essa reação de fuga ou luta, também altera consideravelmente os valores dos leucócitos (FAM *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2007; WEISER, 2015a; WEISER, 2015b).

O estresse agudo e o traumatismo, gerado pelas coletas sanguíneas também pode causar pseudotrombocitopenia, *in vivo* e *in vitro*, um fenômeno onde a ativação das plaquetas leva à formação de agregados e consequentes falhas nas suas contagens, levando a erros na interpretação desses exames. Nos gatos esse fenômeno pode ocorrer rapidamente, por ser uma espécie mais difícil de ser

manipulada, além de possuir fisiologicamente macroplaquetas, que podem ser contadas como hemácias pelos contadores automáticos (BAKER, 2015; SANTOS, 2008; WEISER, 2015a; WILLS, 2008).

Com o aumento da população de felinos domésticos domiciliados começou-se a exigir uma melhor compreensão das particularidades dessa espécie, por parte dos médicos veterinários, para se reduzir a dificuldade de manejo desses animais durante as consultas e procedimentos, visando a segurança do paciente, do profissional envolvido e garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos a partir desses procedimentos (FAM *et al.*, 2010; RODAN, 2010; VOLPATO, 2013).

Um manejo que não respeite as peculiaridades dos felinos está susceptível a gerar alterações importantes no perfil hematológico do paciente, levando a interpretações incorretas dos resultados e, conseqüentemente, prejudicando todo o protocolo clínico adotado posteriormente pelo médico veterinário (LOPES *et al.*, 2007; WEISER, 2015a).

Dessa forma, esta pesquisa tenciona responder à questão/problemática: como proceder corretamente para que o resultado das contagens numéricas das plaquetas dos felinos seja o mais confiável possível?

Esta pesquisa pretende testar todas as variáveis acima apresentadas através da investigação das seguintes hipóteses: a ambientação pré-coleta sanguínea pode interferir na incidência de agregação plaquetária em amostras de felinos domésticos? O tipo de anticoagulante usado interfere na formação de agregados plaquetários *in vitro*? Há diferença nos resultados das contagens automática, em lâmina e em câmara de Neubauer?

Levando-se em consideração todas as características apresentadas, além de alterações causadas por possíveis falhas técnicas durante as etapas do procedimento, algumas soluções foram sugeridas: como realizar a ambientação prévia dos animais submetidos à coleta sanguínea; testar qual o tipo de anticoagulante (citrato de sódio 3,2% ou EDTA) melhor conserva a amostra para a realização das contagens das plaquetas; comparar os resultados obtidos pelo contador automático usado na rotina laboratorial com os resultados das contagens manuais em câmara de Neubauer e esfregaço sanguíneo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sangue é um tecido orgânico constituído por uma porção celular, composta por eritrócitos, leucócitos e plaquetas e uma porção líquida, denominada plasma, composta por proteínas como albumina, imunoglobulinas e fibrinogênio e solutos não proteicos como hormônios, gorduras, enzimas, vitaminas, gases, eletrólitos, glicose, e produtos residuais. Quando coletado sem anticoagulante, o fibrinogênio presente no plasma é consumido e este passa a ser denominado soro sanguíneo (LOPES *et al.*, 2008; VIVAS, 2014).

Juntamente com as veias, artérias, capilares e o coração, o sangue constitui o sistema cardiovascular e é responsável por funções como: transporte de oxigênio, hormônios, nutrientes, substâncias químicas, água e resíduos metabólicos para excreção, além de contribuir para a distribuição da temperatura para os tecidos. Dependendo da espécie, corresponde de 7 a 10% do peso corporal do animal (LOPES *et al.*, 2007; LOPES; CUNHA, 2002; NETO, 2014).

2.1 O hemograma

O hemograma é o exame laboratorial mais solicitado na rotina da clínica veterinária, auxiliando na avaliação do estado de saúde do paciente, no diagnóstico e no prognóstico de doenças. Divide-se em **eritrograma**, que fornece informações sobre a série vermelha da porção celular do sangue como a hematimetria, a dosagem de hemoglobina e o hematócrito; **leucograma**, que fornece informações sobre a série branca: leucometria global e contagem diferencial dos leucócitos e **plaquetograma**, referente à avaliação numérica e morfológica das plaquetas (LOPES *et al.*, 2008; LOPES; CUNHA, 2002; THRALL, 2007; VIVAS, 2014).

2.2 Hemostasia

A hemostasia é o processo responsável por manter o sangue fluido e dentro dos vasos sanguíneos e suas disfunções podem variar desde hemorragias à formação de trombos intravasculares (BOUDREAUX, 2010; LOPES; CUNHA, 2002; SANTOS, 2008; SMITH, 2010; THOMAS, 2010; THRALL, 2007; VIVAS, 2014).

Esse processo é composto por três eventos, que ocorrem de forma praticamente simultânea e que têm início imediatamente após lesão e exposição do endotélio vascular: a **hemostasia primária**, em que ocorre vasoconstrição local conjunta à adesão e agregação plaquetária, resultando na formação de um tampão plaquetário inicial; a **hemostasia secundária**, compreendida pela formação da rede de fibrina a partir da conversão do fibrinogênio presente no plasma sanguíneo, mediada pela reação em cascata dos vários fatores de coagulação atuantes nesse processo; e a **hemostasia terciária**, que corresponde à degradação da fibrina e do coágulo formados pelos dois eventos anteriores (LOPES *et al.*, 2007; LOPES; CUNHA, 2002; SMITH, 2010; THOMAS, 2010; WEISER, 2015a; VIVAS, 2014).

2.2.1 Plaquetas

As plaquetas, ou trombócitos, são produzidas na medula óssea e nos pulmões pela fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. Cada megacariócito pode gerar cerca de 10.000 plaquetas, por meio da ação de dois hormônios, a trombopoietina e a eritropoietina, liberados pelos rins e fígado em um processo denominado trombopoiese (BAKER, 2015; BOUDREAUX, 2010; LOPES *et al.*, 2007; LOPES; CUNHA, 2002; RUSSELL, 2010). Contudo, estudos recentes em ratos relataram que os pulmões apresentam uma participação maior do que o que se conhecia na produção plaquetária, podendo contribuir em até 50% da produção total das plaquetas, ou produzir o equivalente a 10 milhões de plaquetas por hora (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017).

As plaquetas têm formato plano, discóide, seu tamanho varia entre as espécies e são fundamentais para o sucesso da hemostasia (BAKER, 2015; BOUDREAUX, 2010; LOPES; CUNHA, 2002; SANTOS, 2008).

Após o estímulo para a sua produção, as plaquetas são liberadas na corrente sanguínea em três a cinco dias e possuem vida média de aproximadamente oito dias, período no qual são removidas da circulação por macrófagos no baço e fígado. Aproximadamente um terço das plaquetas circulantes é sequestrado pelo baço (BAKER, 2015; BOUDREAUX, 2010; SANTOS, 2008).

Os valores de referência variam entre as espécies domésticas, de 100.000 a 800.000 plaquetas/ μ L. Os menores valores são associados aos equinos e os maiores aos bovinos. Os gatos possuem de 200.000 a 500.000 plaquetas/ μ L

(BAKER, 2015; SANTOS, 2008). Valores abaixo de 100.000 plaquetas/ μ L indicam claramente uma trombocitopenia, porém contagens de até 50.000 plaquetas/ μ L são o suficiente para prevenir hemorragia. Um valor de 30.000 plaquetas/ μ L ou menos pode ocasionar sangramento espontâneo (LOPES *et al.*, 2007).

Apesar de aparentemente simples, as plaquetas apresentam uma estrutura bastante complexa (Figura 1A), compreendida por quatro zonas: **zona periférica**, constituída pela membrana plasmática e pelo sistema canalicular aberto (responsáveis por vários eventos intra e extracelulares, como adesão, ativação e agregação); **zona sol-gel**, formada pelo citoesqueleto, responsável por mudanças morfológicas, por enviar prolongamentos citoplasmáticos (Figura 1B) e pela captação e expulsão de grânulos secretores; **zona das organelas**, composta por numerosos grânulos contendo várias substâncias, entre elas as proteínas, receptores membranares e outras moléculas (serotonina, íons de cálcio, adenosina difosfato, adenosina trifosfato, fatores da coagulação, inibidor do ativador plasminogênio) que participam dos processos metabólicos e funcionais da plaqueta, e **sistema membranar**, composto pelo sistema membranar denso, onde há concentração de cálcio necessário para desencadear os eventos contráteis e dos sistemas enzimáticos utilizados para a síntese de prostaglandinas (BOUDREAU, 2010; CASTRO *et al.*, 2006; FERREIRA, 2013).

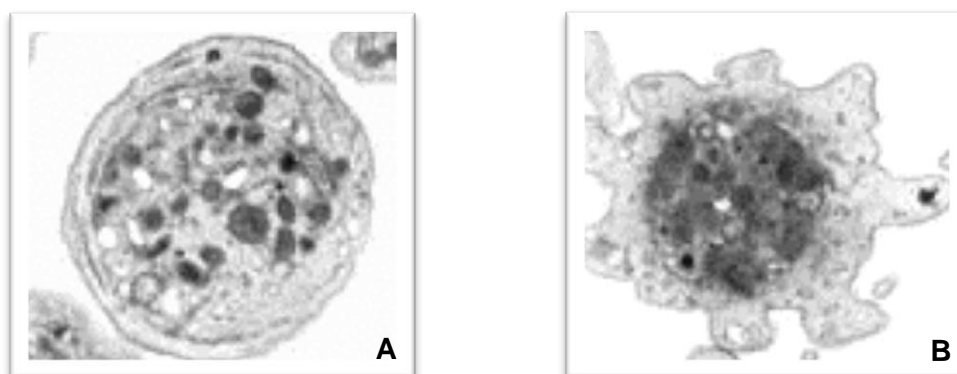


Figura 1A – Fotomicrografia eletrônica de plaqueta em repouso (x10.000). **B** - Fotomicrografia eletrônica de plaqueta ativada. Notar a emissão de pseudópodes e a centralização das organelas (x10.000).

Na Figura 1A, observa-se uma plaqueta em seu estado de repouso, seu tamanho é reduzido, e as organelas encontram-se dispersas em seu interior. Na Figura 1B pode-se ver uma plaqueta em seu estado ativado, evidenciando a emissão de pseudópodes e a centralização das organelas em seu interior.

Para sua efetiva participação na hemostasia, as plaquetas precisam passar por três processos: a **adesão**, onde ocorre a aderência das células diretamente no local da lesão, causada pela resposta de seus receptores de superfície ao colágeno endotelial, à laminina e à fibronectina, mediada pela presença de uma glicoproteína plasmática denominada fator de von Willebrand (as plaquetas também tendem a se aderir *in vitro* em superfícies de vidro); a **liberação** caracterizada pela vasoconstrição local e agregação plaquetária e por fim, a **agregação plaquetária** propriamente dita, que compreende a ligação entre as plaquetas circulantes no local da lesão para a formação do tampão hemostático primário (BAKER, 2015; BOUDREAUX, 2010; LOPES *et al.*, 2007).

A ativação das plaquetas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, caracteriza-se por mudanças na expressão dos receptores de superfície (GPIb/IX – receptor de ibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa e receptor de fator von Willebrand), concentrações de cálcio, formato celular, promovendo, além de outras mudanças, a reorganização do citoesqueleto, alterando a forma discóide e desenvolvendo pseudópodes. Além disso, as suas organelas centralizam-se (ANHADI, 2003; SCHMITZ, 1998; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 1998).

Exames laboratoriais podem ser realizados para avaliar a função plaquetária e a quantidade de plaquetas circulantes, além da função dos fatores de coagulação que atuam diretamente na função das plaquetas, e são parte da rotina clínica laboratorial veterinária (BAKER, 2015). No entanto, alguns cuidados devem ser tomados para a interpretação dos resultados, como informações sobre a coleta e a interpretação conjunta com o histórico clínico do paciente (LOPES; CUNHA, 2002).

A agregação plaquetária é um fenômeno importante, principalmente para a interpretação das contagens plaquetárias dos felinos, visto que nesta espécie a ativação e agregação dão-se de forma mais rápida e intensa, gerando contagens, tanto no contador automático quanto nos métodos manuais, aquém dos valores reais (pseudotrombocitopenia), induzindo interpretações e diagnósticos incorretos dos exames laboratoriais (BOUDREAUX, 2010; NORMAN *et al.*, 2001a; NORMAN *et al.*, 2001b; RIZZI *et al.*, 2010; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 2008).

2.3 Pseudotrombocitopenia em gatos

Pseudotrombocitopenia é um fenômeno *in vitro*, resultante de coletas sanguíneas difíceis, em que as contagens de plaquetas são subestimadas, principalmente pelos contadores automáticos, e ocorrem por vários motivos, entre eles: a presença de megaplaquetas, o satelitismo plaquetário e a agregação plaquetária (KOHN, 2006; RUSSEL, 2010; THOMAS, 2010).

Nos felinos há que se considerar a pseudotrombocitopenia como causa das baixas contagens de plaquetas, porque nesta espécie não é comum se deparar com trombocitopenia verdadeira (KOHN, 2006; NORMAN *et al.*, 2001b).

Um estudo realizado no Hospital Veterinário da Universidade da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, constatou que apenas 1,2% dos 3300 gatos atendidos entre os anos de 1985 a 1990 tiveram trombocitopenia verdadeira, principalmente ocasionada por doenças virais (JORDAN, 1993). Outro estudo, realizado na Universidade de Glasgow, na Escócia, relatou que 71% (256/359) das contagens de plaquetas em amostras sanguíneas de gatos, realizadas em contadores automáticos de impedância, indicaram trombocitopenia ($<200 \times 10^9$ plaquetas/L). Quando comparadas com as contagens manuais em esfregaço sanguíneo, realizadas nas mesmas amostras sanguíneas submetidas às contagens automáticas, os números revelaram que apenas 3,1% (11/359) tiveram resultados inferiores a 200×10^9 plaquetas/L (NORMAN *et al.*, 2001).

Dessa forma, faz-se necessário minimizar a ocorrência de pseudotrombocitopenia (TASKER *et al.*, 1999; TASKER *et al.*, 2001; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 2008).

A elaboração de um esfregaço sanguíneo de qualidade, para visualização em microscopia ótica convencional, e a interpretação deste por parte de um profissional capacitado, mostraram-se alternativas aplicáveis à rotina laboratorial, dada a sua importância e a facilidade em sua confecção, já que além da visualização do número de células também é possível observar-se a sua morfologia, identificando-se assim as megaplaquetas (Figura 2) e os agregados plaquetários, ambos causas da pseudotrombocitopenia (LOPES *et al.*, 2007; NORMAN *et al.*, 2001a; NORMAN *et al.*, 2001b; RIZZI *et al.*, 2010; THOMAS, 2010; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 2008).

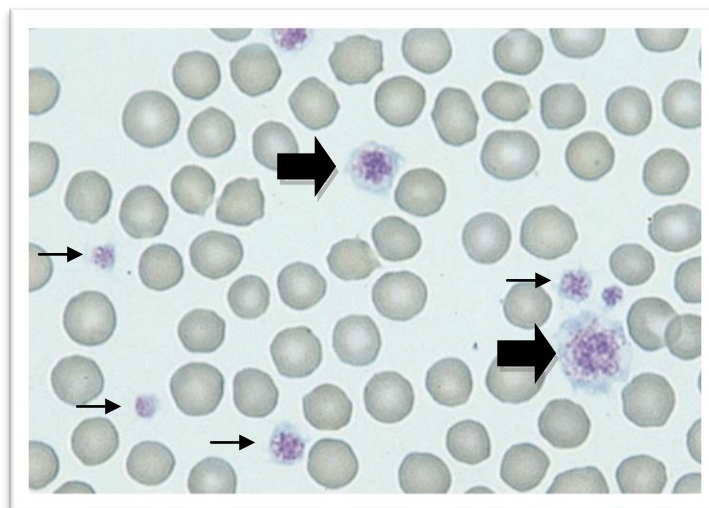


Figura 2 – Fotomicrografia óptica de megaplaquetas (seta maior) e plaquetas de tamanho normal (seta menor) em objetiva de 100x. Fonte: RIZZI, T. E. *et al.* Normal Hematology of the Cat In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology** 6 ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 561-568., modificado.

2.3.1 Agregação plaquetária *in vitro*

Para se garantir a confiabilidade do resultado do hemograma, evitando a agregação das plaquetas *in vitro*, deve-se coletar o material por meio de uma venopunção atraumática utilizando-se anticoagulante na proporção correta para o volume de amostra obtido. Deve-se também escolher os materiais compatíveis com o tamanho do vaso escolhido, puncionar a veia com o bisel da agulha ou do *scalp* voltado para cima, respeitando-se o ângulo de 30° (ângulo oblíquo) em relação à superfície da pele, pois do contrário poderá haver a ativação das plaquetas e elas se agregarão (BAKER, 2015; LOPES, 2009; NORMAN *et al.*, 2001a).

A coleta de sangue não traumática é de extrema importância para se evitar a agregação plaquetária *in vitro*, porém, quando se trata de animais de difícil manuseio como os gatos, seja por seu porte ou por seu temperamento, essa condição é dificilmente alcançada (LOPES, 2009; NORMAN *et al.*, 2001b).

2.3.2 Os anticoagulantes e a Pseudotrombocitopenia

Há que se conhecerem os anticoagulantes disponíveis no mercado e o melhor emprego de cada um deles, além dos cuidados com a amostra após a coleta, como: transferência do material coletado para o tubo de transporte, homogeneização correta do sangue, temperatura de acondicionamento e tempo entre a coleta e o

processamento da amostra (BOUDREAU, 2010; LOPES, 2009; LOPES *et al.*, 2008).

A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (2005) recomenda, em seu guia para Coleta de Sangue Venoso, que amostras acondicionadas em tubos com o anticoagulante citrato de sódio, não devem ser homogeneizadas vigorosamente, a fim de se evitar a ativação plaquetária e a formação de agregados. Recomenda também que a homogeneização do tubo seja feita por inversão.

A escolha do tipo de anticoagulante usado para a avaliação das plaquetas é tão importante que vários estudos dedicaram-se à comparação dos mesmos, a fim de determinar qual é o mais eficiente na conservação de amostras para essa finalidade (DUSSE *et al.*, 2004; FUCK, 2012; MYLONAKIS *et al.*, 2008; NORMAN *et al.*, 2001a).

Um desses estudos, realizado com 70 cães, sugeriu que o anticoagulante citrato de sódio é menos eficaz na prevenção da formação de agregados plaquetário quando comparado com etilenodiaminotetracético (EDTA), e que após 24 horas essas alterações são menos frequentes quando as amostras são mantidas à temperatura ambiente, ao invés de submetidas à refrigeração (4° C) (MYLONAKIS *et al.*, 2008).

Em contrapartida, outro estudo, comparando o citrato de sódio com o EDTA, realizado com gatos, sugeriu que as contagens realizadas nas amostras acondicionadas com citrato foram elevadas, tanto na técnica manual quanto na automática, além de ter formado menos agregados plaquetários quando comparado ao EDTA. A pesquisa sugeriu que com o passar do tempo (uma e duas horas após a coleta) o EDTA se mostrava menos eficaz, causando diminuição do número de plaquetas (FUCK, 2012).

Vários trabalhos foram realizados a fim de buscar alternativas para se contornar a problemática da agregação plaquetária em amostras sanguíneas coletadas com EDTA, inclusive homogeneização utilizando-se o aparelho Vortex, porém sem sucesso como alternativa para desfazer as agregações *in vitro* (TVEDTEN; KORCAL, 2001). Demais pesquisadores sugeriram a adição de aminoglicosídeos na amostra sanguínea, gentamicina (FERREIRA, 2013) e

amicacina (ZHOU *et al.*, 2011), com resultados bastante promissores em relação à dissolução dos agregados plaquetários e o aumento nas contagens de plaquetas.

2.4 Contagem de plaquetas

Fisiologicamente, as plaquetas dos gatos têm tamanhos variados, podendo até se assemelharem ao dos eritrócitos. Por este motivo, os contadores automáticos de impedância, bastante usados na rotina clínica laboratorial veterinária, acabam por confundir ambas as células, e as megaplaquetas, como são chamadas, passam a ser contadas como se fossem eritrócitos, gerando um resultado numérico das plaquetas abaixo dos valores reais, e aumentando os valores das contagens de células vermelhas (BOUDREAUX, 2010; KOHN, 2006; NORMAN *et al.*, 2001b; RUSSEL, 2010; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 2008).

A contagem de plaquetas pode ser realizada por vários métodos, desde métodos manuais até contagens automáticas feitas por aparelhos de citometria de fluxo. Para garantir a confiabilidade do procedimento há que se conhecerem as particularidades dessas células, como a sua tendência à adesão em superfícies de vidro, por exemplo, para evitar ao máximo a sua interferência sobre a amostra, tornando o resultado o mais próximo possível da realidade do paciente (BOUDREAUX, 2010; LOPES *et al.*, 2007; ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 2008).

2.4.1 Contagem automática

Os contadores hematológicos automáticos por impedância e contadores a *laser* são os modelos de contadores automáticos mais utilizados na rotina clínica laboratorial veterinária (WEISER, 2015a).

Os contadores por impedância fazem a diluição da amostra sanguínea em um condutor elétrico que conduz as células por uma pequena abertura entre dois eletrodos (positivo e negativo). À medida que a célula passa pela abertura vai gerando mudanças na corrente elétrica do aparelho. Para manter essa corrente elétrica constante, o aparelho gera um impulso elétrico proporcionalmente ao tamanho da célula que está passando no orifício, desta forma, de acordo com a quantidade de impulsos elétricos gerados o aparelho vai contando as células, e de

acordo com a amplitude elétrica do impulso gerado, o aparelho vai diferenciando as células por tamanhos (FERREIRA, 2013; WEISER, 2015a).

Os contadores a *laser* (citometria de fluxo) medem o desvio da luz em dois ângulos e graus à medida que as células passam pelo feixe de *laser*. As propriedades físicas de cada célula fazem com que a dispersão da luz gerada por ela seja característica, permitindo ao aparelho diferenciar as células (FERREIRA, 2013; VIVAS, 2014; WEISER, 2015a).

2.4.2 Contagens manuais

Um método de contagem manual bastante prático e importante de ser realizado na rotina é o método indireto de contagem de plaquetas em esfregaço sanguíneo (ou método de fônio). Dessa forma, não somente é possível estimar-se a quantidade de plaquetas, como também pode ser avaliada a sua morfologia, estado de ativação e a presença de agregados plaquetários (RUSSEL, 2010; VIVAS, 2014; WEISER, 2015a).

É um método relativamente fácil de ser aplicado, dependendo apenas da confecção de um esfregaço sanguíneo de qualidade e de um profissional capacitado para realizar a sua leitura. O esfregaço deve ser confeccionado o quanto antes, logo após a coleta (no máximo até duas horas pós-coleta é o necessário para conservar uma boa morfologia celular), e deve ser feito para todas as amostras que forem encaminhadas ao laboratório (RUSSEL, 2010; VIVAS, 2014; WEISER, 2015a).

Outro método de contagem manual de plaquetas faz-se usando a câmara de Neubauer, ou hemocitômetro. Várias soluções de diluição da amostra estão disponíveis para este fim, como a solução de Rees-Ecker, solução de Brecher e Cronkite, solução de Feissly, sendo que o método de contagem de Brecher e Cronkite foi estabelecido pelo Conselho Internacional de Padronização em Hematologia, da Sociedade Internacional de Hematologia Laboratorial (ISLH) como método “padrão ouro” para a contagem de plaquetas (OLIVEIRA *et al.*, 2002; TASKER *et al.*, 2011). Contudo, é um método que exige experiência por parte do profissional, para poder realizar uma contagem de confiança, além de dispender muito tempo para sua realização, fato que atrapalha sua aplicabilidade na rotina laboratorial. É necessário ter experiência para distinguir as plaquetas de sujidade e

bactérias (HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2003; OLSEN *et al.*, 2004; TASKER *et al.*, 2001; VIVAS, 2014).

2.5 A coleta sanguínea em felinos

Os gatos tendem a cooperar com as coletas sanguíneas mais do que se imagina, desde que estejam em uma posição confortável e com algum senso de controle, do que quando são forçados a se posicionar contra a sua vontade (SUNDAHL *et al.*, 2015).

A escolha do local de coleta sanguínea é de grande importância para o sucesso do procedimento e a viabilidade da amostra. Vários sítios de coleta estão à disposição do médico veterinário, que deve considerar na sua escolha não apenas o temperamento do gato, mas o volume sanguíneo a ser coletado, o material utilizado no procedimento, o calibre do vaso em relação ao material disponível para coleta, o conforto para o paciente e a segurança de todos os envolvidos no procedimento. Os locais mais indicados para os felinos (Figura 3) são a veia jugular, a veia cefálica e as veias safenas lateral e medial (KIRK; BISTNER, 1987; LOPES, 2009; LOPES; CUNHA, 2002; SUNDAHL *et al.*, 2016; SANTOS, 2008; SOCIEDADE, 2005).

A coleta pode ser realizada com seringa e agulha, *scalp* ou sistemas de coleta a vácuo. O sítio de coleta deve ser escolhido, imobilizado e a pele deve ser distendida para evitar movimentação do vaso sanguíneo. Indica-se também tricotomia da região, quando necessário, e antissepsia com álcool isopropílico ou etílico a 70%. Após secagem da solução antisséptica, deve-se fazer o garrote para melhor visualização da veia e realizar a coleta com o material adequado (KIRK; BISTNER, 1987; LOPES, 2009; SANTOS, 2008; SOCIEDADE, 2005).

Vários métodos de contenção podem ser utilizados para garantir o sucesso da coleta de sangue em gatos, pode-se posicionar o animal em decúbito lateral, esternal ou em estação, além do uso de toalhas, sacolas ou fitas, bandagens ou focinheira para a proteção das pessoas envolvidas no procedimento (KIRK; BISTNER, 1987; LOPES, 2009; SUNDAHL *et al.*, 2016). Alguns gatos podem sentir-se mais confortáveis usando tipos de focinheiras mais firmes, ao invés dos modelos de tecido. Qualquer acessório que diminua a percepção visual ou auditiva pode auxiliar no momento da realização de procedimentos (SUNDAHL *et al.*, 2015).

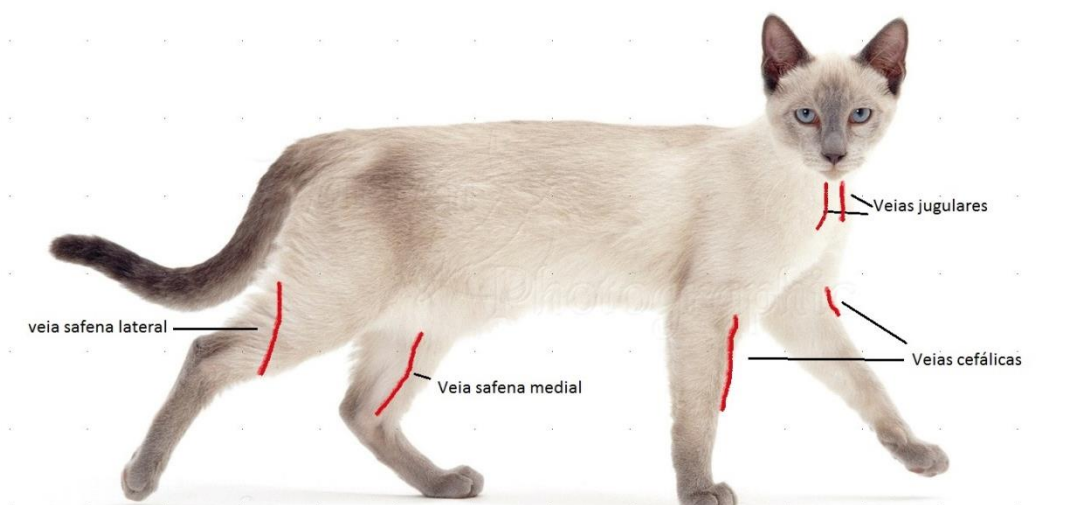


Figura 3 - Veias de coleta sanguínea em gatos. Fonte: <<http://www.warrenphotographic.co.uk/31659-blue-point-siamese-cross-cat-walking-across>>, modificado.

2.5.1 Veia Jugular

A veia jugular é um local de punção bastante utilizado na rotina clínica veterinária, por se tratar de um vaso calibroso, ideal para coleta de maiores volumes de sangue em menor tempo, além de ser uma ótima opção para filhotes, porque os outros vasos de coleta ainda encontram-se pouco desenvolvidos e de difícil acesso (KIRK; BISTNER, 1987; LOPES, 2009; LOPES; CUNHA, 2002; SUNDAHL *et al.*, 2016).

Para se fazer a coleta de sangue na veia jugular, deve-se conter o animal na posição em que ele se sentir mais confortável, seja em decúbito lateral (Figura 4), esternal ou em estação (Figura 5). A contenção da cabeça deve ser feita levantando-se (ângulo de 30°) e rotacionando-se ligeiramente para o lado oposto ao da coleta, a fim de permitir uma melhor visualização do vaso sanguíneo. Se necessário, deve-se fazer a tricotomia do local, e se o animal não for cooperativo, podem-se empregar sacolas ou toalhas, envolvendo-o pelo tecido, facilitando a sua contenção e aumentando a segurança dos profissionais (LOPES, 2009; TAYLOR, 2011; SUNDAHL *et al.*, 2016).

Faz-se o garrote da veia jugular no sulco jugular, próximo à entrada do tórax e então introduz-se a agulha, com o bisel voltado para cima, e traciona-se o êmbulo da seringa. Caso seja necessário, os membros torácicos podem ser contidos gentilmente, colocando-se um dedo entre eles a fim de evitar desconforto para o animal (LOPES, 2009; SUNDAHL *et al.*, 2016; TAYLOR, 2011). Alguns profissionais

bem treinados são capazes de coletar sangue da veia jugular, contendo o animal sozinhos (SUNDAHL *et al.*, 2016).



Figura 4 - Punção da veia jugular em um gato contido em decúbito lateral. Fonte: LOPES, R. D. **Manual para coleta de sangue venoso em caninos e felinos**, São Paulo, 71 f. 2009

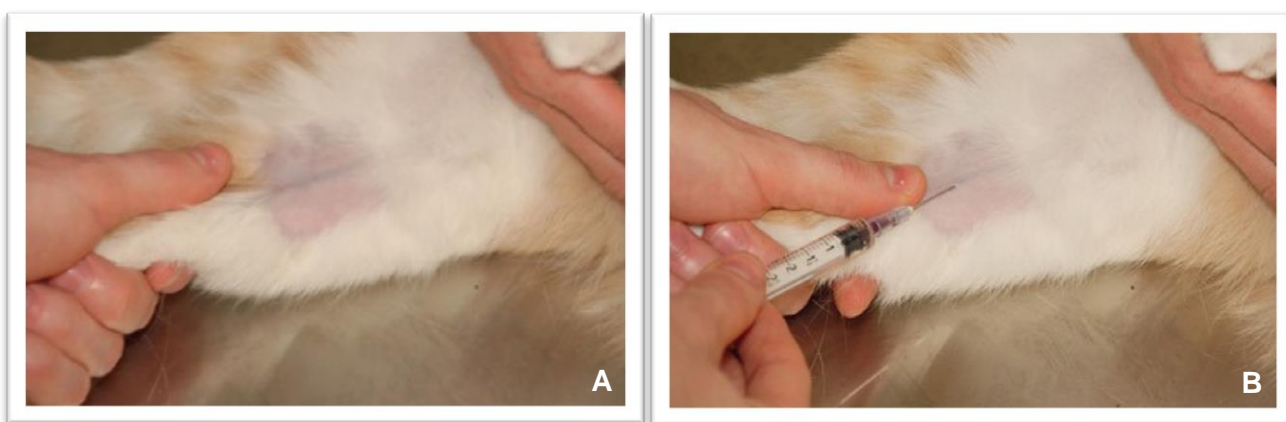


Figura 5 - Punção da veia jugular em um gato contido em decúbito lateral. Fonte: LOPES, R. D. **Manual para coleta de sangue venoso em caninos e felinos**, São Paulo, 71 f. 2009

2.5.2 Veia safena medial

Para alguns animais, quando a quantidade de sangue a ser coletado for pequena, pode-se considerar a veia safena medial como local de coleta, pois por se localizar na região posterior e a área a ser manipulada estar fora do foco de visão do animal, este sente-se menos ameaçado e preocupa-se menos com a coleta, tendendo a ser mais cooperativo (SUNDAHL *et al.*, 2016; TAYLOR, 2011).

Para se coletar sangue da veia safena medial, o coletor deve segurar o membro da veia escolhida, e estendê-lo, enquanto um auxiliar contém o animal, segurando o membro pélvico contralateral e aplicando pressão na região inguinal, fazendo com que a veia se distenda permitindo assim a sua palpação e visualização por parte do coletor (Figura 6A e B). Após a visualização da veia, o coletor deve posicionar o dedo polegar lateralmente à veia, para limitar a sua movimentação durante a coleta, e inserir a agulha com o bisel voltado para cima, fazendo uma pequena sucção com a seringa, para evitar colapamento do vaso, por seu calibre ser pequeno (SUNDAHL, 2016; TAYLOR, 2011).



Figuras 6A e B - Contenção do membro pélvico para coleta da amostra sanguínea. Foi realizada tricotomia da área para melhor visualização do vaso. Coleta do sangue, com seringa e agulha, fazendo-se leve sucção na seringa para evitar colapamento do vaso sanguíneo. Fonte: TAYLOR, S. M.. Coleta de Sangue Venoso. In: TAYLOR, S. M. Semiotécnica de pequenos animais. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 1-13.

Algumas técnicas, como a “técnica de encaixe” (Figura 7), por exemplo, permitem que o animal fique encaixado no braço do auxiliar de forma confortável, cooperando com a coleta. Outros animais sentem-se mais seguros quando enrolados por uma toalha ou sacola, e cabe ao profissional identificar qual contenção favorece o relaxamento do animal de forma individualizada (SUNDAHL *et al.*, 2016).



Figura 7: A “Técnica de encaixe” facilita a punção venosa da veia safena medial. Fonte: SUNDAHL, E.; RODAN, I.; HEATH, S. Providing Feline-Friendly Consultations. In: RODAN, I.; HEATH, S. **Feline Behavioral Health and Welfare**. 1 ed. St Louis: Elsevier. 2015. p 269-286.

2.6 Comportamento felino

Para se ter sucesso em qualquer procedimento que inclua a manipulação de gatos, o médico veterinário tem o dever de conhecer as particularidades da espécie, principalmente no que diz respeito ao seu comportamento natural porque, ao contrário do que muitos dizem, os gatos não são cães pequenos, eles têm suas necessidades comportamentais e sociais específicas, que devem ser respeitadas para garantir uma boa qualidade de vida, minimizando comportamentos agressivos e aumentando interações amigáveis. Inclusive, a compreensão dos comportamentos naturais dos gatos é uma fonte de informação imprescindível para o médico veterinário na identificação de problemas, tanto físicos quanto emocionais, visto que este é um dos animais que melhor camufla os sinais de doença e de dor (CROWELL-DAVIS *et al.*, 2004; RODAN, 2010).

O gato doméstico (*Felis catus*) é uma espécie social, porém com uma dinâmica de grupo bastante complexa, pois tem a capacidade de sobrevivência em estado solitário, mas pode formar grupos sociais ocasionalmente, quando houver necessidade e quando as condições do ambiente permitirem. Essa característica de ser social permitiu aos gatos terem alguns benefícios, na maioria das vezes, quando iniciaram a sua interação com o ser humano, principalmente no último século. A interação gato-homem é datada de 10.000 anos atrás, e passa desde o seu endeusamento pelos egípcios, sua demonização na idade média até chegar à idade moderna, sendo um dos animais de estimação mais populares do mundo e o *pet*

preferido nos Estados Unidos e Europa. Nos EUA o número de gatos já ultrapassa o número de cães, aproximadamente 70 milhões de cães e 74,1 milhões de gatos (AVMA, 2012; CROWELL-DAVIS *et al.*, 2004; RODAN, 2010; TAYLOR *et al.*, 2006).

A clínica felina torna-se ainda mais desafiadora pelo pouco contato que os gatos têm com os consultórios, visto que ainda não há uma rotina, por parte dos tutores, em realizar consultas preventivas (administração de antiparasitários, aplicação de vacinas), pois para estes o gato seria uma espécie “autossuficiente” e conveniente de se ter como *pet*, não necessitando de tantos cuidados preventivos quanto os cães. Essa falha na dessensibilização do animal em relação ao ambiente ambulatorial implica em altos níveis de estresse gerados pela visita ao veterinário impossibilitando, por vezes, a realização de procedimentos simples, e interferindo diretamente na solução do caso clínico (LUE, 2008; RODAN, 2010).

Para melhor atender às necessidades dos pacientes felinos o Escritório de Consultoria Felina (Feline Advisory Bureau) um órgão de caridade dedicado a melhorar a saúde e bem estar dos felinos, realizou em 2006, no Reino Unido, uma campanha intitulada “Clínica Amiga do Gato”. Nessa campanha foram produzidos dois folhetos com o objetivo de melhorar a compreensão sobre as necessidades dos gatos nas consultas clínicas, assim como mudanças estruturais nos consultórios, a fim de torná-los mais “amigos dos gatos”. Em paralelo, foi criada uma competição, da qual as clínicas foram convidadas a participar, concorrendo ao prêmio de “Clínica amiga do gato”. Em dois anos, mais de 50 prêmios foram distribuídos, e mais de 2000 clínicas tiveram acesso ao material de divulgação. Esse conceito de prática “amiga do gato” espalhou-se pelo mundo, foi melhorado e padronizado em 2012, e muitas clínicas atualmente já adequam-se a esse tipo de atendimento especializado (SPARKES, 2013).

Ainda segundo Sparkes (2013), alguns pontos são importantes na “construção” de uma clínica adaptada ao atendimento de gatos, no que diz respeito à área de abordagem ao tutor, à atitude dos funcionários, aos equipamentos, à estrutura, evidenciando ao tutor o quanto a clínica está compromissada com o bem estar do seu gato, e o quanto compreende todas as suas necessidades. Alguns desses pontos estão descritos abaixo:

- Todos os funcionários da clínica devem compreender sobre o comportamento básico dos felinos e como minimizar o seu estresse;

- Os gatos têm que ser manipulados com carinho, gentileza e respeito o tempo todo;
- Consultas felinas de, no mínimo, dez minutos;
- Exames clínicos devem ser adaptados às necessidades do gato e interrompidos ou adiados caso ele se estresse;
- Escolher um funcionário para ser “advogado” dos gatos, responsável por garantir que os padrões sejam respeitados e constantemente melhorados;
- A clínica deve ter instalações e equipamentos apropriados para anestesia e fluidoterapia, etc.

Com a expansão do conceito “Amigo do gato”, várias tecnologias e produtos foram desenvolvidos para a manutenção do bem estar felino, tanto para ser usado nas clínicas quanto no ambiente doméstico. Dentre esses produtos, surgiu a produção de feromônios sintéticos análogos aos liberados pelos felinos, com ação preventiva ou como tratamento para problemas específicos de comportamento. Um desses feromônios sintéticos recebeu o nome de Feliway® (Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia-SP) e é produzido a partir da fração F3 do feromônio facial felino (cinco feromônios faciais, denominados de F1 a F5, são conhecidos até o momento), feromônio depositado pelos gatos quando fazem marcação ao esfregar as bochechas em objetos e pessoas, e dá-lhes a sensação de conforto (DEPORTER, 2016).

Os feromônios são identificados pelos animais, por um órgão chamado vômeronasal (Figura 8), localizado no palato, para onde o ar contendo os odores é empurrado em um movimento característico chamado de reflexo de Flehmen (Figura 9), ativando receptores nervosos que transmitem esses sinais, na forma de impulsos elétricos, que são direcionados para o cérebro, no sistema límbico (lobo límbico), responsável pelas emoções e comportamento do animal (DEPORTER, 2016).

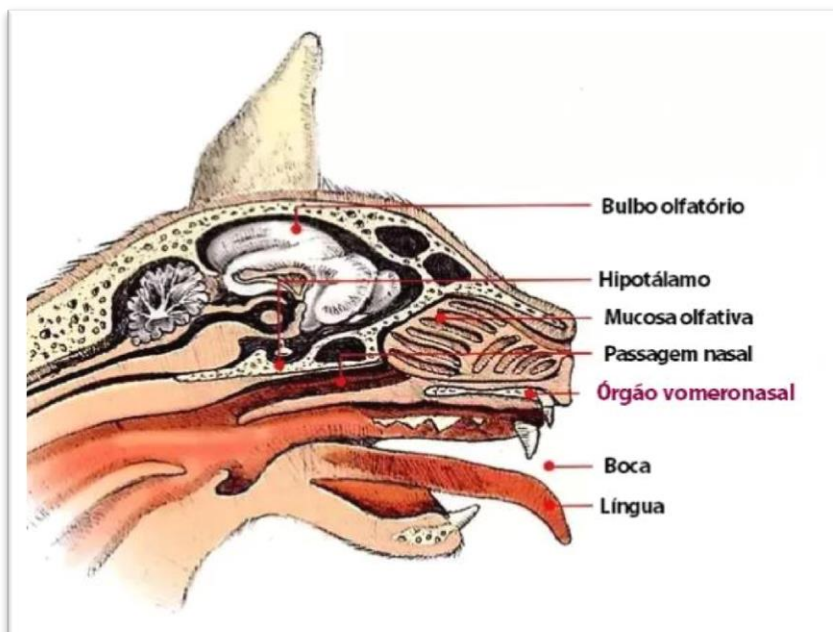


Figura 8: Localização do órgão vômeronasal em felinos. Fonte: <<https://www.peritoanimal.com.br/porque-os-gatos-abrem-a-boca-quando-cheiram-algo-22264.html>>.



Figura 9: Gato expressando o Reflexo de Flehming. Fonte: <<https://www.peritoanimal.com.br/porque-os-gatos-abrem-a-boca-quando-cheiram-algo-22264.html>>.

O Feliway® tem ação comprovada nas seguintes situações: ajuste a uma nova casa (novos gatos); novas experiências (primeiro passeio de carro, etc.); eventos estressantes (fogos de artifício, etc.); mudanças no ambiente do gato; visitas a veterinário, abrigos; viagens e transporte em caixa de transporte; marcação

urinária indevida; marcação territorial por arranhadura; perda de apetite por estresse; mudanças comportamentais por estresse (DEPORTER, 2016).

Alguns estudos já demonstraram a eficácia do Feliway® na forma de Spray como facilitador do manejo dos gatos, reduzindo o estresse durante a consulta veterinária (PEREIRA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi aceito para realização pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) sob o número 030/2017.

3.1 Coletas

Foram coletadas e analisadas amostras sanguíneas de 20 gatos hígdos (a partir de quatro meses e sem preferência de gênero), divididos em dois grupos, cada um composto por 10 animais.

Todos os gatos foram submetidos à coleta de dois ml de sangue da veia jugular, através de *scalp* n.21 acoplado em seringa de três ml. Formou-se um primeiro grupo, composto por 10 animais não-ambientados, denominado “NA”. Foram coletados 2 ml de sangue, onde um ml foi colocado em tubo a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com K3 EDTA (Figura 10) e um ml foi colocado em tubo a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com citrato de sódio a 3,2%, (Figura 10) de forma aleatória. Neste grupo, as coletas foram realizadas logo após a chegada do animal à sala reservada à realização do experimento.



Figura 10 - Tubos a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com citrato de sódio 3,2% (tampa azul) e K3 EDTA (tampa lilás) utilizada para o acondicionamento das amostras sanguíneas de gatos ambientados e não ambientados. Fonte: http://www.instechlabs.com/Infusion/bloodsampling/greiner_minicollect.php, modificado.

Formou-se outro grupo, composto por 10 animais ambientados, denominado de “A”. Dos gatos deste grupo também foram coletados dois ml de sangue, onde metade foi acondicionada em tubo a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com anticoagulante K3 EDTA e a outra metade em tubo a vácuo (MiniCollect™ - Greiner Bio-One™ Brasil - Produtos Médicos Hospitalares Ltda, São Paulo) com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%, também de forma aleatória.

3.2 Ambientação

No grupo “A”, as coletas foram realizadas após a ambientação do animal, por uma hora, dentro de uma sala isenta de barulhos altos e movimentos bruscos. O ar da sala encontrava-se difundido com o feromônio facial felino (Feliway®- Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia-SP), através de difusor elétrico do próprio fabricante.

Os animais foram observados, quanto aos comportamentos demonstrados durante o processo de ambientação e dentre os comportamentos esperados estavam: rolar no chão, esfregar as bochechas em objetos e na equipe do trabalho, aceitar contato físico/carinho, semblante calmo (podendo até dormir durante a ambientação), tamanho das pupilas, reações positivas a estímulos (brincadeiras), reflexo de Flehmen e interesse em explorar o ambiente. Os animais que não apresentaram esses comportamentos foram identificados, a fim de avaliar a eficácia da ambientação.

3.3 Contagens

3.3.1 Contagem automática

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário do CCA/UFPB, onde foram submetidas à contagem automática no Contador Hematológico Automático PockpH-100iV Diff®, seguida da confecção do esfregaço sanguíneo para contagem manual estimada das plaquetas, e por último foi feita a diluição da amostra em solução de Brecher (Anexo 1) para a contagem em câmara de Neubauer (Brecher; Cronkite, 1953).

Aposicionadas no local indicado no aparelho, segundo as orientações do fabricante.

3.3.2 Confeção do esfregaço sanguíneo

A confecção do esfregaço sanguíneo foi realizada através dos seguintes passos (GONZÁLEZ; SILVA, 2008; WEISER, 2015a):

- Homogeneização da amostra por conversão do tubo;
- Colocação de uma microgota de sangue em lâmina de vidro limpa, por pipetamento (Figura 11A);
- Posicionamento da lâmina extensora íntegra à frente da microgota, num ângulo de 45° ou menos, dependendo da viscosidade do sangue (Figura 11A);
- Movimentar a lâmina extensora para trás, espalhando o sangue na sua borda (Figura 11B);
- Fazer um movimento rápido com a lâmina extensora, para frente, espalhando o sangue na lâmina de vidro (Figura 11C);
- Confeção de um esfregaço fino, homogêneo, com comprimento de, aproximadamente, 75% do tamanho da lâmina e com presença de uma cauda sem falhas (Figura 11D).
- Ato contínuo, as lâminas foram coradas com o corante Panótico rápido (Diff-Quick®).

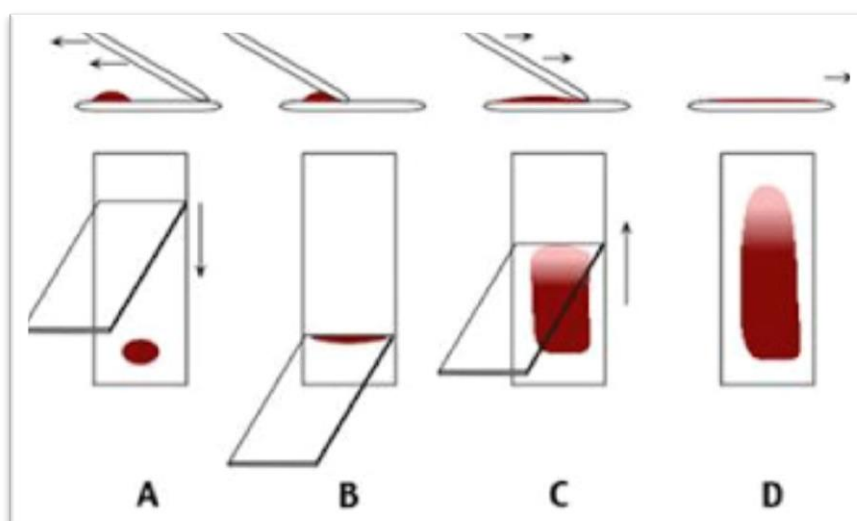


Figura 11A – Colocação de microgota de sangue e posicionamento da lâmina extensora à frente do sangue; **B** – Movimento para trás para adesão do sangue à lâmina extensora; **C** - Movimento para frente para a confecção do esfregaço; **D** – Esfregaço confeccionado, uniforme e com comprimento de aproximadamente 75% do tamanho da lâmina.

3.3.3 Classificação das agregações plaquetárias

Em seguida, as lâminas foram secadas e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 10x e 40x para a visualização da presença de agregados plaquetários na borda e franja do esfregaço (Figura 12).

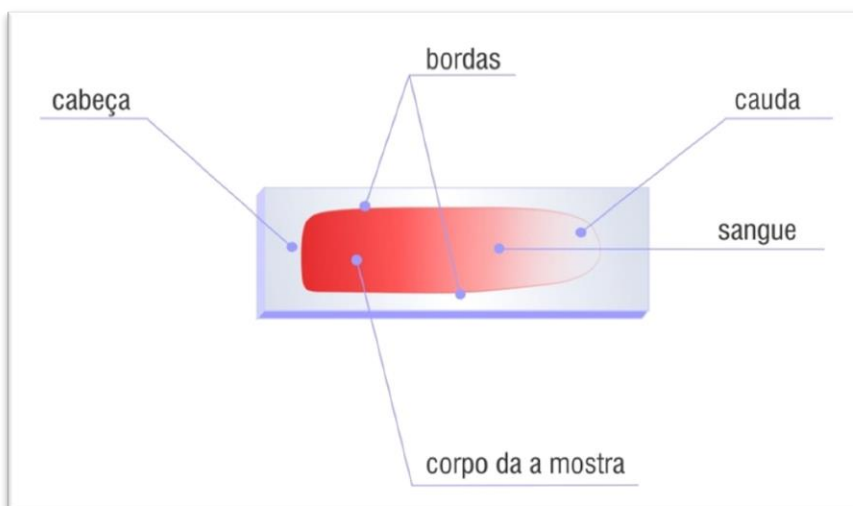


Figura 12 – Partes do esfregaço sanguíneo (cabeça, corpo, borda e cauda/franja). Fonte: <<http://www.biomedicinaemacao.com.br/2015/08/esfregaco-sanguineo-hematologia-dia5.html>>.

A agregação plaquetária foi classificada subjetivamente em: ausente; discreta (pequenos agregados na cauda do esfregaço); moderada (alguns agregados pequenos na borda, e medianos na cauda); intensa (agregados pequenos e médios na borda e grandes na cauda), (Figuras 13 e 14); e amostra coagulada.

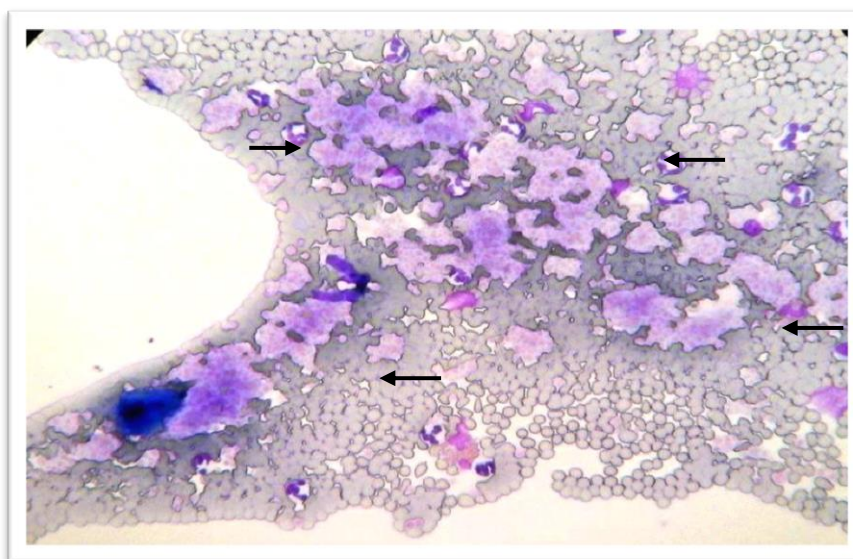


Figura 13 - Agregação intensa (setas) em cauda de esfregaço sanguíneo de gato em amostra com citrato de sódio 3,2% no aumento de 100x. Fonte: Acervo pessoal.

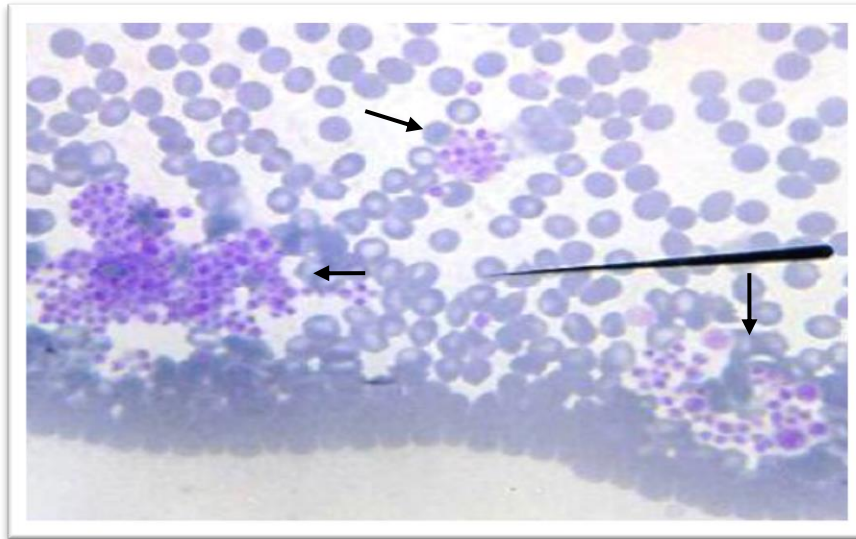


Figura 14 - Agregação intensa (setas) em borda de esfregaço sanguíneo de gato em amostra com citrato de sódio 3,2%, no aumento de 400x. Fonte: Acervo pessoal.

3.3.4 Contagens manuais

Devido ao conhecimento prévio de que a agregação interfere na contagem real das plaquetas do animal, estabeleceu-se que as contagens manuais das amostras com presença de agregação intensa não seriam realizadas, tendo sido contadas apenas pelo método automático, antes da classificação subjetiva qualitativa da agregação plaquetária.

Após a classificação da agregação plaquetária, foi realizada a contagem estimada em esfregaço sanguíneo, fazendo correlação com a hematimetria do animal.

Segundo Pitombeira e Martins (1966) e Hrubec e Smith (1998) com adaptações, foram contadas as hemácias e as plaquetas de 10 campos aleatórios homogêneos, em aumento de 1000x, usando óleo de imersão. Ao final, somou-se o número de hemácias e plaquetas e foi feita regra de três com a hematimetria fornecida pela contagem automática, onde se relacionou o número encontrado de plaquetas com as hemácias contadas, e a hematimetria para encontrar o número de plaquetas.

A contagem manual em câmara de Neubauer, seguindo o método de Brecher e Cronkite (1953), foi realizada após a preparação da câmara da seguinte forma: foi feita a diluição das amostras na proporção de 1:200 (10 μ L de sangue para 1990 μ L de solução de Brecher) em tubo de ensaio de polipropileno (a fim de diminuir a adesão plaquetária na parede do tubo) e homogeneizado por cinco minutos por inversão da amostra em homogeneizador automático (MR-IVBloodMixer®,

BIOMIXER). Após a homogeneização, a câmara de Neubauer foi preparada, fixando-se a lamínula na área indicada, e preenchendo-se os dois compartimentos da câmara. Esperou-se a sedimentação das plaquetas, por 20 minutos em câmara úmida (placa de Petri + papel absorvente umedecido), e após focalização do retículo da câmara, realizou-se a contagem das plaquetas de forma semelhante à contagem de hemácias, contando-se cinco quadrados. A iluminação do microscópio foi reduzida, a fim de melhorar a visibilização das plaquetas e de diminuir a adição de artefatos (sujeidades, bactérias) na contagem final. Após a soma dos resultados dos quadros, o total foi multiplicado por 2500 para se obter o número de plaquetas/ μL , como sugerido por Jain (1986).

Os resultados das contagens plaquetárias foram analisados utilizando-se os testes estatísticos de Wilcoxon e o teste *t* de Student.

A ambientação versus não-ambientação e os anticoagulantes (EDTA versus Citrato de sódio) foram comparados usando-se os testes de Tukey, Duncan e Kruskal-Wallis. O nível de confiança adotado para este estudo foi de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em cada grupo, A e NA foram colhidos dois ml de sangue por animal ($n = 10$), aliquotadas em duas amostras de 1 ml, totalizando 20 amostras por grupo.

4.1 Ambientação *versus* não-ambientação

Dos 10 animais submetidos à ambientação, 50% (5/10) apresentou um ou mais comportamentos esperados, e 50% (5/10) não apresentou comportamento compatível com a ambientação, permanecendo isolados durante o período do experimento, ou evitando contato físico com as pessoas da equipe.

Alguns estudos utilizando o Feliway® Spray, como o realizado por Pereira *et al.* (2015) demonstraram a ação do feromônio como diminuidor do estresse durante procedimentos veterinários e como facilitador do manejo felino nessas situações. No estudo de Kronen *et al.* (2006), apesar de os animais terem exibido menor nível de estresse durante o processo de ambientação, no momento da manipulação para cateterização de veias, os animais mostraram-se relutantes, exibindo novamente sinais de estresse. No presente estudo não foi possível confirmar a ação tranquilizante do feromônio, visto que o número de animais que visualmente ambientaram foi igual ao número de animais que não ambientaram. Além disso, a forma de dispersão do feromônio empregado nos estudos supracitados foi diferente, em *spray*, enquanto no presente estudo usou-se difusor.

Muitos gatos que foram utilizados no experimento tinham um temperamento indócil, inclusive com os tutores, e permaneceram isolados e tensos durante todo o tempo da ambientação. Quando manipulados, ao final de uma hora de ação do feromônio, o comportamento era de agressividade, por medo. Por esse motivo, acredita-se que, mesmo sob a ação do feromônio, o nível de estresse no qual eles se encontravam, por estar em um ambiente estranho, não lhes permitiu relaxar e ambientar.

Em relação à qualidade das agregações (sem agregação, leve, moderada, intensa e coagulação) o grupo NA apresentou os seguintes resultados (Figura 15):

- 5% (1/20) não apresentaram agregação em lâmina;
- 10% (2/20) apresentaram agregação leve;

- 20% (4/20) apresentaram agregação moderada;
- 60% (12/20) apresentaram agregação intensa;
- 5% (1/20) das amostras coagularam.

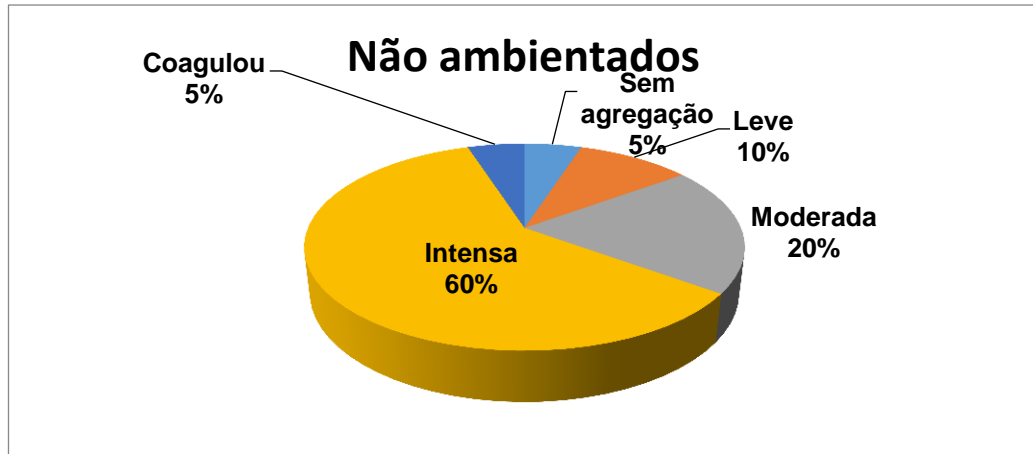


Figura 15 - Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos não ambientados (NA), independente do anticoagulante.

O grupo A apresentou os seguintes resultados (Figura 16):

- Nenhum dos animais deu negativo para agregação;
- 30% (6/20) apresentaram agregação leve;
- 10% (2/20) apresentaram agregação moderada;
- 50% (10/20) apresentaram agregação intensa e
- 10% (2/20) das amostras coagularam.

Nos testes de Tukey, teste *t* e de Duncan, não houve diferença significativa entre os grupos A e NA, inclusive entre a qualidade das agregações, sendo $p = 0,7131$.

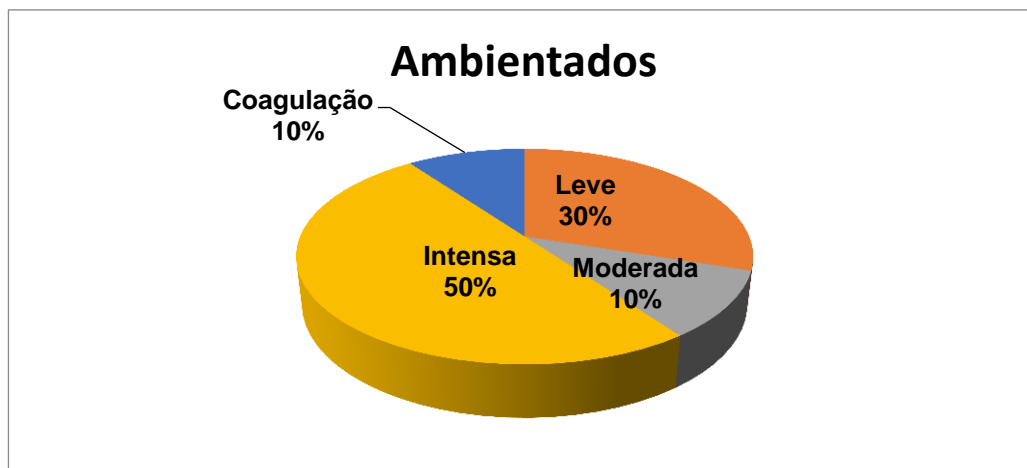


Figura 16- Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos ambientados (A), independente do anticoagulante.

No teste de Tukey não houve diferença significativa ($p = 0,4369$) em relação à qualidade das agregações entre os grupos A e NA.

Até o presente momento, não se tem conhecimento de outro estudo relacionado ao uso de feromônios sintéticos e seu efeito sobre a qualidade da agregação plaquetária nas coletas sanguíneas de gatos. No presente estudo pôde-se observar que a qualidade das agregações não diferiu significativamente entre os grupos A e NA, pois apesar das agregações intensas serem menores no grupo A, não houve amostras sem agregação e dobrou o número de amostras que coagularam.

Apesar do menor índice de agregação intensa observada no grupo A com relação ao NA, não se pode afirmar que o feromônio facial felino sintético interferiu positivamente na qualidade das agregações. Essa observação corrobora com os achados de Kronen *et al* (2006) onde a ação do feromônio também não foi comprovada para a redução da agitação do animal no momento da manipulação e, conseqüentemente, na redução da agregação plaquetária gerada pelo estresse agudo, apesar de diminuir o estresse pré-manipulação.

4.2 Citrato versus EDTA

Na comparação entre os grupos A e NA, citrato de sódio 3,2% e EDTA foram testados aplicando-se o teste Anova e o teste de Tukey e verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,4369$), contudo houve diferença

significativa entre citrato de sódio 3,2% e o EDTA ($p = 0,0035$), quando se consideraram apenas os anticoagulantes, sem fazer distinção por grupo A ou NA.

Todas as amostras foram acondicionadas de forma aleatória nos tubos com anticoagulante. Cinquenta e cinco por cento das vezes foram colocadas em primeiro lugar no tubo EDTA e 45% das vezes no citrato de sódio 3,2%.

Dos 20 esfregaços sanguíneos provenientes de amostras acondicionadas nos tubos com citrato de sódio, 100% agregou. Destes, 15% agregaram moderadamente, 75% intensamente e 10% coagularam (Figura 16). Das 20 amostras com EDTA, 95% apresentaram agregação, e destes, 40% levemente, 15% moderadamente, 35% intensamente e 5% coagularam (Figura 17).

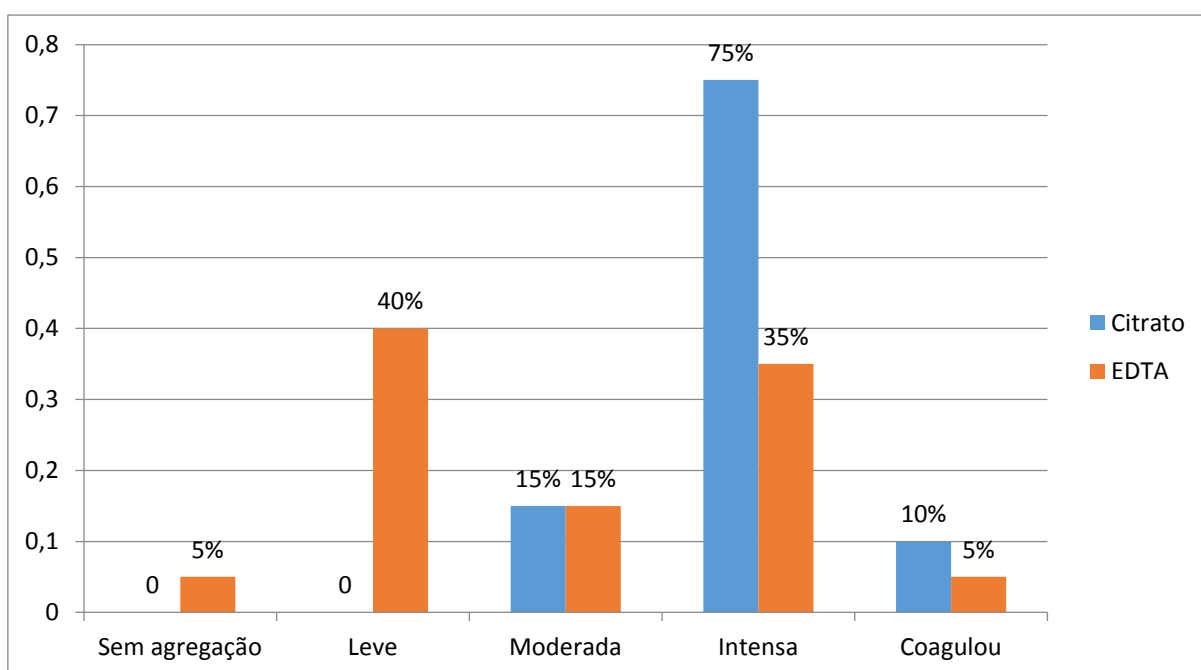


Figura 17 - Qualidade das agregações plaquetárias em amostras sanguíneas de gatos, com citrato de sódio 3,2% ou EDTA.

No teste t , os dois anticoagulantes apresentaram diferença significativa onde $p = 0,0013$.

Ao avaliar as porcentagens encontradas, pode-se observar que o EDTA obteve um melhor desempenho quanto à intensidade das agregações, quando comparado ao citrato de sódio 3,2%, resultado também observado por Mylonakis *et al.* (2008) em amostras sanguíneas de cães, embora vários outros trabalhos tenham associado a pseudotrombocitopenia ao uso do EDTA em diferentes espécies (DUSSE, 2004; FERREIRA, 2013; WILLS; WARDROP, 2008). Nenhum trabalho,

que se tenha conhecimento, associou a influência dos anticoagulantes à qualidade das agregações especificamente em felinos, como realizado neste estudo, sendo difícil afirmar, com segurança, que para esta espécie o EDTA é mais eficiente para a prevenção da agregação plaquetária.

4.3 Contagem automática (PockpH-100iV Diff®) versus manual em câmara de Neubauer versus manual em lâmina

Das 40 amostras obtidas somando os dois grupos, três coagularam e foram descartadas de todos os tipos de contagem. Vinte e duas apresentaram agregação intensa em esfregaço sanguíneo em lâmina e, por esse motivo, não foram realizadas as contagens manuais, pela interferência desse achado no resultado final das contagens. Dessa maneira, em apenas 15 amostras das 40 colhidas em ambos os grupos (A e NA), foi possível realizar, concomitantemente, os três tipos de contagens e correlacionar os seus resultados (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados das contagens plaquetárias realizadas em contador automático (PockpH-100iV Diff®), câmara de Neubauer e em esfregaço sanguíneo a partir de amostras sanguíneas de gatos ambientados e/ou não ambientados, acondicionados em anticoagulante citrato de sódio 3,2% e/ou EDTA.

Animal	Contagem câmara (plaquetas/ μ L)	Contagem automática (plaquetas/ μ L)	Contagem lâmina (plaquetas/ μ L)
A 01 E	112.000	89.000	221.000
A 02 E	565.000	553.000	559.000
A 03 E	249.000	249.000	469.000
A 04 E	266.000	123.000	327.000
A 06 E	441.000	83.000	241.000
A 07 E	236.000	398.000	537.000
A 09 E	273.000	197.000	251.000
A 10 E	255.000	431.000	507.000
NA 01 E	355.000	311.000	470.000
NA 02C	309.000	197.000	399.000
NA 04E	446.000	246.000	244.000
NA 06C	310.000	256.000	303.000
NA 06E	365.000	205.000	418.000
NA 10C	230.000	277.000	229.000
NA 10E	258.000	273.000	342.000

E = EDTA;
C = citrato de sódio 3,2%

Podem-se observar, na Tabela 1, as diferenças numéricas encontradas entre as contagens das plaquetas nos diferentes métodos de contagem de plaquetas.

A maioria dos valores abaixo da referência para a espécie estão relacionadas às contagens em contador automático (PockpH-100iV Diff®), e a maioria dos valores acima da referência encontrados estão relacionados à contagem estimada em esfregaço sanguíneo. Porém não foram contabilizadas as megaplaquetas de cada amostra, nem identificadas individualmente quanto à intensidade das agregações, não sendo possível relacionar essas alterações aos valores abaixo da referência para a espécie, apresentados pelo contador automático.

Também se puderam observar diferenças numéricas entre os dois métodos de contagem manuais (câmara de Neubauer e estimada em esfregaço sanguíneo). Apesar das diferenças dos resultados das contagens automáticas em relação às contagens manuais, e das contagens manuais entre si, ao se correlacionar os resultados, não houve diferença significativa entre a contagem automática e em câmara (teste de Wilcoxon: $p = 0,1673$; teste t : $p = 0,2408$) nem entre a contagem em câmara e a estimativa em lâmina (teste de Wilcoxon: $p = 0,1354$; teste t : $p = 0,1897$). Porém as contagens realizadas no contador automático tiveram diferença significativa em relação às contagens em lâmina (teste de Wilcoxon: $p < 0,001$; teste t : $p = 0,02314$).

Estudos realizados comparando os três métodos de contagem demonstraram não haver diferença significativa entre eles (SILVA *et al.*, 2007; TASKER, 2001), diferentemente dos resultados observados no presente trabalho, onde a contagem na lâmina e no contador automático obtiveram diferença significativa.

Essa diferença entre a contagem automática e a contagem estimada em lâmina era esperada, pela imprecisão da contagem realizada por aparelhos na devido à subcontagem que ocorre em presença de agregados plaquetários na amostra e megaplaquetas, encontradas fisiologicamente na espécie.

Como observado pelos testes estatísticos, era esperado que não se obtivessem diferenças significativas entre os dois métodos manuais. A semelhança estatística entre as contagens sugere eficácia de ambos os métodos em quantificar as megaplaquetas presentes na amostra e em identificar a presença e intensidade das agregações plaquetárias, visto que as agregações plaquetárias permanecem inclusive na câmara de Neubauer.

Estes resultados sugerem superioridade dos dois métodos de contagem manuais quando comparados ao método automático por impedância, visto que a visualização da morfologia das plaquetas e das agregações confere maior segurança no momento da contagem.

4 CONCLUSÕES

Foi possível, por meio das análises deste estudo, concluir que o feromônio facial felino sintético (Feliway®- Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia-SP) tem ação como facilitador do manejo dos gatos, porém a sua eficácia durante processos invasivos como a venopunção não pôde ser comprovada, e pesquisas que estudem esse efeito sobre um maior número de gatos podem vir a encontrar resultados mais significativos.

Ambos os anticoagulantes não preveniram a formação de agregados plaquetários, sendo o citrato de sódio 3,2% responsável pelo maior número de amostras com agregações de forma mais intensa do que o EDTA.

O estudo sugere superioridade das técnicas manuais em identificar e contabilizar as megaplaquetas ou plaquetas de pequenos agregados, presentes nas amostras sanguíneas de gatos, resultando em contagens dentro do intervalo de referência para a espécie, em relação ao contador automático, onde as contagens encontraram-se abaixo, ou próximo aos valores inferiores do intervalo de referência para a espécie.

REFERÊNCIAS

- AHNADI, C. E. *et al.* Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. **Thrombosis and haemostasis**, v. 90, n. 5, p. 940-948. Schattauer Publishers, Stuttgart. 2003
- AVMA American Veterinary Medical Association (). U.S. pet ownership & demographics sourcebook. 2012 ed. Schaumburg, IL: **American Veterinary Medical Association**; 2012. Disponível em: <<https://www.avma.org/kb/resources/statistics/pages/market-research-statistics-us-pet-ownership-demographics-sourcebook.aspx>>, acesso em: 15 de jul. de 2017
- 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.
- BOUDREAUX, M. K. Platelets. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology** 6 ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 561-568.
- BRECHER, G., SCHNEIDERMAN, M. et al. The reproducibility and consistency of the platelet count. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 23, p. 15-26, 1953.
- CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro. v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.
- CROWELL-DAVIS, S. L. *et al.* Social organization in the cat: a modern understanding. **Journal of feline medicine and surgery**. Thousand Oaks: Sage. v. 6, n. 1, p. 19-28, 2004.
- DEPORTER, Theresa L. Use of pheromones in feline practice In: RODAN, I.; HEATH, S. **Feline Behavioral Health and Welfare**. 1 ed. St Louis: Elsevier. 2016. p. 235-244.
- DUSSE, L. M. S'A. *et al.* Pseudothrombocytopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro. v. 40, n. 5, p. 321-324, 2004
- FAM, A. L. P. D.'A. *et al.* Alterações no leucograma de felinos domésticos (*Felis catus*) decorrentes de estresse agudo e crônico. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**. Curitiba: Champagnat. v. 8, n. 3. p. 299-306. 2010.
- FERREIRA, P. A. S. **Contagem automática de plaquetas: ação de um aminoglicosídeo na pseudotrombocitopenia induzida pelo ácido etilenodiaminotetracético tripotássico**. 2013. 36 f. Dissertação (mestrado) – Curso de Medicina, Instituto Politécnico de Coimbra, Portugal, 2013.

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.

HOFMANN-LEHMANN, R. *et al.* Evaluation of the QBC-Vet Autoreadhaematology system for domestic and pet animal species. **Comparative Haematology International**, v. 8, n. 2, p. 108-116, 1998.

JAIN, N. C. The platelets: structural, biochemical and functional aspects. In: _____. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea &Febiger, 1986. p.1-4.

JORDAN, H. L. *et al.* Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 7. n. 5, p. 261-265, 1993.

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

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.

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: 20 jun. 2017.

LOPES, R. D. **Manual para coleta de sangue venoso em caninos e felinos**. São Paulo, [s.n.] 2009. 71f.

LOPES, S. T. A. *et al.* Manual de Patologia Clínica Veterinária. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Lopes & Cunha. **Patologia Clínica Veterinária** – UFSM – Santa Maria/RS – 2002

LUE, T. W. *et al.* Impact of the owner-pet and client-veterinarian bond on the care that pets receive. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 4, p. 531-540, 2008.

MELO, M. A. W.; SILVEIRA, C. M. **Laboratório de Hematologia - teorias, técnicas e atlas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2015, 280 p.

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.

NETO, D. M. Semiologia do Sistema Circulatório de Equinos e Ruminantes In: FEITOSA, F. I. **Semiologia Veterinária : a arte do diagnóstico**. 3ª. ed. - São Paulo: Roca, 2014. p. 2017-240.

NORMAN, E. J. *et al.* Evaluation of a Citrate-Based Anticoagulant with Platelet Inhibitory Activity for Feline Blood Cell Counts. **Veterinary clinical pathology**, v. 30, n. 3, p. 124-132, 2001. A

NORMAN, E. J. *et al.* Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 3, p. 137-140, 2001. B

OLIVEIRA, R. A. G. *et al.* A absoluta recomendação de se usar o método direto de contagem de plaquetas em câmara de Neubauer em pacientes intensamente plaquetopênicos. **J. Bras.Patol.Med. Lab**, v. 39, n. 2, p. 139-141, 2003.

OLSEN, L. H. *et al.* Comparison of manual and automated methods for determining platelet counts in dogs with macrothrombocytopenia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Columbia**, v.16, n.2, p.167-170, 2004.

PEREIRA, J. S. - **FELIWAY® SPRAY ASSESSMENT TO HANDLE STRESS IN CATS IN VETERINARY CONSULTATION** TESE (mestrado) UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO. Vila Real 2014

PEREIRA, J. S. *et al.* Improving the feline veterinary consultation: the usefulness of Feliway spray in reducing cats' stress. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 18, n. 12, p. 959-964, 2015.

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.

QURESHI, B. H. Pseudothrombocytopenia EDTA-Dependent. **Clinical Pathology Rounds**. [s.n.] v. 29. N. 8. p. 471-473. 1998.

RIZZI, T. E. *et al.* Normal Hematology of the Cat In: In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology** 6 ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 811-820.

RODAN, Ilona. Understanding feline behavior and application for appropriate handling and management. **Topics in companion animal medicine**, v. 25, n. 4, p. 178-188, 2010.

RUSSELL K. E. Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology** 6 ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 576-585.

SANTOS, A. P. Avaliação da Hemostasia e distúrbios da coagulação In: GONZÁLEZ F. H. D.; SILVA, S. C. da. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório** . – Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. p. 58-72.

SCHMITZ, G. et al. European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. **Thrombosis and haemostasis**, v. 79, n. 5, p. 885-896, 1998.

SILVA, P. F. N. da *et al.* Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL). **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. v. 28, n. 4, p.659-664. 2007.

SMITH, S. A. Overview of Hemostasis In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology** 6 ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 635-653.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. **Coleta de Sangue Venoso**. São Paulo, p. 22, 2005.

SPARKES, A. Developing cat-friendly clinics. **In Practice**, v. 35, n. 4, p. 212-215, 2013.

SUNDAHL, E. *et al.* Providing Feline-Friendly Consultations. In: RODAN, I.; HEATH, S. **Feline Behavioral Health and Welfare**. 1 ed. St Louis: Elsevier. 2016. p. 269-286.

TASKER, S. *et al.* Evaluation of methods of platelet counting in the cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 7, p. 326-332, 2001

TASKER, S. *et al.* Estimation of platelet counts on feline blood smears. **Veterinary clinical pathology**. [s.l.]: Wiley. v. 28. n. 2. p. 42-45, 1999.

TAYLOR P, Funk C, Craighill P: **Gauging family intimacy: dogs edge cats (dads trail both)**. PewResearch Center, 2006. Disponível em: <<http://pewresearch.org/pubs/303/gauging-family-intimacy>>, acesso em: 17 de jun. 2017

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

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

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.

TVEDTEN, H.; KORCAL, D. Vortex mixing of feline blood to disaggregate platelet clumps. **Veterinary clinical pathology**. [s.l.]: Wiley. v. 30, n. 3, p. 104-106, 2001

VIVAS, W. L. P. **Manual Prático de Hematologia Clínica**. [s.l.: s.n] 2014.

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

WEISER, G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015a. p. 22–86.

WEISER, G. Interpretação da resposta leucocitária na doença. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015b. p. 276–305.

WILLS, T. B.; WARDROP, K. J. Pseudothrombocytopenia secondary to the effects of EDTA in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association.** v. 44, n. 2, p. 95-97, 2008.

ZELMANOVIC, D.; HETHERINGTON, E. J. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. **Veterinary Clinical Pathology.** [s.l.]: Wiley. v. 27, n. 1. p. 2-9, 1998.

ZHOU, X. *et al.* Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count. **American journal of clinical pathology,** v. 136, n. 4, p. 646-652. 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Solução de Brecher, modo de preparo (MELO; SILVEIRA, 2015):

Oxalato de amônio-----	1 g
Azul de metileno 1%-----	2 gotas
Água deionizada autoclavada (qsp)-----	100 ml

- A solução deve ser armazenada refrigerada.