

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE**  
**Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**  
**Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal**



**Dissertação**

**Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na pseudotrombocitopenia em  
pequenos animais**

**Maurício Eduardo Mezaroba**

**Concórdia, 2022**

**Maurício Eduardo Mezaroba**

**Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na  
pseudotrombocitopenia em pequenos animais**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

**Orientador:** Soraya Regina Sacco Surian

**Concórdia, 2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e  
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

MM617U  
u Mezaroba, Mauricio Eduardo  
    Uso do vórtex como dissociador de agregados  
    plaquetários na pseudotrombocitopenia em pequenos  
    animais / Mauricio Eduardo Mezaroba; orientadora  
    Soraya Regina Sacco Surian; coorientadora Angela  
    Patrícia Medeiros Veiga. -- Conrcórdia, 2022.  
    42 p.

    Dissertação (mestrado) - Instituto Federal  
    Catarinense, campus Concórdia, , Conrcórdia, 2022.

    Inclui referências.

    1. Patologia Clínica. 2. Hematologia. 3.  
    Trombocitopenia. 4. Hemostasia. 5. Laboratório. I.  
    Surian, Soraya Regina Sacco, II. Veiga, Angela  
    Patrícia Medeiros. III. Instituto Federal Catarinense.  
    . IV. Título.

**Maurício Eduardo Mezaroba**

**Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na  
pseudotrombocitopenia em pequenos animais**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

**Data da Defesa: 24/08/2022**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Soraya Regina Sacco Surian (Orientador)**

**Doutora em Clínica Veterinária pela Universidade Estadual Paulista  
Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Patrícia Medeiros Veiga**

**Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Paola Santarosa**

**Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**



---

Emitido em 24/08/2022

**DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 27954/2022 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 20/04/2023 17:48 )*

**SORAYA REGINA SACCO**

COORDENADOR DE CURSO

CCMEDV/CON (11.01.04.01.03.02.12)

Matrícula: ###082#6

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **27954**, ano: **2022**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **19/04/2023** e o código de verificação: **a76f857e91**

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha mãe Eliane Andreola que sempre dedicou muito tempo de sua vida para me oferecer uma educação de qualidade. Ao meu namorado Cristian Carpes, que esteve me auxiliando a conciliar o trabalho com o desenvolvimento da dissertação. A Doutora, membro da banca, Bianca Paola Santarosa, que aceitou auxiliar no desenvolvimento desse projeto. A Doutora, Vanessa Peripolli, co-autoria desse artigo por ter auxiliado com seus conhecimentos. A Doutora, Angela Patricia Medeiros Veiga, por mais um auxílio no desenvolvimento científico durante minha trajetória na carreira acadêmica. Não posso deixar de agradecer em especial a minha orientadora, Dra Soraya Regina Sacco Surian, que sempre esteve disponível para me auxiliar, me norteando e dando apoio científico no desenvolver desse trabalho. Sou grato a colaboração do Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia e Campus Araquari e Laboratório de Análises Veterinárias AmigoVida (Videira, Santa Catarina) no desenvolvimento desse programa. Por fim, manifesto aqui a minha gratidão a Deus, que me deu força e energia para realizar mais essa etapa.

***“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez.”  
(George Bernard Shaw)***

## Resumo

MEZAROBA, Maurício Eduardo. **Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na pseudotrombocitopenia em pequenos animais.** 2022. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2022.

A pseudotrombocitopenia é a falsa diminuição na contagem plaquetária, que possui prevalência aumentada devido a interferências na coleta sanguínea e por ação inadequada do anticoagulante, tendo como principal causa à formação de agregados plaquetários. Esta representa um importante problema na clínica de caninos e felinos, pois pode resultar em diagnóstico errôneo, solicitação desnecessária de exames laboratoriais e conduta terapêutica totalmente inadequada. Objetivou-se avaliar o uso de agitador vórtex como alternativa para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia nessas espécies. Executou-se o projeto no Laboratório Amigovida – Análises Veterinárias (Videira, Santa Catarina) com amostras coletadas pelas clínicas veterinárias conveniadas. Selecionou-se as amostras de tubos contendo anticoagulante etilenedinitrilotetraacetato de potássio (EDTA) (caninos n=100 e felinos n=100), que apresentavam diminuição na contagem plaquetária, realizada em aparelho contador de células, por bioimpedância, além da presença de agregados plaquetários, avaliados durante a observação de esfregaço sanguíneo corado. As plaquetas foram avaliadas quantitativamente pré e pós tratamento com o agitador pela contagem automatizada por bioimpedância em analisador hematológico veterinário SDH-3-VET (Labtest®) e por estimativa média de contagem de plaquetas por campo de imersão (aumento de 1000X). O tratamento foi realizado por agitação em vórtex (Na3600, FORTECIENTÍFICA®) a 3600 rotações por minuto (r.p.m.) por três minutos seguido de homogeneização da amostra para confecção de esfregaço e recontagem por bioimpedância elétrica. Paralelamente avaliou-se a incidência de variações na plaquetometria de 100 caninos e 100 felinos atendidos no mesmo laboratório. A análise resultou em diferença significativa entre os valores de plaquetas por campo e por bioimpedância pré e pós tratamento ( $p < 0,05$ ), obtendo-se valores maiores em todos os pacientes avaliados após o



tratamento com agitação, com médias de plaquetas dentro dos valores de referência para as espécies avaliadas. Felinos foram a espécie com maior incidência de pseudotrombocitopenia e agregados plaquetários, mas a espécie que teve menor dissociação de agregados com a técnica. A dissociação de agregados plaquetários é proporcional a intensidade de agregados plaquetários pré agitação. Conclui-se que o uso de agitador vórtex no protocolo proposto associado à avaliação de plaquetas por bioimpedância elétrica ou estimativa de plaquetas por campo é capaz de diminuir a incidência de pseudotrombocitopenia em pequenos animais, diminuindo a faixa de contagem subestimada. Porém, o uso do agitador nessa rotação e tempo não deve ser usado como único parâmetro de avaliação para pseudotrombocitopenia em animais domésticos, considerando que mesmo após o uso da técnica houve a presença de agregados plaquetários em esfregaços sanguíneos, evidenciando que a dissociação não é total, embora minimize os falsos diagnósticos e auxilie o clínico em uma conduta terapêutica mais adequada.

**Palavras-chave:** patologia clínica; hematologia; trombocitopenia; caninos; felinos.

## Abstract

MEZARROBA, Maurício Eduardo. **Use of the vortex as dissociator of platelet aggregates in pseudothrombocytopenia in small animals.** 2022. 42f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2022.

Pseudothrombocytopenia is a false decrease in platelet count, which has an increased prevalence due to interference in blood collection and inadequate anticoagulant action, the main cause of which is the formation of platelet aggregates. This represents an important problem in the canine and feline clinic, as it can result in misdiagnosis, unnecessary request for laboratory tests and totally inadequate therapeutic management. The objective was to evaluate the use of a vortex mixer as an alternative for the laboratory resolution of pseudothrombocytopenia in these species. The project was carried out at the Laboratório Amigovida – Análises Veterinárias (Videira, Santa Catarina) with samples collected by the accredited veterinary clinics. Samples were selected from tubes containing the anticoagulant potassium ethylenedinitrilotetraacetate (EDTA) (canines n=100 and felines n=100), which showed a decrease in platelet count, performed in a cell-counting device, by bioimpedance, in addition to the presence of platelet aggregates. , evaluated during observation of stained blood smear. Platelets were quantitatively evaluated pre- and post-treatment with the shaker by automated bioimpedance counting on an SDH-3-VET veterinary hematology analyzer (Labtest®) and by mean estimation of platelet count per immersion field (1000X magnification). The treatment was carried out by vortexing (Na3600, FORTECIENTÍFICA®) at 3600 revolutions per minute (r.p.m.) for three minutes, followed by homogenization of the sample for making a smear and recounting by electrical bioimpedance. In parallel, the incidence of variations in platelet count of 100 canines and 100 felines treated in the same laboratory was evaluated. The analysis resulted in a significant difference between the platelet values per field and by bioimpedance pre and post treatment ( $p < 0.05$ ), with higher values being obtained in all patients evaluated after treatment with agitation, with mean platelets within the ranges. reference values for the evaluated species. Felines were the species with the highest incidence of pseudothrombocytopenia and platelet aggregates, but

the species that had the lowest aggregate dissociation with the technique. Dissociation of platelet aggregates is proportional to the intensity of pre-shake platelet aggregates. It is concluded that the use of a vortex mixer in the proposed protocol associated with the evaluation of platelets by bioelectrical impedance or estimation of platelets by field is able to reduce the incidence of pseudothrombocytopenia in small animals, decreasing the underestimated count range. However, the use of the agitator in this rotation and time should not be used as the only evaluation parameter for pseudothrombocytopenia in domestic animals, considering that even after using the technique there was the presence of platelet aggregates in blood smears, evidencing that the dissociation is not complete, although it minimizes false diagnoses and helps the clinician in a more adequate therapeutic approach.

**Keywords:** clinical pathology; hematology; thrombocytopenia; canines; cats.

## Lista de Figuras

- Figura 1** - Plaquetas de caninos em sua forma ativada apresentando pseudópodes e grânulos citoplasmáticos (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral). ..... 3
- Figura 2** - Plaquetas de felinos distribuídas em forma de agregado plaquetário, apresentando macroplaquetas em meio ao agregado (seta) (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral). ..... 6
- Figura 3** - Médias±DP da contagem plaquetária por microlitro em caninos e felinos pré tratamento e pós tratamento com uso de agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto durante três minutos através da contagem por impedância elétrica e estimativa em lâmina. .. 28
- Figura 4** - Médias±DP de plaquetas por microlitro em caninos pré-tratamento, pós-tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras – média plaquetária dissociada - categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários. .... 29
- Figura 5** - Médias±DP de plaquetas por microlitro em felinos pré tratamento, pós tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários. .... 30
- Figura 6** - Média de plaquetas por microlitro em caninos e felinos pré tratamento e pós tratamento separadas por metodologia de contagem plaquetária: impedância elétrica e estimativa em lâmina. .... 31

## SUMÁRIO

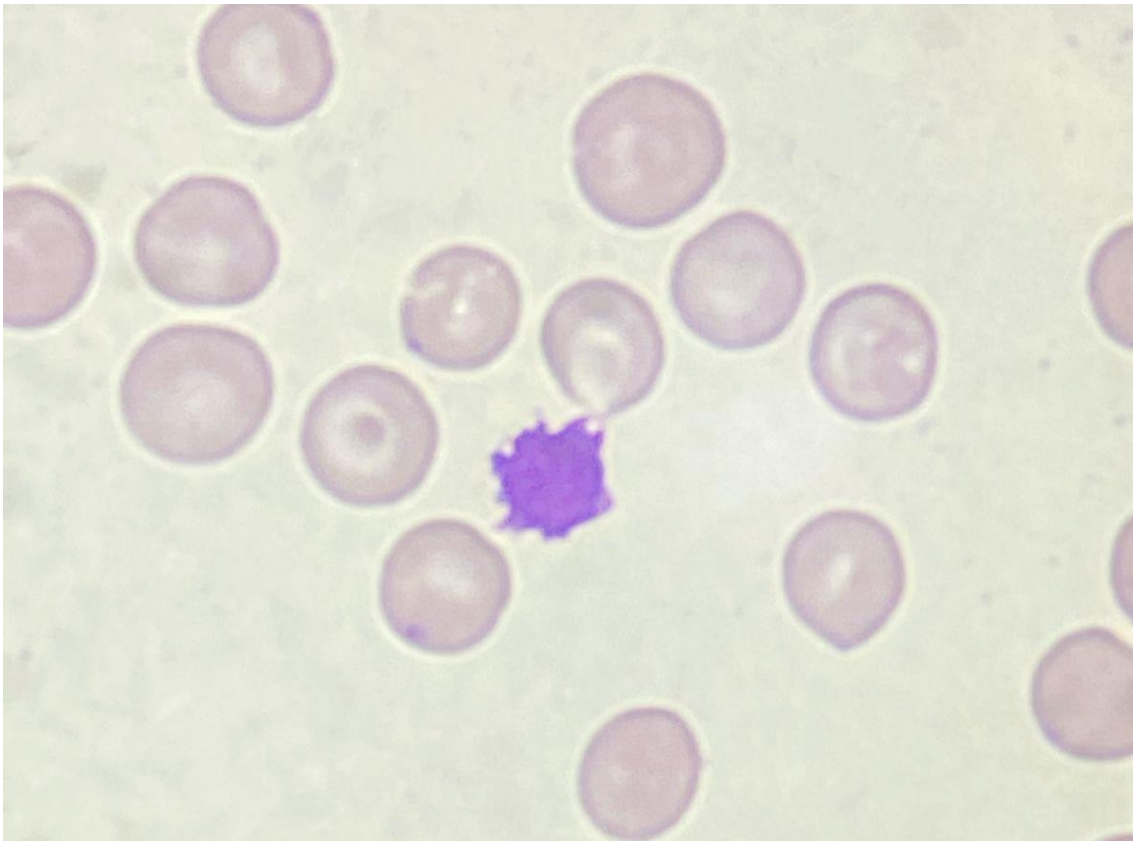
1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE .....	2
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo Geral.....	10
2.2	Objetivos Específicos .....	10
3	ARTIGO .....	11
3.1	Introdução .....	12
3.2	Material e Métodos.....	14
3.2.1	Local do experimento .....	14
3.2.2	Incidência de variações da plaquetometria e de agregados plaquetários .....	14
3.2.3	Critérios de seleção de amostras para o tratamento .....	15
3.2.4	Gradação dos agregados plaquetários das amostras pré-tratamento.....	15
3.2.5	Contagem plaquetária por estimativa em lâmina .....	16
3.2.6	Protocolo de tratamento das amostras pelo uso de vórtex.....	16
3.2.7	Análise estatística dos dados .....	17
3.3	Resultados .....	17
3.4	Discussão .....	19
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
5	REFERÊNCIAS.....	23
6	ANEXOS .....	28

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

As plaquetas, que também podem ser chamadas de trombócitos, são fragmentos celulares oriundos de megacariócitos, célula presente na medula óssea, que, posteriormente a fragmentação citoplasmática intramedular dos megacariócitos são lançadas na circulação sanguínea (Peerschke, 2002; Galdêncio *et al.*, 2017). Devido ao fato dessas células serem um resquício citoplasmático, plaquetas não possuem núcleo e carregam consigo características morfológicas e biológicas derivadas do material genético do megacariócito (Hartwig & Italiano, 2003).

Essas células possuem um formato bicôncavo na maioria dos animais, exceto em caprinos que possuem um formato piriforme e, quando passam para a sua forma ativada, apresentam pseudópodes (Figura 1) (Santos & Alessi, 2017). A ativação plaquetária precede a formação de agregados e esses dois mecanismos podem interferir na avaliação quantitativa total e de parâmetros plaquetários: volume médio plaquetário (VPM) e índice de anisocitose plaquetária (PDW) (Stockham & Scott, 2002).

**Figura 1** - Macroplaquetas de canino em sua forma ativada apresentando pseudópodes (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral).



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Mesmo sem possuírem núcleo, são consideradas partículas metabolicamente ativas, por possuírem retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias, uma variedade de grânulos, participando da síntese de proteínas através de RNA mensageiro (Mancuso & Santagostino, 2017). Elas apresentam uma estrutura dividida em quatro zonas (Castro *et al.*, 2006; Boudreaux *et al.*, 2010; Ferreira, 2013).

Uma das zonas é denominada a zona periférica, onde encontra-se a membrana plasmática e o sistema canalicular aberto - sistema responsável por adesão, ativação e agregação plaquetária. A zona sol-gel corresponde ao citoesqueleto plaquetário - sistema responsável por pseudópodes e mudanças morfológicas, captando e

expulsando grânulos secretores. Por sua vez, a zona das organelas abriga os grânulos dos processos funcionais e metabólicos plaquetários compostos de proteínas, receptores de membrana e moléculas de serotonina, íons de cálcio, adenosina difosfato, adenosina trifosfato, fatores da coagulação, inibidor do ativador plasminogênio. E a quarta zona é composta pelo sistema membranal denso, que corresponde ao sistema com concentração de cálcio em quantidade necessária para realizar os eventos contráteis e dos sistemas enzimáticos que desencadeiam a síntese de prostaglandinas.

Estima-se que se originem 30.000 plaquetas por mililitro de sangue diariamente em mamíferos (Rodrigues *et al.*, 2013). Após a produção, elas sofrem um processo de maturação, no qual as plaquetas mais jovens possuem um maior volume médio plaquetário (Stockham & Scott, 2002) e podem ser chamadas de plaquetas reticuladas, assim conhecidas por conter maior quantidade de RNA em seu interior, sendo comparadas com os reticulócitos de hemácias, as quais podem ser quantificadas através da solução de thiazole Orange. Entretanto, em estudo realizado por Silva (2009) não se evidenciou correlação entre a quantidade de plaquetas reticuladas séricas e megacariócitos medulares em caninos, sugerindo que a contagem destas não seja um bom avaliador de trombopoiese.

A avaliação da trombopoiese é realizada através da quantificação do número de megacariócitos no mielograma (Silva, 2009) e possui dificuldades de colheita, considerando que nem todos os médicos veterinários clínicos sentem-se seguros e capacitados para coleta de mielograma. Outra maneira de avaliar subjetivamente a trombopoiese é descrita como a avaliação dos índices plaquetários, entretanto, esses também sofrem interferência da coleta (Stockham & Scott, 2002), além de que as dificuldades e intercorrência durante a coleta também não permitem estabelecer uma plaquetometria confiável (Schneider, 2000).

As plaquetas participam de três processos durante a hemostasia: adesão pelos receptores de superfície ao colágeno, fibronectina e laminina, mediada pelo fator de



von Willebrand, processo que também pode ocorrer *in vitro* devido os receptores a superfícies, como de vidro; liberação que é representada pela vasoconstrição local com agregação plaquetária; e; a agregação plaquetária propriamente dita, correspondendo a formação do tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária (Baker, 2015; Boudreaux, 2010).

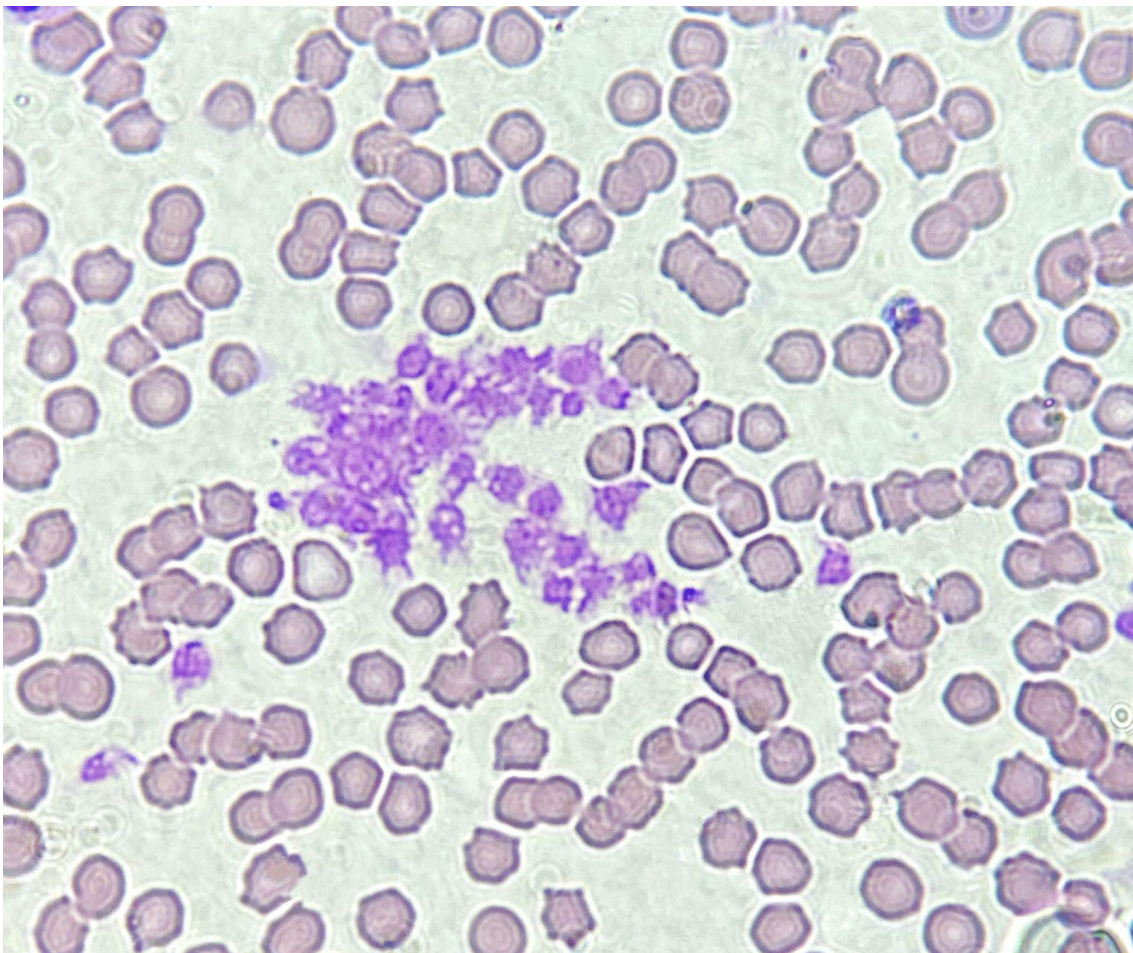
No processo de ativação ocorre uma reorganização do citoesqueleto da plaqueta, que desenvolve pseudópodes e centralização de organelas. Isto pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*, e fisiologicamente corresponde, além da mudança do formato celular discoide, a uma alteração nos receptores de superfície e concentrações de cálcio (Anhadi, 2003).

Para que as plaquetas possam realizar suas funções inerentes a hemostasia, a plaquetometria, isto é, a quantidade de plaquetas sérica deve-se encontrar em valores adequados (Meyer *et al.*, 1995). O valor de referência das plaquetas é variável de acordo com a espécie, sendo menores em equinos e maiores em bovinos (Subapriya *et al.*, 2020). Em caninos, há a presença de uma variação quantitativa plaquetária racial, pode-se observar valores reduzidos de forma fisiológica nas raças Akita (Hawakaya *et al.*, 2016), Cavalier King Charles Spaniel e Greyhounds (Kelley *et al.*, 2014). Quando ocorre uma queda nesses valores denomina-se trombocitopenia, e, no aumento desses valores, denomina-se trombocitose (Kuter, 2019). A agregação plaquetária pode produzir valores de plaquetas totais falsamente diminuídos, assim sendo denominados de pseudotrombocitopenia (RIOND *et al.*, 2015).

A pseudotrombocitopenia é uma alteração decorrente de fenômenos *in vitro*, associado a coletas sanguíneas mais laboriosas, na qual ocorre uma subestimação da plaquetometria, podendo acontecer por diferentes motivos, sendo o principal a agregação plaquetária (Figura 2), mas podendo acontecer um erro analítico em contagens automatizadas, principalmente por impedância, devido à presença de macroplaquetas que acabam por não ser diferenciadas de hemácias devido o tamanho

semelhante na espécie felina, e, menos comumente em animais, o satelitismo plaquetário (Russel, 2010; Thomas, 2010).

**Figura 2** - Plaquetas de felinos distribuídas em forma de agregado plaquetário, apresentando macroplaquetas em estado ativado (apresentando pseudópodes e granulação citoplasmática) em meio ao agregado (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral).



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Em estudo realizado por De Melo (2020) observou-se que os agregados plaquetários foram o erro pré-analítico mais prevalente em amostras de felinos, estando presente em 35% das amostras da rotina laboratorial. Outros estudos demonstram a alta incidência dessa alteração em felinos, atingindo 36% (Moritz &

Hoffman, 1997), 62% (Zelmanovic & Hetherington, 1998) e até 71% (Norman *et al.*, 2001) das amostras felinas coletadas com EDTA.

Foi postulado que a agregação plaquetária é um fenômeno que ocorre *in vitro* devido a erros de coleta ou coletas mais dificultosas (Weiser & Kosiba, 1984). Sendo que estudos demonstram que o local da punção, atraso na coleta, demora entre coleta e análise, proporção incorreta entre anticoagulante e amostra e homogeneização incorreta podem resultar na produção de agregados plaquetários (Schneider, 2000). As plaquetas felinas são mais propensas a agregados plaquetários, e vários fatores exclusivos das plaquetas felinas podem estar envolvidos em sua propensão a agregar, como o grande tamanho das plaquetas, maior concentração de serotonina, liberação de grânulos quando exposto a serotonina e agregação irversível em baixas quantidades de adenosina difosfato (ADP) (Riond *et al.*, 2015).

Em relação ao tipo de anticoagulante, Mylonakis *et al.* (2008) realizaram um estudo que concluiu que a utilização do etilenodiaminotetracético de potássio (EDTA) em comparação ao citrato de sódio produz menos agregados plaquetários em caninos e que os agregados tendem a se formar no decorrer de 24 horas com maior intensidade em amostras submetidas a refrigeração a 4°C, do que em amostras mantidas a temperatura ambiente. Enquanto estudo realizado por Fuck (2012) demonstrou que o citrato de sódio causou contagens plaquetárias maiores com menor incidência de agregados em comparação ao EDTA de potássio, além da estocagem de amostra por uma a duas horas formar mais agregados em pacientes com EDTA que com citrato de sódio.

Também pensando na prevenção da formação de agregados plaquetários, diferentes técnicas foram avaliadas, sendo que o gotejamento por veia cefálica em felinos se mostrou mais eficaz na redução da formação de agregados plaquetários do que a venopunção de jugular tradicional (Valeda, 2018).

A desagregação plaquetária em felinos após a coleta foi comprovada em estudo realizado por Riond *et al.* (2015) após 24 horas a temperatura ambiente em

homogeneizador (*Rock 'n roller 34201*, Snijders Scientific B.V.) observando o resultado de que todos os felinos com pseudotrombocitopenia, que apresentavam agregados plaquetários, após a coleta obtiveram valores de plaquetometria dentro da normalidade, após a homogeneização por 24 horas, entretanto, nem todos os felinos não apresentaram mais agregados plaquetários na avaliação do esfregaço sanguíneo, evidenciando que a desagregação não é total.

Estudos também relatam que a adição de aminoglicosídeos ao sangue coletado pode evitar a formação de agregados plaquetários ou causar a dissociação dos mesmos (Sakurai *et al.*, 1997). A adição de gentamicina foi comprovada como um rápido dissociador no caso de pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA por formação de agregados plaquetários em humanos por Ferreira (2013), bem como a amicacina (Zhou *et al.*, 2011). Engelmann *et al.* (2019) concluiu em um estudo que a adição prévia de 10 microlitros de amicacina ao EDTA produz uma menor incidência de agregados plaquetários, quando comparada ao grupo controle, no entanto, a presença de agregados plaquetários ainda ocorreu em 5% das amostras, contrastando com 56% do grupo controle e evidenciando que a amicacina não é capaz de prevenir totalmente a agregação plaquetária, mas que seu uso pode ser recomendado. Salienta-se que outros parâmetros hematológicos no exame sofreram alterações da introdução da amicacina nessa dosagem.

Em humanos o uso de agitação por vórtex em amostras com pseudotrombocitopenia é recomendado por Gulati *et al.* (1997) para minimizar as interferências. Nestes casos os autores recomendam que informe-se o valor de plaquetas pós uso do tratamento em laudo, quando a diferença for maior que 10% em comparação ao valor pré tratamento. A desagregação plaquetária ocorreu de forma total em 44% das amostras humanas com pseudotrombocitopenia, mas que na maioria a dissociação não é total quando as amostras foram submetidas de 1 a 2 minutos de agitação na velocidade maior do vórtex (entre 8 a 10 na escala de 1 a 10). A técnica foi testada em 42 felinos com agregados plaquetários por Tvedten & Cortal (2001)

aumentando o total plaquetário em todas, exceto em uma das amostras, quando submetida a agitação por um minuto no S8223 Vortex Genie mixer (VWR Scientific Products, Chicago, Ill, USA) a 3000 rotações por minuto. Havia a presença de agregados plaquetários na maioria das amostras, resultando em uma desagregação total em apenas 12% dos pacientes testados.

Embora haja a indicação de notificar sempre que a diferença for maior que 10% na Medicina, Tvedten & Cortal (2001) relatam que uma diferença importante em felinos seria maior igual a 100%, ou nos aumentos de mais de 100.000 plaquetas/microlitro, nesses casos indicando que há pseudotrombocitopenia e não uma trombocitopenia verdadeira. Ademais, segundo os autores pode-se suspeitar fortemente de uma trombocitopenia verdadeira em felinos quando a diferença com o tratamento for menor ou igual que 50.000 plaquetas/microlitro. Até o presente momento, não encontra-se na literatura avaliação da técnica para caninos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o uso de agitador vórtex como alternativa para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia em caninos e felinos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar o resultado entre uso de agitador vórtex como alternativa para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia entre caninos e felinos;
- Avaliar a incidência de agregados plaquetários em caninos e felinos em um laboratório de patologia clínica veterinária na cidade de Videira, Santa Catarina;
- Estudar a incidência das variações da plaquetometria (trombocitose, trombocitopenia, pseudotrombocitopenia e contagem normal plaquetária) em caninos e felinos da rotina de atendimento de pequenos animais na região de Videira, Santa Catarina;
- Verificar se há diferença entre o uso de contagem plaquetária por impedância elétrica e estimativa em esfregaço sanguíneo associada ao uso de vórtex como dissociador de agregados plaquetários;
- Avaliar se a maior dissociação de agregados plaquetários está ligada a amostras com maior quantidade de agregados plaquetários.

### 3 ARTIGO

#### **Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na pseudotrombocitopenia em pequenos animais**

**Manuscrito a ser submetido à *Veterinary Clinical Pathology Journal***

(<https://www.asvcp.org/page/VCPJournal>)

---

#### **Autores**

Maurício Eduardo Mezaroba<sup>1</sup>; Soraya Regina Sacco Surian<sup>2\*</sup>; Vanessa Peripolli<sup>3</sup>;  
Angela Patricia Medeiros Veiga<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal. Instituto Federal Catarinense.

<sup>2</sup> Instituto Federal Catarinense. Rodovia SC-283, km 17. Fragosos. CEP – 89.703-720 – Concórdia, Santa Catarina – Brasil. \*Autora para correspondência: [soraya.surian@ifc.edu.br](mailto:soraya.surian@ifc.edu.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Ulysses Gaboardi, km 3. CEP 89520-000 Curitibanos, Santa Catarina – Brasil.

<sup>4</sup> Instituto Federal Catarinense. Rodovia BR-280, km 27. CEP – 89.245-000 – Araquari, Santa Catarina – Brasil.

### 3.1 Introdução

Para que as plaquetas possam realizar suas funções inerentes a hemostasia, a plaquetometria, isto é, a quantidade de plaquetas sérica deve-se encontrar em valores adequados (Meyer *et al.*, 1995). Quando ocorre uma queda nesses valores denomina-se trombocitopenia, e, no aumento desses valores, denomina-se trombocitose (Kuter, 2019). A agregação plaquetária pode produzir valores de plaquetas totais falsamente diminuídos, assim sendo denominados de pseudotrombocitopenia (RIOND *et al.*, 2015).

A pseudotrombocitopenia é uma alteração decorrente de fenômenos *in vitro*, associado a coletas sanguíneas mais laboriosas, na qual ocorre uma subestimação da plaquetometria, podendo acontecer por diferentes motivos, sendo o principal a agregação plaquetária, mas podendo acontecer um erro analítico em contagens automatizadas, principalmente por impedância, devido à presença de macroplaquetas que acabam por não ser diferenciadas de hemácias devido o tamanho semelhante na espécie felina, e, menos comumente em animais, o satelitismo plaquetário (Russel, 2010; Thomas, 2010).

As plaquetas felinas são mais propensas a agregados plaquetários devido a vários fatores exclusivos das plaquetas felinas podem estar envolvidos em sua propensão a agregar, como o grande tamanho das plaquetas, maior concentração de serotonina, liberação de grânulos quando exposto a serotonina e agregação irreversível em baixas quantidades de adenosina difosfato (ADP) (Riond *et al.*, 2015). Em estudo realizado por De Melo (2020) observou-se que os agregados plaquetários foram o erro pré-analítico mais prevalente em amostras de felinos, estando presente em 35% das amostras da rotina laboratorial. Outros estudos demonstram a alta incidência dessa alteração em felinos, atingindo 36% (Moritz & Hoffman, 1997), 62% (Zelmanovic & Hetherington, 1998) e até 71% (Norman *et al.*, 2001) das amostras felinas coletadas com EDTA.



Em humanos o uso de agitação por vórtex em amostras com pseudotrombocitopenia é recomendado por Gulati *et al.* (1997) para minimizar as interferências. Nestes casos os autores recomendam que se informe o valor de plaquetas pós-uso do tratamento em laudo, quando a diferença for maior que 10% em comparação ao valor pré-tratamento. A desagregação plaquetária ocorreu de forma total em 44% das amostras humanas com pseudotrombocitopenia, mas que na maioria a dissociação não é total quando as amostras foram submetidas de 1 a 2 minutos de agitação na velocidade maior do vórtex (entre 8 a 10 na escala de 1 a 10). A técnica foi testada em 42 felinos com agregados plaquetários por Tvedten & Cortal (2001) aumentando o total plaquetário em todas, exceto em uma das amostras, quando submetida a agitação por um minuto no S8223 Vortex Genie mixer (VWR Scientific Products, Chicago, Ill, USA) a 3000 rotações por minuto. Havia a presença de agregados plaquetários na maioria das amostras, resultando em uma desagregação total em apenas 12% dos pacientes testados.

Embora haja a indicação de notificar sempre que a diferença for maior que 10% na Medicina, Tvedten & Cortal (2001) relatam que uma diferença importante em felinos seria maior igual a 100%, ou nos aumentos de mais de 100.000 plaquetas/microlitro, nesses casos indicando que há pseudotrombocitopenia e não uma trombocitopenia verdadeira. Ademais, segundo os autores pode-se suspeitar fortemente de uma trombocitopenia verdadeira em felinos quando a diferença com o tratamento for menor ou igual que 50.000 plaquetas/microlitro. Até o presente momento, não se encontra na literatura avaliação da técnica para caninos.

Objetivou-se nesse estudo avaliar o uso de agitador vórtex como alternativa para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia em caninos e felinos com um grupo amostral maior, verificando as diferenças de dissociação entre caninos e felinos e submetidas a uma agitação de maior intensidade por mais tempo. Ademais, avaliou-se a incidência de agregados plaquetários e variações de plaquetometria nessas espécies em um laboratório veterinário na região de Videira, Santa Catarina.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Local do experimento**

Executou-se o projeto no Laboratório Amigovida – Análises Veterinárias (Videira, Santa Catarina) com amostras coletadas pelas clínicas veterinárias conveniadas, oriundas de cidades do meio oeste catarinense (Caçador, Lebon Régis, Rio das Antas, Arroio Trinta, Salto Veloso, Treze Tílias, Fraiburgo, Campos Novos, Tangará) no período de janeiro a julho de 2022.

### **3.2.2 Incidência de variações da plaquetometria e de agregados plaquetários**

Realizou-se a avaliação de 100 amostras de caninos e de 100 amostras de felinos coletadas em tubo de EDTA de potássio que não apresentassem presença de coágulos no tubo, estivessem em tubos dentro da data de validade e fossem coletados de acordo a quantidade correta indicada no tubo durante o mês de maio de 2022 até obter 100 amostras de cada espécie visando estabelecer a incidência das variações de plaquetometria e de agregados plaquetários observados em esfregaço sanguíneo. Foram consideradas quatro variações: pseudotrombocitopenia (diminuição dos valores de referência de plaquetas totais na contagem por impedância elétrica adjacente a presença de agregados plaquetários e satelitismo plaquetário em esfregaço sanguíneo); Trombocitopenia (diminuição dos valores de plaquetas totais perante os valores de referência sem apresentar agregados plaquetários), trombocitose (valores plaquetários aumentados perante os valores de referência) e normoplaquetometria (valores plaquetários do paciente de acordo com os valores de referência). Consideraram-se os valores mínimos de referência estabelecidos no laboratório de acordo com 175.000 plaquetas/microlitro para caninos e 200.000 plaquetas/microlitro para felinos e os valores máximos de referência estabelecidos no laboratório de 500.000 plaquetas/microlitro em caninos e 800.000 plaquetas/microlitro em felinos. Não se incluiu como pseudotrombocitopenia amostras com valores plaquetários diminuídos perante os valores de referência e com presença de macroplaquetas, pois

se considerou como erro analítico e visando não ocorrer, todas as amostras tiveram concordância com desvio de 20% entre a estimativa em lâmina e contagem automatizada por impedância elétrica.

### 3.2.3 Critérios de seleção de amostras para o tratamento

Selecionaram-se as amostras de tubos contendo anticoagulante etilenedinitrilotetraacetato de potássio (EDTA) que fossem aprovadas nos critérios de qualidade de amostra: sem apresentar coágulos, nem fibrina durante análise visual do tubo, que apresentavam diminuição na contagem plaquetária, quando os tubos encontram-se dentro da validade estipulada para o lote em questão e que respeitassem a quantidade máxima e mínima indicada pelo fabricante. Após a provação dos critérios de qualidade foram incluídos no grupo amostral para avaliação da eficácia do tratamento, animais que apresentassem valores plaquetários inferiores aos valores de referência estipulados pelo laboratório, respectivamente inferior a 200.000 plaquetas/microlitro e 175.000 plaquetas/microlitro para felinos e caninos, respectivamente, na contagem por impedância elétrica, adjacente a presença de agregados plaquetários na lâmina de esfregaço sanguíneo. Utilizou-se amostra de animais hígidos e doentes, sem diferenciação por sexo, idade ou raças.

### 3.2.4 Graduação dos agregados plaquetários das amostras pré-tratamento

A presença de agregados plaquetários foi avaliada em esfregaço sanguíneo corado com May-Grunwald Giemsa de acordo com especificações do fabricante (Laborclin<sup>®</sup>, Brasil) considerando a presença de agrupamentos com três ou mais plaquetas como positivos. A quantificação de agregados plaquetários foi estabelecida de forma subjetiva de acordo com metodologia adaptada de Silva (2017), na qual se considerou leve sendo representada por pequenos agregados de três a dez plaquetas na cauda do esfregaço; moderada representada por alguns agregados pequenos na borda, e, medianos, contendo de dez a vinte agregados, na cauda; e; intensa representada por agregados pequenos e médios na borda, e, grandes, contendo mais que vinte plaquetas, em qualquer local.

### 3.2.5 Contagem plaquetária por impedância elétrica

A contagem por impedância elétrica foi realizada após homogeneização da amostra em homogeneizador automático (Agrot-1213, Spinlab®) por 18 rotações por minuto, por, no mínimo, 10 minutos. Durante o decorrer do projeto o analisador hematológico (SDH-3-VET, Labtest®) era realizado controle de qualidade externo de caninos e felinos (Controllab®) com aplicação do gráfico de Levey – Jennings e regras de Westgard.

### 3.2.6 Contagem plaquetária por estimativa em lâmina

As amostras além da contagem plaquetária por impedância elétrica tiveram contagem realizada por estimativa em esfregaço sanguíneo adaptado de Silva *et al.* (2007). Realizou-se a média de 10 campos de imersão (aumento total de 1.000x) avaliados entre o corpo e a franja na porção em que as hemácias ficavam próximas, mas não sobrepostas, e, multiplicou-se por 15.000 obtendo as plaquetas/microlitro. Regiões que apresentassem agregados plaquetários não eram inclusas na contagem para estimativa em lâmina.

### 3.2.7 Protocolo de tratamento das amostras pelo uso de vórtex

Após a contagem primária plaquetária por impedância elétrica, estimativa em lâmina e classificação da intensidade de agregados plaquetários, as amostras eram submetidas ao tratamento. O tratamento corresponde a agitação em vórtex (Na3600, FORTECIENTÍFICA®) a 3600 rotações por minuto (r.p.m.) por três minutos seguido de homogeneização da amostra por, no mínimo 10 minutos em homogeneizador automático (Agrot-1213, Spinlab®) por 18 rotações por minuto.

Após tratamento realizou-se a confecção de outra lâmina que foi corada da mesma maneira e reavaliação da contagem plaquetária por estimativa em lâmina e por impedância elétrica.

### 3.2.8 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos sofreram análise descritiva e teste de normalidade (Shapiro Wilk) através do programa SAS (Statistical Analysis System Institute, Cary, 2013). Para analisar as relações entre o número de plaquetas por microlitros com as variáveis de tempo, método de contagem plaquetária e espécie, os dados foram submetidos a análise de correlação as análises de correlação de Spearman (PROC CORR). Para as variáveis paramétricas utilizou-se *teste t de student* ao nível de significância de 5% para comparação de médias pré e pós-tratamento e teste de *Odds ratio* (razão de chances) no qui quadrado para comparação da probabilidade de agregados plaquetários em caninos e felinos e da incidência das variações da plaquetometria.

### 3.3 Resultados

A incidência de normoplaquetometria foi a maior dentre as possibilidades de plaquetometria em caninos, representando 64% dos animais avaliados, enquanto 12% apresentaram trombocitose, 14% pseudotrombocitopenia e a menor incidência foi de trombocitopenia verdadeira, presente em 10 amostras. Na avaliação de incidência de agregados plaquetários, indiferente da plaquetometria, amostras de caninos com agregados representam 34% das amostras avaliadas nesse período.

Em contrapartida observa-se que felinos possuíram uma incidência maior de pseudotrombocitopenia quando comparadas a caninos, representando o total de 60% das amostras analisadas. Na análise de *odds ratio* evidenciou-se que felinos possuem seis vezes mais chances de ter agregados plaquetários que caninos, baseado nessa população. Também nota-se que felinos apresentam uma menor incidência de trombocitopenia e de trombocitose, com apenas 4% das amostras em cada classificação. A normoplaquetometria estava presente em 32% das amostras da espécie felina e 76% das amostras felinas possuíam agregados plaquetários, indiferente da plaquetometria.

As médias plaquetárias pré e pós-tratamento em caninos e felinos (Figura 3) tiveram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e amentaram em todos os animais do grupo amostral em comparação do valor de plaquetas antes de submeter ao vórtex com o valor após a agitação. No entanto, observa-se que nem todos os animais após o uso do agitador obtiveram valores que se enquadrassem nos valores de referência e sustentadas pelo fato da permanência dos agregados plaquetários na avaliação de esfregaço sanguíneo após tratamento sugerem que a dissociação de agregados plaquetários não ocorre de forma total.

Os resultados evidenciam uma média com diferença mais expressiva entre o momento de antes e depois do tratamento em caninos, em comparação a felinos, sugerindo que a técnica forneça uma dissociação mais efetiva nessa espécie.

A dissociação também sofre interferência da intensidade de agregados plaquetários previamente ao tratamento, mostrando uma dissociação maior e gradativa conforme maior a intensidade de agregados plaquetários em caninos e felinos (Figuras 4 e 5).

Evidenciou-se que caninos mesmo com leve presença de agregados plaquetários tem uma média de diferença com o tratamento de 103.046 plaquetas/microlitro, enquanto os felinos com presença intensa de agregados tendem a dissociar uma média de 75.000 de plaquetas por microlitro e felinos com presença leve apenas 40.464 plaquetas por microlitro.

Não houve interação entre a variável método (utilização de impedância elétrica ou de estimativa em lâmina para contagem plaquetária) com o tempo (antes ou depois do tratamento com vórtex), indicando que as duas técnicas não têm diferença entre si quanto ao resultado do tratamento ( $p$  valor 0,0537).

Apesar de não ter sido evidenciado interação entre o momento e método estatisticamente, em comparação das médias, observa-se uma média plaquetária elevada tanto pré quanto pós-tratamento quando avaliadas em impedância elétrica em comparação a estimativa em lâmina (Figura 4).

### 3.4 Discussão

A pseudotrombocitopenia é um problema prevalente em felinos e esse estudo corrobora com os achados da literatura obtendo uma alta incidência de pseudotrombocitopenia nessa espécie (DE MELO, 2020), com 60% de incidência superando os caninos, corroborando com a prevalência de 62% descrita por Zelmanovic & Hetherington (1998).

Tvedten & Cortal (2001) ao testar o efeito do vórtex sobre dissociação de agregados plaquetários em felinos não obtiveram dissociação em todas as amostras, em comparação a esse estudo que usou um grupo amostral maior e teve dissociação em todos os felinos. Esse resultado vai contra a afirmação de Gulati *et al.* (1997) de que aumento no tempo de agitação de vórtex acima de dois minutos provavelmente não aumentariam as chances de desagregar plaquetas, devido estudo realizado em humanos, provavelmente estando relacionado a uma diferença interespecie de humanos e felinos. Riond *et al.* (2015) também corroboram com a afirmação que agitações por mais de dois minutos potencializam a dissociação plaquetária em felinos, visto que em 24 horas de homogeneização sem agitação em vórtex obteve-se normoplaquetometria em todos os felinos que apresentavam pseudotrombocitopenia.

Assim como no estudo de Riond *et al.* (2015), avaliando o efeito de homogeneização por 24 horas, e Tvedten & Cortal (2001), avaliando o efeito de agitação em vórtex a 3000 rotações por minuto durante um a dois minutos, a dissociação plaquetária não é total no tratamento proposto no presente trabalho, no qual submete-se a uma agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto por 3 minutos, permanecendo os agregados plaquetários após tratamento.

Apesar dos felinos serem a espécie mais afetada pelos agregados plaquetários, devido sua propensão a agregar, relacionada ao grande tamanho das plaquetas, maior concentração de serotonina, liberação de grânulos quando exposto a serotonina e agregação irreversível em baixas quantidades de adenosina difosfato (ADP) (Riond *et*

*al.*, 2015). Os caninos são a espécie com maior média de diferença pré e pós-tratamento, indicando que eles se favorecem mais do tratamento de amostras com vórtex com maior dissociação.

Em humanos, indica-se relatar em laudo plaquetas pós vórtex quando a diferença for maior que 10% do valor pré-tratamento por Gulati *et al.* (1997), Tvedten & Cortal (2001) relatam que uma diferença importante em felinos seria de quando é maior igual que 100% ou com aumento de mais de 100.000 plaquetas/microlitro. No entanto, a média de diferença de pré e pós-tratamento em felinos atingiu 75.000 plaquetas/microlitro nos pacientes que apresentaram maior intensidade de agregados plaquetários na pré-avaliação, enquanto a intensidade leve de agregados plaquetários teve média de 40.464 plaquetas/microlitro, indicando que relatar apenas quando houver aumento de 100.000 plaquetas/microlitro não caberia no estudo e que variações de 10%, conforme a indicação na medicina humana seria mais apropriado. Considerando que quando o valor de plaquetas após vórtex continuar abaixo do valor de referência não se pode considerar trombocitopenia verdadeira e mais avaliações seriam necessárias para concluir o diagnóstico, visto que a dissociação de plaquetas não ocorre de forma total. No entanto, quando o valor de plaquetas pós vórtex estiver de acordo com o valor de referência descarta-se a trombocitopenia verdadeira.

Caninos, mesmo com a presença leve de agregados plaquetários, tem uma grande dissociação plaquetária e relatar em laudo aumento com mais de 100.000 plaquetas/microlitro parece funcionar, no entanto, utilizar o mesmo padrão de relatar variações a partir de 10%, como em humanos, surgiria mais efeito considerando que pseudotrombocitopenias podem apresentar valores próximos no limite inferior do valor de referência.

Mesmo sem houver diferença estatística entre as médias da associação de vórtex com estimativa em lâmina e com contagem plaquetária por impedância elétrica, com p valor de 0,0537, sugere-se que os resultados, baseados na diferença das médias, são melhores com a associação de agitação de vórtex com avaliação por



impedância elétrica posterior, mas sempre considerando a importância da avaliação em lâmina para descartar erros analíticos, como uma baixa contagem plaquetária devido macroplaquetas.

A média plaquetária inferior da metodologia de estimativa por campo em comparação a contagem por bioimpedância elétrica pode estar aliada ao fator de correção utilizado, que possui variações de recomendações na literatura. Optou-se nesse trabalho por seguir a metodologia de correção de estimativa em lâmina proposta por Silva *et al.* (2007), no qual o fator de correção é de 15.000. Entretanto, existem outros fatores de correção na literatura que variam de acordo com o tamanho do campo do microscópio, tipo de luz usada, hematócrito, hemoglobina do paciente e espécie. Em estudo realizado por Comar, Danchura e Silva (2009) evidenciou-se que a contagem automatizada de plaquetas possui maior precisão, mas está sujeita a erros quando não tem avaliação morfológica adjacente considerando a não identificação de causas de pseudotrombocitopenia e/ou erros na contagem por macroplaquetas, e, que as diferentes metodologias de contagem por estimativa tendem a diminuir o valor total plaquetário devido às plaquetas poderem estar sobrepostas por hemácias ou não serem todas visualizadas.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A pseudotrombocitopenia em pequenos animais possui alta incidência na região do meio oeste catarinense, com maior proporção na espécie felina quando comparada a caninos apresentando seis vezes mais chances de desenvolver agregados plaquetários. A utilização de vórtex como dissociador de agregados plaquetários, na velocidade de 3600 rotações por minuto durante 3 minutos, é recomendada visando diminuir as interferências pré-analíticas nas duas espécies, mas com maior eficácia em caninos.

Sugere-se que seja relatado no hemograma a partir da variação de 10% do valor pré-agitação sempre associado com avaliação morfológica plaquetária em lâmina visando descartar falsas trombocitopenias devido erro analítico por contagem de macroplaquetas como hemácias. Orienta-se que quando as plaquetas pós vórtex apresentem valores dentro da referência de plaquetometria que se descarte a possibilidade de trombocitopenia verdadeira e que quando não atinjam esses valores, uma recoleta seja considerada.

## 5 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.

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.

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.

COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 431-436, 2009.

DE MELO, P. H. M. *et al.* A prevalência de erros pré-analíticos em exames hematológicos de felinos. **Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa**, 2020.

ENGELMANN, A. M. *et al.* Associação da ampicacina com EDTA na pseudotrombocitopenia em felinos. 2019.

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.

GAUDÊNCIO, F. N. *et al.* Estimativa da plaquetometria através da capa leucocitária. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 112 (603-604) 21-27. Rio de Janeiro, 2017.

GULATI, G. L.; ASSELTA, A.; CHEN, C. Using a vortex to disaggregate platelet clumps. **Laboratory Medicine**, v. 28, n. 10, p. 665-667, 1997.

HARTWIG, J.; ITALIANO JR, J. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1580-1586, 2003.

HAYAKAWA, S. *et al.* A novel form of macrothrombocytopenia in Akita dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103-105, 2016.

KELLEY, J. *et al.* Platelet count and plateletcrit in Cavalier King Charles Spaniels and Greyhounds using the Advia 120 and 2120. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 43-49, 2014.

KUTER, D. J. General aspects of thrombocytopenia, platelet transfusions, and thrombopoietic growth factors. **Consultative hemostasis and thrombosis**. 2019.p. 108-126

MANCUSO, M.E.; SANTAGOSTINO, E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. **British Journal of Haematology**, v.178, p. 209–219, 2017.

MEYER, D.J; COLES, E. H; RICH, L. J. Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 38-46, 1995.

MORITZ, A; HOFFMANN, C. [Contagem de plaquetas no gato]. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere*. 1997;25(6):695–700.

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.

NORMAN, E. J.; BARRON; R. C. J.; NASH, A. S.; CLAMPITT, R. B. Prevalência de baixa contagem de plaquetas automatizadas em gatos: Comparação com prevalência de trombocitopenia com base na estimativa de manchas de sangue. **Veterinary Clin Pathol**. 2001;30(3):137–40.

PEERSCHKE, E. B. The laboratory evaluation of platelet dysfunction. **Clinics in laboratory medicine**, v. 22, n. 2, p. 405-420, 2002.

RIOND, B. *et al.* Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. **BMC veterinary research**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2015.

RODRIGUES, B. R. *et al.* Análise do volume plaquetário médio (VPM) em pacientes com doença arterial coronariana. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 15, n. 1, p. 192 - 197, 2013.

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.

SAKURAI, S. *et al.* Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseud thrombocytopenia. **British journal of haematology**, v. 99, n. 4, p. 817-823, 1997.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. *Patologia veterinária* .2. Ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2017. 856p.

SAS, Institute. Inc. SAS/ GRAPH Software: Reference. Version 9.4., Vol. 2. Cary, NC, USA: Statistical Analysis System Institute Inc, 2013.

SCHNEIDER, A. Principles of a blood collection and processing. In: Feldman, B. F.; Zink, J. G.; Jain, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. EUA. 2000. p. 586-595.

SILVA, D. C. B. C. 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. 2017.

SILVA, L. F. N. Plaquetas reticuladas na avaliação da trombopoiese medular em cães. 2009.

SILVA, S. B.; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1045-1051, 2007a.

STOCKHAM, S L; SCOTT, M A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ed Iowa State Press, 2002, p. 601.

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.

TVEDTEN, H., & KORCAL, D. Vortex Mixing of Feline Blood to Disaggregate Platelet Clumps. **Veterinary Clinical Pathology**, 30(3), 104–106. doi:10.1111/j.1939-165x.2001.tb00416.x. 2001.

VELEDA, P. A. *et al.* Avaliação de parâmetros hematológicos e comportamentais de diferentes técnicas de coleta de sangue venoso de felinos. 2018.

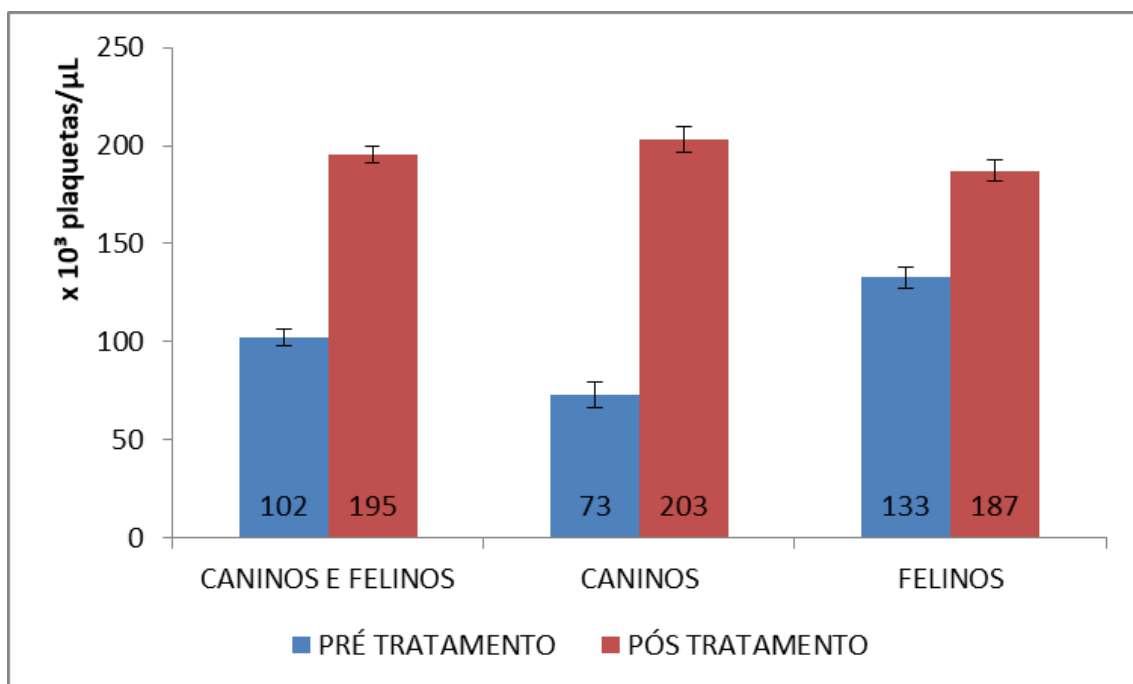
WEISER, M. G.; KOCIBA, G. J. Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. **Am J Vet Res**. 1984;45(3):518–22.

ZELMANOVIC, D.; HETHERINGTON, E. J. Análise automatizada de plaquetas felinas em sangue inteiro, incluindo contagem de plaquetas, volume médio de plaquetas e estado de ativação. **Veterinary Clin Pathol.** 1998;27(1):2-9.

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

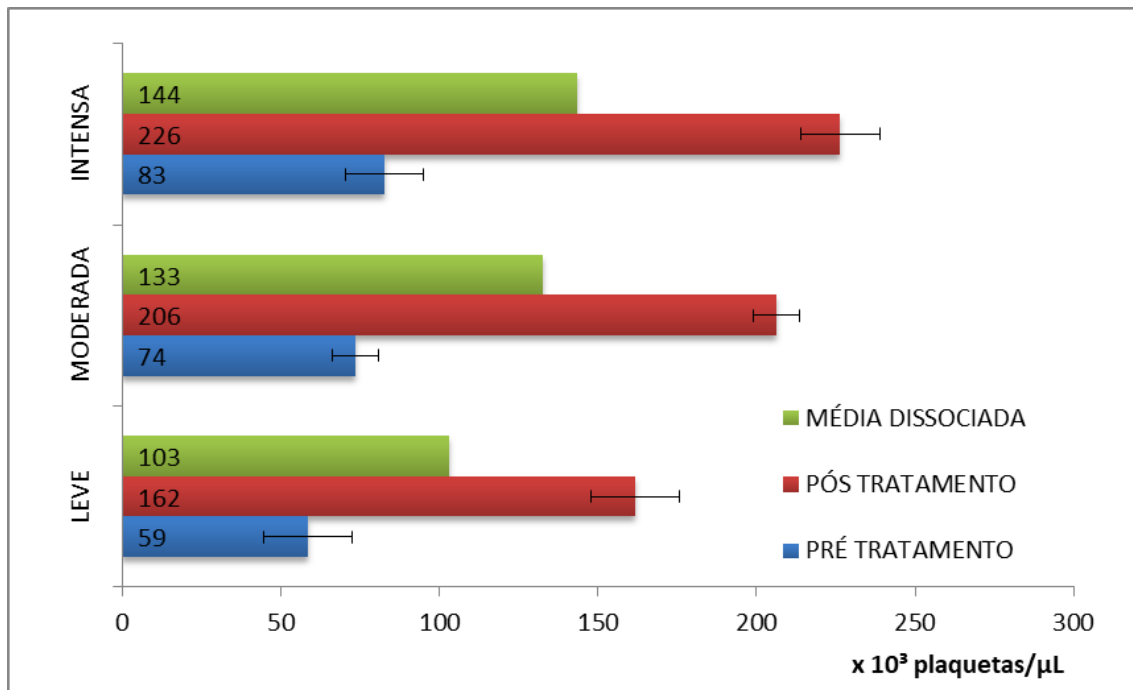
## 6 ANEXOS

**Figura 3** - Médias±DP da contagem plaquetária por microlitro em caninos e felinos pré tratamento e pós tratamento com uso de agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto durante três minutos através da contagem por impedância elétrica e estimativa em lâmina.

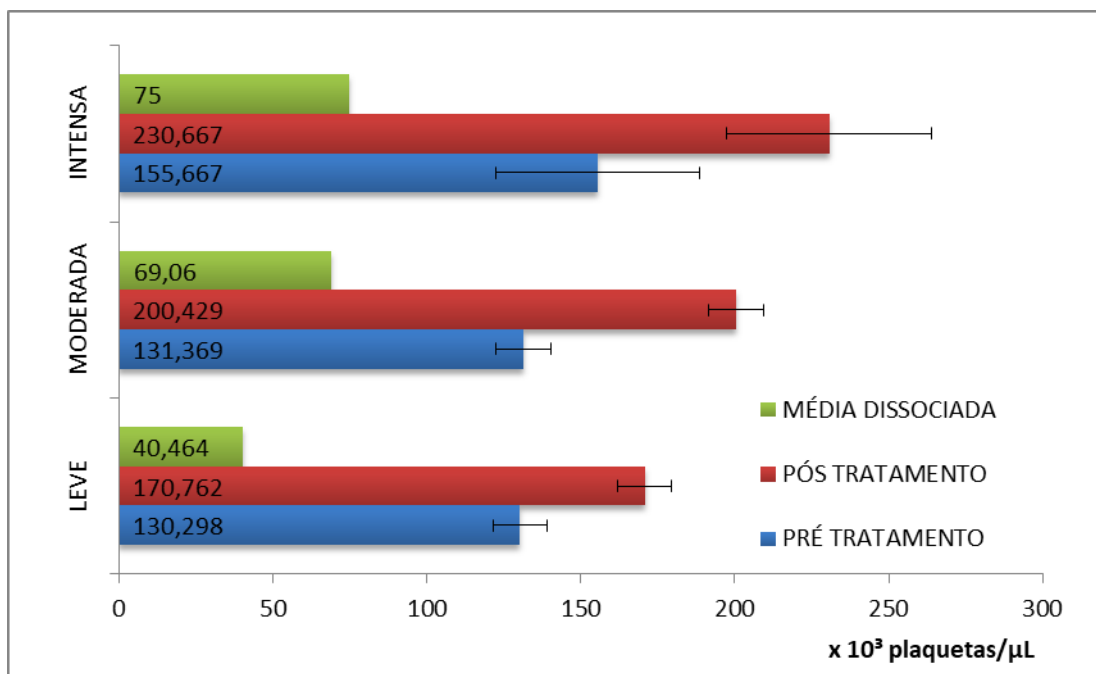




**Figura 4** - Médias $\pm$ DP de plaquetas por microlitro em caninos pré-tratamento, pós-tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras – média plaquetária dissociada - categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários.



**Figura 5** - Médias $\pm$ DP de plaquetas por microlitro em felinos pré tratamento, pós tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários.



**Figura 6** - Média de plaquetas por microlitro em caninos e felinos pré tratamento e pós tratamento separadas por metodologia de contagem plaquetária: impedância elétrica e estimativa em lâmina.

